

## <シンポジウム 16—5>神経疾患と RNA

### SCA31 (脊髄小脳失調症 31 型)

石川 欽也<sup>1)</sup> 佐藤 望<sup>1)</sup> 新美 祐介<sup>1)</sup> 網野 猛志<sup>1)2)</sup> 水澤 英洋<sup>1)</sup>

(臨床神経 2010;50:985-987)

Key words : SCA31, 挿入変異, 5塩基リピート, RNA

#### はじめに

脊髄小脳失調症 (SCA) は, 優性遺伝型脊髄小脳変性症の別名として使われ, 多数の病型があることがわかっている。われわれは 16 番染色体長腕 16q22.1 に連鎖する SCA の存在を 2000 年に明らかにし<sup>1)</sup>, その原因遺伝子同定に取り組んできた。遂に 2009 年にその原因を発見し, 新しく「SCA31」の病名を与えられた<sup>2)</sup>。この疾患は日本で頻度が高く重要なだけでなく, 異常な RNA が関与する新しい分子病態の一つを示唆するという点で重要と思われるここに報告する。

#### 1. SCA31 の臨床および神経病理学的特徴

この疾患は, 2000 年に 16 番染色体長腕に連鎖する家系としてその存在が発見された<sup>1)</sup>。2005 年にはそれに強く連鎖する遺伝子変化 *puratrophin-1* 遺伝子の-16C<T<sup>3)</sup>をみいだしたことにより, 本邦での頻度や臨床的特徴が明らかになった。まず臨床的には 50~60 歳代に平均を持つ, 比較的高齢発症の純粋小脳型の SCA である<sup>1)2)4)~6)</sup>。頻度はわれわれの施設では全 SCA の内 30% を占めるほど高頻度であり, 他の施設でも地域によって様々であるが, 10%~50% と比較的高頻度で日本全国に存在する病型である<sup>2)4)~6)</sup>。神経病理学的には, Purkinje 細胞の細胞体の周囲にエオジン好性の構造物がみられること

が特徴で, この所見で神経病理学的な診断が可能である<sup>7)</sup>。この構造物は Purkinje 細胞の細胞体から出た突起と, 何らかの神経細胞から来る神経前終末の増加で形成されている。

#### 2. SCA31 遺伝子変異の特徴と臨床遺伝学的所見

SCA31 は創始者効果が非常に強く, 遺伝子変異に近づくほど家系がことなっても同じハプロタイプを示す現象がある。実はこれが遺伝子単離を難しくし, 遺伝子が存在すると断定した 900 キロベース (kb) 領域については, いくつもの変異の候補が発見されてしまった。このため, われわれは患者の全 900kb ゲノム領域をショットガンシーケンス法で解読する手段と, 染色体挿入や欠失などシーケンス法では見逃しうる変異をサザンブロット法などで網羅的に解析する手段の 2 つを敢行した。また, 患者家系の集積もふくめたところ, 運よくまれな組み換えを有する患者に遭遇したことも手伝い, 最終的に 2 つの遺伝子変異に候補を絞ることができた。1 つは, TK2 (thymidine kinase 2) 遺伝子のイントロン奥深い 1 塩基置換であり, 連鎖不平衡マーカーであると判定した。残る一つが, 約 3kb 程度の挿入配列で, 結局これが遺伝子変異であると断定した。

この遺伝子変異は, 先にあげた創始者効果にもかかわらず家系間で大きさが 2.8~3.5kb と変化していた。その長さや発症年齢の関係を調査すると, 長いほど発症年齢が若くなる傾

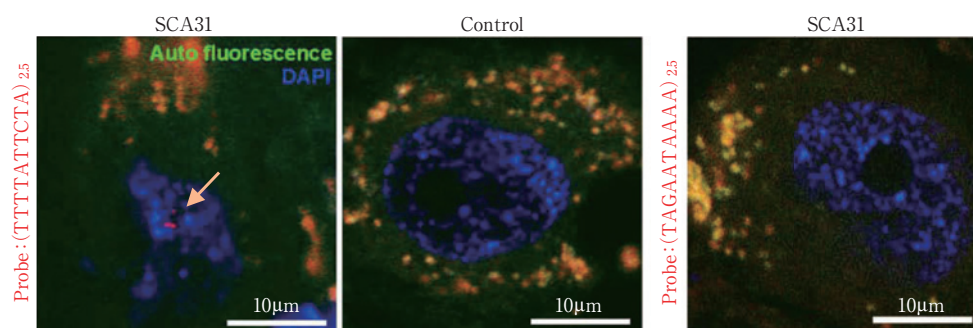


Fig. 1 SCA31 患者での RNA foci.

SCA31 の Purkinje 細胞に, BEAN 型転写産物を検出する probe (TTTTATTCTA)<sub>25</sub> を用いたときのみ, 矢印のように foci がみられる。(文献 2 を転載し, 改変).

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 [〒113-8519 東京都文京区湯島 1—5—45]

<sup>2)</sup> 現 日本赤十字社武蔵野赤十字病院神経内科

(受付日: 2010 年 5 月 22 日)

向が証明され、病的関与が示唆された。その変異を詳細に解析してみると、挿入変異は (TAAAA)<sub>n</sub>、(TAGAA)<sub>n</sub>、(TGGAA)<sub>n</sub> などのことなる 5 塩基くりかえし配列の複合体で形成されていること、健常者ではその挿入は無いものの、ごくまれ(0.2%程度)に (TAAAA)<sub>n</sub>、(TAGAA)<sub>n</sub> で構成される挿入を有することもあることをみいだした。逆に、患者では (TGGAA)<sub>n</sub> は必ず存在し、この長さは 1kb 以上とかなり長いので、この配列の存在が SCA31 の発症に重要であろうと推定している。

この挿入配列は発見当初、データベースでは遺伝子 (BEAN : brain expressed associated with NEDD4) と遺伝子 TK2 の間の狭間に存在すると示唆された。しかし、われわれで詳細な発現解析をおこなってみると、これら 2 つの遺伝子にはそれぞれ下流エクソンが実は存在しているために、挿入配列は両遺伝子がイントロンとして共有する部分に挿入されていることが判明した。BEAN と TK2 は逆方向に転写されるまったく別の遺伝子であるため、挿入変異は両方向に (bi-directional) に転写されていることが示唆された。興味深いことに、TK2 は脳をふくむ様々な組織で発現しているが、BEAN は脳内の神経細胞でだけ発現する。

### 3. 病態について : 機能獲得型 RNA 仮説

それでは、どのように挿入変異が病気をおこすのであろうか? イントロン内の遺伝子挿入としてはもっとも一般的な機序としては、BEAN や TK2 遺伝子のスプライシングや発現量の異常がおきることである。しかし患者剖検脳組織などをもちいて解析したが、そのいずれも否定的であった。

ここで、筋強直性ジストロフィー (DM1, DM2) あるいは SCA 8, SCA 10, fragile X-tremor ataxia syndrome (FXTAS) などで提唱されている「機能獲得型 RNA 仮説」<sup>8)</sup> を紹介したい。これらの疾患は、いずれも 3~5 塩基のくりかえし配列が非翻訳 RNA として発現し、RNA 凝集体 (RNA foci) を形成する。その foci に様々な splice 因子が隔離・没収 (sequester) されることによって、splicing の異常をきたす、という重要な機序である。たとえば、DM1 においては異常に伸長した CTG くりかえし配列は、異常に長い CUG くりかえし配列に転写され、筋細胞核などで RNA foci を形成する。この foci には CUG に結合する muscle bind-like 1 (MBNL1) が結合して細胞内では隔離されるため、結果として本来機能するはずの Cl チャンネル遺伝子の splicing に異常が生じ、異常な Cl チャンネルが産生されるために、膜の異常からミオトニア現象が出現する<sup>8)</sup>。

SCA31 では 2 つの方向に TGGAA などの 5 塩基が転写される。いずれの方向にもプローブを作製して患者脳で検索したところ、BEAN 方向の転写産物のばあいには RNA foci が発見された (Fig. 1)。さらに、TGGAA の転写産物である UG-

GAA 配列に結合する蛋白を探索したところ、何と splice 因子である SFRS1 と SFRS9 が同定された。実は SFRS1 は様々な mRNA の合成や細胞内輸送などを司る重要な splice 因子で<sup>9)</sup>、欠損させると生物は生まれえないことや、発生後に欠損させても臓器に重大な異常をきたすことが知られている<sup>10)</sup>。もし SCA31 の Purkinje 細胞で SFRS1 が隔離されるのであれば、DM1 などで提唱される仮説と類似する機序が充分想定されるといえる。今後はモデル動物の作製やその解析から、病態を阻止できる手段を開発することによって、疾患の根本的治療を目指してゆきたい。

### 文 献

- 1) Nagaoka U\*, Takashima M\*, Ishikawa K\*, et al. A gene on SCA4 locus causes dominantly inherited pure cerebellar ataxia. *Neurology* 2000;54:1971-1975. (\*: equal contribution).
- 2) Sato N\*, Amino T\*, Kobayashi K, et al. Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" pentanucleotide repeats containing (TGGAA)<sub>n</sub>. *Am J Hum Genet* 2009;85:544-557. (\*: equal contribution).
- 3) Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, et al. 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 domains. *Am J Hum Genet* 2005;77:280-296.
- 4) Ohata T, Yoshida K, Sakai H, et al. A-16C>T substitution in the 5' UTR of the *puratrophin-1* gene is prevalent in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano. *J Hum Genet* 2006;51:461-466.
- 5) Ouyang Y, Sakoe K, Shimazaki H, et al. 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia: a clinical and genetic study. *J Neurol Sci* 2006;247:180-186.
- 6) Onodera Y, Aoki M, Mizuno H, et al. Clinical features of chromosome 16q22.1 linked autosomal dominant cerebellar ataxia in Japanese. *Neurology* 2006;67:1300-1302.
- 7) Owada K, Ishikawa K, Toru S, et al. A clinical, genetic, and neuropathologic study in a family with 16q-linked ADCA type III. *Neurology* 2005;65:629-632.
- 8) Ranum LP, Cooper TA. RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:259-277.
- 9) Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell* 2009;136:777-793.
- 10) Xu X, Yang D, Ding JH, et al. ASF/SF2-regulated CaMKIIdelta alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Cell* 2005;120:59-72.

**Abstract****Spinocerebellar ataxia type 31**Kinya Ishikawa, M.D.<sup>1)</sup>, Nozomu Sato, M.D.<sup>1)</sup>, Yusuke Niimi, M.D.<sup>1)</sup>,Takeshi Amino, M.D.<sup>1)2)</sup> and Hidehiro Mizusawa, M.D.<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University<sup>2)</sup>Present Address: Department of Neurology, Musashino Red Cross Hospital

Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) is a relatively common degenerative ataxia in Japan. We recently discovered SCA31 mutation as a complex pentanucleotide repeat containing (TAAAA)<sub>n</sub>, (TAGAA)<sub>n</sub>, and (TGGAA)<sub>n</sub>. The size of this repeat ranged from 2.8 to 3.5 kilo-base pairs (kb). Among these repeats, (TGGAA)<sub>n</sub> repeat appears crucial for SCA31 pathogenesis. The length of this complex repeat inversely correlated with ages of onset in patients. The mutation lies in an intron shared by two different genes, *BEAN* (brain expressed, associated with NEDD4) and *TK2* (thymidine kinase 2), which are transcribed in opposite directions. Thus, the complex pentanucleotide sequence is predicted to be transcribed in both directions, but not necessarily translated into proteins. *In situ* hybridization analysis in patients' Purkinje cells demonstrated that pentanucleotide repeats transcribed in *BEAN* direction form RNA aggregates ("RNA foci"). We further found that splicing factors, SFRS1 and SFRS9, binds to (UGGAA)<sub>n</sub>, the transcript of (TGGAA)<sub>n</sub> *in vitro*. These findings may imply that SCA31 conforms to pathogenic mechanisms underlying non-coding repeat disorders, such as myotonic dystrophies (DM1 & DM2), and that SFRS1 and SFRS9 are involved in SCA31 pathogenesis.

(Clin Neurol 2010;50:985-987)

**Key words:** SCA31, insertion, pentanucleotide repeat, RNA