

200500150A

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

遺伝性脊髄小脳変性症(16q-ADCAIII)の
分子病態解明

平成 17 年度 総括研究報告書

Annual Report of the Study for Discovering the Molecular
Pathogenesis underlying the Inherited Spinocerebellar
Degeneration (16q-ADCA III),
the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan

主任研究者 石川欽也

Chairman: Kinya Ishikawa, MD, PhD.
Department of Neurology and Neurological Science,
Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

平成 18 年(2006 年)4 月

目 次

総括研究報告書	1 頁
研究成果の刊行に関する一覧表	25 頁
刊行成果別刷り	27 頁

遺伝性脊髄小脳変性症(16q-ADCAIII)の分子病態解明

主任研究者 石川欽也 東京医科歯科大学 医学部附属病院 神経内科 講師

研究要旨 我々は、本邦に存在する原因不明の遺伝性脊髄小脳変性症の中では最も頻度が高いと考えられる、第16番染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症(16q-ADCAIII)の原因遺伝子を同定する研究を行った。16q-ADCAIIIの52家系を全国から集積し、共通するハプロタイプが存在する領域であるDNAマーカーGATA01から17msmまでの600キロベース(kb)の領域が最も有力な候補領域と考えられた。この領域に存在する21個の遺伝子について変異を探索したところ、構造・機能とも詳細が不明の遺伝子(DKFZP434I216)の、翻訳開始直前16塩基の位置にあるシトシン(C)が患者では特異的にチミン(T)に置換していることを見出した。我々はこの遺伝子の構造や発現部位を解明し、新しく“*puratrophin-1*”と命名した。この遺伝子変化を有する家系は検索した全ての地方に分布し、頻度は本邦の優性遺伝性脊髄小脳変性症の15~20%を占めるほど高頻度であった。しかし、誌上公表後この遺伝子変化を有さず、ごく軽い運動失調を示す患者を1名見出した。したがって、この領域付近に存在する別の遺伝子に真の変異がある可能性は否定できず、さらに詳細な遺伝子変異の探索を行った。

分担研究者 水澤英洋 東京医科歯科大学・大学院脳神経病態学・教授
融 衆太 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助手
常深泰司 東京医科歯科大学・大学院脳神経病態学・助手

不明で、かつ有効な治療法がない神経難病であることから明らかであるが、さらにこの病型の頻度が我々の統計では全優性遺伝性失調症の約15~20%程度を占める、高いものであることから明らかである。なお、本病型は同様な症候を呈する脊髄小脳失調症6型(SCA6)を含め脊髄小脳変性症の中で最も高齢で発症することが特徴である。

原因遺伝子が同定できれば、本疾患の正確な病態の解明と、ひいては発症機序に基づいた根本的治療法の確立に大きく寄与すると期待される。本疾患に類似した臨床像を呈する失調症の家系がアメリカやドイツ、イギリス、オーストラリアなど海外の広い地域からも記載されていることや、同じ領域に連鎖するものの、臨床症状の大きく異なる家系が脊髄小脳失調症4型(SCA4)としてアメリカやドイツから報告されていることから、本研究により原因遺伝子が解明されれば、世界的にもこの領域の研究推進に大きく貢献するものと期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、本邦に存在する原因不明の遺伝性脊髄小脳変性症のうち、最も頻度が高いと思われる病型、すなわち第16番染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症(16q-ADCAIII; またはNCBI(National Center for Biotechnology Information)のデータベースOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> で16q-22.1-linked ADCA(#117210)とも呼ばれている)の原因遺伝子を同定することである。具体的には、昨年度遺伝子変異が存在する候補領域を限定化したことに基づいて、ポジショナル・クローニング(positional cloning)の最終的な段階である遺伝子変異の検索を進める。すなわち、その候補領域内に存在する遺伝子について逐次患者での変異の有無を解析し、遺伝子変異を同定することである。遺伝子変異が同定されれば、この遺伝子の本来の機能を明らかにし、遺伝子変異がどのように疾患の発症をもたらすかを解明することにより、それらの情報に基づき新しい治療法の開発が可能となる。

本研究の必要性は、本病型が現在のところ原因

B. 研究方法

B-1 遺伝子変異同定のための解析

遺伝子同定のためのステップは、次のとおりであった。1) 候補領域の限定化、2) 候補領域内の候補遺伝子の塩基配列検索による遺伝子変異探索、3) 患者脳内での遺伝子発現パターンの異常の検索、4) サザンブロット法による変異解析。これらについて逐次研究経過を記載する。

1) 候補領域の限定化: 候補領域を限定化することにより、より早く変異の同定に至ることができ、我々は北海道から九州に至るほぼ全国に分布する20施設に依頼し、類似する患者家系のDNAを供与していただいた。その患者DNAにつ

いて我々がこれまでに報告したハプロタイプ (Takashima M. et al. J Hum Genet, 2001; Li M. et al. J Hum Genet 2003)が、どの範囲まで共通しているかを解析した。この解析はマイクロサテライト DNA マーカーが中心で、表 1 にマーカーを示す。また、本施設における類似症例についても同様に検索し、全症例で共通する最大のハプロタイプ領域を新たな候補領域と定めることにした。

2) 候補領域内の候補遺伝子の塩基配列検索による遺伝子変異探索：遺伝子変異のスクリーニングについては、その領域にある候補遺伝子を遺伝子情報がインターネットデータベース、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) や、Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) などから取得した。最終的に最も可能性のあることが絞り込まれた候補領域内には候補遺伝子は 21 個存在していた。この他にも EST (expression sequenced tag) として 21 個の遺伝子に関連する遺伝子情報も存在した。したがって、原因解明のために多数の遺伝子をスクリーニングする必要が迫られた。

当初この段階で positional-candidate approach《各々の遺伝子(その産物である「蛋白」)の機能が、本疾患と強く関連するものを優先的に候補遺伝子と想定し、その遺伝子の解析から着手する戦略》により短時間で遺伝子を同定する方法も検討した。しかし、ほとんどの遺伝子が脳で発現していたことや、ほとんどの遺伝子は機能予測から本疾患の原因となりうると考えられたため、bias なく全ての遺伝子をスクリーニングすることにした。

これらの遺伝子について、翻訳領域だけではなく、転写されると考えられた全てのエクソンを検索対象とした。まず、イントロン部分を含んで PCR で増幅するために primer を設定した。その際に、Alu などの反復配列をソフトウェア RepeatMasker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>) と、Tandem Repeat Finder (<http://c3.biomath.mssm.edu/trf.html>) を用いて同定し、増幅しにくい領域はこの反復配列を避けるように配慮した。結局、プライマーを設定し解析したエクソンは 750 個を超えた。次に、PCR 法でゲノム DNA を増幅し、その産物の塩基配列を直接蛍光自動シーケンサー (ABI PRISM™ 3100 Sequencer) で解析した。この方法を用いた理由は、本疾患が常染色体優性遺伝性疾患であるため、ヘテロ接合性の異常を検索しやすくするためであった。

塩基配列解読については、各エクソンについてセンス、アンチセンスの両側からシーケンシングすることを原則とした。得られたシーケンス結果を Ensembl などのデータベースと照合し、点

変異などの有無を解析した。

3) 患者脳内での遺伝子発現パターンの異常の検索：遺伝子の発現は、非常に広いゲノム内の調節領域によって決定されている。しかし、その調節領域の全てをゲノム解析によって探索するには大きな労力が必要であり、非効率的である。一方、遺伝子の発現パターンが、健常者と比べて患者で大きく変わっていることが判れば、この情報を元に広い範囲の調節領域から、一気に候補領域を絞り込めて、短時間で変異を同定することができる可能性がある。このため、候補領域の遺伝子について、患者脳での mRNA を RT-PCR 法によって検索した。

メッセンジャー RNA の抽出・精製は、すでに我々が公表している方法を用いた (Ishikawa K. et al. Human Molecular Genetics 1999)。患者および健常者の 2 名ずつについて凍結脳組織より全 RNA を抽出し、random hexamer を用いて逆転写し、mRNA を得た。これを用いて各遺伝子について最初のエクソンから翻訳領域最後のエクソンまで RT-PCR を行い、データベースと比較した。

