

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591016

研究課題名（和文）脳幹部ニューロンに発現するシネミンの機能解明

研究課題名（英文）Research of mechanism of synemin in neurons of midbrain

研究代表者

水野 裕司（MIZUNO YUJI）

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20282395

研究成果の概要（和文）：2007年、マウス脳組織を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは、橋から中脳背側の脳幹部の大型ニューロンに synemin 遺伝子が発現しており、抗 synemin 抗体を用いた免疫組織染色では同じニューロンが特異性を持って染色されることを報告した。今期間は、マウス脊髄に着目し、脊髄前角細胞においても synemin の遺伝子とタンパク質が共存していることを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：We reported that synemin transcript and its protein are more highly expressed in the midbrain and pons of C57BL/6 in 2007, using *in situ* hybridization and immunohistochemical analysis. In this study, we further focused on the anterior horn cells of spinal cord and showed that synemin transcript and its encoded protein also co-localize in the anterior horn cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：synemin、desmuslin、intermediate filament、muscular dystrophy、dystrobrevin

1. 研究開始当初の背景

(1) Synemin 遺伝子発見の背景

Duchenne 型筋ジストロフィーの責任タンパク質である dystrophin の発見以降、それに結合するタンパク質が明らかになり、その一つが Harvard 大学の Louis M. Kunkel 教授の教室から報告された a-dystrobrevin である。私は彼の研究室で、「a-dystrobrevin」をおとりタンパク質としてそれに結合するタンパク質を Two-Hybrid 法を使って探求し、新規な中間径フィラメントを desmuslin（後

の b-synemin）と命名して報告した（Mizuno Y et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 6156-6161）。b-synemin は膜タンパク質である a-dystrobrevin だけではなく、細胞骨格系タンパク質である desmin にも結合する。また、共焦点レーザー顕微鏡による解析では、Z帯に沿って分布するが、細胞膜のZ帯に対応するコストメアと呼ばれる非常に強い力のかかる部分に多く存在する（Mizuno Y et al, *Muscle Nerve*, 2004; 30: 337-346）。筋収縮時、Z帯とZ帯の間の細胞膜の部位は外側に

膨らんだ状態になるが、コスタメアは固定され、筋細胞は形態を維持している。収縮時にコスタメアが強く固定されるためには、膜タンパク質と細胞骨格系タンパク質の両者を結ぶ分子が必要であり、その一つのタンパク質が b-synemin であるという仮説を我々は立てている。近年中間径フィラメントの代表である desmin の遺伝子異常がミオパチーを引き起こすことが報告された。我々は b-synemin も細胞骨格系タンパク質の一つとして desmin に類似した機能を担っているものと考えている。

(2) b-synemin の遺伝子変異の研究

Harvard 大学の倫理審査委員会の承諾を経て、遺伝子バンクにある原因遺伝子の明らかでない筋疾患患者のジェノミック DNA を使って、b-synemin 遺伝子の翻訳領域をすべてシーケンシングした。b-synemin 遺伝子は 5 個のエクソンより構成され、3,762 個の核酸よりなる。そのすべてを解読するためには 11 種類の PCR が必要であった。対象は先天性ミオパチーや肢帯型筋ジストロフィーを含む計 71 例の患者群と、計 156 例のコントロール群であった (計 227 例、計 454 本の allele を検索した)。Single-nucleotide polymorphisms として、アミノ酸置換を伴うものを 12 種類、伴わないものを 9 種類認めた。これらの変異は患者群だけでなくコントロール群にも存在したため、患者の筋症状を引き起こしている変異ではないと判断した。興味深かった事実として、ある患者において 598 番目の核酸が C から T に置換し (C598T)、CAG が TAG となり、グルタミンが停止コドンに変換していたことである (ヘテロ変異)。同じ変異はその患者の健康な父親と他のコントロール群の 1 人に認めた。つまり C598T の起こる確率は約 0.44% (2/454: 患者 1 人とコントロール群の 1 人の計 2 人を含み、父親は含んでいない) となった。このノンセンス変異をホモ状態で持つ確率は 0.44% \times 0.44% = 0.00194% と非常に低いものであったが、ホモ変異であれば筋症状を呈することを明らかにしたと確信した。(Mizuno Y et al, *BMC Genet*, 2001; 2: 8)。

(3) 脳における synemin の遺伝子とタンパク質はどこに存在しているのか?

Synemin には二つのアイソフォーム (a と b) が存在し、どちらも同じ遺伝子より翻訳される。a と b-synemin の相違点は、936 個の核酸分、すなわち 312 個のアミノ酸分だけ a-synemin が大きなタンパク質になっている。Synemin タンパク質の発現を検索したところ、ヒト正常骨格筋には b タイプのみを認めたが、脳組織においては両方のタイプが存在することがわかった (Mizuno Y et al, *Muscle*

Nerve, 2004; 30: 337-346)。これはノーザンブロットの結果と一致するものであった。次の課題は脳における局在部位の検討であった。

平成 18-19 年度の科学研究費では、マウス脳組織において *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、a と b-synemin の遺伝子の発現箇所を検索した。両遺伝子とも脳幹部背側の非常に限局的な領域の大きなニューロンに強く発現していた。当初脳に特異的に発現している a は、脳と骨格筋の両方に存在する b とは全く別の機能を有し、b とは別の領域に存在しているものと考えていた。*In situ* の結果より両アイソフォームは、ダイマーを形成している可能性が高いのではないかと推測した。さらに、ミラー切片を用いた抗 synemin 抗体による免疫組織学的検討においては、遺伝子が発現しているニューロンにはタンパク質も存在していることを証明することができた。Synemin の遺伝子とタンパク質の限局的存在かつ共存を明らかにでき、普遍的存在よりも意味深いと考えている (Mizuno Y et al, *Muscle Nerve*, 2007; 36: 497-504)。

2. 研究の目的

(1) Synemin が発現しているニューロンはどのような機能も担っている細胞なのか?

a-dystrobrevin に結合するタンパク質として、b-synemin の他に syncoilin, dysbindin が報告されている。近年、dysbindin 遺伝子の single nucleotide polymorphisms が統合失調症の発症と関係のあることが報告され、a-dystrobrevin に結合するタンパク質の研究の重要性が明らかになった。私は synemin の研究が、筋疾患のみならず、神経変性疾患の病態解明へとつながる可能性があると考え、下記の課題を設定した。

① Synemin は脳幹部の大きなニューロンだけではなく、同じく大型ニューロンである脊髄前角細胞にも発現しているのではないかと考えた。この神経細胞は筋萎縮性側索硬化症の患者では特に変性が強く、非常に興味があった。まず始めに正常マウスについて発現しているかを検討する。

② Synemin の発現が明らかとなった脳幹部のニューロンはコリン作動性か、セロトニン作動性か、いかなる神経伝達物質を担ったニューロンであるのか全く不明である。その点を解明することができれば synemin の役割を考えるうえで重要な情報になりうる。コリン作動性ニューロンに関係する cholin-O-acetyltransferase、セロトニン作動性ニューロンに関与する aromatic L-aminoacid decarboxylase や tryptophan

hydroxylase が、synemin の遺伝子とタンパク質が発現している脳幹部のニューロンに存在しているか否かを免疫組織学的に検討する。

3. 研究の方法

(1) *In situ* ハイブリダイゼーションについて

① パラフィン包埋脳組織切片の作製

ヒト脳組織を用いることは困難なので動物で検討する。6-8 週齢の ICR マウスから約 6 mm の矢状断 (臭球・大脳・小脳が含まれる) と冠状断のパラフィン包埋組織切片を用意する。矢状断では、脳での大まかな遺伝子の発現情報を得ることができる。たとえば、臭球・小脳では発現がなく、大脳のみでみられるような場合は、冠状断を検索することにより、大脳の特定の領域を詳細に解析することが可能となる。必要に応じてより細かい断面で検討する。

パラフィン包埋組織切片は組織形態がよいが、RNA の分解が問題となる。また組織の固定、脱水、包埋の操作は良い切片を得るために重要なステップであり、その後の実験結果に大きく影響する。この操作はジェノスタッフ社に依頼する。

② ジゴキシゲニン標識プローブの作製

ヒト a-dystrobrevin-1 と-2 に相当する配列がマウスにも存在する。タイプ 1 と 2 に特異的な領域 (C 端側の配列が異なる) からそれぞれ 300 bp-500 bp のプローブを設計する。この際に極端に偏った GC% を避けること、Blast 解析によるホモロジー検索によりホモロジーの高い領域を避けることが重要である。上記で作製した DNA をもとに、*in vitro* transcription 法により、ジゴキシゲニンを標識したプローブを作製する。なお、プローブを作製する前に以下のことを考えている。上記の条件に見合ったプローブが短い場合には、発現量が低くなり検出が微妙になるため、正常マウスを用いて発現量を検討する必要がある。鋳型としては脳 (Brain)、脳 (Brain, pons)、骨格筋などを使用し、PCR を 25-35 サイクル行い、容易にバンドが確認できるレベルの発現量があるか否かを検討する。Synemin 遺伝子の発現している脳 (Brain, pons) を鋳型としたときに特に強いシグナルを認めることが理想である。

③ *In situ* ハイブリダイゼーションの染色条件の検討

過剰なプローブや過剰な抗ジゴキシゲニン抗体濃度、切片のしわや亀裂などによるプローブや抗体の非特異的な吸着などのために、バックグラウンドがシグナルよりも高い状態になることは致命的である。それらの防止、

除去を行うために、パラフィン包埋組織切片とジゴキシゲニン標識したプローブを用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションの染色条件 {ハイブリダイゼーション前処理 (酵素濃度等)、最適温度、バッファーの検討、プローブ濃度の検討、ハイブリダイゼーション後の洗浄条件、抗体反応条件など} を十分検討する。遺伝子をもとに作製したプローブごとに最適条件が異なるので、これらの条件検討が欠かせない。以上のプロセスを経ることにより、よりシャープな染色像の条件を決定できる。

④ *In situ* ハイブリダイゼーションを行う

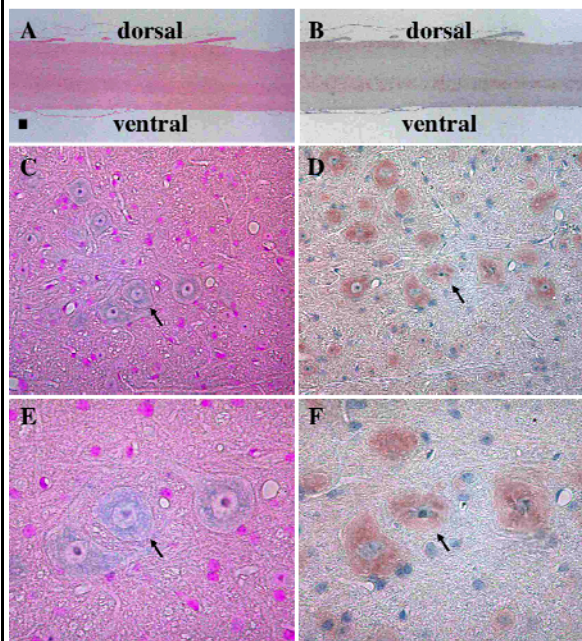
最適条件下で a-dystrobrevin-1 と-2 の遺伝子局在部位を検討する。当研究施設にあるプロトコルに沿って、パラフィン包埋組織切片の前処理、ハイブリダイゼーション、プローブの洗浄 (重要なことは切片を傷つけないこと)、抗体反応 (ペルオキシダーゼ系や蛍光でもシグナルは検出可能であるが、感度と再現性を考慮した場合、アルカリフォスファターゼ標識がよい)、発色反応 (NBT/BCIP を使用) を行う。

(2) 免疫組織学的検討について

抗体は a と b-synemin の両タイプを認識するウサギポリクローナル抗体を使用した。

4. 研究成果

(1) 脳幹部の大きなニューロンに認められたシグナルよりも弱かったが、脊髄の前角細胞には synemin の遺伝子及びタンパク質が発現していた。



「図の説明」 C57BL/6 マウスの脊髄を示す。

A, C, E は *in situ* ハイブリダイゼーション、B, D, F は抗 synemin 抗体を用いた免疫組織染色の結果である。C, D と E, F は連続切片であり、E, F は C, D の拡大像である。→は同一細胞を示す。同じ脊髄前角細胞に synemin の遺伝子とタンパク質が共存していることが分かる。

