

非翻訳領域リピート伸長による運動失調症の分子病態・リピート不安定性解析

業務担当責任者：松浦 徹 自治医科大学内科学講座神経内科学部門,

研究協力者：黒崎 辰昭^{1),2)}、山下喜洋¹⁾、大野欽司¹⁾、Partha S. Sarkar³⁾

1) 名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学,

2) Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, 3) Department of Neurology and

Neuroscience and Cell Biology, University of Texas Medical Branch

研究要旨

脊髄小脳失調症 10 型 (SCA10) の原因遺伝子変異は 22q13.3 上の *ATXN10* イントロン 9 に存在する ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である (280~4500 リピート)。筋強直性ジストロフィーで明らかにされたように、RNA レベルで伸長 AUUCU リピートが SCA10 分子病態に寄与しているものと考えられており、SCA10 患者由来リンパ芽球の AUUCU 核内凝集体の存在は既に示されている。本研究では、AUUCU 凝集体の核内局在について解析を加え、傍核小体との共局在を認めた。また、伸長 AUUCU リピート結合タンパクの検索を行い、4 種の核タンパクを同定した。これらのタンパクはいずれも AUUCU 凝集体との共局在を認めた。その中の 1 つである PTBP1 においては、そのスプライシング因子としての機能障害を生じていた。更に、SCA10 剖検脳組織を用いて、これらの分子病態を確認した。

A. 研究目的

SCA10 の原因遺伝子変異は 22q13.3 上の *ATXN10* イントロン 9 に存在する ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である (280~4500 リピート)。この非翻訳領域リピート伸長が、何故どのように優性遺伝様式で病気を発症させるのかは十分に解明されていない。同じく非翻訳領域に CTG/CCTG リピート異常伸長をもつ筋強直性ジストロフィー (DM) の RNA 病態が明らかになってきた。すなわち、伸長 CTG リピートが RNA に転写され、CUG 転写物とその結合蛋白と核内凝集体 (foci) を作ることがトリガーとなり、核内 RNA 蛋白制御不全をもたらすというもので

ある。SCA10 においても ATTCT 伸長リピートが RNA レベルで転写され、AUUCU foci を形成することを既に示されている。そこで、本研究の目的は 1) AUUCU foci の核内局在を明らかにすること、2) AUUCU 結合タンパクを同定し、3) その機能不全を解析することで、SCA10 RNA 病態を明らかにすることにある。

B. 研究方法

1) AUUCU foci 核内局在の解析

SCA10 リンパ芽球を用いて RNA-FISH で核内 AUUCU foci 検出後、その核内局在をより明らかにするために免疫蛍光法 (IF) を組

み合わせ、核膜(抗 Lamin B1 抗体)、核小体(抗 nucleolin 抗体)、PML 小体(抗 PML 抗体)、Cajal 小体(抗 Coilin 抗体)、スペクル(抗 SC35 抗体)、傍核小体(抗 CUGBP1 抗体)等との共局在を FISH-IF により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2) AUUCU 結合タンパク同定

ヒトリンパ芽球と神経芽腫細胞から核抽出物を精製し、AUUCU-pull down 法で質量分析により同定した。更にウエスタン法(WB)で確認した。

3) SCA10 細胞における AUUCU 結合因子の発現解析

SCA10 リンパ芽球を用いて、2) で同定された AUUCU 結合タンパクと AUUCU 封入体との共局在を FISH-IF で検討した。更にそれらの発現量・スプライシングパターンを WB と RT-PCR でそれぞれ対照と比較検討した。さらに、その機能異常を検討した。

4) SCA10 剖検例での検討

SCA10 剖検例を用いて、AUUCU foci を検出し、2) で同定された AUUCU 結合タンパクの機能不全を実際の患者脳組織(大脳・小脳)を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って行った。

C. 研究結果

D. 考察

E. 結論

1) AUUCU 封入体は傍核小体に局在していた。疾患コントロールとして筋強直性ジストロフィー 1 型・2 型(DM1、DM2)の CUG、CCUG 封入体等はその局在が異なった。

2) AUUCU 結合タンパクとして MATRN3、PSF、p54nrb、PTBP1 の 4 種を確認した。

3) FISH-IF の結果、SCA10 リンパ芽球に

おいて上記の 4 因子は、AUUCU foci と共局在していた。SCA10 リンパ芽球の核抽出物を用いた WB 法では、対照と比較して発現レベルに差を認めなかった。しかしながら、PTBP1 がスプライシング調節している遺伝子のスプライシング異常が生じて、そのタンパクの発現が著明に上昇していた。

4) SCA10 剖検例において、核内 AUUCU foci を認めた。PTBP1 との共局在を確認し、PTBP1 の機能不全による異常スプライシングを、リンパ芽球と同様に確認した。

[参考文献]

1. Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Alu-mediated acquisition of unstable ATTCT pentanucleotide repeats in the human *ATXN10* gene. **Mol Biol Evol** 2009;26;2573-2579.
2. Hagerman KA, Ruan H, Edamura KN, Matsuura T, Pearson CE, Wang YH. The ATTCT repeats of spinocerebellar ataxia type 10 display strong nucleosome assembly which is enhanced by repeat interruptions. **Gene** 2009;434;29-34.
3. Almeida T, Alonso I, Martins S, Ramos EM, Azevedo L, Ohno K, Amorim A, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB, Matsuura T, Sequeiros J, Silveira I. Ancestral origin of the ATTCT repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10). **PLoS One** 2009; 4;e4553.
4. #Kobayashi H, #Abe K, #Matsuura T (#equally contributed), Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Yang LW, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes a type of spinocerebellar ataxia (SCA36) accompanied by motor neuron involvement. **Am J Hum Genet**

2011; 89;121-130.

5. Xia G, McFarland KN, Wang K, Sarkar PS, Yachnis AT, Ashizawa T. Purkinje cell loss is the major brain pathology of spinocerebellar ataxia type 10. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2013; 84:1409-1411.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Kameda T, Namekawa M, Shimazaki H, Minakata D, Matsuura T, Nakano I. Unique combination of hyperintense vessel sign on initial FLAIR and delayed vasoconstriction on MRA in reversible cerebral vasoconstriction syndrome: case report. **Cephalalgia** 2014;34;1093-6
- 2) Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T* (*corresponding author). Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. **J Hum Genet** 2014;59;129-33.
- 3) Sato K, Morimoto N, Deguchi K, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Seven amyotrophic lateral sclerosis patients diagnosed only after development of respiratory failure. **J Clin Neurosci** 2014;218;1341-3.
- 4) Yamashita Y#, Tohru Matsuura# *

(#equally contributed, *corresponding author), Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita T, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. **Neurobiol Dis** 2014;69;200-5.

- 5) Gao R, Liu Y, Silva-Fernandes A, Fang X, Paulucci-Holthauzen A, Chatterjee A, Zhang HL, Matsuura T, Choudhary S, Ashizawa T, Koeppen AH, Maciel P, Hazra TK, Sarkar PS. Inactivation of PNKP by mutant ATXN3 triggers apoptosis by activating the DNA damage response pathway in SCA3. **PLoS Genet** 2015;11:e1004834.

2. 学会発表

松浦 徹「筋強直性ジストロフィーの分子病態～治療」.日本遺伝カウンセリング学会主催第6回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー . 大阪、2015年1月10日 .

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし