

E. 結論

RNA 解析パイプラインの整備を行った。今後十分な症例数を用いた解析を行い、筋萎縮性側索硬化症を中心に、神経筋変性疾患の RNA 異常を見出し、病態解明につなげることを目指す。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当せず。

2. 実用新案登録

該当せず。

3. その他

該当せず。

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)

委託業務成果報告(業務項目)

診断を目的とした網羅的遺伝子解析システムの構築と遺伝子診断の提供

担当責任者 後藤 順

東京大学医学部附属病院神経内科准教授

研究要旨

標準的で高精度の遺伝子診断システムを臨床に提供することを目標にして、以下の業務を行った。1. 作業の標準化と各工程における質の確認、業務代替が可能になるよう人員の確保、2. 変異の絞り込みのためのパイプライン整備、3. 変異データの質の検証。その上で、一般研究班、学会との連携を呼びかけ、遺伝子診断を主な目的とするエクソーム解析サービスを提供した。

A. 研究目的

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)による分類では、遺伝性神経疾患として登録されている疾患は2,802にのぼり、神経内科診療の中で遺伝子診断を必要とする機会も多い。しかし、遺伝性痙性対麻痺や遺伝性ニューロパチーなど、原因遺伝子が数十個に及ぶこともあり、これまで遺伝子解析には、多くのマンパワー、費用、時間が必要であった。本研究では、次世代シーケンサーを駆使したゲノム配列解析拠点の整備を通じて、標準的で高精度の遺伝子診断システムを提供することを目的としている。

B. 研究方法

1. 一連の作業工程を見直し、作業の標準化と各工程における質の確認を行った。また、業務代替が可能になるよう人員を確

2. 保した。

3. 遺伝子診断の際に病原性変異の候補を検出し、絞り込むための情報解析パイプラインを整備した。
4. シーケンス・エラーについて検討するため、435例のエクソームデータの特定の遺伝子群における変異の中から、dbSNPに登録されていない変異のみを抽出し、全変異についてその有無をサンガーシーケンスで確認した。
5. 一般研究班、学会との連携を呼びかけ、遺伝子診断を主な目的とするエクソーム解析サービスを提供した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて研究を行った。

C. 研究結果

1. ①. サンプルチューブに ID 番号を付す際には 2 人の担当者が立会い、独立にチェックすることを原則とした。②. ライブラリー・プレップ作業の大部分をロボティクス化し、工程中、全サンプルのライブラリーの質を確認するよう定めた。③. ライブラリー・プレップ作業、シーケンサー解析作業の全工程を文書化した。また、習熟したテクニシヤンの人数を増やし、業務代替が可能になるよう人員を確保した。④. データ解析において、PCR duplication 率、変異の個数、ゲノムの各領域における coverage の変動の程度などいくつかのパラメータに基づき、データの質を確認するよう定めた。⑤. エクソームの解析結果から、診断の報告をする際は、別の解析手法による確認（サンガーシーケンス、アレイ CGH 法など）を原則とするよう定めた。
2. ①. 病原性変異の候補を絞り込むためには、遺伝形式の仮定が前提になる。de novo 変異を仮定した場合は、両親や非罹患同胞には存在せず、罹患者だけが有するヘテロ接合性変異を抽出するアルゴリズムを開発し、診断に応用した。②. 絞り込みにおいては変異の頻度情報が最も重要な条件になる。そのため、インハウスにおける対照健常者 600 例の頻度情報、および Exome Aggregation Consortium (ExAC) の頻度情報を参照し、絞り込みに活用できるようなパイプラインを整備した。これによって、きわめて稀な常染色体劣性遺伝性疾患を仮定する場合、患者一人だけのデータでも、候補遺伝子を数個以内に絞り込むことが可能となった。
3. ③. 既知の病原性変異、既知の遺伝子・表現型関連について、Human Gene Mutation Database (HGMD)、OMIM に基づくデータを参照可能なパイプラインを整備した。④. 従来の変異検出パイプラインでは、塩基置換変異、数塩基の欠失・重複変異までしか検出できなかった。新たに Conifer を用いてエクソームのデータを解析して、大きな欠失・重複変異を検出するためのパイプラインを整備した。このパイプラインによって、初めて診断がついた例もあった。
4. 検証の対象とした 466 個の dbSNP に登録のない変異をサンガーシーケンスで確認したところ 74.9% が真陽性であり、25.1% は偽陽性であった。変異検出パイプラインとして用いている samtools による Variant quality score による層別化では、score 50 以上で陽性的中率が 97.3%、score 20-50 で 52.8%、score 20 未満で 9.9% であった。
5. ①. 遺伝性ニューロパチー、HTLV-I 関連脊髄症などの難治性疾患研究班を担当する鹿児島大学神経内科と連携して、これまでに計 693 例の検体のエクソーム解析を実施した。②. 遺伝性痙性対麻痺の全国多施設共同研究体制である Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC) と連携して、これまでに計 291 例の検体のエクソーム解析を実施した。③. 運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班、神経変性疾患に関する調査研究班などと連携して、エクソーム解析の提供を開始した。

D. 考察

質の高い遺伝子診断システムを提供するために、サンプルの受け取りからウェットの工程、情報解析工程に対して、作業の標準化と各工程における質の確認をルチーン化した。

さらに、対象疾患の仮定に基づくパラメータ（遺伝形式、疾患頻度、変異頻度、連鎖解析を含む血縁者の情報、候補となる遺伝子リスト）から、絞り込みを行うところまではパイプラインを整備し、自動化した。

また、ライブラリー・プレップ作業、シーケンサー解析作業の全工程を文書化し、習熟したテクニシャンの人数を増やし、業務代替が可能になるよう人員を確保することで、業務の継続性を担保した。

E. 結論

標準的で高精度の遺伝子診断システムを臨床に提供することを目標にして、遺伝子診断サービスの品質管理基準を整備した。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Saigoh K, Mitsui J, Hirano M, Shioyama M, Samukawa M, Ichikawa Y, Goto J, Tsuji S, Kusunoki S. The first Japanese familial case of spinocerebellar ataxia 23 with a novel mutation in the PDYN gene. Parkinsonism Relat Disord. 2015; 21: 332-4

2. 学会発表

該当せず。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定

を含む)

1. 特許取得

該当せず。

2. 実用新案登録

該当せず。

3. その他

該当せず。

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「神経疾患の集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究」

機関名 東京大学医学部附属病院神経内科

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
次世代シーケンサーを用いたミトコンドリア遺伝子変異の高感度定量的解析, 口頭	田中 真生	第55回日本神経学会	2014年5月22日	国内
思春期/成人大脳型副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植の臨床的効果の検討, 口頭	松川 敬志, 山本 知孝, 篠原 明仁, 市川 幹, 高橋 祐二, 石浦 浩之, 三井 純, 田中 真生, 後藤 順, 黒川 峰夫, 辻 省次	第55回日本神経学会	2014年5月23日	国内
多系統萎縮症の疾患関連遺伝子の探索, 口頭	三井 純	第55回日本神経学会	2014年5月23日	国内
常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺104例の遺伝子解析, 口頭	石浦 浩之	第55回日本神経学会	2014年5月23日	国内
Completing CpG methylation statuses in human and vertebrate genomes by integrating SMRT sequencing kinetic data. (Poster)	S. Morishita, Y. Suzuki, J. Korlach, S. Turner, W. Qu, T. Tsukahara, H. Yurino, J. Yoshimura, Y. Takahashi, J. Mitsui, S. Tsuji, H. Takeda	The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics	2014年10月19日	国外
Update and expansion of Human Variation Database in Japanese Database Integration Program. (Poster)	A. Koike, H. Sawai, I. Inoue, S. Tsuji, K. Tokunaga	The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics	2014年10月19日	国外
Exome Association Study and 2nd SNP-GWAS of Japanese Parkinson's disease. (Poster)	W. Satake, D. Shigemizu, Y. Suzuki, K. Yamamoto, H. Tomiyama, M. Yamamoto, M. Murata, N. Hattori, T. Tsunoda, M. Kubo, S. Tsuji, Y. Nakamura, S. Sugano, T. Toda	The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics	2014年10月20日	国外
Exome analysis of 116 patients supposed to be autosomal recessive hereditary spastic paraplegia established molecular diagnoses of 49 patients with broad genetic heterogeneities. (Poster)	H. Ishiura, K. Koh, H. Shimazaki, J. Mitsui, Y. Takahashi, J. Goto, K. Yoshimura, K. Doi, S. Morishita, H. Sasaki, Y. Takiyama, S. Tsuji, JASPAC (Japan Spastic Paraplegia Research Consortium)	The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics	2014年10月21日	国外
エクソーム解析を用いた HAM 疾患感受性遺伝子の探索, ポスター	野妻 智嗣, 松浦 英治, 久保田 龍二, 児玉 大介, 松崎 敏男, 渡邊 修, 三井 純, 石浦 浩之, 吉村 淳, 土井 晃一郎, 山野 嘉久, 森下 真一, 辻 省次, 出雲 周二, 高嶋 博	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月20日	国内
Charcot-Marie-Tooth 病におけるミエリン関連蛋白を中心とした新規遺伝子探索の試み, ポスター	田邊 肇, 吉村 明子, 石原 聡, 野妻 智嗣, 樋口 雄二郎, 袁 軍輝, 橋口 昭大, 岡本 裕嗣, 吉村 淳, 土井 晃一郎, 森下 真一, 石浦 浩之, 三井 純, 辻 省次, 高嶋 博	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月20日	国内
ニューロフィラメントに関連した Charcot-Marie-Tooth 病の新規原因遺伝子同定の試み, ポスター	石原 聡, 田邊 肇, 吉村 明子, 樋口 雄二郎, 袁 軍輝, 橋口 昭大, 岡本 裕嗣, 吉村 淳, 土井 晃一郎, 森下 真一, 石浦 浩之, 三井 純, 辻 省次, 高嶋 博	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月20日	国内
Exome 解析を用いた家族性 ALS の分子疫学の解明, ポスター	成瀬 紘也, 石浦 浩之, 三井 純, 高橋 祐二, 吉村 淳, 土井 晃一郎, 森下 真一, 後藤 順, 辻 省次	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月20日	国内
家族性腫瘍疾患 VHL 病に対するゲノム医療の展開, ポスター	高柳 俊作, 武笠 晃丈, 中富 浩文, 後藤 順, 辻 省次, 齊藤 延人	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月21日	国内

46,XY gonadal dysgenesis を伴う minifascicular neuropathy における新規遺伝子変異の同定, 口頭	佐藤 奈穂子, 石浦 浩之, 三井 純, 成瀬 紘也, 前川 理沙, 楯 玄秀, 清水 潤, 後藤 順, 椎尾 康, 辻 省次	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月20日	国内
Boucher-Neuhauser 症候群の新規 PNPLA6 遺伝子変異, 口頭	高 紀信, 小林 史和, 三輪 道然, 新藤 和雅, 磯崎 英治, 石浦 浩之, 辻 省次, 瀧山 嘉久	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月20日	国内
常染色体劣性遺伝形式を示す spastic ataxia の病因遺伝子の探索, 口頭	大崎 雅央, 高橋 祐二, 石浦 浩之, 三井 純, 松川 敬志, 吉村 淳, 土井 晃一郎, 森下 真一, 後藤 順, 辻 省次	第59回日本人類遺伝学会	2014年11月20日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation.	Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, Nakano I, Yazaki M, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda S, Ishiura H, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Takiyama Y.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	2014	国外
Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes.	Tezenas du Montcel S, Durr A, Bauer P, Figueroa KP, Ichikawa Y, Brussino A, Forlani S, Rakowicz M, Schöls L, Mariotti C, van de Warrenburg BP, Orsi L, Giunti P, Filla A, Szymanski S, Klockgether T, Berciano J, Pandolfo M, Boesch S, Melegh B, Timmann D, Mandich P, Camuzat A; Clinical Research Consortium for Spinocerebellar Ataxia (CRC-SCA); EUROSCA network, Goto J, Ashizawa T, Cazeneuve C, Tsuji S, Pulst SM, Brusco A, Riess O, Brice A, Stevanin G.	Brain	2014	国外
Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous DDHD2 mutation.	Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, Yoshida K.	Sci Rep.	2014 Nov	国外
Adult-onset vanishing white matter disease with novel missense mutations in a subunit of translational regulator, EIF2B4.	Kanbayashi T, Saito F, Matsukawa T, Oba H, Hokkoku K, Hatanaka Y, Tsuji S, Sonoo M.	Clin Genet.	2015	国外
Novel mutations in the PNPLA6 gene in Boucher-Neuhäuser syndrome.	Koh K, Kobayashi F, Miwa M, Shindo K, Isozaki E, Ishiura H, Tsuji S, Takiyama Y.	J Hum Genet.	2015	国外
The first Japanese familial case of spinocerebellar ataxia 23 with a novel mutation in the PDYN gene.	Saigoh K, Mitsui J, Hirano M, Shioyama M, Samukawa M, Ichikawa Y, Goto J, Tsuji S, Kusunoki S.	Parkinsonism Relat Disord.	2015	国外
Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation.	Yamashita S, Mori A, Nishida Y, Kurisaki R, Tawara N, Nishikami T, Misumi Y, Ueyama H, Imamura S, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higuchi I, Morishita S, Yoshimura J, Uchino M, Takashima H, Tsuji S, Ando Y.	Neuropathol Appl Neurobiol.	2015	国外