4) サザンブロット法による変異解析：候補領域について、健常染色体を含有する BAC clone を入手し、このインサートを 50kb 程度ごとに制限酵素で断片化し、cosmid クローンに再度クローニングしなおし、最終的には候補領域の cosmid contig を得た。各々の cosmid clone を ³²P ラジオアイソトープ存在下で random labeling 法によってアイソトープラベルし、プローブを作製した。一方、患者 5 名および健常者 3 名の末梢血液リンパ球を EB ウイルスによってリンパ芽球株化した。次にリンパ芽球株より得られた高分子ゲノム DNA を Bam HI など 5 種類の制限酵素で切断し、電気泳動後、通常の方法でナイロンメンブレンにブロットした。このメンブレンに逐次 cosmid プローブをあてて、ゲノム DNA のサザンブロット解析を行った。ゲノム情報から各プローブで認められるはずのバンドと、実際に得られたバンドの差を検討し、患者で健常者と異なった所見がないかを検索した。

B-2 *puratrophin-1* 遺伝子同定後の検索

先述の方法によって患者で特異的な遺伝子変化を新規遺伝子 *puratrophin-1* の 5' 端非翻訳領域内に見出した (詳細は結果の項を参照)。この遺伝子変化がどのような意義を持つかを以下の検索で明らかにした。すなわち、1) 遺伝子変化が発現量に影響するかの *in vitro* 実験による検証；2) mRNA レベルでの脳内遺伝子発現パターン

や発現量の解析; 3) 蛋白レベルの検索、である。

1) 遺伝子変化が発現量に影響するかの *in vitro* 実験による検証

5' 端での変化を含むゲノム 300bp 領域を PCR によって増幅し、発現用ベクターにクローニングした。その上で、このプラスミドを常法に従って培養細胞 HEK293 細胞に一過性発現させ、luciferase 蛋白の発現量を定量するという、*in vitro* luciferase assay を行った。まったくベクターだけを発現させた対照(mock)と、正常のゲノム断片をつないだ construct での発現量と、C→T 変異を有する construct での発現量との3種類について luciferase 蛋白の発現量に差があるかを検証した。なお、発現効率を一定にするために *renilla* を発現するベクターを毎回同時に発現させて、導入効率を算定する上での目安にした。

2) mRNA レベルでの脳内遺伝子発現パターンや発現量の解析

健常者および患者脳内での *puratrophin-1* 遺伝子 mRNA の発現量に差があるかを検討する目的で、全長型 *puratrophin-1* mRNA および短縮型 *puratrophin-1* mRNA をそれぞれ検出する特異的 TaqMan probe を合成した。また、housekeeping 遺伝子の代表である G3PDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA についても TaqMan probe を合成し、各検体間での総 mRNA 量の目安とした。これらのプローブを用いて ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System 上で real-time PCR を行い、*puratrophin-1* mRNA 量を比較した。

3) 蛋白レベルの検索

Puratrophin-1 蛋白の発現を、ウサギポリクローナル抗 puratrophin-1 抗体を作製し解析した。抗原部位として全長型 puratrophin-1 に 4 箇所 (FL-01, FL-02, FL-03, FL-04)、短縮型に 1 箇所 (SV-01) 設定した。ウサギに通常のとおり (Ishikawa K. et al. Human Molecular Genetics 1999)、FL-01, FL-02, FL-03, FL-04, あるいは SV-01 のペプチド抗原を注射し、血清を得た。血清を抗原を用いて濃縮し、抗体 (FL-01, FL-02, FL-03, FL-04, あるいは SV-01) を得た。

B-3 16q-ADCAIII の病態解明のための puratrophin-1 蛋白機能の解析

1) 培養細胞を用いた puratrophin-1 蛋白機能の解析

puratrophin-1 cDNA を発現型ベクターにクローニングし、遺伝子をラット褐色細胞腫由来の PC12 培養細胞に一過性に発現させる。発現した puratrophin-1 蛋白を免疫組織化学的に検証し、蛋白発現の局在を検討する。実際には全長型

puratrophin-1 蛋白のアミノ (N) 端側に green fluorescent protein (GFP) を、またカルボキシル (C) 端側には hemagglutinin A (HA) をそれぞれ付加した遺伝子を構築した (GFP-全長型 puratrophin-1-HA tagged cDNA)。これを pcDNA3 (Invitrogen 社) にクローニングし培養細胞に導入した。

2) *puratrophin-1* 遺伝子ノックアウトマウス作製の試み

マウスでの *puratrophin-1* 遺伝子もゲノム解読によってすでに明らかにされていたため、マウスゲノムでの制限酵素地図を作成。その上で、通常の targeting construct を作製する計画を立てた。

倫理面での配慮：倫理面への配慮については、平成 12 年 4 月の厚生科学審議会の指針にもとづき本施設において新設された遺伝子研究のための倫理審査委員会の審議を経て許可されており、その後の個人情報保護に基づく平成 17 年度の倫理指針にも準拠している。また、動物の取り扱いも本学動物実験委員会の指針に基づいて行うなど十分な配慮がなされている。

C. 研究結果

C-1 遺伝子変異同定のための解析

1) 候補領域の限定化

本邦の広い範囲の神経内科教育施設にご協力いただき、多数の家系を集積した。その結果最終的には 52 家系の集積を行えた。

その家系について、DNA マーカー(表 1)について検索し、各家系における患者に共通するハプロタイプを検索したところ、表 2 のような結果が得られた。

この結果から、16q-ADCAIII は第 16 番染色体長腕 16q22.1 の領域を中心に広い範囲に渡って共通するハプロタイプを有すること、すなわち強い「創始者効果 (founder effect)」がみられること、がわかった。この結果は、これまで我々が得て誌上 (Takashima M. et al. J Hum Genet, 2001; Li M. et al. J Hum Genet 2003) 報告した結果をさらに支持するものである。

特にハプロタイプが全ての家系で共通する領域に、原因疾患が存在する可能性が高い。この観点から検索すると、マーカー GATA01 から 17msm にわたる、600 キロベース (kb) 領域で、全ての家系のハプロタイプが一致することがわかった。さらに、これを直接指示するデータとして、この領域内のマーカーである GA001 についてみた場合、全ての患者で共通するアレルが、健常者ではわずかに 1000 本の染色体中 1 本認められただけであり、頻度は 0.1% と非常に強い連鎖不平衡があることが示された。した

がって、GATA01 から 17msm も区間が最も可能性が高い領域であるといえる。一方、動原体側の境界であるマーカーGATA01 と、テロメア側の境界であるマーカー17msm では、家系によって患者でのアレルが異なっており、この領域の外には遺伝子変異が存在する可能性は低くなる、と考えられた。ただし、外側でも一部はアレルが共通するマーカーも存在しており、完全には否定できないと考えている。

2) 候補領域内の候補遺伝子の塩基配列検索による遺伝子変異探索

マーカーGATA01 と 17msm の間には、Ensembl などのデータベースによると 21 個の異なった遺伝子が存在することが公表されていた(図 1)。その遺伝子名を列挙すると、となる。これらのほとんどが脳で発現して、蛋白として機能していると考えることができた。逆に、これらのほとんどが原因遺伝子である可能性を否定できず、全てを虱潰しに解析する必要があった。

このため、この全てについて翻訳領域を含む転写される領域を、PCR 後に直接塩基配列を検証した(PCR product-direct sequencing)。その結果、データベースにおいて登録されているのみで、実験的な検証がなされておらず、蛋白の機能がほとんどわかっていない遺伝子(DKFZP434I216)の 5' 非翻訳領域に 1 塩基置換を認めた(図 2)。すなわち、翻訳開始点とされた ATG のアデニン(A)から数えて 16 塩基上流の位置にあるシトシン(C)が患者ではチミン(T)に置換されている(-16C>T)、という変化であった。

この C→T の 1 塩基置換を患者群で検索したところ、患者では全員ヘテロ接合体で有していた。一方、健常者集団 500 人について調べたところ、全く T への置換は見られず、GA001 よりもさらに強い連鎖不平衡を示し、患者と正常人を区別する唯一の変化であることが判明した。

この遺伝子以外に残る 20 個全てを解析したが、この変化以外には患者と健常者を完全に区別する遺伝子変化は見られなかった。

3) 患者脳内での遺伝子発現パターンの異常の検索

候補領域内の遺伝子について、ヒト脳での発現を確認し、健常者と患者での発現パターンの違いを検索した。しかし検索した範囲ではいずれの遺伝子でも、患者脳で明瞭に発現パターンが健常者と異なる遺伝子は検出されなかった。したがって、明瞭に遺伝子発現パターンに変化を与えるような変化は少なくとも GATA01 から 17msm の 600kb 区間には存在しない、と考えた。

4) サザンブロット法による変異解析

患者群と健常者群で、cosmid プローブを用いてサザンブロット法で解析し、1kb 以上の大きな DNA 配列の挿入や欠質などの変化が無いかを検索した。代表的な結果を図 3 に示す。

検索した候補領域に相当する 4 つの BAC clone については、患者で特異的な変化は見出されなかった。

以上の結果から、*puratrophin-1* 遺伝子での 5' 端での 1 塩基置換が患者に特異的な唯一の変化であると結論した。この変化が真の変異である可能性を検証するために、以下の実験を行った。また、この遺伝子は実験的に詳細な検討がなされていなかったため、この疾患では特徴的な小脳 Purkinje 細胞の萎縮像(図 4)が見られるということに因んで、この遺伝子を“*puratrophin-1*”(Purkinje cell atrophy associated protein-1)と命名することにした。

C-2 *puratrophin-1* 遺伝子同定後の検索

1) 遺伝子変化が発現量に影響するかの *in vitro* 実験による検証

5' 端での変化を含む 300bp 領域を PCR によって増幅し、*in vitro* 的な検証方法である luciferase assay によって、蛋白発現量に差が生じるかを調べた。その結果を図 5 に示す。

導入した部分 5' 配列は、mock 遺伝子を導入した場合よりも確かに転写活性を上げる効果が見られた。すなわち *puratrophin-1* 遺伝子の発現を調節する働きを有している一部分であると考えられる。

一方、この 300bp 領域のうちの患者で見られる 1 塩基置換を導入したコンストラクトでは、転写活性が有意に下がっていた(図 5)。すなわち、この遺伝子変化によって遺伝子発現が低下している可能性が挙げられた。

2) mRNA レベルでの脳内遺伝子発現パターンや発現量の解析

luciferase assay によって患者脳では遺伝子の発現量が低下している可能性が挙げられたため、患者脳で実際に発現量が低下しているか否かを検証した。

まず、ヒト脳内でどのようなパターンで発現しているかを RT-PCR で検索した。その結果を図 6 に示す。

puratrophin-1 遺伝子は複雑な alternative transcription を経て mRNA が作られていることが示された。このうち、最もメジャーな

transcript は二つであり、そのうちの一方は全長型 *puratrophin-1* mRNA であった(図7)。すなわち、エクソン1からエクソン21までの全長が転写され、全長9kb近い長さのmRNAになる。この型が翻訳されると、1192個のアミノ酸からなる約134キロダルトン(kDa)の分子量を有する蛋白になる。機能予測では、CRAIL-TRIO (cellular retinaldehyde-binding/triple function domain)、spectrin repeat、Rho GEF (Rho guanine-nucleotide exchange factor)、DH(Dbl homology domain)の4つの重要なドメインを有する蛋白であることが予想された。我々による後述の誌上公表後(Ishikawa K. & Toru S. et al. Am J Hum Genet 2005; 77: 280-296.)、*puratrophin-1* 蛋白は PLEKHG4 (pleckstrin homology domain-containing protein, family G, member 4) (*609526) という別名でもNCBIデータベースに登録された。

もう一方のメジャーな transcript は、エクソン1とエクソン2の間のイントロンがスプライシングを受けずに、挿入された mRNA である。このために、翻訳された場合は frame-shift をきたして蛋白レベルでは194個のアミノ酸になる。これを短縮型と呼んだ。

これら *puratrophin-1* mRNA が人体ではどのような組織で発現しているかを RT-PCR で検索した(図8)。その結果、遺伝子の発現は脳では必ずしも高くなく、精巣やすい臓で最も高く発現する遺伝子であることがわかった。脳内では大脳皮質や基底核などよりも小脳での発現が強かった。

次に患者と健常者脳での *puratrophin-1* 遺伝子量を定量的に検索した。TaqMan プローブは1)短縮型、2)全長型および短縮型の総量、の2種類を検出するように設計したが、全長型だけを特異的に認識するプローブを作製することはできなかった。そして、各脳組織間での mRNA 量が同一ではないため、housekeeping gene である *G3PDH* mRNA を対照 mRNA として、これに対する *puratrophin-1* mRNA の比率で比較した。

この TaqMan 法によって得られた定量的 PCR 法の結果を図9に示す。総量(図9-A)では患者小脳で確かに *puratrophin-1* mRNA が低下している傾向が認められたが、その差は統計的には有意ではなかった。しかし、短縮型では(図9-B)さらに発現減少の傾向は軽かったため、総量での結果を加味すると、全長型 *puratrophin-1* mRNA は患者で対照者に比べて確かに低下している可能性を残す結果であった。

この他、5'非翻訳領域での1塩基置換であったため、alternative splicing 機構に変化をきたす可能性を想定し、RT-PCR を行い、その産物を TA-cloning し、塩基配列を検証する実験を丹念に行ったが、患者脳組織で異なった transcript が

クローニングされることはなく、alternative transcription に変化をきたす可能性は否定的であった。

3) 蛋白レベルの検索

Puratrophin-1 蛋白の発現を、ウサギポリクローナル抗 *puratrophin-1* 抗体を作製し解析した。この全長蛋白に5種類のペプチド抗原を設計し、これを基にウサギに免疫し、抗体を得た。抗原の位置は図7に示した。

抗体の特異性の検証を、ウエスタンブロット法による recombinant 蛋白の認識と、吸収試験の両方で行った。

免疫組織化学的手法で *puratrophin-1* 蛋白の発現を検索した。まず、コントロールのヒト組織では、すい臓や精巣、前立腺組織などで強い免疫反応性を認めた(図10)。一方、肝臓や肺、消化管などでは発現が非常に弱いか、認められない、程度に低下しており、発現性の局在性が認められた。また、本疾患患者では高率に難聴を合併するため、マウスの内耳組織を検索したところ、有毛細胞で発現を認めた(図10)。神経系組織では、様々な神経細胞で免疫反応性が見られたが、特に小脳 Purkinje 細胞で発現が強かった(図11A)。

一方、患者中枢神経系組織では、ほとんどの領域で対照者でのパターンと違いは見られなかった。しかし、小脳 Purkinje 細胞内では時に強く染まる構造物が細胞質内に認められた(図11B)。

さらに *puratrophin-1* 蛋白の機能予測から、本蛋白が Golgi 装置での actin 分子との結合に関与している可能性が考えられたため、Golgi 装置膜関連蛋白である G58k と spectrin 蛋白に対する抗体を用いて、健常者および患者小脳を免疫組織化学的に解析した(図12)。健常者ではいずれも Purkinje 細胞の細胞質がび慢性に淡く染色される結果であったが、患者小脳 Purkinje 細胞では、*puratrophin-1* 凝集体と同じような凝集構造物を形成していることがわかった。

以上の結果から、患者での *puratrophin-1* 遺伝子の5'非翻訳領域内 C→T 変化は、少なくとも患者でのみ認められ、遺伝子発現量に変化を与え、脳内での同蛋白の凝集をきたす重要な変化であると結論した。この結果を誌上報告した(Ishikawa K. & Toru S. et al. Am J Hum Genet 2005; 77: 280-296.)。

C-3 16q-ADCAIII の病態解明のための *puratrophin-1* 蛋白機能の解析

1) 培養細胞での *puratrophin-1* 蛋白の発現

GFP-全長型 *puratrophin-1*-HA tagged cDNA を、PC12 細胞に一過性に発現させた。遺伝子が正確に

導入されると、GFP のために緑の蛍光を発した。この細胞から蛋白を抽出し、ウエスタンブロットを行うと、抗 HA 抗体で認識された。一方、抗 puratrophin-1 抗体では認識されにくく、抗体の力価が十分高い状態ではないと判断した。

しかし、抗 puratrophin-1 抗体で免疫沈降を行い、抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行うと、対照血清では検出されない GFP-全長型 puratrophin-1-HA 融合蛋白が確かに検出された(図 13)。

2) puratrophin-1 遺伝子ノックアウトマウス作製の試み

マウスでの puratrophin-1 遺伝子を target するための計画を立て、これまでに targeting construct を作製する実験を行っている。Targeting construct が完成すれば、筑波大学に依頼してノックアウトマウスを作製することにした。

C-4 puratrophin-1 遺伝子陰性例の発見とその後の遺伝子変異検索

誌上報告後、多数の家系の依頼があり puratrophin-1 遺伝子の C→T 変化を解析した。その結果、本遺伝子変化を有する家系は全優性遺伝性脊髄小脳変性症の約 20% を占める高頻度の疾患であることが判明した(図 14)。当教室での結果では、SCA6 と Machado-Joseph 病に並ぶ高頻度の疾患であり、これまでに原因不明であった家系の半分以上を占めることになる。

多数の家系を集積するうち、他の発症者には本遺伝子変化を有しているが、わずか 1 名では軽症の失調症を呈しながらも本遺伝子変化を有さない者が居る家系に遭遇した。ハプロタイプ解析の結果、この puratrophin-1 遺伝子変化で組み換えがあり、その動原体側ではこの軽症例も同じハプロタイプを共有していた。

