

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591255

研究課題名(和文) 脊髄小脳失調症31型のRNA病因説に対するプロテオーム解析

研究課題名(英文) Proteome analysis for spinocerebellar ataxia type 31

研究代表者

吉田 邦広 (YOSHIDA, Kunihiro)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：90242693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症31型(SCA31)患者2名の剖検脳の神経病理学的な検討により特徴的なhalo構造を有するプルキンエ細胞では核の変形、Golgi装置の断片化が高率に起きていることを見出した。また、SCA31のRNA病因説に基づき、ビオチンラベルした(UGGAA)₈プローブを用いて、(UGGAA)_nに結合する蛋白の同定を試みた。この結果、1つの候補蛋白としてミトコンドリア内膜に局在する蛋白を同定した。これが今回の実験条件下でのfalse positiveであるのか、SCA31小脳の病的変性過程で有意な現象なのかを現在、検証している。

研究成果の概要(英文)：We performed neuropathological examinations on two autopsied brains from patients with spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31). We found there were two degenerating pathways of Purkinje cells with or without halo-like structures. In Purkinje cells with halo-like structures, the nuclear deformity and fragmentation of the Golgi apparatus were more frequently observed than in those without halo-like structures.

Using biotin-labeled (UGGAA)_n probe, we tried to identify proteins that bound to pre-messenger RNA with abnormally expanded (UGGAA) repeat in SCA31 brains. As a result, a protein identified in our experiments was a mitochondrial inner membrane protein. This might be false positive, but based on neuropathological observations, it is possible that abnormal pre-messenger RNA could pass through fragile nuclear membrane and interact with proteins involving cytoplasmic organelles in SCA31.

研究分野：脊髄小脳変性症

キーワード：脊髄小脳失調症31型 プルキンエ細胞 Golgi装置断片化 RNA結合蛋白

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) は常染色体優性遺伝性の失調症であり、本邦に多い病型である。特に長野県は国内他地域と比べてもその頻度が高く (常染色体優性遺伝性 SCA の約 42%)、申請者は従来から SCA31 の臨床的、分子遺伝学的な検討を行ってきた (Ohata T, et al. *J Hum Genet* 51: 461-466, 2006; Yoshida K, et al. *Cerebellum* 8: 46-51, 2009; Sakai H, et al. *Neurogenetics* 11: 409-415, 2010)。また 2011 年から SCA31 の自然史調査 (5 年間の前向き調査) も進めてきた。

SCA31 の遺伝子異常は第 16 番染色体長腕に局在する双方向性の *BEAN/TK2* 遺伝子が共有するイントロンへの (TGGAA)_n の挿入変異と考えられる (Sato N, et al. *Am J Hum Genet* 85: 1-14, 2009)。その発症機序としては、過剰に伸長した (UGGAA)_n を有する pre-messenger RNA が種々の核内蛋白と相互作用をすることにより新たな細胞毒性を獲得するものと想定されている (RNA 病因説)。

また、申請時点で日本人患者 3 名の神経病理学的所見が報告されており、SCA31 では変性した小脳プルキンエ細胞の周囲に細胞を取り巻くような構造物 (halo 構造) が見られることが特徴的とされていた。

ただし、研究開始時点では、まだ剖検例も少なく、発症機序、分子病態に関しては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

SCA31 における小脳プルキンエ細胞変性の発症機序、分子病態を解明することを目的とした。まず SCA31 の RNA 病因説に基づいて、(UGGAA)_n に結合する蛋白の同定を試みた。また、SCA31 の小脳プルキンエ細胞変性過程について神経病理学的に検討した。

3. 研究の方法

(1) ビオチンでラベルした (UGGAA)₈ プロープを用いて、マウス脳ホモジネートを試料として Dynabeads-M280 により pull down 法を行った。分画 (上清画分、沈渣画分) は既報 (Jin P, et al. *Neuron* 55: 556-564, 2007) に従って行った。Dynabeads 回収時にプロープ(-)を陰性コントロールとした。回収した蛋白試料を電気泳動し、銀染色した。プロープ(+)試料に特異的に見られるバンドを切り出して、LC-MS/MS 解析を行い、蛋白を同定した。同定した蛋白の抗体を用いて、上記の試料の western blot を行い、試料中に当該蛋白が含まれることを確認した。

(2) 神経病理学的解析には 2 名の剖検脳を用いた。ホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して、各種の抗体を用いた免疫染色、二重免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) Dynabeads-M280 で回収した蛋白試料の電気泳動では、プロープ(+)の沈渣画分にてい

くつか陰性コントロールには見られないバンドが確認できた。これらを切り出して LC-MS/MS 解析を行ったところ、多数の候補蛋白が見出された。これらのうち最終的に western blot でプロープ(+)レーンのみに確認できたのは、一つであった。これはミトコンドリア内膜に局在する蛋白であった。

(2) 変性プルキンエ細胞には、特徴的な細胞周囲の halo 構造を有する細胞と有しない細胞が観察された。この 2 つの変性過程は患者ごとにその割合が異なっていた。以前から報告されているように halo 構造はプルキンエ細胞体からの突起 (somatic sprouting) とシナプトフィジン陽性顆粒から構成されており、少量のアストロサイトの突起が混在していた。halo 構造を有するプルキンエ細胞では扁平化して引き伸ばされたような核の変形が目立った。また、抗 trans-Golgi network protein 2 (TGOLN2) 抗体を用いて Golgi 装置の断片化を検討したが、halo 構造を有するプルキンエ細胞では halo 構造を有さない細胞に比べて、有意に高頻度に Golgi 装置の断片化が起きていた。

予測に反して、(UGGAA)_n に結合する蛋白として、ミトコンドリア蛋白が同定された。用いた脳ホモジネートの分画ではミトコンドリアは沈渣画分に回収される。実験条件により本来なら (UGGAA)₈ に結合するはずの蛋白を逃している可能性はあるが、確認のための western blot ではプロープ(-)の沈渣画分、およびプロープ(+)(-)の上清画分には明らかなバンドが見られなかったことから、少なくとも非特異的に拾えたものとは考えにくい。

本来なら pre-messenger RNA は核内蛋白との相互作用が想定される。実際に SCA31 脳では異常伸長した (UGGAA)_n が核内に RNA foci を形成することが報告されている (Niimi Y, et al. *Neuropathology* 2013; 33, 600-611)。ただ、今回の結果は、核内の RNA foci 形成とは別の病態機序として、核内処理を免れた (UGGAA)_n 断片が脆弱化した核膜を抜けて細胞質内でさまざま細胞内小器官と会合するという可能性を示唆するものかも知れない。

SCA31 では他の脊髄小脳変性症で一般的に見られる小脳プルキンエ細胞の萎縮・消失という変性過程に加えて、顕著な somatic sprouting により胞体周囲に halo 構造を形成するという変性過程が見られることが特徴である。後者は局所的な細胞構成成分の異常増殖とも考えられ、何らかの細胞質内・細胞膜蛋白の機能異常があるのではと推察される。核内での異常 RNA の存在と過剰な somatic sprouting をつなぐ分子を解明することが SCA31 の発症機序、分子病態の理解には不可欠と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Yabe I, Matsushima M, Yoshida K, Ishikawa K, Shirai S, Takahashi I, Sasaki H. Rare frequency of downbeat positioning nystagmus in spinocerebellar ataxia type 31. *J Neurol Sci* 350 (1-2): 90-92, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2014.12.042> 査読有
2. Yahikozawa H, Yoshida K, Shunichi S, Hanyu N, Doi H, Miyatake S, Matsumoto N. Predominant cerebellar phenotype in spastic paraplegia 7 (SPG7). *Hum Genome Variat* 2: 15012, 2015. DOI:10.1038/hgv.2015.12 査読有
3. Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Yuzawa FY, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous *DDHD2* mutation. *Sci Rep* 4: 7132, 2014. DOI: 10.1038/srep07132 査読有
4. Yoshida K, Miyatake S, Kinoshita T, Doi H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. 'Cortical cerebellar atrophy' dwindles away in the era of next-generation sequencing. *J Hum Genet* 59: 589-590, 2014. DOI:10.1038/jhg.2014.75 査読有
5. Yoshida K, Asakawa M, Suzuki-Kouyama E, Tabata K, Shintaku M, Ikeda S, Oyanagi K. Distinctive features of degenerating Purkinje cells in spinocerebellar ataxia type 31. *Neuropathology* 34: 261-267, 2014. DOI:10.1111/neup.12090 査読有
6. 吉田邦広. 皮質性小脳萎縮症(CCA)(脊髄小脳変性症(SCD)のUp-To-Date). **新医学** 67(5): 1071-1076, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 吉田邦広, 浅川美果, 鈴木 - 香山絵美, 田畑賢一, 新宅雅幸, 池田修一, 小柳清

光. 脊髄小脳失調症 31 型の小脳プルキンエ細胞の形態変化とゴルジ装置断片化の検討. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会. 2014.6.6, 東京(学術総合センター).

2. 中村勝哉, 吉田邦広, 清水雄策, 兼子一真, 佐藤俊一, 矢彦沢裕之, 森田洋, 大原慎司, 矢沢正信, 牛山雅夫, 佐藤充人, 宮崎大吾, 井上敦, 池田修一. 脊髄小脳失調症 31 型の自然史. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014. 5. 22, 福岡(福岡国際会議場, 福岡サンパレス, 福岡国際センター).
3. 中村勝哉, 吉田邦広, 宮崎大吾, 兼子一真, 清水雄策, 佐藤俊一, 矢彦沢裕之, 森田洋, 大原慎司, 矢沢正信, 牛山雅夫, 池田修一. 脊髄小脳失調症 31 型の自然史 —多施設共同前向き調査—. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013. 5. 29, 東京(東京国際フォーラム).
4. 吉田邦広, 浅川美果, 鈴木絵美, 田畑賢一, 新宅雅幸, 池田修一, 小柳清. 脊髄小脳失調症 31 型小脳病変の神経病理学的再検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013. 5. 29, 東京(東京国際フォーラム).
5. 吉田邦広, 鈴木佳代, 石川えり, 小柳清, 池田修一. 脊髄小脳失調症 31 型における(TGGAA)_n・(UGGAA)_n結合蛋白の探索. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012. 5. 25, 東京(東京国際フォーラム).

〔図書〕(計 1 件)

1. 吉田邦広. 孤発性皮質性小脳萎縮症. 神経症候群(第 2 版)—その他の神経疾患を含めて—II III 変性疾患(脊髄小脳変性症, 孤発性脊髄小脳変性症)〔新領域別症候群シリーズ No.27〕pp336-340, 日本臨牀, 東京, 2014.

6. 研究組織
(1)研究代表者

吉田 邦広 (YOSHIDA, Kunihiro)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号：90242693

(2)研究分担者

小柳 清光 (OYANAGI, Kiyomitsu)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号：00134958