<p>Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy</p>	<p>Jun Mitsui, Takashi Matsukawa, Hidenao Sasaki, Ichiro Yabe, Masaaki Matsushima, Alexandra Dürr, Alexis Brice, Hiroshi Takashima, Akio Kikuchi, Masashi Aoki, Hiroyuki Ishiura, Tsutomu Yasuda, Hidetoshi Date, Budrul Ahsan, Atsushi Iwata, Jun Goto, Yaeko Ichikawa, Yasuo Nakahara, Yoshio Momose, Yuji Takahashi, Kenju Hara, Akiyoshi Kakita, Mitsunori Yamada, Hitoshi Takahashi, Osamu Onodera, Masatoyo Nishizawa, Hirohisa Watanabe, Mizuki Ito, Gen Sobue, Kinya Ishikawa, Hidehiro Mizusawa, Kazuaki Kanai, Takamichi Hattori, Satoshi Kuwabara, Kimihito Arai, Shigeru Koyano, Yoshiyuki Kuroiwa, Kazuko Hasegawa, Tatsuhiko Yuasa, Kenichi Yasui, Kenji Nakashima, Hijiri Ito, Yuishin Izumi, Ryuji Kaji, Takeo Kato, Susumu Kusunoki, Yasushi Osaki, Masahiro Horiuchi, Tomoyoshi Kondo, Shigeo Murayama, Nobutaka Hattori, Mitsutoshi Yamamoto, Miho Murata, Wataru Satake, Tatsushi Toda, Alessandro Filla, Thomas Klockgether, Ullrich Wüllner, Garth Nicholson, Sid Gilman, Caroline M. Tanner, Walter A. Kukull, Mathew B. Stern, Virginia M.-Y. Lee, John Q. Trojanowski, Eliezer Masliah, Phillip A. Low, Paola Sandroni, Laurie J. Ozelius, Tatiana Foroud and Shoji Tsuji</p>	<p>Ann Clin Transl Neurol.</p>	<p>2015</p>	<p>国外</p>
<p>Rapid detection of expanded short tandem repeats in personal genomics using hybrid sequencing</p>	<p>Rapid detection of expanded short tandem repeats in personal genomics using hybrid sequencing</p>	<p>Bioinformatics</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>A simple but powerful heuristic method for accelerating k-means clustering of large-scale data in life science</p>	<p>Kazuki Ichikawa, Shinichi Morishita</p>	<p>IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>Exome sequencing shows a novel de novo mutation in AT11</p>	<p>Kishin Koh, Hiroyuki Ishiura, Michiaki Miwa, Jun Yoshimura, Jun Mitsui, Jun Goto, Shinichi Morishita, Shoji Tsuji, Yoshihisa Takiyama</p>	<p>Neurology and Clinical Neuroscience</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

RESEARCH PAPER

Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel *lysosomal trafficking regulator* gene mutation

Haruo Shimazaki,¹ Junko Honda,¹ Tametou Naoi,¹ Michito Namekawa,¹ Imaharu Nakano,² Masahide Yazaki,³ Katsuya Nakamura,³ Kunihiro Yoshida,³ Shu-ichi Ikeda,³ Hiroyuki Ishiura,⁴ Yoko Fukuda,⁴ Yuji Takahashi,⁴ Jun Goto,⁴ Shoji Tsuji,⁴ Yoshihisa Takiyama⁵

¹Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Jichi Medical University School of Medicine, Tochigi, Japan

²Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Neurological Hospital, Tokyo, Japan

³Department of Medicine (Neurology and Rheumatology), Shinshu University School of Medicine, Nagano, Japan

⁴Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

⁵Department of Neurology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan

Correspondence to

Dr Haruo Shimazaki, Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Jichi Medical University School of Medicine, Yakushiji 3311-1, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan; hshimaza@jichi.ac.jp

Received 9 October 2013

Revised 8 January 2014

Accepted 9 January 2014

Published Online First

12 February 2014



CrossMark

To cite: Shimazaki H, Honda J, Naoi T, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;**85**:1024–1028.

ABSTRACT

Background Autosomal-recessive hereditary spastic paraplegias (AR-HSP) consist of a genetically diverse group of neurodegenerative diseases characterised by pyramidal tracts dysfunction. The causative genes for many types of AR-HSP remain elusive. We tried to identify the gene mutation for AR-HSP with cerebellar ataxia and neuropathy.

Methods This study included two patients in a Japanese family with their parents who are first cousins. Neurological examination and gene analysis were conducted in the two patients and two normal family members. We undertook genome-wide linkage analysis employing single nucleotide polymorphism arrays using the two patients' DNAs and exome sequencing using one patient's sample.

Results We detected a homozygous missense mutation (c.4189T>G, p.F1397V) in the *lysosomal trafficking regulator* (*LYST*) gene, which is described as the causative gene for Chédiak–Higashi syndrome (CHS). CHS is a rare autosomal-recessive syndrome characterised by hypopigmentation, severe immune deficiency, a bleeding tendency and progressive neurological dysfunction. This mutation was co-segregated with the disease in the family and was located at well-conserved amino acid. This *LYST* mutation was not found in 200 Japanese control DNAs. Microscopic observation of peripheral blood in the two patients disclosed large peroxidase-positive granules in both patients' granulocytes, although they had no symptoms of immune deficiency or bleeding tendency.

Conclusions We diagnosed these patients as having adult CHS presenting spastic paraplegia with cerebellar ataxia and neuropathy. The clinical spectrum of CHS is broader than previously recognised. Adult CHS must be considered in the differential diagnosis of AR-HSP.

INTRODUCTION

Hereditary spastic paraplegias (HSP) comprise a genetically diverse group of inherited neurological disorders mainly exhibiting increased tone of the lower limb muscles with various associated symptoms. HSP are classified into two subtypes, that is, pure and complicated forms. The pure HSP presents with symptoms of progressive bilateral leg spasticity and weakness, exaggerated tendon reflexes and positive pathological reflexes.

Meanwhile, the complicated HSP has additional neurological symptoms, as follows: mental impairment, extrapyramidal signs, cerebellar ataxia, peripheral neuropathy, muscle atrophy and optic atrophy, as well as symptoms other than neurological ones.¹

HSP can be inherited in an autosomal-dominant (AD), autosomal-recessive (AR) or X-linked recessive (XR) pattern. Fifty-seven spastic paraplegia gene (SPG) loci have been assigned and about 40 causative genes have been identified to date. The pure HSP is mainly transmitted as an AD trait, whereas the complicated HSP exhibits AR or XR transmission. SPG4, the most common pure AD-HSP, is accounting for about 50% of such cases.² The most frequent AR-HSP is SPG11, which shows a complex phenotype, including cognitive impairment, a thin corpus callosum and peripheral neuropathy.³ However, the majority of causative genes for AR-HSPs remain to be identified.