本研究の目的は、まず 16q-ADCAIII の原因遺伝子を同定することであり、これが最初の重要なステップであるため、わずか 1 例と非常に稀な例ではあるが、puratrophin-1 遺伝子変化が真の遺伝子変化ではない可能性をも示唆しており、貴重な発見である。このようなことから、我々は平成 17 年 10 月に、それまで予定していた puratrophin-1 蛋白機能解明のための研究を中断し、puratrophin-1 遺伝子から動原体側への変異遺伝子の再探索を行い、真の遺伝子変異が他にあるか否かをまず決着することにした。

これまでに 1 メガベースにわたり染色体領域の解析を行ってきた。その結果、動原体側に患者特

異的な遺伝子変化を認め、この例外症例でもその変化を有していることがわかった。この変化のうち、遺伝子変異である可能性が期待できる変化もあり、今後その変化の意義を解析してゆく予定である。

D. 考察

これまでに我々は 60 家系の 16q-ADCAIII 家系患者を集積した。この数は世界でも類を見ない。また、本邦の広い範囲の主要大学病院神経内科の協力を得て、家系を集積したまさに本邦オリジナルの研究と言える。

長くに渡るポジショナル・クローニング法を用いた研究の結果、候補遺伝子領域を限定化し、健常者には認められず、患者に特異的なハプロタイプを見出し、最も可能性のある染色体領域を GATA01 から 17msm に至る 600kb 領域とした。

この領域の中から、C→T の 1 塩基置換が puratrophin-1 遺伝子にあることを見出した。この遺伝子変化を見出したことには大きく分けて 3 つの意義がある。

意義の 1 つ目は、この遺伝子変化を有する家系が本邦では非常に多いことである。脊髄小脳変性症は未だ治療法が確立していない難病であるが、正確な原因が解明されることが、根本的治療や発症・進行の予防を可能にする重要なステップのひとつである。したがって、特に本疾患の頻度が高い本邦においてこのような研究がなされ、遺伝子変化の同定に至った意義が高いと考えている。

意義の 2 つ目は、本遺伝子は新規遺伝子であり、その産物である蛋白は新しい細胞骨格蛋白である可能性が高く、単に脊髄小脳変性症の原因蛋白としてだけではなく、細胞生物学的に神経内科学以外の分野にも重要な発見である可能性がある。特に、Golgi 装置は近年、アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症など多数の神経変性疾患で関連が謳われている。本蛋白は actin と結合し、Golgi 装置が細胞内で安定して存在するために重要な働きをしている可能性が高い。このことは患者小脳 Purkinje 細胞で puratrophin-1 蛋白のみならず G58k と spectrin 蛋白が凝集体を形成していたことによって、ほぼ裏付けられたと考えられる。このような所見は、他の脊髄小脳変性症患者の小脳では認められず、16q-ADCAIII の病態に密接に関係していると考えられる。

また、本疾患患者の 40% に進行性の聴力低下を認めた。本疾患は高齢発症ではあるが、この聴力低下は、加齢の影響では説明できない所見である。したがって、本疾患の原因遺伝子は難聴遺伝子でもある可能性が挙げられる。puratrophin-1 蛋白は内耳の有毛細胞でも発現しており、遺伝子変異

によって、内耳有毛細胞の機能障害が起きる可能性がある。実はこれまでに難聴遺伝子のなかで、本蛋白のような GEF 蛋白は発見されていなかったが、我々が誌上報告した後に、類縁蛋白をコードする遺伝子 *TRIOBP* の変異によって難聴が起きることが相次いで報告された (Riazuddin S. et al. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 137-143; Shahin H. et al. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 144-152)。また、Rho GTPase を制御する遺伝子変異でも難聴が起きるが、この遺伝子の発現部位も *puratrophin-1* と同様に内耳の有毛細胞であることがわかった (Yan D. et al. *J Mol Biol* 2006; 357: 755-764)。したがって、*puratrophin-1* が難聴に関する遺伝子である可能性がさらに支持されたとも考えられる。今後、本遺伝子のノックアウトマウスを複製・解析することによってこの遺伝子の役割について解明してゆく予定である。

3 つ目の重要な意義は、遺伝子変化の位置が 5' 非翻訳領域にありながら蛋白凝集を来たす、というまったく新しい所見を見出した点である。神経変性疾患、特に常染色体優性遺伝性神経変性疾患の多くでは、原因遺伝子の産物である変異蛋白は凝集し、細胞機能障害から細胞死へと至ることが共通の経路であると考えられている。これらの疾患では、ほとんどが原因遺伝子の翻訳領域内の変異や翻訳蛋白の変化が起きる変異である。今回我々が見出した遺伝子変化は、翻訳領域内ではなく、非翻訳領域内の変化が蛋白の凝集をきたす、という所見であるため、非常にユニークである。今までに、原因遺伝子座は解明されていても原因遺伝子が不明の神経変性疾患は、本変化のように非翻訳領域内の変異である可能性が示された、とも言えるため、非常に重要であると考えている。

今後本疾患の治療法を考える点では、*puratrophin-1* 蛋白の正確な機能解明と、遺伝子発現量の減少が本当にあるとして、それがどのようにして蛋白凝集を来たすのかを明らかにしてゆく必要がある。しかし、もしこれらの点が解明されれば、遺伝子導入を行うことで根本的治療が可能になると期待できる。

一方、多数の家系を集積するうちに、ごく稀に 1 例においてこの遺伝子変化を有さずに極めて軽症の失調症を呈した症例を見出した。この症例の詳細は不明であるが、小脳萎縮は明らかでなく、運動失調の発症年齢は 60 歳代で、程度も専門医が見ても見落とすほどの軽微である。しかし、この患者のハプロタイプは *puratrophin-1* 遺伝子で組み替えが起きており、これより動原体側に別の変異遺伝子がある可能性がまったく否定できるわけではなかった。これを受けて、我々は予定していた *puratrophin-1* 遺伝子・蛋白の機能解明を中断し、再度遺伝子探索を行っている。現在までにこの稀な患者を含めて発症者にのみ認める

遺伝子変化を見出しており、近い将来その病的意義の解明と、真の遺伝子変異の解明ができると期待している。

E. 結論

我々は、本邦の優性遺伝性脊髄小脳変性症の 20% を占めるほど高頻度に存在する、第 16 番染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症 (16q-ADCAIII) の原因遺伝子を同定する研究を行った。その結果、候補領域である DNA マーカー GATA01 から 17msm までの 600 キロベース (kb) の領域内に存在し、遺伝子の構造・機能とも詳細が不明の遺伝子 (*DKFZP434I216*) の、翻訳開始直前 16 塩基の位置にある cytosine が、患者では特異的に thymine に置換していることを見出した。我々はこの遺伝子の構造、発現部位を解明し、新しく "*puratrophin-1*" と命名した。この遺伝子変化は遺伝子の発現量を低下させ、蛋白は凝集することが判明した。この成果を誌上公表した後、この遺伝子変化を有さず、ごく軽い運動失調を示す患者を 1 名見出した。このため現在この領域付近をさらに詳細に探索している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishikawa K., Toru S., Tsunemi T., Li M., Kobayashi K., Yokota T., Amino T., Owada K., Fujigasaki H., Sakamoto M., Tomimitsu H., Takashima M., Kumagai J., Noguchi Y., Kawashima Y., Ohkoshi N., Ishida G., Gomyoda M., Yoshida M., Hashizume Y., Saito Y., Murayama S., Yamanouchi H., Mizutani T., Kondo I., Toda T., Mizusawa H. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domain. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 280-296.
- 2) Owada K., Ishikawa K., Toru S., Ishida G., Gomyoda M., Tao O., Noguchi Y., Kitamura K., Kondo I., Noguchi E., Arinami T., Mizusawa H. A clinical, genetic, and neuropathologic study in a family with 16q-linked ADCA type III. *Neurology* 2005; 65: 629-632.
- 3) Toru S, Yokota T, Tomimitsu H, Kanouchi T, Yamada M, Mizusawa H: Somatosensory-evoked cortical potential during attacks of paroxysmal dysesthesia in multiple sclerosis. *Euro J Neurol* 2005; 12: 233-234.
- 4) Amino T, Orimo S, Itoh Y, Takahashi A, Uchihara T, Mizusawa H. Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson disease. *Brain Pathol* 2005; 15: 29-34.
- 5) Kubodera, T., Yokota, T., Ishikawa, K., Mizusawa, H.: New RNAi Strategy for Selective

Suppression of Mutant Allele in Polyglutamine Disease. *Oligonucleotides* 2005; 15: 298-302.

- 6) 常深泰司, 水澤英洋. ポリグルタミン病 - 脊髄小脳失調症 6 型を中心に -. イオンチャネル最前線 update. 別冊 医学のあゆみ. 2005; 227-31.
- 7) 水澤英洋: ハンチントン病. 山口 徹, 北原光夫 / 編, 今日の治療指針 2005. 医学書院(東京), 648-649, 2005.1.1
- 8) 水澤英洋: パーキンソン病治療ガイドライン (2002). 山口 徹, 北原光夫 / 編, 今日の治療指針 2005. 医学書院(東京), 648-649, 2005.1.1
- 9) 水澤英洋: プリオン病. 石原得博 / 監修 池田修一 / 編, アミロイドーシスの基礎と臨床. 金原出版(東京), 277-286, 2005.3.31
- 10) 水澤英洋: 脊髄小脳変性症、痙性対麻痺. 矢崎義雄・菅野健太郎 / 監修, 疾患別最新処方. メジカルビュー社(東京), 652-653, 2005.3.30 改訂第 4 版
- 11) 水澤英洋: 神経疾患. 新版・社会福祉学習双書 編集委員会 / 編, 新版・社会福祉学習双書 2005, 12 医学一般. 全国社会福祉協議会, 89-100, 2005.2.25 改訂 4 版
- 12) 水澤英洋: 新版・社会福祉学習双書 編集委員会 / 編, 社会福祉学習重要語句集. 全国社会福祉協議会, 2005.3.30
- 13) 水澤英洋: プリオン病. 疾病対策研究会 / 編, 難病の診断と治療指針 1. 東京六法出版(東京), 456-475, 2005.7.1 3訂版
- 14) 水澤英洋: 進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症. 日野原重明、井村裕夫 / 監修 岩井郁子、北村 聖 / 監修協力 祖父江 元 / 編, 看護のための最新医学講座 第 1 巻 脳・神経系疾患. 中山書店(東京), 326-331, 2005.12.9 第 2 版
- 15) 水澤英洋: 多系統萎縮症. 日野原重明、井村裕夫 / 監修 岩井郁子、北村 聖 / 監修協力 祖父江 元 / 編, 看護のための最新医学講座 第 1 巻 脳・神経系疾患. 中山書店(東京), 331-334, 2005.12.9 第 2 版
- 16) 石川欽也, 高橋博樹, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)におけるめまい. *神経研究の進歩* 2005; 49 (2): 237-244.
- 17) 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症と痙性対麻痺. *ゲノム医学* 2005; 5(3): 267-274.
- 18) 石川欽也, 水澤英洋. ポリグルタミン病. *ゲノム医学* 2005; 5(3): 311-316.
- 19) 坂本昌己, 水澤英洋. 小脳とその障害 - update 小脳の疾患と治療 優性遺伝性脊髄小脳変性症 *Clinical Neuroscience* 2005; 23(12): page
- 20) 常深泰司, 水澤英洋. 神経・筋 遺伝性脊髄小

脳変性症の診断基準・病型分類・重症度.【内科疾患の診断基準病型分類・重症度】. *内科* 2005;95(6);1541-7.

- 21) 水澤英洋: 精神神経疾患とゲノム - 最近の動向 特集にあたって. *ゲノム医学* 5(3): 4(224)-5(225), 2005.6
 - 22) 水澤英洋: 純粋小脳失調症 - 脊髄小脳失調症 6 型を中心に -. *運動障害* 15(2): 77-89, 2005
 - 23) 水澤英洋: RNA 干渉 神経疾患治療の新しいテクノロジー. *神経研究の進歩* 49(6): 915-920, 2005
- ## 2. 学会発表
- 1) Ishikawa K. Clinical features and molecular genetic analysis of two autosomal dominant cerebellar ataxias common in Japan. 1st Workshop on Polyglutamine Disease and Related Disorders ---New Perspectives, Tokyo, Japan, 2005. September 23.
 - 2) Ishikawa K., Toru S., Tsunemi T., Amino T., Kobayashi K., Kodo I., Toda T., Mizusawa H. A single nucleotide substitution in the 5'-UTR in the gene encoding spectrin repeat and Rho guanine nucleotide exchange factor domains is strongly associated with autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1. The American Society of Human Genetics. 55th Annual Meeting. Salt Lake City, Utah, USA. 2005. October 25-29.
 - 3) Ishikawa K. Identification of a single nucleotide substitution in the 5'-UTR in the gene encoding spectrin repeat and Rho guanine nucleotide exchange factor domains within the founder chromosomal region for the autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1. *Ataxia* 2005. A Satellite Meeting to the World Congress of Neurology. Radisson Hotel Gold Coast, Queensland, Australia. 2005. November 3-4.
 - 4) 石川欽也、水澤英洋. ポリグルタミン病以外の優性遺伝性失調症: 第 16 番染色体連鎖型 (16q-linked ADCA type III) を中心に. シンポジウム I: 脊髄小脳変性症最前線. 第 46 回日本神経病理学会学術研究会. 宇都宮, 2005. 5. 12.
 - 5) 石川欽也, 融衆太, 常深泰司, 大和田潔, 石田玄, 吉田眞理, 橋詰良夫, 村山繁雄, 水谷俊雄, 小林千浩, 近藤郁子, 戸田達史, 水澤英洋. 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性小脳皮質萎縮症 (16q-ADCCA) の臨床・病理・遺伝的特徴. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5. 26.
 - 6) 常深泰司, 石川欽也, 融衆太, 李明順, 網野猛, 水澤英洋. 第 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性小脳皮質萎縮症 (16q-ADCCA) の原因遺伝子検索. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島, 2005. 5. 25.

- 7) 融衆太, 石川欽也, 常深泰司, 網野猛, 李明順, 水澤英洋. 第 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性小脳皮質萎縮症 (16q-ADCCA) の頻度と臨床的特徴. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島, 2005. 5. 25.
- 8) 網野猛志, 高橋博樹, 常深泰司, 融衆太, 石川欽也, 堤剛, 喜多村健, 水澤英洋. 第 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性小脳皮質萎縮症の聴覚, 眼球運動障害の検討. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5. 27.
- 9) 三木一徳, 袖山信幸, 網野猛志, 融衆太, 藤ヶ崎浩人, 石川欽也, 横田隆徳, 水澤英洋. 可逆性腫大性脊髄病変のステロイド反応性・臨床経過および画像診断的検討. 第 27 回日本脳神経 CI 学会, 高松, 2005. 3. 19.
- 10) 高橋博樹, 石川欽也, 水澤英洋. SCA6 と MJD における CAG リピート数と発症年齢の関連についての再検討. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島, 2005. 5. 25.
- 11) 三木一徳, 融衆太, 石川欽也, 横田隆徳, 水澤英洋. Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis の 3 家系の臨床的・遺伝学的検討. 第 45 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5. 25.
- 12) 藤ヶ崎浩人, 坂本昌己, 藤ヶ崎純子, 尾崎心, 石川欽也, 水澤英洋. 変異 $\alpha 1A$ -Ca チャネルタンパクの分子機構. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5. 26.
- 13) 坂本昌己, 藤ヶ崎浩人, 尾崎心, 石川欽也, 水澤英洋. テトラサイクリンシステムを利用した SCA6 細胞モデル. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5. 26.
- 14) 富満弘之, 石川欽也, 垣塚彰, 水澤英洋. DMRV および IBM の筋病理における VCP の関与. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5. 26.
- 15) 石川欽也, 吉田雅幸, 小笹由香, 田村智英子, 水澤英洋, 奥山虎之, 稲澤譲司, 木村彰方, 水谷修紀. 東京医科歯科大学における神経変性疾患に関する発症前遺伝子診断希望者(クライアント)の受診理由について. 日本人類遺伝学会 第 50 回大会. 倉敷, 2005. 9. 20.
- 16) 石川欽也, 融衆太, 李明順, 常深泰司, 網野猛, 小林千浩, 近藤郁子, 戸田達史, 水澤英洋. 本邦に高頻度に存在し, 創始者効果を認める第 16 番染色体長腕連鎖型常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症(16q-ADCA)の原因遺伝子探索. 若手ワークショップ. 日本人類遺伝学会第 50 回大会. 倉敷, 2005. 9. 22.
- G. 知的所有権の取得状況
とくになし。ただし、本研究成果が米国国立衛生研究所 (NIH) の NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベース Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> に 16q-22. 1-linked ADCA (#117210)、puratrophin-1 (PLEKHG4; *609526) として登録された。
- H. 健康危険情報
とくになし。

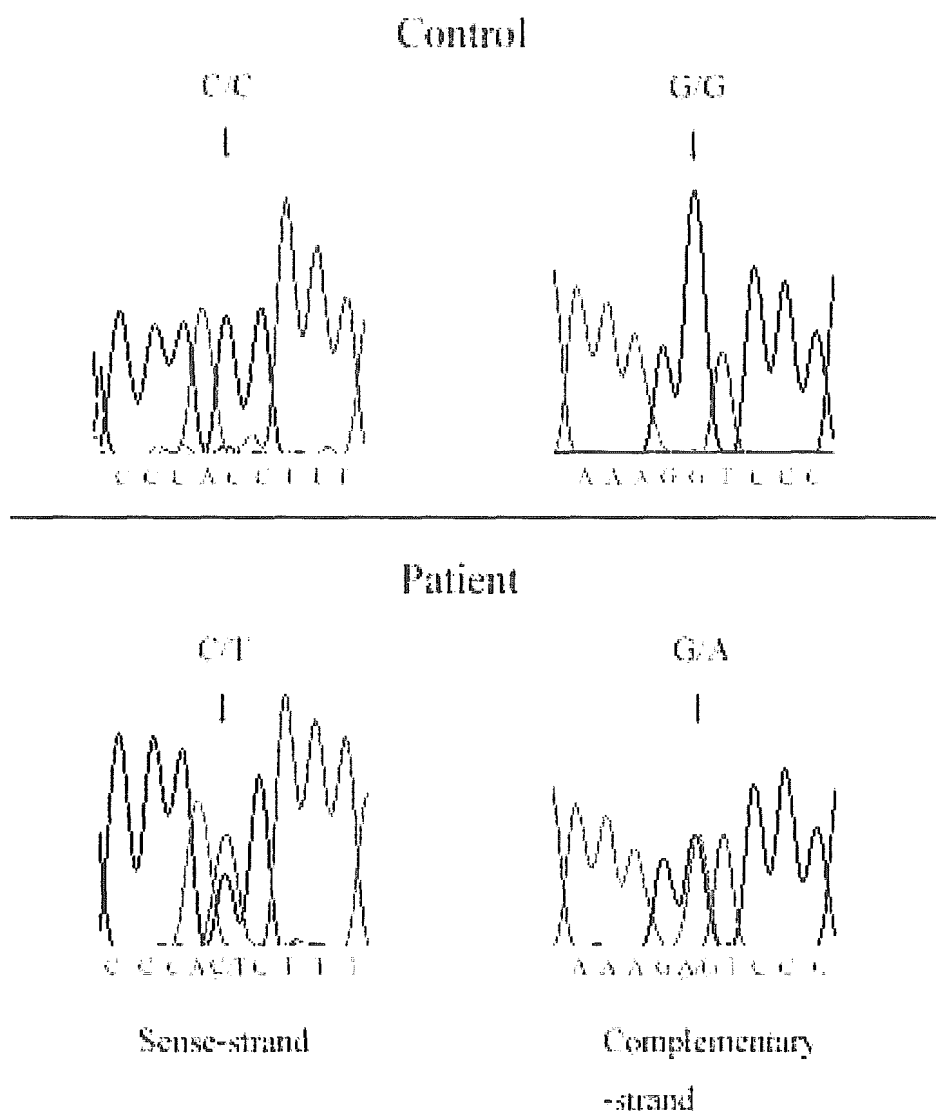
マーカー	16q22.1での位置 #	センスプライマー	アンチセンス プライマー	PCR産物の 断片長 (コントロール)
16q-centromere				
1	D16S3031 64338902 - 64339180	5'-ACTTACCAGTGTGCCAGTTG-3'	5'-ATACATGGGTCCTTAAACCG-3'	258 - 278
2	GGAA05 64938932 - 64939196	5'-GTTGCAGTGAGCGGAAATT-3'	5'-CCTACCTCCAGTCCAGATT-3'	240 - 264
3	GGAA10 65452426 - 65452828	5'-GAGCTCTGATCACACCATTT-3'	5'-GCGGCACTTGCAATTCATCA-3'	378 - 402
4	TTCC01 65479376 - 65479551	5'-CCATCTTATCTCTTAGTCCGT-3'	5'-GTGAGCCAAGATCATGCCAT-3'	147 - 175
5	D16S3086 65493398 - 65493588	5'-CCTGCTGGGAAGTGACC-3'	5'-CTAAGGACAAATGTAGATGCTCTGG-3'	184 - 190
6	GATA01 65700158 - 65700328	5'-GGGTCAGTGTGATGTCCAGTA-3'	5'-CGCTGTGAGCACTGCTCTCA-3'	150 - 170
7	D16S421 65853212 - 65853436	5'-ACATGAACCGATTGGACTGA-3'	5'-CCGTTCCCTATATTTCTGG-3'	214 - 224
8	TA001 65906164 - 65906326	5'-CTTCACTTAGCTGACATGATGG-3'	5'-TGCACCACTGTGTTCCAGCTG-3'	144 - 162
9	GA001 65922378 - 65922591	5'-GGAGGCTGAGAAGTCCAAGAGC-3'	5'-CATGCTGTTATCTAGGAGTTAGTTAT-3'	195 - 213
10	TTTA001 65943941 - 65944165	5'-CCGAAATAGGCGTACCTAGGCTA-3'	5'-AGTGAGCTGAGTTTGCACCACTG-3'	204 - 224
11	CATG003 66024974 - 66025174	5'-ACCACAGAGCTGAGGCCT-3'	5'-AGCAAGTCTGCCTTGGAGAGG-3'	188 - 200
12	17msm 66081379 - 66081581	5'-ATGACCCCTGGTCACTATGG-3'	5'-CCCATGTGCTTCAGGGAAGAT-3'	184 - 202
13	D16S3107 66215715 - 66216019	5'-CCAGAGTGATGGGGAATA-3'	5'-TGAGCACTGTCTCAAAAAA-3'	290 - 304
14	D16S3085 66225096 - 66225302	5'-GCTATGACCCGACCACTG-3'	5'-CGGAAATGGACCCCTTG-3'	200 - 206
15	AAT01 66588293 - 66588532	5'-CGAATCACAGACACCCAC-3'	5'-CAGAGATTGCAGTGAGCCAA-3'	224 - 239
16	GGAA01 66601419 - 66601639	5'-GCCTAGGCAACATACTAAGA-3'	5'-GCCCTCTAACTCCTGGTTT-3'	192 - 220
17	D16S3025 67123897 - 67124008	5'-TCCATTGGACTTATAACCATG-3'	5'-AGCTGAGAGACATCTGGG-3'	101 - 111
18	CTTT01 67334584 - 67334848	5'-GCCCCAGATACGCCAGAG-3'	5'-CCTCTCTACACTCCAGCCT-3'	226 - 264
19	D16S496 67506219 - 67506439	5'-GAAAGGCTACTTCATAGATGGCAAT-3'	5'-ATAAGCCACTGCGCCCAT-3'	208 - 220
20	D16S3141 67663582 - 67663846	5'-GGCGTTCAGATTCTTTATCA-3'	5'-AAGCCTCAGTNTTGTGTGT-3'	242 - 264
21	D16S3067 67666169 - 67666321	5'-GCCACCTCAGCTAGCCTG-3'	5'-TCACTCAAAATGGAGTCACTCTG-3'	138 - 152
22	GT01 67870229 - 67870422	5'-GGGCACTAAGGACACTTCTT-3'	5'-GGCTCTGTATCCATGTTATG-3'	177 - 193
23	D16S3095 68503731 - 68503891	5'-TCAGTTGGAAGATGAGTTGG-3'	5'-TATAGTTTGTGTCCCCGAC-3'	152 - 160

