

論 文 要 旨

Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene

SEPNI 遺伝子変異に起因する rigid spine with muscular dystrophy type 1 の分子生物学的メカニズム

岡本 裕嗣

【序論および目的】

Rigid spine syndrome (RSS) は、脊椎関節拘縮、頸椎前屈制限を主徴とし、四肢体幹の筋萎縮、筋力低下を示す緩徐進行性のミオパチーである。しかし長い間、脊椎強直が他の先天性筋ジストロフィー(CMD) でもみられる非特異的な症状であるため独立した疾患とされていなかった。1997年 European Neuromuscular Center の第50回国際ワークショップにおいて、メロシン欠損症を伴わない CMD の中で出生後早期からの脊椎関節拘縮が特徴的な RSS が取り上げられ、改めて一つの疾患群として注目された。その後、原因遺伝子として *SEPNI* 遺伝子が同定され rigid spine with muscular dystrophy type 1 (RSMD 1) という単一疾患が抽出された。*SEPNI* 遺伝子は selenoprotein N という蛋白を作り出す、この蛋白の働きなどはまだ未解明の部分が多い。その後の研究で同蛋白が小胞体に関連した蛋白であることが推察されているが、生検体を用いた検討は行われていなかった。我々の施設において過去 20 年で 3 家系、3 症例が上記ワークショップの条件に該当し RSMD と診断した。そのうち 2 例は *SEPNI* 遺伝子に変異を伴い RSMD 1 と診断した。そこでこの 2 症例を用いて免疫組織学的検討を行い局在について検討すると共に、同遺伝子のもつ特異な蛋白翻訳機能に着目し、分子生物学的メカニズムについて検討した。

【対象および研究方法】

(症例 1) 41 歳男性。生下時異常なし。処女歩行は 3 歳。幼少時より頸部前屈制限と筋力低下。学童期も走ることや飛び上がることは困難であった。16 歳時に呼吸困難感が出現。24 歳時より気管切開を受けている。34 歳まで短距離ならつかまり歩行可能。

(症例 2) 31 歳女性。生下時異常なし。処女歩行 11 ヶ月。幼児期より徒競走が飛び抜けて遅く、自覚的にも筋力低下あり。学童時より脊柱前屈制限。12 歳から夜間に呼吸苦、起座呼吸が出現し、14 歳時に気管切開を施行した。躯幹筋の筋力低下を認めたが、四肢筋力は比較的に保たれ 30 歳までつかまり歩行可能。

上記 2 例は RSMD 1 に特徴的な経過で歩行可能な時期に気管切開を必要とするような呼吸筋傷害をきたすことは他の先天性ミオパチーにみられない経過である。

(遺伝子解析) NCBI のホームページより *SEPNI* 遺伝子の配列を同定し、Primer v3 プログラムを用いて各 exon に対してオリジナルのプライマーをデザインした。Applied Biosystems の ABI 377 sequencer および Sequencher sequence alignment program を用いて塩基配列を解析した。

(Real-time PCR) 全血より RNA を抽出し、RT-PCR 行い cDNA を作成。TaqMan Gene Expression Assay catalog (ABI) より exon 5-6, 12-13 領域のプライマー及び、プローブを選択し、ABI Prism 7700 Sequence Detector を用い、TaqMan system により Real-time PCR を行い半定量的に mRNA の発現量を検討した。

(免疫組織染色およびウエスタンブロッティング)

症例の生検筋を用いて一般的な組織化学的検討を行うと共に、我々は新たに selenoprotein N に対するポリクローナル抗体を作製し(Bio-synthesis)、この抗体を用いて免疫組織染色、ウエスタンブロッティングを行い正常筋および RSMD 1 筋における同蛋白の局在および発現について検討した。

【結果】

1) 症例 1 において *SEPN1* 遺伝子の exon 1 に 1₂insT のホモ接合体変異を認め、症例 2 において exon 1 に 80dup20, frameshift at R27 のホモ接合体変異を認めた(Fig. 1)。これらの変異はそれぞれの家系の両親および姉妹にはヘテロ接合体として存在し、連鎖していることを確認した。またこれらの変異はコントロール 100 chromosomes に認められないことを確認した。

2) 一般組織化学的染色では、筋線維の大小不同、変性、壊死線維の存在、結合織増加など非特異的ジストロフィー所見を認めた。selenoprotein N 抗体による免疫染色では、症例 1 において 40-50%の筋線維において染色性が低下し、染まりもまばらであった。またコントロール組織、症例 2 では細胞質にびまん性に存在する器官に局在しているようにみられた。これらの染色性の局在は対照として染色した小胞体蛋白 calnexin と類似していた(Fig. 2)。selenoprotein N 抗体を用いたウエスタンブロッティングでは症例 1 において、正常でみられるはずの 70 KDa にバンドはみられず 62-63 KDa にコントロールではみられないバンドを認めた。また症例 2 においてはコントロールに比較して数 Kda 短いバンドが認められた(Fig. 3,4)。

3) mRNA の発現をみるために real-time RT-PCR を行ったところ、exon 5-6, 12-13 両ターゲットにおいてコントロールに比較して症例 1, 2 共に発現量は低下しており、症例 1 に比較して症例 2 のほうがどちらのターゲットでも発現量が減少していた(Fig. 5)。

【考察】

本研究において、selenoprotein N 抗体を用いた染色により同蛋白が筋小胞体蛋白である可能性を生検筋組織にて明らかにした。今回検討した 2 症例に認められた変異部位は、これまでに報告されたことのない変異部位であった。また症例 1 は開始コドンそのものの変異であり、症例 2 は exon 1 における 20bp 重複であった(Fig. 1)。これらの変異は通常の遺伝子であれば、無効もしくは未熟な蛋白翻訳となり有効な蛋白発現が行われな可能性はある。組織染色では症例 1 で発現の異常が疑われたが、臨床的にはこの 2 症例に大きな差はない。これまでの同遺伝子の疾病原因とされる変異部位も他の疾患に比較し、我々の症例と同じような開始コドンの異常やフレームシフトを伴った変異が多くみられる。我々はこの事実は *SEPN1* 遺伝子そのものの特異性に起因するものであると考えた。selenoprotein N はシステインの硫黄原子が微量元素 Se (セレン) に代わったアミノ酸 Sec (セレノシステイン) を含有するタンパクであるが、本遺伝子の翻訳過程が特殊である。この遺伝子はヘアピン構造の Selenocystein insertion sequence (SECIS) を 3'末端領域に有することを特徴としている。この構造は遺伝子から mRNA に転写され、その後アミノ酸に翻訳される時に、通常はストップコドンとなりうる UGA コドンにセレノシステインを翻訳させるというリコーディングに重要な働きを示す。そこで我々は以下のような仮説を想定した。症例 1 においてはシミュレーション上当初の開始コドン以外に開始コドンになるうる配列が複数あり、中には Kozak 配列を含むものがある。その新たな開始コドンから翻訳が行われている可能性があると考えた。また症例 2 においては 20bp の重複によりフレームシフトとなり幾つかのストップコドンが出現することが予測される。しかし SECIS を伴ったシステムにより nonsense-mediated decay process (NMD) を免れ翻訳された短い蛋白が存在する可能性があると考えた(Fig. 6)。そこで mRNA の発現をみるために real-time RT-PCR を行ったところ、コントロールに比較して症例 1, 2 共に発現量は低下していた(Fig. 5)。この事実は疾病原因としての selenoprotein N の発現低下を確認したと共に、上記に示したようななんらかの分子生物学的メカニズムが働き完全欠損という形でない蛋白発現がおこったことを示しており、興味深い結果であった。今回の検討により、selenoprotein N 蛋白が筋小胞体関連蛋白である可能性や *SEPN1* 遺伝子の蛋白翻訳機能の特殊性が本疾患発現に関与していることが初めて示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 3 号	学位申請者	岡本裕嗣
審査委員	主査	佐野 輝	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小澤政之	副査 丸山征郎
	副査	熊本一朗	副査 後藤正道

Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene

(*SEPN1* 遺伝子変異に起因する *rigid spine with muscular dystrophy type 1* の分子生物学的メカニズム)

Neurogenetics Vol. 7(3) P175-183 2006 掲載

Rigid spine syndrome は、脊椎関節拘縮、前屈制限を主徴とする緩徐進行性のミオパチーである。近年、原因遺伝子 *SEPN1* が同定され rigid spine with muscular dystrophy type1 (RSMD1) という単一疾患が抽出された。*SEPN1* 遺伝子は selenoproteinN という蛋白を作り出すが、この蛋白の働きはまだ未解明の部分が多い。その後の研究で同蛋白が小胞体蛋白であることが推察されているが、筋組織を用いた検討は行われていない。そこで学位申請者らは、臨床的に RSMD と診断された症例を用いて分子生物学的検討を行い、*SEPN1* 遺伝子の変異について検討し、selenoproteinN の局在を調べるために免疫組織学的染色と Western blotting を施行した。また同遺伝子のもつ特異な蛋白翻訳機能に着目し、real-time RT-PCR 法を用い mRNA の発現を確認し、分子生物学的メカニズムについて考察を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 症例 1 において *SEPN1* 遺伝子の exon1 に 1_2insT の変異、症例 2 において exon1 に 80dup20, frameshift at R27 の変異を認めた。これらの変異は novel mutation であった。
- 2) selenoprotein N 抗体による免疫組織染色では、症例 1 において、全体的にも、それぞれの筋線維での染色性にもばらつきを認め、小胞体蛋白 calnexin 抗体との染色性と類似性をもっていた。コントロール組織における分布などと合わせると selenoprotein N が筋小胞体タンパクであることが示された。Western blotting では 2 症例共に短いながらも同抗体に抗原性を有す異常なタンパク発現が示唆された。
- 3) mRNA の発現をみるために real-time RT-PCR を行ったところ、目的とした *SEPN1* 遺伝子 Exon5-6, 12-13 両ターゲットにおいて症例 1, 2 共に発現量は低下しているながらも mRNA の発現を確認した。

本研究において、selenoprotein N 抗体を用いた染色により同蛋白が筋小胞体蛋白である可能性を生検筋組織にて明らかにされた。また今回検討した 2 症例に認められた変異部位は、novel mutations であった。これらの変異は通常の遺伝子であれば、無効もしくは未熟な蛋白翻訳となり有効な蛋白発現が行われない可能性がある。しかし組織染色では 2 症例共に異常ながらもタンパクが発現していることが予測された。学位申請者らはこの事実は Selenoprotein N のもつ通常であればストップコドンとなりうる UGA コドンにセレノシステインを翻訳させるという特殊な翻訳過程に原因があると考えた。開始コドンに異常のある場合、新たな開始コドンから翻訳が行われている可能性があるのではないかと考えた。またフレームシフトを伴い多くのストップコドンの出現が予測された同研究の症例の変異で、タンパクの品質管理機構である nonsense-mediated decay process (NMD) を免れ翻訳された短い蛋白が存在するということである。そこで学位申請者らは mRNA の発現をみるために real-time RT-PCR を行ったところ、コントロールに比較して症例 1, 2 共に発現量は低下していた。この事実は疾病原因としての selenoprotein N の発現低下を確認したと共に、上記に示したようななんらかの分子生物学的メカニズムが働き完全欠損という形でない蛋白発現がおこったことを示しており、興味深い結果であった。今回の検討により、selenoprotein N 蛋白が筋小胞体関連蛋白である可能性や *SEPN1* 遺伝子の蛋白翻訳機能の特殊性が本疾患発現に関与している可能性が初めて示され、NMD をまぬがれて mRNA が発現していることが証明された点は非常に興味深いよって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 3 号		学位申請者	岡本裕嗣
審査委員	主査	佐野 輝	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小澤政之	副査	丸山征郎
	副査	熊本一朗	副査	後藤正道

主査および副査の5名は、平成18年10月25日、学位申請者 岡本 裕嗣 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) ここで示した症例は、今回の検討の前にはどのような診断をしていましたか。

(回答) 今回提示させていただいた症例はすべて当院関連施設の沖縄病院で経験した症例です。病理学的検索などからは確定診断にはいたらず、臨床診断として rigid spine syndrome としてひとくくりにされていました。

質問2) 障害の分布が特徴的だがその理由はわかっていますか。

(回答) たしかに、横隔膜、傍脊柱筋の障害は著しいのが本疾患の特徴です。原因についてはまだわかっておりません。胎生期の筋肉分布とタンパク発現の関与などが関係しているかもしれませんし、四肢の筋力も長期的な目で見ていきますと次第に障害されてきます。常に呼吸や抗重力筋として負荷がかかっていることもなんらかの影響があるのではないかと推察しています。

質問3) 脊椎の側弯にはなにか左右差とかあるのでしょうか。

(回答) それにつきましては、本症候群において特に左右差の報告はありません。他の筋ジストロフィーの患者さんでも利き腕などにより側弯の向きがかわることがあり、非特異的な所見と考えます。

質問4) 今回一緒に検討された Emery-Dreifuss 症候群ではなぜ心疾患が多いのでしょうか。

(回答) 常染色体優性遺伝型の Emery-Dreifuss 症候群において、心疾患の合併が多い理由はまだわかっておりません。ちなみに RSMD1 においては致死的な心合併症の報告はなされておられません。

質問5) 同じ selenoprotein である selenoprotein P は抗酸化作用があるが、selenoprotein N はそのような働きはないですか。

(回答) selenoprotein は selenoprotein P だけでなく、グルタチオンペルオキシダーゼをはじめとした抗酸化作用を有すタンパクが多く報告されていますが、selenoprotein N についてはそのような働きを有するかどうかはまだわかっておりません。

質問6) 組織像ではボツボツとまだらにそまっていたり、コアができるようだがその理由はどうですか。

(回答) そのことについてはまだ全くわかっておりません。同じように multiminicore をきたす疾患の原因としてリアノジンレセプター遺伝子があります。リアノジンレセプターが Ca チャネルと関わりをもった遺伝子であることから、同様の働きをしている可能性があります。先に述べた筋肉の障害分布とも重なりますが、筋小胞体の収縮や維持に関与したタンパクが本疾患のタンパクであり、そのことがこの組織像に関係しているのではないかと考えています。

質問7) 筋空胞を来す疾患などにオートファジーが強く関与しているとおもいますが、ユビキチンプロテオゾーム系についてはどう考えていますか。

(回答) 本疾患に関しては、筋小胞体とミトコンドリアネットワークなどについては着目していましたが、ユビキチンプロテオゾーム系については全く考えておりませんでした。今後検討したいと思います。

質問8) このタンパクは血球には発現しないのですか。

(回答) 血球だけでなく多くの臓器で発現していることが確認されています。

質問 9) 病初期の夜間呼吸困難について赤血球の酸素運搬能などの面からのアプローチをしてみればおもしろいのではないですか。

(回答) そのような視点で夜間呼吸苦に着目しておりませんでした。今後注意して見てみたいと思います。

質問 10) 症例 2 は孤発例ということですが、常染色体劣性遺伝の疾患としておかしくありませんか。

(回答) 症例 2 は本人、御家族からの病歴聴取り孤発例としました。父親は亡くなられており、確認できていませんが、母、姉に同変異を heterozygous に認めました。恐らく父親も heterozygous に変異をもっていたものと考えます。沖縄という限られた地域のため本例の発症があったものと思われました。

質問 11) 沖縄における mutation frequency は検討しましたか。

(回答) 今回の研究に用いたコントロール検体は鹿児島、宮崎の方々のもので、沖縄における mutation frequency は検討しておりません。恐らく何%かの確率でキャリアの方がいらっしゃるものと思います。

質問 12) 小胞体関連タンパクということですが、アミノ酸配列までわかっているのならどのようなタンパクなのか示す必要があるとおもいますが。

(回答) 今回検討しました selenoprotein N につきましては、脂溶性のアミノ酸配列の連続があり、膜貫通領域をもつタンパクであることや、EF-hand という Ca 結合部位になりうる構造を有していることが予測されていますが、まだ構造については web 上で公開されていますものを検討しましてもわからない状態でした。

質問 13) Western blotting をみると強く発現しているバンドもあり、免疫染色に影響を与えていませんか。また症例 2 のようなフレームシフトを来した場合抗原性が失われるのでは。

(回答) 今回検討した抗体はポリクローナル抗体であり、確かに複数のバンドがあり、免疫染色でもクロスリアクションしている可能性があります。現に症例 2 は当初 R5MD1 ではないのではないかと考えたほどです。ただ論文にも示しましたとおり、コントロールにはみられないバンドをみとめたことと、症例 1 で示したように明らかに異常な染色性をきたす症例もあることから、むしろ免疫染色で有意な差がでなかった理由について今回のような仮説を立てた次第です。

質問 14) このタンパクは心筋には発現しているのですか、なぜ心合併症がないのでしょうか。

(回答) isoform 2 が心筋に発現しているとされています。しかし心合併症については軽度のブロックや、肺性心の症例が報告されているだけです。ただ骨格筋がこれだけ障害されているのですからなんらかの影響はできるものと思われれます。さらに詳細な経過観察が必要と考えています。

質問 15) 一般的な組織染色についてはどうでしたか。

(回答) 筋線維の大小不同、変性、壊死繊維の存在、結合織増加、脂肪変性など非特異的ジストロフィー所見を認めました。

質問 16) 症例 2 のように selenoprotein N 抗体での染色に差がでなかったのはそこそこに function しているものと考えていますか。

(回答) Real-time RT-PCR の結果も併せて考えた場合。免疫染色では差がでませんでした。コントロールに比較して症例 1, 2 共に低下しており、特に症例 2 において低下していることがわかります。全く機能していないわけではないと思われれますが、異常なタンパクが発現し、本症の発症に影響を与えたものと考えております。

質問 17) Western blotting の結果などから second ATG が開始コドンになりうるということですが、これは Kozak 配列を有していますか。

(回答) 残念ながら当初予測した Kozak 配列を有する ATG ではありませんでした。

質問 18) 今回の発表では isoform 1, 2 のみがあるということですが、start site の使い分けや splice variant など他のバリエーションが実はあり、そのことで今回の結果を説明できるかもしれません。

(回答) cDNA のシークエンスを含めまして今後検討したいと思います。

質問 19) 本疾患は常染色体劣性の疾患であり、開始コドンの変異やフレームシフトはそれほどめづらしくないと思います。保因者である御家族に軽いながらも症状はありませんでしたか。

(回答) 採血時に両親、御兄弟については検査さしていただきましたが、明らかな異常はありませんでした。しかし発症年齢などにばらつきあることから、今後も注意深く見ていきたいと思ひます。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。