A number of pathogenic mechanisms underlying HSPs have been suggested by studies on several implicated genes for HSP. HSP is thought to be involved in intracellular trafficking, resulting from disruption of the axonal transport of molecules, organelles and other cargos, which predominantly affects the distal parts of motor neurons.⁴

Here, we present an AR-HSP family with cerebellar ataxia and neuropathy with a novel homozygous missense mutation in the *lysosomal trafficking regulator* (*LYST*) gene. *LYST* is known as the causative gene for Chédiak–Higashi syndrome (CHS, OMIM #214500),⁵ which is a rare AR syndrome characterised by hypopigmentation, severe immune deficiency, a bleeding tendency and progressive neurological dysfunction.

METHODS

Patients

This study included two patients from a family with spastic paraplegia, cerebellar ataxia and peripheral neuropathy. The family tree is shown in figure 1C. The parents were first cousins. Two affected (II-1 and II-2) and two unaffected members (II-3, III-1) of the family underwent neurological examinations and blood analyses. All of the genomic DNA samples were obtained with written informed consent.

Linkage analysis

We extracted genomic DNAs from blood samples in the two affected individuals (II-1 and II-2) (figure 1C). Then, we conducted multipoint parametric linkage analysis using a pipeline software, SNP high-throughput linkage analysis system (SNP HiTLink).⁶ We can directly import SNP chip data for the Mapping 100k/500k array set and Genome-Wide Human SNP array V.6.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) and pass to a multipoint parametric linkage analysis program, Allegro, with this system.⁷ We calculated Parametric logarithm of the odds (LOD) scores using Allegro V.2 with the parameter setting of an AR model with 100% penetrance.

Exome sequencing

We extracted Genomic DNA from leucocytes from one patient (II-1) and then sheared. We purified the sample using Agencourt AMPure XP beads. We prepared an adaptor-ligated library and clustered on the cBOT system (Illumina, San Diego, California, USA). We performed exon capture with a SureSelect Human All Exon 50 Mb Kit (Agilent). We carried out paired-end sequencing on an Illumina HiSeq 2000, which generated 101 bp reads. We aligned the sequences with the human genome reference sequence (hg19 build, <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/chromosomes/>) using a Burrows-Wheeler Aligner for sequence alignment, variant calling and annotation. We carried out substitution calling with a Genome Analysis Toolkit (GATK, http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit). SNP calls were made with a GATK Unified Genotyper, and indel calls were made with a GATK IndelGenotyper V2. We performed SNP calling with reference to dbSNP135 (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/snp/orgasms/human_9606/ASN1_flat/) and 1000 Genomes (<ftp://1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp/release/20110521>). All variants were annotated with reference to consensus coding sequences (CCDS) (NCBI release 20111122) and RefSeq (UCSC dumped 20111122).

Validation of mutations by Sanger sequencing

We amplified exon 12 of *LYST* and flanking intronic sequences using the genomic DNA of the two patients using a MJ Research PTC-100 Thermal Cycler (Marshall Scientific, Brentwood, New Hampshire, USA). The primer sequences were as follows: *LYST* ex12-F: agg aat gct gat atg tgt ggg; *LYST* ex12-R: cac att ttt acg gct caa gga. We performed Sanger sequencing according to an established standard protocol on an Applied Biosystems (ABI) 3730 capillary sequencer (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). We also analysed genomic DNA samples from 200 Japanese subjects without apparent neurological disorders as controls.

The institutional review boards of the Jichi Medical University, the Shinshu University, the University of Tokyo and the University of Yamanashi approved this study.

RESULTS

Clinical features

The proband (II-2) was a 53-year-old man who was admitted to our hospital because of gait disturbance and slowly progressive weakness of the lower extremities. He was experiencing difficulties in walking up stairs and standing upright at age 48 years. Later he walked with a cane due to unsteadiness. His Mini-Mental State Examination (MMSE) score was 25/30. On neurological examination, he showed bilateral leg spasticity, and bilateral iliopsoas muscle weakness and atrophy. Tendon reflexes

were exaggerated in all extremities except for diminished ankle jerks. He showed extensor bilateral plantar responses. We could observe subtle ataxia in the upper extremities. Brain MRI showed mild cerebellar atrophy, and spinal MRI revealed mild thoracic cord atrophy (figure 2A). Mild decreases of motor and sensory nerve conduction velocities in the lower extremities were revealed by a nerve conduction study, but SNAPs were not evoked in the sural nerves. Motor-evoked potential examination disclosed marked delay of the central motor conduction times in the corticospinal tracts. His eyes exhibited no areas of hyperpigmentation or hypopigmentation on ophthalmological examination. Pigmentary abnormalities of the skin were not observed. Peroxidase staining of peripheral blood revealed giant granules in granulocytes (figure 2B) and mild reduction of natural killer cell activity.

The second case, an older brother of the proband (II-1), showed almost the same clinical presentations except for the leg tonus. He suffered from gait difficulty at age 58 years and became unable to walk for a long time at age 62 years. A year later he walked with a cane and was admitted to our hospital for slowly progressive gait disturbance. His MMSE score was 16/30. Neurological examination at age 63 years showed bilateral iliopsoas muscle weakness and atrophy, but leg spasticity was not noted. Tendon reflexes were diminished in all extremities with extensor plantar responses bilaterally. Mild ataxia in the upper extremities was observed. Brain MRI showed mild cerebellar atrophy, whereas spinal MRI revealed no spinal cord atrophy. A nerve conduction study showed normal motor and sensory nerve conduction velocities in the upper and lower extremities, whereas the amplitudes of compound muscle action potentials and sensory nerve action potentials were decreased in all extremities, and F-wave conduction velocities were decreased in the lower extremities. Motor-evoked potential examination revealed prolongation of the central motor conduction times in the corticospinal tracts. Needle EMG showed chronic neurogenic patterns in his legs. A sural nerve biopsy disclosed a decreased number of nerve fibres of large diameter and residual axonal swelling, but no formation of onion bulb-like structure. Peripheral blood examinations showed peroxidase-positive giant granules in granulocytes and reduced natural killer cell activity.

Identification of candidate chromosome areas

We found linkages to a several parts of chromosomes 1 (rs3914503-rs2186205), 2 (rs12614444-rs4035021), 11 (rs11235880-rs120435) and 17 (rs7216464-rs4128515, rs7217461-rs11079098), with maximum cumulative LOD scores of 1.8 (figure 1A). These four chromosome parts did not contain previously reported HSP loci.

Exome sequencing allowed identification of the candidate gene substitutions

Exome sequencing covered 98.65% of the target region with an average sequence depth of 106.24X. All coding sequences in the four candidate chromosomal areas were covered at least eight times. The presence of consanguinity and two asymptomatic parents supported that the patients have homozygous disease-causing mutations. We selected all coding variants in the homozygous regions and then filtered them by discarding variants documented in the dbSNP135 and the 1000 Genomes Project, and heterozygous and synonymous substitutions. We identified three novel homozygous, non-synonymous single nucleotide variants: c.4189T>G (p.F1397V) in *LYST* in the chromosome 1 candidate area (figure 1B), c.5135G>A (p.G1712E) in *FAT3* in the chromosome 11 candidate area and

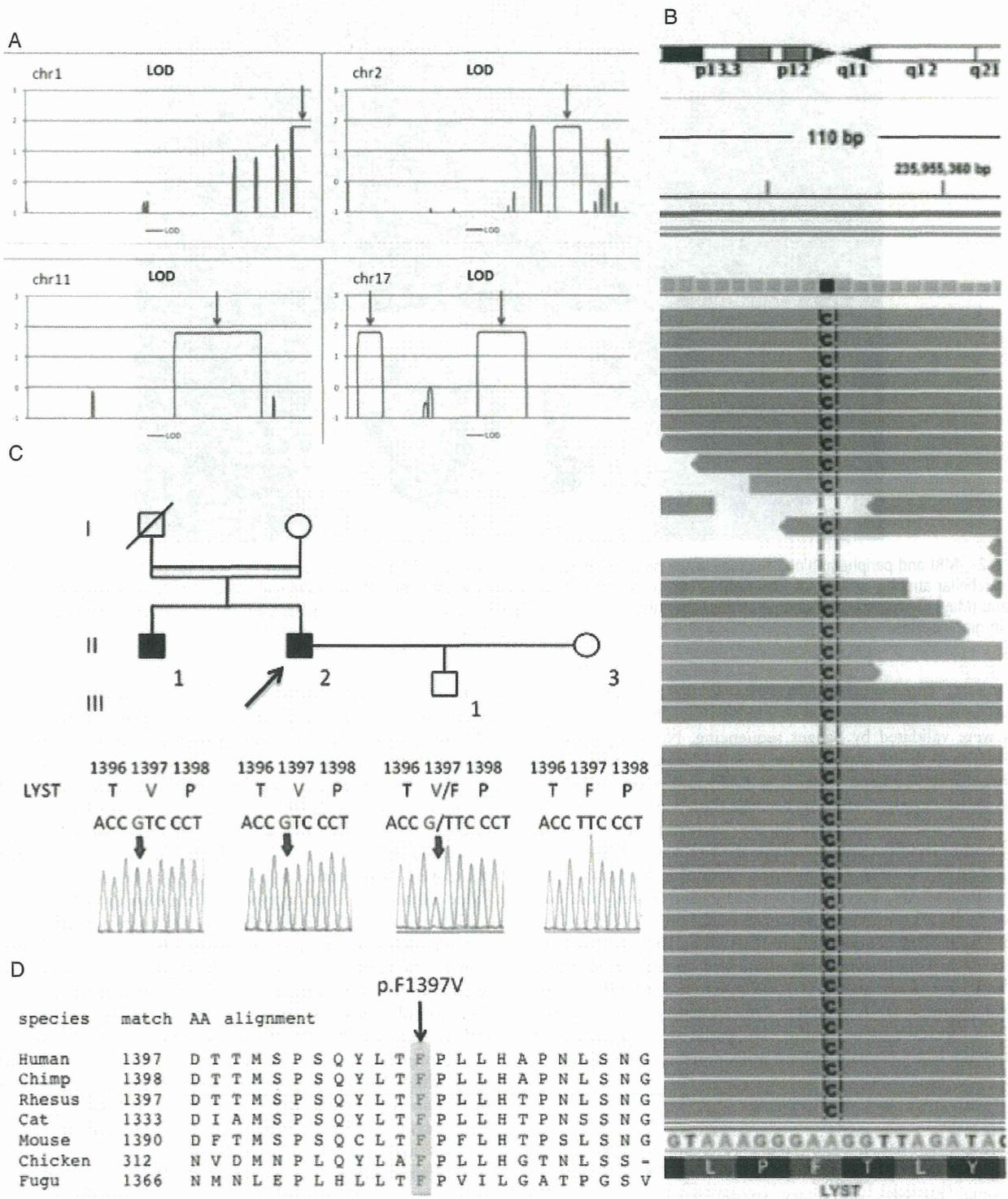


Figure 1 Linkage analysis and mutation of the *lysosomal trafficking regulator* (*LYST*) gene in the family. (A) Linkage analysis involving single nucleotide proteins revealed the highest logarithm of the odds (LOD) scores (about 1.8) in parts of chromosomes 1, 2, 11 and 17 (arrows). These four areas were thought to be candidate areas in which the causative gene was located. (B) Exome sequencing using one patient’s DNA identified the mutation of the *LYST* gene on chromosome 1. This mutation was demonstrated with Integrative genomics viewer (IGV).²⁶ (C) Family tree and Sanger sequencing validation. Sanger sequencing confirmed the homozygous missense mutation (c.4189T>G, p.F1397V) of the *LYST* gene identified in the proband and the affected brother. This mutation was co-segregated with the disease in this family. (D) This amino acid substitution (p.F1397V) is located at a highly conserved residue within the concanavalin A (ConA)-like lectin domain (amino acid numbers 1390–1691) of the *LYST* protein.