16q-telomere

: データベースEnsemblでの位置を示した。

図 1

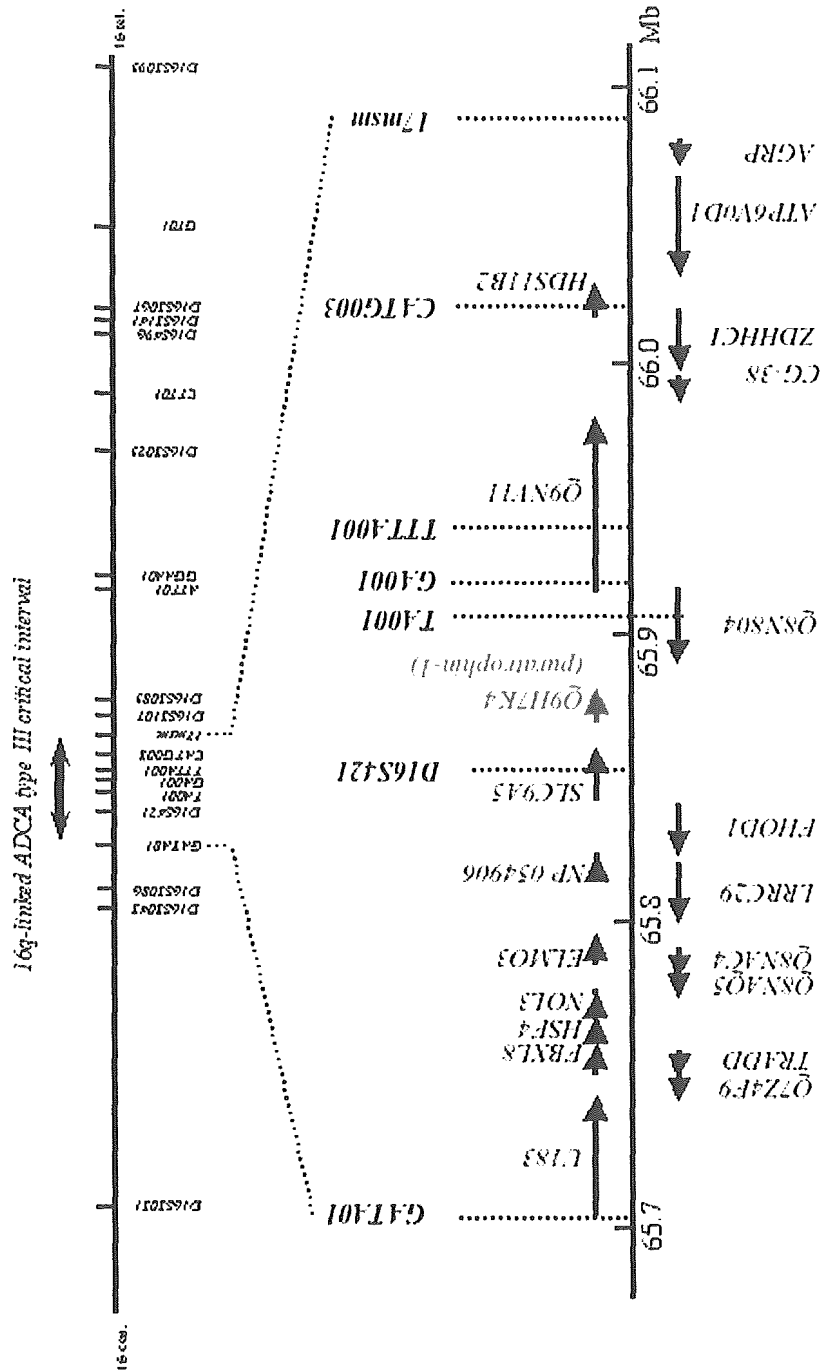
石川欽也ら
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
平成17年度研究報告書



puratrophin-1 遺伝子のシーケンス結果。上段は対照者、下段は患者。患者ではsense-strandでC/Tのヘテロ接合性の異常が見られる。

図2

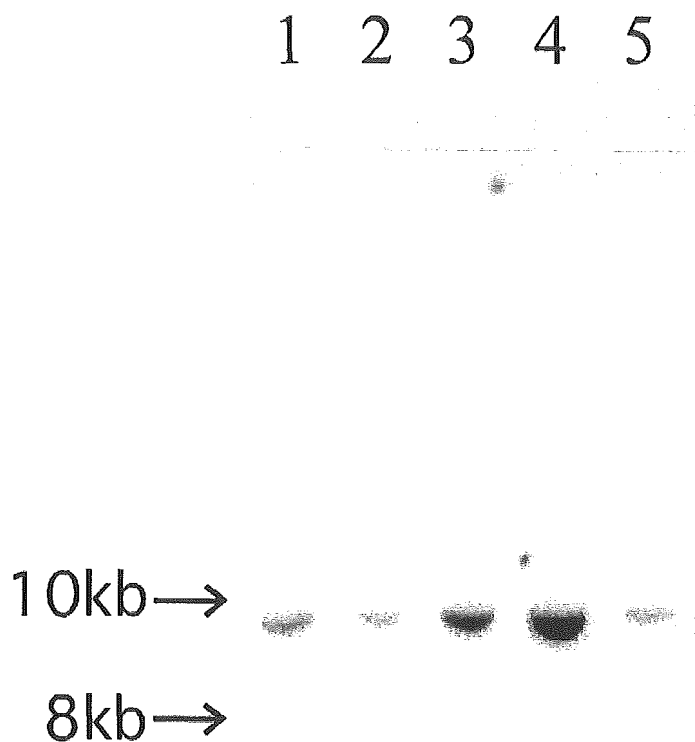
石川欽也ら
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
平成17年度研究報告書



16q-ADCA III候補領域のゲノム地図。GATA01から17msmまでの600kb領域には21個の異なる遺伝子が存在していた。Puratrophin-1は候補領域のほぼ中央に位置する。

図3

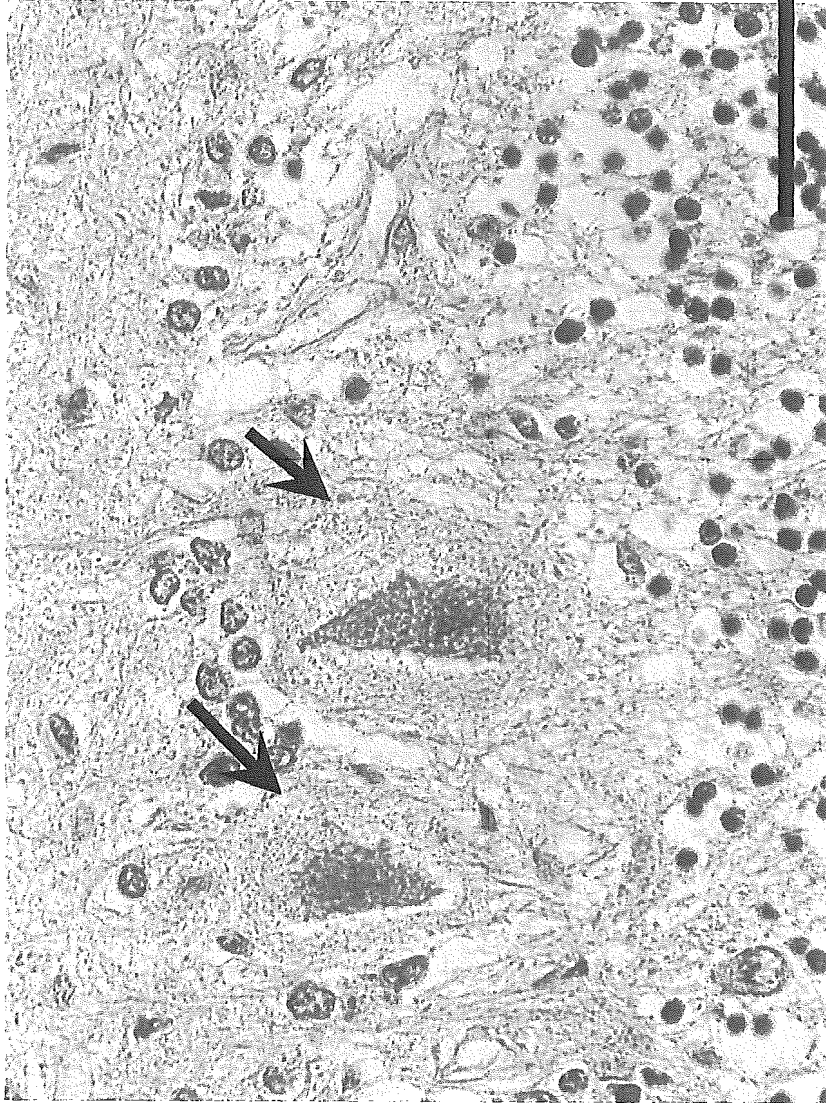
石川欽也ら
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
平成17年度研究報告書



ゲノムDNAのサザン・ブロット解析例。患者由来DNA(レーン1-3)と対照者由来DNA(レーン4, 5)で違いは見られない。

図4

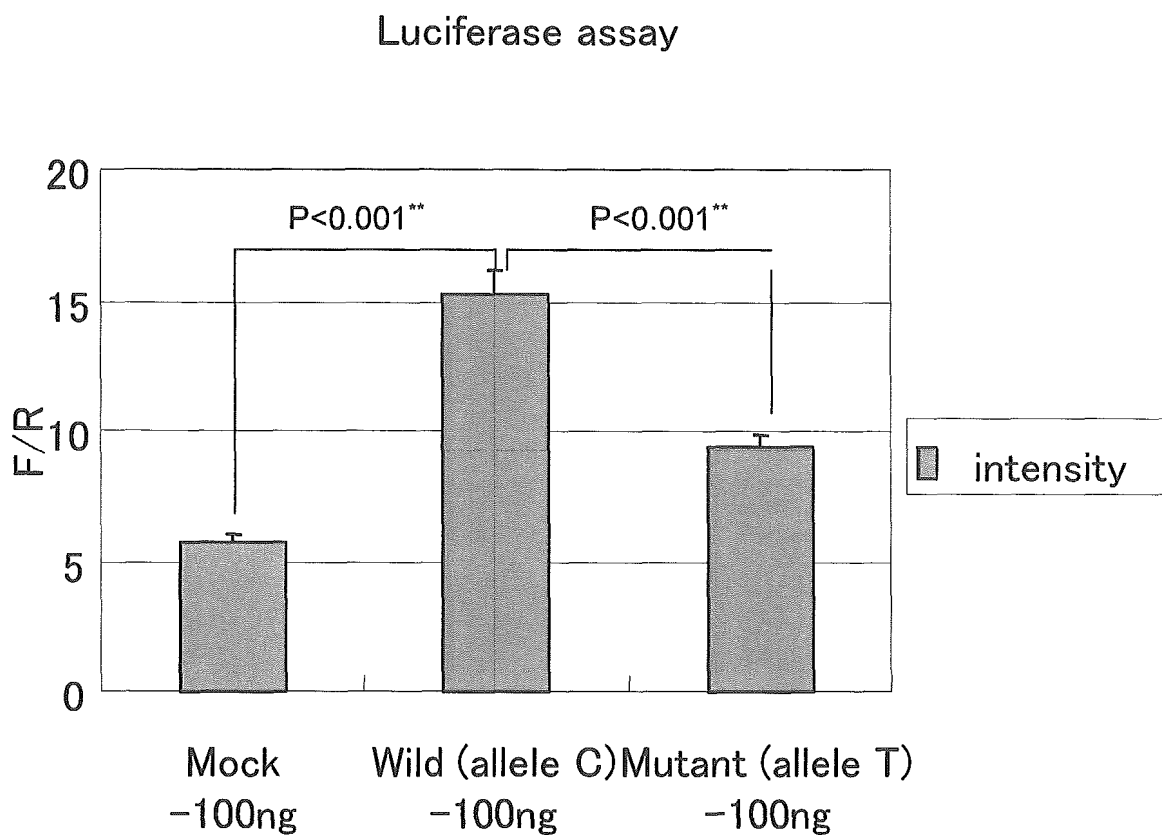
石川 欽也ら
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
平成17年度研究報告書



16q-ADCA III患者小脳皮質組織のHematoxylin-eosin染色像。Purkinje細胞は細胞体が萎縮し、その周囲にはamorphousな構造物(→)が取り巻いている特異な像を認めた。スケールは50マイクロメートル。

図5

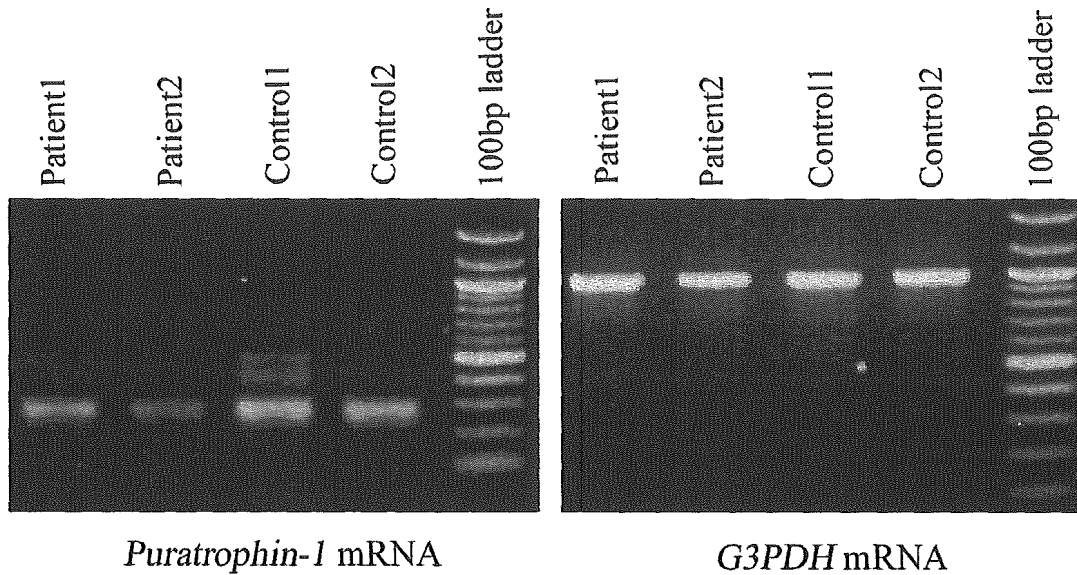
石川欽也ら
 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
 平成17年度研究報告書



puratrophin-1 遺伝子の部分5'-UTR断片を挿入したコンストラクトでのluciferase assay。同断片を有さないmockベクターに比べて、正常断片(野生型)では確かに転写活性が上昇している。一方、T alleleを有するmutant型ベクターでは、有意に転写活性が低下している。

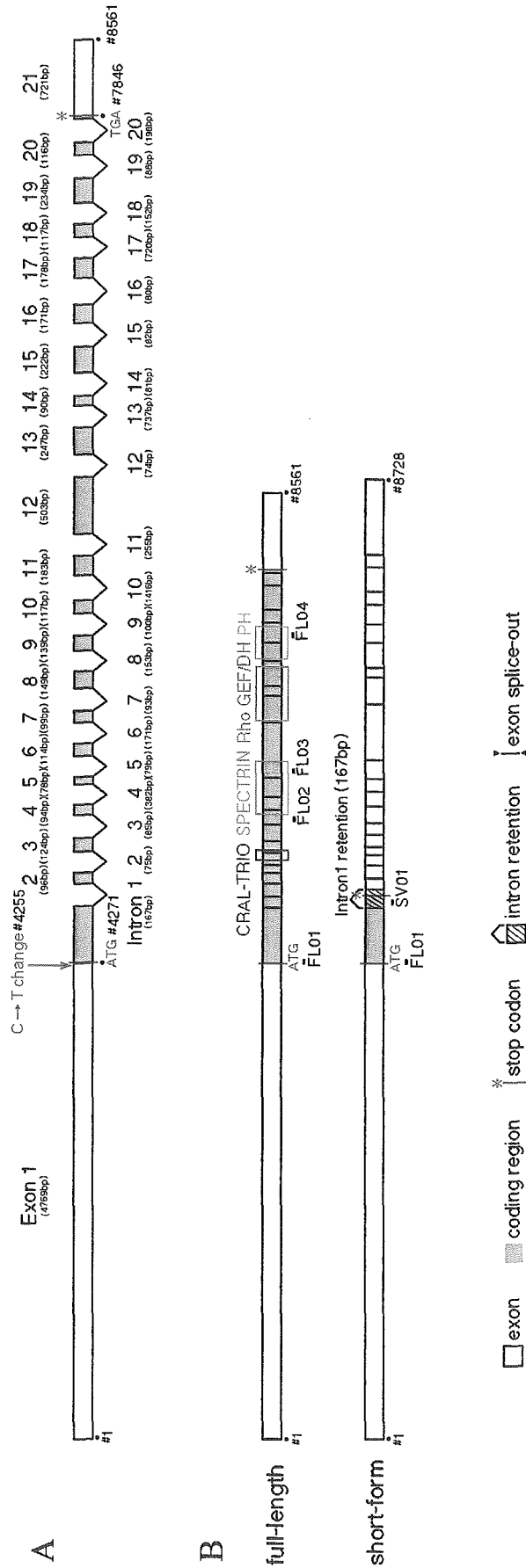
図6

石川欽也ら
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
平成17年度研究報告書



対照(control)および患者(patient)脳における*puratrophin-1* 遺伝子のRT-PCR解析。G3PDH mRNAを用いて相対的に定量すると、患者(n=2)では*puratrophin-1* mRNA量が低下しているがごとく観察された。

図 7



puratrophin-1 遺伝子の構造。A: ゲノム構造。B: mRNAの構造。本遺伝子は21個のエクソンよりなると考えられた(A)。mRNAでは、2つの代表的な転写産物があり、全長型(full-length)ではCRAL-TRIO、spectrin、Rho guanine-nucleotide exchange factor (GEF)、PH (plectrin homology)のドメインを有する蛋白であることが想定された(B)。各抗体の認識部位をFL01～FL04、SV01に示した。