(2) コリン作動性ニューロンに関する cholin-O-acetyltransferase、セロトニン作動性ニューロンに関する aromatic L-aminoacid decarboxylase や tryptophan hydroxylase などの抗体を数種類作成もしくは購入したが、有意な所見を見出すことはできなかった。抗体そのものがパラフィン切片には反応しない可能性もあったが、もともと存在しない可能性も否定はできなかった。

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 13 件)

① Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K: Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 2011; 302: 14-18. (査読有り)

② 水野裕司、岡本幸市: Tacrolimus を投与した重症筋無力症患者 36 例の検討。神経治療学 27: 69-75、2010 (査読有り)

③ Mizuno Y, Guyon JR, Okamoto K, Kunkel LM: Expression of synemin in the mouse spinal cord. *Muscle Nerve*, 2009; 39: 634-641. (査読有り)

④ 水野裕司: 中間径フィラメントである synemin の研究。KITAKANTO MED J 59: 281-282、2009 (査読なし)

⑤ 水野裕司、岡本幸市: Cyclosporin を投与した重症筋無力症 9 例の検討。神経治療学 26: 189-196、2009 (査読有り)

⑥ 水野裕司: マウス脳組織における synemin の発現に関する検討。厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」、筋ジストロフィーおよびその関連する疾患の病態生理の解明と治療薬物の開発に関する研究、班長: 清水輝夫、平成 17-19 年度研究報告書、p80-81、2008 (査読なし)

[学会発表] (計 26 件)

① Mizuno Y, Osawa T, Fujita Y, Takatama

M, Nakazato Y, Okamoto K: Optineurin in neurodegenerative diseases. 10th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, Barcelona, Spain, March 11-12, 2011.

② 水野裕司、平柳公利、岡本幸市: ゼニサミドを投与したパーキンソン病患者 5 例の検討。第 28 回 日本神経治療学会、横浜、2010. 7. 15

③ 水野裕司、Jeffrey R. Guyon、Louis M. Kunkel、岡本幸市: α -dystrobrevin に結合する synemin と Tryptophan Hydroxylase-1 の発現について。第 51 回 日本神経学会総会、東京、2010. 5. 20

④ Mizuno Y, Guyon JR, Okamoto K, Kunkel LM: Screening the synemin gene for disease causative mutations in patients with myopathic and neurological diseases. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, USA, October 21, 2009.

⑤ 水野裕司、岡本幸市: 当科において tacrolimus を使用した重症筋無力症患者 35 例の検討。第 27 回 日本神経治療学会、熊本、2009. 6. 11

⑥ 水野裕司、Jeffrey R. Guyon、Louis M. Kunkel、岡本幸市: α -dystrobrevin に結合する synemin の脊髄における発現について。第 50 回 日本神経学会総会、仙台、2009. 5. 22

⑦ 水野裕司、田中司玄文、岡本幸市: 画像上胸腺腫の再発性胸膜播腫が疑われたが、組織学的に胸膜デスマイドであった重症筋無力症の 1 例。第 26 回 日本神経治療学会、横浜、2008. 6. 27

⑧ 水野裕司、岡本幸市: シクロスポリンを投与した糖尿病合併重症筋無力症の 2 症例。第 26 回 日本神経治療学会、横浜、2008. 6. 27

⑨ 水野裕司、藤田行雄、高玉真光、岡本幸市: 筋萎縮性側索硬化症の中脳黒質における TDP-43 の発現に関する検討。第 49 回 日本神経病理学会、東京、2008. 5. 20

⑩ 水野裕司、Jeffrey R. Guyon、Louis M. Kunkel、岡本幸市: α -dystrobrevin に結合する synemin の脳における発現について。第 49 回 日本神経学会総会、横浜、2008. 5. 16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 裕司 (MIZUNO YUJI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20282395