

主論文の要旨

TUBA1A mutation can cause a hydranencephaly-like
severe form of cortical dysgenesis

〔 *TUBA1A* 変異は水無脳症に類似した重度の脳形成異常を引き起こす 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

横井 摂理

【緒言】

微小管 microtubule は、 α と β の二種類の tubulin が重合してできた管状の線維構造のタンパク質で、細胞骨格の一種である。神経細胞に発現する tubulin 遺伝子の変異によって引き起こされる脳形成異常は tubulinopathy と呼ばれ、現在までに *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3*, *TUBB*, *TUBB4A*, *TUBB2A*, *TUBG1* 遺伝子の変異が報告されている。そのうちの一つである *TUBA1A* 遺伝子変異により引き起こされる脳形成異常は、小脳低形成を伴う滑脳症が典型的であるが、今回我々は、最重度の脳形成異常の二例において、*TUBA1A* 遺伝子の新規ミスセンス変異を同定した。これらの患者がなぜ最重度の表現型を呈したのか調べるために、二例の α -tubulin 変異体と患者線維芽細胞を用いて、その機能と重症度を考察した。

【症例】

症例 1 は 3 歳女児。胎児期に脳室拡大を認めた。生後水頭症が進行し、大脳実質は非常に菲薄で、脳幹の低形成、小脳・脳梁無形成を伴う最重度の滑脳症を呈した (Figure 1.a-d)。四肢麻痺があり、自発呼吸や嚥下反射はなく、人工呼吸管理と経管栄養を行っている。症例 2 は 2 歳男児。胎児期に脳室拡大を認め、出生後の頭部 MRI では、著明な脳室拡大、無脳回/厚脳回、基底核異形成、脳梁欠損、小脳虫部の軽度低形成を認めた (Figure 1.e-h)。四肢麻痺があり、寝返り、座位は不可能であった。患者と両親のトリオ全エクソーム解析で、症例 1 は *TUBA1A* c.190C>T(p.R64W) の de novo ヘテロミスセンス変異、症例 2 は *TUBA1A* c.74G>T(p.C25F) の de novo ヘテロミスセンス変異を新規に同定した。

【方法】

1. α -tubulin 変異体の微小管形成能を評価するため、FLAG タグを付けた WT(野生型)、p.R64W、p.C25F(患者変異)、p.R402C(古典的滑脳症を呈する対照変異)の *TUBA1A* を COS7 細胞に強制発現させ、24 時間後に抗 α -tubulin 抗体、抗 FLAG 抗体で免疫染色し、*TUBA1A* 変異体が内在性の microtubule network に取り込まれて線維構造を取ることができるかどうか調べた。
2. 線維芽細胞の微小管は、氷上でインキュベートすると脱重合する。この性質を利用し、コントロールと患者由来線維芽細胞を 5,10,15,20 分間氷上で冷却して抗 α -tubulin 抗体で免疫染色し、それぞれの時間毎に、 α -tubulin が完全に脱重合した細胞の割合を調べ、患者線維芽細胞の微小管の安定性を評価した。
3. R64 と C25 の α -tubulin における位置と機能を、蛋白構造解析から予測した。

【結果と考察】

TUBA1A 遺伝子の変異による脳形成異常は、典型的には後頭優位の滑脳症、小脳低形成、基底核異形成、脳梁低(無)形成、小頭症、脳室拡大、海馬と脳幹の異常が認められるが、これらの特徴を満たさなければ、臨床診断は難しい。今回我々は大脳実

質が非常に菲薄で、重度の水頭症を伴い、小脳・脳梁無形成、脳幹低形成という最重度の脳形成異常の症例 (*TUBA1A* p.R64W) を経験した。*TUBA1A* 遺伝子異常による脳形成異常の既報告にはみられない、最重度の症例であった。また、もう一例 (*TUBA1A* p.C25F) も既報告症例の最重症群と同等の重症例であった。*TUBA1A* 遺伝子異常の脳形成異常の重症度は、変異により様々であると考えられた。

1. Flag-tagged *TUBA1A* WT は、線維状の微小管を形成し、内在性の α -tubulin と共局在していた(Figure2.a.A,B,C)。Flag-tagged *TUBA1A* 変異体は、線維状の染色とともに、細胞質内に拡散した粒状の染色を認めた(Figure2.a.E,H,K)。ImageJ を用いて線維状の染色の線分抽出を行い、関心領域に設定した COS7 細胞中の線維密度を計算して 30 細胞の平均値を比較したところ、WT > R64W > C25F > R402C であった(Figure2.b.A.)。WT と各変異体、R64W と R402C の間に有意差を認めた($p < 0.01$)。すなわち R402C に比べて、R64W、C25F では、FLAG が線維状に染色されており、より多くの *TUBA1A* 変異体が微小管の形成に参加していると考えられた。従来 *TUBA1A* 遺伝子の異常は、ミスセンス変異の報告のみで、優性阻害形式の変異であると考えられている。より多くの α -tubulin 変異体が微小管形成に参加しているという点で、優性阻害効果により、より重症な表現型を呈したと考えられた。

2. 冷却 5 分ではコントロール、患者由来線維芽細胞ともに完全に脱重合した細胞は見られなかった(Figure3.a.D,E,F)。冷却 10 分後完全に脱重合した細胞の割合は、コントロール細胞では 6.5%であったが、R64W では 36%、C25F では 25%であり、コントロール細胞と患者細胞で有意差を認めた(それぞれ $p = 5.6 \times 10^{-24}$ 、 $p = 5.8 \times 10^{-14}$)(Figure3.a.G,H,I)。R64W と C25F の患者細胞間では有意差は認められなかった。冷却後に再度 37°C に 15 分間置いた線維芽細胞では、 α -tubulin は再重合しており、冷却前の線維芽細胞と同様であった(Figure3.a.P,Q,R)。このことから、R64W、C25F の方が冷却後早期に α -tubulin が脱重合している細胞が多く、微小管がより不安定であると考えられた。

3. 微小管は α -tubulin と β -tubulin が繰り返し重合し、protofilament と呼ばれる線維構造を形成し、その protofilament が 13 本集まって筒状の微小管が形成される。protofilament 同士の結合は、lateral interaction と呼ばれ、tubulin の M loop, H1'-S2 loop, H2-S3 loop で結合している。蛋白構造解析では α -tubulin の R64 は H1'-S2 loop に位置し、lateral interaction に直接的に関与すると予測された。C25 は helix H1 と H1-H1' loop の境界に位置し、H1-H1' loop は H1'-S2 loop を安定化させると考えられており、C25 は二次的に lateral interaction に関与すると考えられた(Figure4)。lateral interaction は微小管の集合に必要であるため、lateral interaction に関与する変異は、微小管を不安定にすると考えられている。微小管は、neuron の複雑な network の形成に寄与しており、その構造を維持する上で lateral interaction は重要な機能を果たすと考えられている。過去の報告では、 α -tubulin の lateral interaction に関与する変異は、小脳低形成を伴う滑脳症の重症群に属するものが多かった。したがって、今回の結果と併せると、 α -tubulin の lateral interaction に影響を与える変異は重症な表現型を呈する可能性がある。

【結語】

TUBA1A p.R64W、p.C25F では、 α -tubulin の lateral interaction が障害され、より多くの不安定な α -tubulin 変異体が微小管形成に参加しているという点で、優性阻害効果によって表現型が最重症であると考えられた。過去の報告でも α -tubulin の lateral interaction に関与する変異は小脳低形成を伴う滑脳症の重症群に属するものが多く、この部位の変異は重症な表現型を呈する可能性がある。