

網羅的アラニンスキャニングを用いた STAT1 遺伝子変異参照データベースの作成

研究分担者 小林正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授）
岡田 賢，香川礼子，西村志帆，坂田園子

研究要旨

STAT1 機能喪失型 (LOF) 変異によりメンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症が、機能獲得型 (GOF) 変異により慢性皮膚粘膜カンジダ症が発症する。STAT1 の coiled-coil ドメイン (CCD) と DNA 結合ドメイン (DBD) には、LOF 変異、GOF 変異が共に存在することから、変異の病的意義を判断するために個々の変異の質的評価が必要であった。我々は STAT1 の CCD/DBD に網羅的なアラニンに置換体を作製し、レポーターアッセイを用いた質的評価により変異参照データベースを作成した。その結果、342 のアラニン置換体のうち、111 のアラニン置換体が GOF、30 のアラニン置換体が LOF と判断され、既知の GOF 変異との一致率は 78.1%、LOF 変異は 100%であった。同領域に存在する正常多型との一致率は 71.1%であった。さらにアラニン変異体の分布から、STAT1 antiparallel dimer を安定化する変異は LOF に、不安定化する変異体は GOF になること発見した。

A. 研究目的

STAT1 は、IFN- α/β 、 γ のシグナル伝達に必須の転写因子で、宿主の病原体に対する感染防御に重要な分子である。IFN- α/β はウイルスの排除に、IFN- γ は抗酸菌（結核菌など）の排除に重要であることから、STAT1 の機能異常を持つ患者は様々な感染症を発症する。実臨床において、STAT1 遺伝子の LOF 変異を持つ患者はメンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (MSMD) を発症する。一方で、STAT1 遺伝子の機能獲得型 (GOF) 変異は、症候性の慢性皮膚粘膜カンジダ感染 (CMCD) の発症に関与する。過去の検討で、GOF 変異は STAT1 の coiled-coil ドメイン (CCD)、DNA 結合ドメイン (DBD) に集中して認められることが知られている。一方で、LOF 変異は CCD、DBD を含む STAT1 の全長にわたって分布する。MSMD と CMCD は全く異なった原発性免疫不全症であるが、両疾患は稀に類似した臨床症状を示す。そのため、患者で認めた STAT1 遺伝子変異の病的意義を判断するためには、個々の変異の機能解析

が必要であった。

このような問題点を解決するために、我々は STAT1 の CCD と DBD (CCD/DBD) にアラニン置換体を網羅的に作製し、個々の機能解析を行うことで STAT1 遺伝子変異の参照データベースを確立し、その評価を行った。

B. 研究方法

STAT1 の CCD/DBD に合計 342 のアラニン置換体を作製し、個々のアラニン置換体に対して IFN- γ 刺激に伴う転写活性化能の測定を行った（網羅的アラニンスキャニング解析）。並行して、CMCD 患者、MSMD 患者を対象に次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を行った。網羅的遺伝子解析で同定した STAT1 の機能解析を、ウエスタンブロット、免疫染色、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイで行ったほか、MOE を用いた *in silico* 解析も行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヒトの遺伝子解析、エクソーム配

列解析を含んでおり、広島大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会により承認を受けて研究を遂行した。文部科学省組み換えDNA 実験指針に従って実験しており、「広島大学組み換えDNA 実験安全管理規定」で実験計画の承認を受けて研究を遂行した。

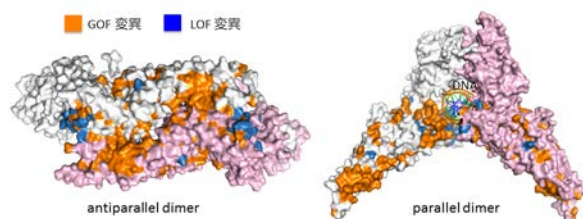
C. 研究結果

網羅的アラニンスキャニング解析の結果、111のアラニン置換体が GOF 変異、30のアラニン置換体が LOF 変異と判断された。過去に *STAT1* 遺伝子の CCD/DBD には 2 つの LOF 変異、74 の GOF 変異が認められていたため、アラニン置換体により、それらの既知変異が正確に評価できているか検討した。その結果、既知の LOF 変異との一致率は 100%、GOF 変異との一致率は 78.1% という良好な結果が得られた。さらに、CCD/DBD に存在する 39 の正常多型 (variants) を対象にして、アラニン置換体が正確に機能を評価できているか検討したところ、71.1% という高い一致率が得られた。これらの結果は、アミノ酸置換の機能変化を予測する既存のコンピューターアルゴリズムである MSC-CADD 法と比較しても、格段に精度が高い一致率であった。

STAT1 は通常状態で二量体 (antiparallel dimer) を形成しており、IFN- γ 刺激により活性化された二量体 (parallel dimer) に構造変化することが知られている。網羅的アラニンスキャニングで得られた結果を、antiparallel dimer、parallel dimer に反映させた結果、一定の法則性が認められた。図 1 に示すように、GOF 変異は antiparallel dimer における二分子間接合面に集中していた。一方で、LOF 変異は parallel dimer における DNA 結合部位に多く認められた。これらの結果から、GOF 変異は不活性型である antiparallel dimer の形成を障害することで機能亢進にいたることが明らかとなった。

さらに、antiparallel dimer の二分子間接合面に存在する特殊な LOF 変異 (E157K 変異) を持つ MSMD 家系例を同定し、*in vitro* 解析と *in silico* 解析を組み合わせることで、E157K 変異が antiparallel dimer を安定化させ、その結果として LOF 変異になることを証明

した。

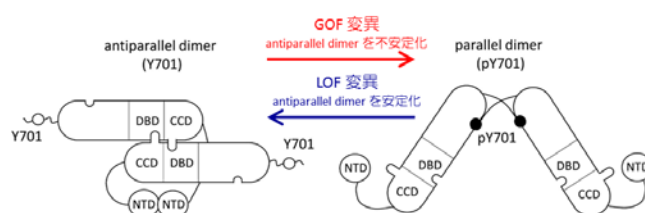


(図 1) LOF, GOF *STAT1* アラニン置換体の分布

STAT1 遺伝子の GOF 変異 (オレンジ) は、antiparallel dimer の二分子間接合面 (白とピンクで示された *STAT1* の接合部位) に集中して認められる。一方で、LOF 変異 (青) は、parallel dimer の DNA 結合部位に多く認められる。

D. 考察

STAT1 は IFN- γ 刺激により Tyr701 (Y701) の部位がリン酸化を受け活性化され、不活性型である antiparallel dimer から活性型である parallel dimer に構造変化する。今回の研究成果で、antiparallel dimer を不安定化するアミノ酸置換は GOF 変異、安定化させるアミノ酸置換は LOF 変異になるという図 2 に示すモデルが提唱された。



(図 2) 遺伝子変異と機能変化の関係

Antiparallel dimer を不安定化するアミノ酸置換は GOF 変異、安定化させるアミノ酸置換は LOF 変異になる。

E. 結論

原発性免疫不全症を引き起こす代表的な責任遺伝子である *STAT1* 遺伝子を対象として、網羅的アラニンスキャニングを用いた参照データベースの作製を行い、*STAT1* 遺伝子変異の質的評価を可能にするシステムを確立した。次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析手法の導入により、遺伝子レベ

