

α -synucleinopathy 発症に対する synuclein 関連遺伝子の 寄与についての検討

大 竹 弘 哲

新潟大学大学院医学研究科神経内科学分野

(主任：西澤正豊教授)

A Study of Synuclein Related Genes for Onset of α -Synucleinopathies

Hiroaki OHTAKE

Department of Neurology,

Graduate School of Medicine, Niigata University

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要 旨

Parkinson 病 (PD), Lewy 小体型痴呆 (DLB) は Lewy 小体, 多系統萎縮症では Glial cytoplasmic inclusion が診断に欠かせない病理所見である. いずれも α -synuclein (SNCA) が主な構成要素であることから, これらの疾患を " α -synucleinopathy" と総称する. これら α -synucleinopathy に対する synuclein 関連蛋白の関与について遺伝子からの検討を行った. DLB21 例 (うち, 家族性 10 例) に対して, SNCA とその相同体である β -synuclein (SNCB), γ -synuclein (SNCG) の翻訳領域を直接塩基配列決定法で解析した. このうち, SNCB のアミノ酸置換を伴う一塩基置換 (V70M) と, SNCG のアミノ酸置換を伴う一塩基置換 (E86G) が家族歴を持たない DLB の, それぞれ各 1 例に認められた. この一塩基置換は正常対照 279 例, PD 患者 354 例には認められなかった. 多系統萎縮症 48 例においては, SNCA, SNCB, SNCG と Synphilin-1 (SNCAIP) 遺伝子の一塩基多型 (SNP) を調べ, 各多型のアレル頻度について疾患対照相関解析を行ったが, 有意差は認められなかった. SNCA において解析した SNPs, 91.2kb の範囲にわたって, D' (絶対値) > 0.7 で強い連鎖不平衡を認めた. また SNPs より推定される haplotype は患者・対照群全例が, 6つのパターンに集約され, その頻度分布に相違は認めなかった. 一方, SNCAIP においては, 111.6kb の範囲から SNP を選択したが, $D' > 0.25$ による評価では, 2つの連鎖不平衡領域の存在が示唆され, $r^2 > 0.25$ では, まとまった連鎖不平衡領域が指摘できなかった. 同領域から推定される haplotype は 10パターン以上に及び, 患者群と対照群間で haplotype 分布に有意差を認めた. PD のみならず, 他の α -synucleinopathy の発症に対し, SNCB, SNCG, SNCAIP という関連蛋白の遺伝子が関与している可能性を示した.

キーワード: Synucleinopathy, Dementia with Lewy Bodies, Multiple system atrophy, β -synuclein, γ -synuclein, Synphilin-1.

Reprint requests to: Hiroaki OHTAKE
Department of Neurology
Brain Research Institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学脳研究所神経内科 大竹弘哲

はじめに

近年、神経変性疾患の一群に α -synuclein (SNCA) を主体とする蓄積物質が認められる疾患群が認識され、これらを α -synucleinopathy と総称している。これらの疾患群には、Parkinson 病 (PD), Lewy 小体型痴呆 (DLB), 多系統萎縮症 (MSA) などが含まれる。PD 及び DLB では Lewy 小体, MSA では Glial cytoplasmic inclusion (GCI) と呼ばれる細胞内凝集体が病理学的な特徴であり、 α -synuclein (SNCA)^{1)–3)} や、SNCA と結合する蛋白 synphilin-1 (SNCA interaction protein, SNCAIP)^{4)–6)} により構成されている。一方、SNCA と高い相同性を持つ β -synuclein (SNCB) 及び γ -synuclein (SNCG) は含まれない¹⁾²⁾⁷⁾。生化学的解析から、SNCA は凝集体形成しやすい傾向が強いが、SNCB と SNCG では弱く⁸⁾⁹⁾、更に SNCA の凝集体形成過程に関して抑制的に働くと考えられている⁹⁾¹⁰⁾。

凝集体成分と疾患との関連は、今まで多くの神経難病で認められてきた。列挙すればアルツハイマー病と amyloid beta-protein¹¹⁾¹²⁾, apolipoprotein E¹³⁾¹⁴⁾, ポリグルタミン病と増大ポリグルタミン鎖¹⁵⁾ などが代表的なものとしてあげられる。これらの疾患では、凝集体構成蛋白の異常により、疾患が引き起こされていることが明らかとなった。一方、 α -synucleinopathy においても、凝集体成分である SNCA 及びその関連蛋白の異常と疾患との関連が注目されている。常染色体優性遺伝性の PD に関して精力的に解析が進められ、まず SNCA の点変異¹⁶⁾¹⁷⁾ が報告され、最近 SNCA 遺伝子領域の triplication が報告された¹⁸⁾。また、孤発性の PD では、SNCA の特定の haplotype との関連も示唆されている¹⁹⁾。しかし、多くの孤発性の α -synucleinopathy に関してはその原因が明らかとはなっていない。そのため SNCA 以外の SNCA 関連蛋白に関して、これらの疾患群での異常の有無が注目されていた。まず家族性 DLB において 2001 年 Bird らにより SNCB のミスセンス変異 (P123H) をもつ症例が報告され、変異により、SNCA の凝集体形成を抑制する機能が失わ

れる可能性が示唆された²⁰⁾。更に、孤発性の PD にて SNCAIP の点変異が報告され、このような SNCA 関連蛋白により α -synucleinopathy が引き起こされる可能性が示唆されている²¹⁾。

本研究では、PD 以外の α -synucleinopathy と synuclein 関連蛋白遺伝子との関連を明らかにする目的で、DLB に対して、SNCA, SNCB と SNCG 遺伝子の翻訳領域を直接塩基配列法にて解析し、その変異の有無を検討した。一方、MSA では、SNCA, SNCB, SNCG, SNCAIP の翻訳領域周辺を含めた一塩基多型 (SNP) を解析し、 α -synucleinopathy とこれら候補遺伝子との関連について解析した。その結果、DLB 2 症例で SNCB 及び SNCG 遺伝子領域に正常対照例では見られないアミノ酸置換を伴う一塩基置換を見出し、MSA 症例と SNCAIP の haplotype との関連を示した。

対象と方法

対象とした症例は、DLB 症例が 21 例 (10 例が家族歴を持ち、常染色体優性遺伝 2 家系で 5 例、常染色体劣性遺伝 2 家系 5 例)、MSA が 48 例。全例から informed consent を得、末梢血白血球、又は凍結脳標本から高分子ゲノム DNA を抽出した。DLB 症例の解析では対照として、PD38 例と正常対照 44 例において、SNCA, SNCB と SNCG 遺伝子の全翻訳領域を直接塩基配列決定法で解析し、見出した一塩基置換に関しては、PD316 例と正常例 235 例を対照にその有無を解析した。

MSA 症例の解析では正常対照 48 例と比較を行った。

1. DLB 症例における遺伝子解析

SNCA exon 3 から exon 6 の PCR は、Farrer らの primer²²⁾, SNCA exon 7 と、SNCB の exon 2 から exon 6, SNCG の exon 1 から exon 5 までは Primer Express ver 1.5 (Applied Biosystems) により設計した。Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver2.0 (Applied Biosystems) にて反応し、Dye Ex Spin Kit (QIAGEN) にて Dye terminator を除去後、ABI PRISM 3100 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems) で配列を決定した。

SNCG の E86G を来す A257G 置換, 及び SNCB V70M を起こす G208A 置換について, それぞれの多型に対応した TaqMan MGB probe と primer を Primer Express ver1.5 を用いて設計し, ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) にて対照例を検討した。

2. MSA 症例における遺伝子解析

SNCA, SNCB, SNCG の SNP は NCBI refSNP のデータベース上に公開されているうち, アジア人種での minor allele の頻度が 10% 以上であるものを選択し, Assay-by-Design service (Applied Biosystems) にて TaqMan MGB probe と primer を設計した。SNCAIP では Assay-On-Demand SNP genotyping product (Applied Biosystems) を用いた。SNCA 遺伝子については, intron 3 から intron 5 までの intron 内に位置する, 14 の SNP を解析し, SNCB では, 5' UTR で 2ヶ所の SNP を, SNCG は 5' UTR と intron1 に位置する 2ヶ所の SNP を, SNCAIP は, intron1 から 3' UTR まで主に intron に存在する, 6ヶ所の SNP において, TaqMan MGB probe (Applied Biosystems) を設定した。SNPs typing は ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) にて評価した。

結果は, SNPalyze ver3.1 (DYNACOM) にて, 各 SNP における症例-対照研究, 各 SNPs 間の連鎖不平衡解析, 各群内での Expectation-Maximization (EM) アルゴリズム²³⁾ による haplotype 推定を行い, haplotype 分布に関しても症例-対照研究を行った。

結 果

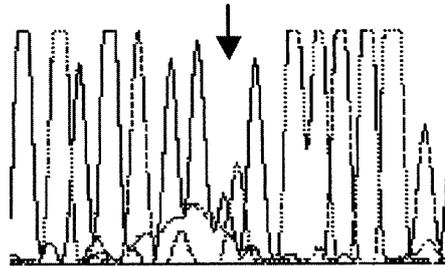
1. DLB における synuclein family 遺伝子翻訳領域の解析

家族性の DLB 症例 10 例 (常染色体優性遺伝 2 家系 5 例, 常染色体劣性遺伝 2 家系 5 例) では, SNCA, SNCB, SNCG の全翻訳領域に変異を認めなかった。一方, 孤発性の DLB 11 例のうち, 1 例

(患者 1) にて, SNCG の 86 番目の glutamate が glycine に置換するアミノ酸置換 E86G) を伴う一塩基置換 (A257G) を heterozygote で認めた (図 1A)。また, もう一例 (患者 2) で SNCB の 70 番目の valine が methionine に置換するアミノ酸置換 (V70M) を伴う一塩基置換 (G208A) を heterozygote で認めた (図 2A)。これらの一塩基置換は, 正常対照 279 例, PD354 例では認められなかった。

各症例の臨床像を要約する。患者 1 は, 74 歳時, 歩行障害で発症した女性。75 歳で歩行器を使うようになり, 77 歳時, A 病院神経内科を受診。仮面様顔貌, 筋強剛, 寡動, 小刻み・前傾歩行, 単調で抑揚の無い発声を指摘された。これらはドーパ合剤への反応に乏しく, 塩酸ペルゴリドの内服後, “誰もいない所に人物が見える” などの幻視と, 行ってもいない場所に出掛けて来たなどの妄想を示した。頭部 MRI で, 中等度の脳萎縮は認めるものの, 虚血性変化は目立たなかった。その後認知障害と歩行障害が悪化し, 78 歳時 Wechsler Adult Intelligence Scale - Revised (WAIS-R) で verbal IQ が 60, 改訂式長谷川式痴呆スケール (HDS-R) で 15 点であった。同時期より車椅子移動と食事の介助が必要となった。現在 82 歳で存命であり, 類似した症状を示す家族は認められていない。患者 2 は, 78 歳時に左手の巧緻運動障害にて発症した男性。ドーパ合剤を開始。当初は改善を示したが, 79 歳時, 構音障害と歩行障害の増悪に伴い, ドーパ合剤を増量したところ, ねずみが見えるなどの幻視を示した。構音障害, 嚥下障害, 四肢体幹の運動障害が進行。誤嚥性肺炎を合併し 83 歳で当院に入院。動作緩慢, 筋強剛, 左上下肢の振戦, 小刻み・前傾歩行を認め, HDS-R が 19 点と軽度認知障害を認めた。頭部 MRI 所見ではびまん性に皮質の萎縮を認め, 陳旧性の虚血巣は数箇所のみであった。以後臥床状態となり, 他院に転院, 84 歳で肺炎にて死亡。病理解剖は行われなかった。いずれの症例も臨床的には Consortium on Dementia with Lewy bodies の criteria²⁴⁾ により DLB と診断された。

A)



B)

	E86G ↓
<i>Homo sapiens</i>	64 NAVSEAVVSSVNTVATKTVEEAENIAV
<i>Rattus norvegicus</i>	64 NAVSEAVVSSVNTVATETVVEEAENIVV
<i>Mus musculus</i>	64 NAVSEAVVSSVNTVANKTVVEEAENIVV
<i>Bos taurus</i>	64 NAVSEAVVSSVNTVATKTVEEVENIAV

C)

	E86G ↓
γ -synuclein	64 NAVSEAVVSSVNTVATKTVEEAENIAV
β -synuclein	64 SHLGGAVFS-----GAGNIAA
α -synuclein	64 TNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAA
	Hydrophobic residues

図 1

A) 患者 1 の SNCG 塩基配列クロマトグラム。矢印部が変異部位を示す。B) 異種生物間の SNCG アミノ酸配列の比較。86 番目の glutamate は種を越えて保存されている。C) synuclein family 間でのアミノ酸配列の比較。二重下線部は SNCA による凝集体形成に重要な疎水性残基を示す⁸⁾。

Gene accession number は , *Homo sapiens* SNCG; NP_003078, *Homo sapiens* SNCA; NP_000336, *Homo sapiens* SNCB; AAB30860, *Rattus norvegicus* SNCG; NP_113876, *Mus musculus* SNCG; NP_035560, *Bos taurus* Synoretin; AAF32342.

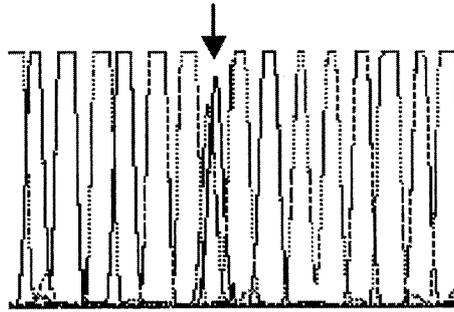
2. MSA 症例における遺伝子解析

1) synuclein family (SNCA, SNCB, SNCG) 遺伝子についての SNP 解析による検討

SNCA 遺伝子領域内 intron 3 から intron 5 の 14SNP, SNCB の 5' UTR の 2 SNP, と SNCG の 5' UTR と intron 1 に位置する SNP について解析した。個々の SNP の頻度について、対照群との間

でアレル頻度に有意差は認めなかった (表 1)。SNCA の周辺 91.2kb の範囲での、各 SNP の 2 点間連鎖不平衡解析では、すべての組み合わせで D' (絶対値) が 0.7 を超え、強い連鎖不平衡状態を示した (表 2A)。同領域に関して $r^2 > 0.25$ を閾値として評価すると、この領域内に少なくとも 3 つの弱い連鎖不平衡領域を推定することが可能であっ

A)



B)

V70M
↓

<i>Homo sapiens</i>	64 SHLGGAVFS-----GAGNIAAA
<i>Rattus norvegicus</i>	64 SHLGGAVFS-----GAGNIAAA
<i>Mus musculus</i>	64 SHLGGAVFS-----GAGNIAAA
<i>Xenopus laevis</i>	64 NVVGGAVVSGVNVQVSSKTVEGTENVVSS

C)

V70M
↓

β -synuclein	64 SHLGGAVFS-----GAGNIAA
γ -synuclein	64 NAVSEAVVSSVNTVATKTVEEAENIAV
α -synuclein	64 TNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAA

Hydrophobic residues

図2

A) 患者2のSNCB塩基配列クロマトグラム。矢印部が変異部位を示す。B) 異種生物間のSNCBアミノ酸配列の比較。70番目のValineは種を越えて保存されている。C) synuclein family間でのアミノ酸配列の比較。二重下線部はSNCAによる凝集体形成に重要な疎水性残基部を示す⁸⁾。

Gene accession number は, *Homo sapiens* SNCB; AAB30860, *Homo sapiens* SNCA; NP_000336, *Homo sapiens* SNCG; NP_003078, *Rattus norvegicus* SNCB; NP_542955, *Mus musculus* SNCB; AAH19409, *Xenopus laevis* SNCB; AAL16411.

た(表2B)。次にEMアルゴリズム²³⁾を用いhaplotype頻度を推定した。患者対照群全例は6種類のhaplotype(HA1-6:表3)に集約されると予想され、患者群の82.7%、対照群の87.5%が3種類のhaplotype(HA1-3:表3)に集約された。推定される4つの連鎖不平衡領域(A1, A2-7, A8-11, A12-14)それぞれから1ヶ所のSNP

(A1, A2, A8, A12)を用い設定したhaplotype頻度には患者対照群間の χ^2 検定で有意差を認めなかった(data not shown)。

SNCB, SNCGのSNPよりEMアルゴリズムにて推定されたhaplotype頻度の患者対照群間での χ^2 検定も、SNCBで $P=0.72$ 、SNCGで $P=0.72$ と有意差を認めなかった(表4)。

表 1 SNCA, SNCB, SNCG 遺伝子の各 SNP のアレル頻度

A)

SNP	患者群の遺伝子型			対照群の遺伝子型			allele1 対 allele2	
	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	χ^2	P値
A1	16	14	5	23	17	8	0.00	0.99
A2	19	15	3	25	20	3	0.04	0.85
A3	19	15	3	25	20	3	0.04	0.85
A4	19	15	3	25	20	3	0.04	0.85
A5	18	14	3	25	20	3	0.04	0.83
A6	19	15	3	25	20	3	0.04	0.85
A7	19	14	4	25	20	3	0.14	0.70
A8	19	13	5	23	20	5	0.00	0.98
A9	13	16	6	17	18	9	0.01	0.91
A10	12	15	6	17	18	9	0.00	1.00
A11	17	13	5	20	19	5	0.00	0.99
A12	11	17	6	16	18	10	0.00	0.95
A13	17	13	5	20	16	8	0.21	0.65
A14	10	19	6	16	18	10	0.02	0.89

B)

SNP ID	患者群の遺伝子型			対照群の遺伝子型			allele1 対 allele2	
	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	χ^2	P値
rs2075667	14	23	7	14	20	14	1.17	0.28
rs3762967	11	25	8	10	25	13	0.78	0.38

C)

SNP ID	患者群の遺伝子型			対照群の遺伝子型			allele1 対 allele2	
	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	χ^2	P値
rs3750823	24	17	3	28	18	2	0.26	0.61
rs3793900	33	10	1	36	10	2	0.03	0.85

MSA 症例と正常対照間でアレル頻度を χ^2 検定にて解析。患者対照群総じて、アレル頻度のより多いアレルを 1, 少ないアレルを 2 と規定した。

A) SNCA の各 SNP, A1=rs3796665, A2=rs3756056, A3=rs3775448, A4=rs3775447, A5=rs3775446, A6=rs3756055, A7=rs3775443, A8=rs3775442, A9=rs2737029, A10=rs3775439, A11=rs3775435, A12=rs3775424, A13=rs356204, A14=rs3775423, B) SNCB, C) SNCG での SNP での検討。

2) SNCAIP 遺伝子についての検討

SNCAIP 遺伝子においても、各 SNP でアレル頻度に有意差は認めなかった (表 5)。各 SNP の 2 点間の連鎖不平衡解析では、 D' (絶対値) > 0.7 による評価では 3 つの連鎖不平衡領域 (AIP1-2, AIP3-4, AIP5-6) の存在が示唆されたが、 $r^2 > 0.25$ では AIP3-4 間以外に、連鎖不平衡領域は指摘できなかった (表 5)。そこですべての SNP を用い EM アルゴリズムにて haplotype を推定し

た。正常対照群で haplotype は少なくとも 16 種のパターンがあり (表 6)、患者群では 12 種類推定された (表 6)。正常対照群では、頻度の多い 4 つの haplotype (HAIP1, 2, 3, 5 表 7) に、62.4% のアレルが集約されると考えられた。患者対照群間で haplotype の頻度を χ^2 検定した結果、 $P = 0.048$ であった (表 7)。各 haplotype で見ると、HAIP4 は、対照群 (1.38%) に比し、患者群では 7.67% と多く認められた。

表2 SNCA遺伝子周辺のSNPsによる連鎖不平衡解析

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
A1		0.200	0.200	0.200	0.202	0.200	0.200	0.232	0.715	0.715	0.238	0.561	0.783	0.532
A2	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	0.971	0.173	0.247	0.251	0.178	0.268	0.193	0.281
A3	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	0.971	0.173	0.247	0.251	0.178	0.268	0.193	0.281
A4	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	0.971	0.173	0.247	0.251	0.178	0.268	0.193	0.281
A5	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	0.175	0.245	0.254	0.180	0.267	0.196	0.279
A6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.971	0.173	0.247	0.251	0.178	0.268	0.193	0.281
A7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.178	0.214	0.251	0.183	0.234	0.200	0.247
A8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.334	0.333	1.000	0.258	0.186	0.227
A9	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.916	1.000		1.000	0.334	0.799	0.547	0.780
A10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.333	0.795	0.559	0.775
A11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.258	0.186	0.227
A12	0.924	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.918	0.828	0.942	0.941	0.828		0.723	0.974
A13	0.937	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.843	0.835	0.834	0.843	1.000		0.689
A14	0.922	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.922	0.773	0.942	0.941	0.773	1.000	1.000	
SNP間距離	14377	228	5682	500	6966	5283	443	3461	2029	6712	37773	1714	6051	

左下が患者対照群全体での、D' (絶対値) による評価 (D' > 0.25 を灰色で示す), 右上が r² による評価 (r² > 0.25 を灰色で) を示す。
 SNPの表示は、表1と同様。各SNP間の距離は、表に示した通り。

表3 EM アルゴリズムを用いてSNPsにより推定されたSNCA周辺の haplotype

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	患者群 頻度	対照群 頻度
HA1	A	T	C	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	C	0.300	0.318
HA2	G	C	G	A	T	G	G	C	G	A	A	T	A	T	0.271	0.261
HA3	G	T	C	G	G	A	T	T	G	A	G	T	A	T	0.256	0.295
HA4	G	T	C	G	G	A	T	C	A	G	A	C	A	C	0.071	0.068
HA5	G	T	C	G	G	A	T	T	G	A	G	C	G	C	0.029	0.034
HA6	A	T	C	G	G	A	T	C	A	G	A	T	A	T	0.015	0.012

SNPの表示は、表1と同様。MSA患者群で頻度の多いhaplotypeからHA1, 2, 3, 4, 5, 6とした。
 患者対照群総じて、アレル頻度のより多いアレルを白枠、少ないアレルを灰色の枠で示した。

考 察

今回、我々は臨床的にDLBと診断された2症例において、synuclein family 遺伝子に一塩基置換を見出した。SNCGについては世界で初めて、SNCBについては2例目である。患者1に認められたSNCGの86番目のglycineは、生物種を超

えて保存され(図1B)、かつ、synuclein family 遺伝子の相同性解析では、同アミノ酸はSNCA、SNCBと同じglycineへ変化していた(図1C)。SNCAは、野生型・変異型のどちらも、oligomerを形成しやすい傾向があり、この形成には71-82番目の疎水残基の配列が重要であると指摘されている⁸⁾。相同性解析でE86Gはその疎水残基に近

表 4 SNCB と SNCG の SNPs より EM アルゴリズムを用いて推定した haplotype の頻度

A)

Haplotype	患者群	対照群	全体
GG	0.469	0.388	0.427
AA	0.356	0.419	0.389
GA	0.110	0.112	0.111
AG	0.065	0.081	0.073

B)

Haplotype	患者群	対照群	全体
TA	0.739	0.759	0.749
CC	0.136	0.134	0.135
CA	0.125	0.095	0.109
TC	0.000	0.011	0.006

接していた (図 1C)。一方患者 2 で認められた SNCB の V70M も同様に、異種生物間、さらに synuclein family 遺伝子内で保存されており、かつ SNCA との相同性をみると、中心部の疎水残基に隣接していた (図 2B, C)。

野生型の SNCB, SNCG は凝集しにくいとされるが⁸⁾⁹⁾, SNCG が E86G 置換し SNCA と同様のアミノ酸配列になることにより、凝集体形成能の高い SNCA 類似の構造に変化する可能性が考えられた (図 3A)。また、野生型の SNCB と SNCG は凝集体の形成を抑制することが種々の系で示されている⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾²⁵⁾。今回のアミノ酸置換により、SNCB と SNCG が SNCA 凝集に対する拮抗作用

表 5 SNCAIP 遺伝子の各 SNP のアレル頻度

SNP	患者群の遺伝子型			対照群の遺伝子型			allele1 対 allele2	
	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	homo (1/1)	hetero (1/2)	homo (2/2)	χ^2	P値
AIP1	36	7	1	36	12	0	0.23	0.63
AIP2	15	17	12	14	20	14	0.21	0.64
AIP3	20	18	4	19	21	8	1.13	0.29
AIP4	24	13	7	18	22	8	1.59	0.21
AIP5	11	19	14	17	21	10	2.11	0.15
AIP6	37	5	0	38	9	1	1.68	0.20

MSA 症例と正常対照間でアレル頻度を χ^2 検定にて解析した。患者対照群総じて、アレル頻度の多いアレルを 1, 少ないアレルを 2 と規定した。各 SNP は、AIP1 = hCV15965557, AIP2 = hCV1151471, AIP3 = hCV1151458, AIP4 = hCV1151456, AIP5 = hCV11380138, AIP6 = hCV7574609。

表 6 SNCAIP 遺伝子周辺の SNPs による連鎖不平衡解析

	AIP1	AIP2	AIP3	AIP4	AIP5	AIP6
AIP1		0.138	0.027	0.007	0.005	0.008
AIP2	1.000		0.021	0.050	0.200	0.000
AIP3	0.655	0.191		0.675	0.145	0.053
AIP4	0.305	0.293	0.842		0.263	0.050
AIP5	0.187	0.482	0.536	0.725		0.091
AIP6	0.096	0.044	1.000	1.000	1.000	
SNP間距離	59312	21434	4452	10674	15709	

左下が患者対照群全体での、D' (絶対値) による評価 (D' > 0.25 を灰色で示す)、右上が r² による評価 (r² > 0.25 を灰色で) を示す。SNP の表示は、表 5 同様。各 SNP 間の距離は、表に示した通り。

表7 EM アルゴリズムを用い SNPs により推定された SNCAIP 周辺の haplotype

	AIP1	AIP2	AIP3	AIP4	AIP5	AIP6	患者群 頻度	対照群 頻度
HAIP1	C	G	G	A	G	T	0.320	0.273
HAIP2	C	A	A	G	C	T	0.143	0.142
HAIP3	C	A	G	A	C	T	0.115	0.095
HAIP4	C	A	G	A	G	T	0.077	0.014
HAIP5	C	G	A	G	C	T	0.071	0.114
HAIP6	C	G	G	A	C	T	0.057	
HAIP7	A	A	G	A	G	T	0.053	0.055
HAIP8	C	G	A	A	G	T	0.035	0.028
HAIP9	C	A	A	G	C	C	0.029	
HAIP10	C	G	A	G	G	T	0.018	0.019
HAIP11	C	A	G	G	C	T	0.013	0.054
HAIP12	C	G	G	A	C	C	0.012	0.067
HAIP13	C	A	A	G	G	T		0.035
HAIP14	A	A	A	G	C	T		0.031
HAIP15	C	A	G	A	C	C		0.024
HAIP16	A	A	G	A	C	T		0.022
HAIP17	A	A	G	A	C	C		0.012
HAIP18	C	A	A	A	C	C		0.010

SNP の表示は、表 5 と同様。MSA 患者群で頻度の多い haplotype から HAIP1-12 と規定し、HAIP13-18 は、正常対照のみで認められた haplotype で、頻度の多いものから番号を付けた。患者対照群総じて、アレル頻度のより多いアレルを白枠、少ないアレルを灰色の枠で示した。

を失い、Lewy 小体の形成過程が促進される可能性も想定される (図 3A)。今後これらの一塩基置換による SNCA 関連蛋白間の相互作用について、検討する必要がある。

今回我々が経験した SNCG の E86G と SNCB の V70M 症例は、共に発症年齢が 70 代後半と高齢であり、病状の進行が比較的緩徐であった。SNCA の点変異を持つ、常染色体優性遺伝性 PD 症例の臨床像と比較すると、A53T 変異家系の平均発症年齢が 45.6 歳²⁶⁾、A30P 変異家系の平均発症年齢は 59.7 歳であり²⁷⁾、今回の症例に比して若年であった。SNCA の変異による影響に比して、これら SNCA 関連蛋白変異は、あくまでも補助的

であるため、その臨床像が、SNCA 変異例に比して軽症であった可能性が考えられた。

今回見出した SNCG の E86G を持つ患者 1 と SNCB の V70M を持つ患者 2 では、家族内での同病の発症者を確認できていない。そのため、これらの一塩基置換と DLB 発症の関連については、慎重な判断が必要と考える。しかし、これらの一塩基置換が正常対照 279 例、PD 患者 354 例で認められておらず、一方、DLB 症例 21 例中 2 例に認められたことは意義があると思われる。今後、これらの一塩基置換の意義を明らかとするため、類似症例の蓄積、本変異による SNCA 凝集能の生化学的な検討が必要である。

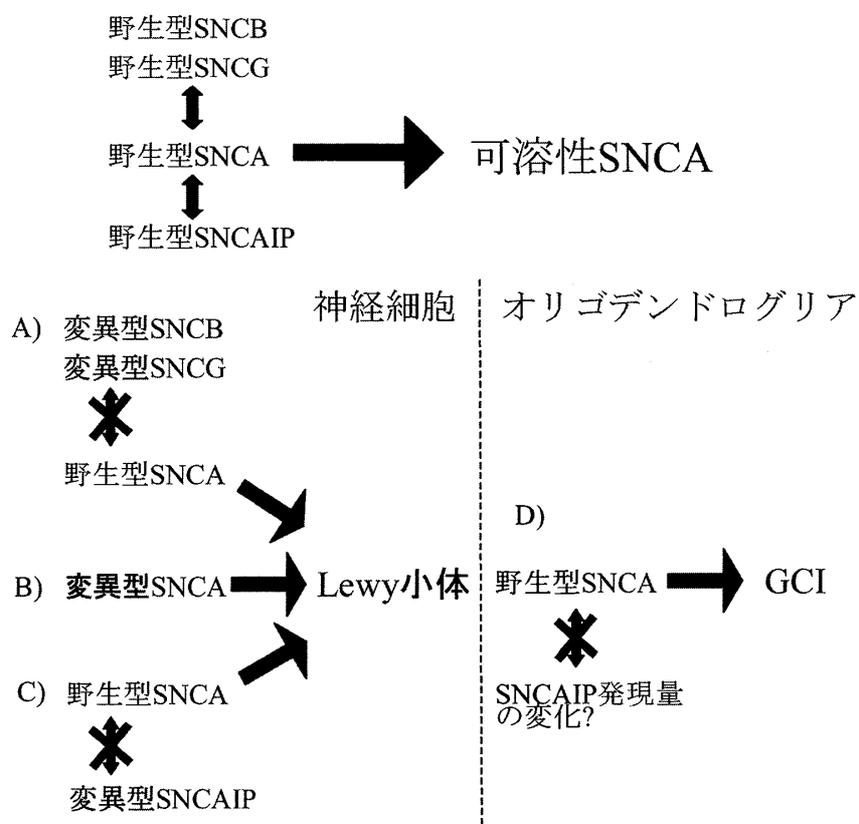


図3 α -synucleinopathy の病態に対する SNCA 及び SNCAIP 関連蛋白の関与

上段 野生型 SNCA は凝集体を形成しやすいが、野生型の SNCB, SNGC, SNCAIP は SNCA と結合することで、SNCA を可溶化させている。

下段左 神経細胞では、A) 変異型 SNCB, SNGC, C) 変異型 SNCAIP は SNCA の可溶性を維持する能力を失い、SNCA を凝集させ Lewy 小体を形成する。B) 変異型 SNCA そのものが凝集体を形成しやすくなり、Lewy 小体を形成する。

下段右 オリゴデンドログリアでは、野生型 SNCAIP が何らかの変化（発現量の変化?）を起こし、野生型 SNCA を可溶化できず GCI を形成促進する。

MSA に関しては、既に Ozawa らにより SNCA の翻訳領域には変異のないことが、報告されている²⁸⁾。今回、我々は、調節領域及び intron における変異の可能性も考え、SNP による関連解析を行った。しかし SNCA, SNCB, SNGC の SNPs 解析にて患者対照群間で、有意差を持って異なるアレル頻度を示す SNPs は指摘できなかった。一方、SNCAIP 遺伝子領域では、推定 haplotype 頻度で患者対照群間において有意差 ($P < 0.05$) を認め

た。これより SNCAIP 遺伝子及びその近傍に、MSA 発症の疾患感受性遺伝子が存在する可能性が考えられた。Lewy 小体と同様に、MSA 症例の GCI においても SNCAIP が存在することが明らかとなっている⁶⁾。両者の遺伝子レベルからの解析では、SNCAIP 遺伝子の exon3 に位置する SNP との関連を認めなかったという報告のみである²⁹⁾。SNCAIP は SNCA に結合する蛋白として分離されており⁴⁾、当初より α -synucleinopathy との関連

が推察されてきた。最近、孤発性 PD 症例において SNCAIP のミスセンス変異 R621C が指摘された²¹⁾。この R621C 変異 SNCAIP は、SNCAIP 由来の細胞内封入体を有する細胞の割合を野生型に比べ低下させ、細胞死を増加させることが報告されている(図 3C)。MSA においても SNCAIP が α -synucleinopathy の病態に関与している可能性が考えられ、今後、同領域に関して、さらに症例数、SNP を増やし、検討を加える必要がある(図 3D)。

今回、SNCA 遺伝子では 91.2kb、SNCAIP では 111.6kb の範囲に分布する SNP で連鎖不平衡解析を行い、SNCA では全領域にわたり連鎖不平衡ブロックが推測され、一方 SNCAIP では、ほぼ同じ物理的距離でありながら、連鎖不平衡領域を指摘しにくく、多型性に富む領域であることを示した。さらに、孤発性の DLB 各 1 例で SNCG の E86G、SNCB の V70M を報告し、MSA 症例と正常対照群で SNCAIP の haplotype 頻度に相違があることを示した。PD のみならず、他の α -synucleinopathy の発症に対し、SNCB、SNCG、SNCAIP という SNCA 関連蛋白遺伝子群の関与が示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、公益信託 永尾 武難病研究基金の助成を受けた。本稿を終えるにあたり、本研究のご指導を頂きました、新潟大学脳研究所脳疾患リソース解析部門分子神経疾患資源解析学分野 小野寺理助教授、脳疾患標本解析学分野 柿田明美助教授、病理学分野 高橋均教授、神経内科学分野 西澤正豊教授、大阪大学ゲノム機能分野 戸田達史教授、東京大学神経内科 辻 省次教授に心より深謝申し上げます。

文 献

- 1) Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R and Goedert M: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840, 1997.
- 2) Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M and Goedert M: alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6469-6473, 1998.
- 3) Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S and Takahashi H: Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 249: 180-182, 1998.
- 4) Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ, Margolis RL, Troncoso JC, Lanahan AA, Worley PF, Dawson VL, Dawson TM and Ross CA: Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet* 22: 110-114, 1999.
- 5) Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA and Takahashi H: Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47: 521-523, 2000.
- 6) Wakabayashi K, Engelender S, Tanaka Y, Yoshimoto M, Mori F, Tsuji S, Ross CA and Takahashi H: Immunocytochemical localization of synphilin-1, an alpha-synuclein-associated protein, in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 103: 209-214, 2002.
- 7) Mori F, Nishie M, Yoshimoto M, Takahashi H and Wakabayashi K: Reciprocal accumulation of beta-synuclein in alpha-synuclein lesions in multiple system atrophy. *Neuroreport* 14: 1783-1786, 2003.
- 8) Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ and Lee VM: A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276: 2380-2386, 2001.
- 9) Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, Goedert M and Fink AL: Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. *J Biol Chem* 277: 11970-11978, 2002.
- 10) Park JY and Lansbury PT Jr: Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry* 42: 3696-3700, 2003.

- 11) Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL and Beyreuther K: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4245 - 4249, 1985.
- 12) Goate A, Chartier - Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak - Vance MA, Roses AD, Williamson R, Rossor M, Owen M and Hardy J: Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704 - 706, 1991.
- 13) Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E and Ikeda K: Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt - Jakob disease. *Brain Res* 541: 163 - 166, 1991.
- 14) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL and Pericak - Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921 - 923, 1993.
- 15) Orr HT: Beyond the Qs in the polyglutamine diseases. *Genes Dev* 15: 925 - 932, 2001.
- 16) Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L and Riess O: Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha - synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18: 106 - 108, 1998.
- 17) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI and Nussbaum RL: Mutation in the alpha - synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045 - 2047, 1997.
- 18) Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J and Gwinn - Hardy K: alpha - Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841, 2003.
- 19) Farrer M, Maraganore DM, Lockhart P, Singleton A, Lesnick TG, de Andrade M, West A, de Silva R, Hardy J and Hernandez D: alpha - Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 10: 1847 - 1851, 2001.
- 20) Limprasert P, Taylor JP, Leverenz J, Tsuang D, Bonner L, Tanaka F, Bird TD, Sopher BL and La Spada AR: Beta - synuclein gene alteration in Dementia with Lewy Bodies (DLB). *ASHG 51st Annual Meeting*: 2001.
- 21) Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, Cookson MR, Hernandez D, Farrer MJ, Kachergus J, Engelender S, Ross CA, Berger K, Schöls L, Schulz JB, Riess O and Krüger R: Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin - 1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 12: 1223 - 1231, 2003.
- 22) Farrer M, Wavrant - De Vrieze F, Crook R, Boles L, Perez - Tur J, Hardy J, Johnson WG, Steele J, Maraganore D, Gwinn K and Lynch T: Low frequency of alpha - synuclein mutations in familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 43: 394 - 397, 1998.
- 23) Excoffier L and Slatkin M: Maximum - likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 12: 921 - 927, 1995.
- 24) McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA and Perry RH: Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on

- DLB international workshop. *Neurology* 47: 1113 - 1124, 1996.
- 25) Hashimoto M, Rockenstein E, Mante M, Mallory M and Masliah E: beta - Synuclein inhibits alpha - synuclein aggregation: a possible role as an anti - parkinsonian factor. *Neuron* 32: 213 - 223, 2001.
- 26) Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J and Nicholson GA: Clinical and Pathological Features of a Parkinsonian Syndrome in a Family with an Ala53Thr alpha - Synuclein Mutation. *Ann Neurol* 49: 313 - 319, 2001.
- 27) Krüger R, Kuhn W, Leenders KL, Sprengelmeyer R, Müller T, Woitalla D, Portman AT, Maguire RP, Veenma L, Schröder U, Schöls L, Epplen JT, Riess O and Przuntek H: Familial parkinsonism with synuclein pathology Clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology* 56: 1355 - 1362, 2001.
- 28) Ozawa T, Takano H, Onodera O, Kobayashi H, Ikeuchi T, Koide R, Okuizumi K, Shimohata T, Wakabayashi K, Takahashi H and Tsuji S: No mutation in the entire coding region of the alpha - synuclein gene in pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 270: 110 - 112, 1999.
- 29) Morris HR, Vaughan JR, Datta SR, Bandopadhyay R, Rohan De Silva HA, Schrag A, Cairns NJ, Burn D, Nath U, Lantos PL, Daniel S, Lees AJ, Quinn NP and Wood NW: Multiple system atrophy/ progressive supranuclear palsy: alpha - Synuclein, synphilin, tau, and APOE. *Neurology* 55: 1918 - 1920, 2000.

(平成16年1月23日受付)