ルでの変化が先天性疾患や腫瘍の原因となることが明らかとなってきた。一方で、網羅的解析により同定される多数のアミノ酸置換をどのように評価するかが、今後の大きな課題となっている。今回作製したような参照データベースが他の遺伝子でも確立されれば、網羅的遺伝子解析の副産物である病的意義不明のアミノ酸置換の評価が容易となり、疾患発症に關与する有害変異の同定に役立つことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, Baghdadi JE, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Puel A, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate loss- or gain-of-function variants. *J Allergy Clin Immunol*. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.jaci. 2016.09.035
- 2) Lévy R, Okada S, Béziat V, Moriya K, Liu C, Chai LY, Migaud M, Hauck F, Al Ali A, Cyrus C, Vatte C, Patiroglu T, Unal E, Ferneiny M, Hyakuna N, Nepesov S, Oleastro M, Ikinciogullari A, Dogu F, Asano T, Ohara O, Yun L, Della Mina E, Bronnimann D, Itan Y, Gothe F, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tahuil N, Aytakin C, Salhi A, Al Muhsen S, Kobayashi M, Toubiana J, Abel L, Li X, Camcioglu Y, Celmeli F, Klein C, AlKhater SA, Casanova JL, Puel A. Genetic, immunological, and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113: E8277-85, 2016, DOI: 10.1073/pnas.1618300114
- 3) Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol*. [Epub ahead of print], DOI: 10.1016/j.jaci. 2016.09.029
- 4) Toubiana J, Okada S, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, Ouachée-Chardin M, Fouyssac F, Girisha KM, Etzioni A, Van Montfrans J, Camcioglu Y, Kerns LA, Belohradsky B, Blanche S, Bousfiha A, Rodriguez-Gallego C, Meyts I, Kisand K, Reichenbach J, Renner ED, Rosenzweig S, Grimbacher B, van de Veerdonk FL, Traidl-Hoffmann C, Picard C, Marodi L, Morio T, Kobayashi M, Lilic D, Milner JD, Holland S, Casanova JL, Puel A. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype: an international survey of 276 patients from 169 kindreds. *Blood*. 127: 3154-64, 2016, DOI: 10.1182/blood-2015-11-679902
- 5) Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, Torpy J, O'Young P, Deenick E, Bustamante J, Puel A, Okada S, Kobayashi M, Martinez-Barricarte R, Elliott M, Sebnem Kilic S, El Baghdadi J, Minegishi Y, Bousfiha A, Robertson N, Hambleton S, Arkwright PD, French M, Blincoe AK, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Fulcher DA, Cook MC, Stepensky P, Boztug K, Beier R, Ikinciogullari A, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Boisson-Dupuis S, Phan TG, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+ T cells into distinct effector subsets *J Exp Med*. 213: 1589-608, 2016, DOI: 10.1084/jem.20151467
- 6) Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsui N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase δ syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 138: 1672-1680.e10, 2016, DOI: 10.1016/j.jaci. 2016.03.055
- 7) Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi Y, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M, Sano C, Sato H, Oh-Iwa I, Ito M, Kojima D, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Extrapulmonary tuberculosis mimicking Mendelian susceptibility to mycobacterial

disease in a patient with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 137: 619-622.e1, 2016, DOI: 10.1016/j.jaci.2015.06.028

- 8) Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M. A Patient with CTLA-4 Haploinsufficiency Presenting Gastric Cancer. *J Clin Immunol*. 36: 28-32, 2016. Doi: 10.1007/s10875-015-0221-x
- 9) Okada S, Puel A, Casanova JL, Kobayashi M. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clin Transl Immunology*. 5: e114, 2016, DOI: 10.1038/cti.2016
- 10) Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Hara K, Kagawa R, Okada S, Kobayashi M, Mayumi I, Anzo M, Cho H, Takayasu S, Nigawara T, Daimon M, Sato T, Terui K, Ito E, Noda M. Adipsic Hypertremia without Hypothalamic Lesions Accompanied by Autoantibodies to Subfornical Organ. *Brain Pathol*. [Epub ahead of print], DOI: 10.1111/bpa.12409

2. 学会発表

- 1) Satoshi Okada, Reiko Kagawa, Ryoji Fujiki, Zenichiro Kato, Hidenori Ohnishi, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jacinta Bustamante, Jean-Laurent Casanova, Osamu Ohara, and Masao Kobayashi. Loss-of-function and dominant negative STAT1 coiled-coil domain mutations in MSMD. Congress of Asia Pacific Society for Immunodeficiencies, Hong Kong, China, Apr 30, 2016 (poster)
- 2) 岡田賢, 津村弥来, 西村志帆, 坂田園子, Julie Toubiana, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova, 小林正夫. STAT1 機能獲得型変異を有する原発性免疫不全症患者の臨床症状の国際調査. 第 44 回 日本臨床免疫学会, 東京, Sep 9, 2016
- 3) Satoshi Okada, Ryoji Fujiki, Reiko Kagawa, Miyuki Tsumura, Xiaofei Kong, Sonoko Sakata, Shiho Nishimura, Zenichiro Kato, Hidenori Ohnishi, Yuval Itan, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jacinta Bustamante, Jean-Laurent Casanova, Osamu Ohara, and Masao Kobayashi. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate the loss- or gain-of-function nature of variants. 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies, Barcelona, Spain, Sep 22, 2016

- 4) 岡田賢, 津村弥来, 西村志帆, 坂田園子, 香川礼子, Julie Toubiana, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova, 小林正夫. International survey of clinical manifestations of patients with STAT1 gain-of-function mutations. 第 78 回 日本血液学会, 横浜, Oct 13, 2016

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし