

## 壹、緒論

### 一、脊髓小腦運動失調症(SCA)

脊髓小腦運動失調症(Spinocerebellar ataxia，簡稱 SCA)，為一種晚發性的體染色體顯性遺傳之退化性神經疾病，小腦功能障礙是所有脊髓小腦運動失調症的病狀。目前從分子層次分析，可有效鑑定出三種不同類型的 SCA，第一類有 SCA1、2、3、7 和 17，起因於可轉譯蛋白的基因序列上，CAG 三核苷酸的重複擴增，導致轉譯出帶有多聚醯胺酸(PolyQ tract)的毒性蛋白(Orr *et al.*, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1994; Pulst *et al.*, 1996; David *et al.*, 1997; Zhuchenko *et al.*, 1997; Koide *et al.*, 1999)。第二類有 SCA6、EA1 (episodic ataxia type 1)、EA2 (episodic ataxia type 2)三種疾病，其突變基因會轉譯出功能缺失的鈣或鉀離子通道蛋白(Zhuchenko *et al.*, 1997; Jodice *et al.*, 1997; Bozzola *et al.*, 2007)。此外還有三種 SCA 類型是源自不會轉譯出蛋白質的基因序列，其上的三或五核苷酸重複的不正常擴增所導致，如 SCA10 起因於致病基因 intron 內 ATTCT 五核苷酸重複擴增(Matsuura *et al.*, 2000)，SCA8 起因於致病基因 3'端 CTG 三核苷酸重複擴增(Koob *et al.*, 1999)，而 SCA12 起因於 *PPP2R2B* 基因 5'端有一 CAG 三核苷酸重複擴增，在基因的上游處 133 個核苷酸的位置(Holmes *et*

*al.*, 1999)。

## 二、第十二型脊髓小腦運動失調症(SCA12)

*PPP2R2B*基因CAG三核苷酸重複擴增所導致的SCA12最早報導於一德裔美藉家族(Holmes *et al.*, 1999)，隨後陸續在多個印度家庭中發現此疾病，一般印度人族群中*PPP2R2B*基因5'端CAG三核苷酸重複次數範圍是7 ~ 45次，所發現SCA12病人的CAG三核苷酸重複擴增範圍是55 ~ 78次(Holmes *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 2001)，在五個印度家族中，發現有六位病患及三個無發病的個體皆帶有不正常擴增的三核苷酸重複片段，推論此疾病在印度並非少見，且有一共同創始者，但SCA12在印度家族跟美裔家族的基因創始者並不相同(Bahl *et al.*, 2005)。SCA12初期的臨床症狀有上肢運動型的震顫，然後漸漸出現輕微的小腦功能障礙(運動失調和四肢及眼球的運動功能失調)、過度反射、眼球震顫、肌肉異常緊張、類帕金森氏症症狀(肌肉緊張、自發性運動和運動或智能上的遲緩)、晚期則會出現失智的情形，一部分病人會出現精神疾病症狀(焦慮和憂慮) (Holmes *et al.*, 2003)。利用磁共振造影(magnetic resonance imaging, 簡稱MRI)發現SCA12的病人在大腦、小腦及蚯葉(vermis)都出現萎縮現象，這些不同部位的萎縮情形可以與其臨床上的症狀作對應。患者的發病年齡自8到55歲，大

部分的病人發病時間為40歲左右，發病之後疾病的進程非常的緩慢(Holmes *et al.*, 2001, 2003)。在台灣的正常人族群中，CAG三核苷酸重複範圍是7~27次，最常見的重複次數為10、13和16，但未見到CAG三核苷酸重複擴增的SCA12病患(Wu *et al.*, 2004)。

### 三、阿茲海默氏症(AD)

阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, 簡稱 AD)是一種漸進式的神經退化性疾病，是目前全球最普遍的老人失智型式。主要的症狀包括認知、理解能力的減弱和嚴重的記憶喪失，大部分的病人在發病8~10年之後會死亡。阿茲海默氏症依發病年齡，可分為早發性(小於65歲)及晚發性(大於65歲)兩大類，90%的病例皆是發生在65歲之後。高齡、頭部外傷、罹患唐氏症及帕金森氏症、高教育程度、抽煙和酗酒皆是增加得到阿茲海默氏症的危險因子(Richard and Amouyel, 2001)。具有失智家族病史是阿茲海默氏症的另一個危險因子。在針對雙胞胎的研究中，同卵雙胞相較於異卵雙胞對於遺傳的影響更有一致性(Raiha *et al.*, 1996)。

阿茲海默氏症在組織上的主要病理特徵包括與Tau蛋白相關的神經纖維糾結(neurofibrillary tangles)及腦部類澱粉粒蛋白大量沉積

(senile plaques 或 amyloid plaques) (Hardy, 1997)。Tau 蛋白透過磷酸化及去磷酸化來調節神經細胞骨架的微管，以維持微管的穩定。當 Tau 過度磷酸化時，便無法正常作用並在神經細胞內形成絲狀糾結 (Bramblett *et al.*, 1993)。β-amyloid 蛋白是先驅蛋白 APP (β-amyloid precursor protein)經切割而來。

在早發性的阿茲海默氏症中，第一個被報導的相關基因是位於二十一號染色體上的 Amyloid β precursor protein (*APP*)基因(Goate *et al.*, 1991)；接著第十四號體染色體上的 presenilin-1 (*PS-1*) 基因 (Schellenberg *et al.*, 1992)與第一號染色體上 presenilin-2 (*PS-2*)基因 (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1995)亦被報導與體染色體顯性遺傳型式的阿茲海默氏症相關。*PS-1* 及 *PS-2* 可能在神經新生方面扮演著幫助神經分化的角色(Capell *et al.*, 1997)。另外，位在第十九號染色體上的 *APOE* 基因的 ε4 等位基因為阿茲海默氏症的危險因子 (Richard and Amouyel, 2001)。唐氏症之所以為阿茲海默氏症的危險因子其原因為患者在第二十一條染色體擁有異常三條染色體，故 *APP* 基因擁有多一倍的表現量，如此導致 *APP* 蛋白的過度表現，生產過多的有毒類澱粉粒蛋白迅速堆積，無法以正常速度有效分解，造成通常唐氏症患者在三十歲左右就會出現類阿茲海默氏症的病症，因此

*APP* 基因的表現調節對於阿茲海默氏症的發展扮演著重要的角色(Lv *et al.*, 2006)。

#### 四、原發性顫抖症(Essential tremor)

原發性顫抖症(Essential tremor)是動作障礙疾病中最常見的疾患，也是震顫疾病中最普遍的一種型態，患者肢體肌肉產生非自主但是節律性震顫。顫抖通常是兩側對稱性一起開始，並以手為起始部位，有時也會影響到頭頸部、聲音、腿部或是軀幹，有 30%~50%的原發性顫抖症的病人容易被誤診為帕金森氏症或其餘型式的顫抖症(Benito-Leon and Louis, 2006)；患有原發性顫抖症的患者在大腦的路易氏體以及多巴胺神經元產生病變(Shahed and Joseph, 2007)。在美國有多個研究顯示白種人較非裔美國人普遍罹患此疾病(Louis *et al.*, 1995, 2003)，而居住在北以色列的阿拉伯居民患此疾病的普及率很低(Inzelberg *et al.*, 2006)。年齡是罹患原發性顫抖症的最大危險因子，許多原發性顫抖症的病人具有家族遺傳史的情形，因此基因遺傳因子為其病因的重要的危險因子，但是其確切的遺傳方式目前仍不清楚，最近找到三個具高感受性的位置，分別位在染色體 3q13 (Gulcher *et al.*, 1997)、2q22 (Higgins *et al.*, 1998)以及 6q (Shatunov *et al.*, 2006)；染色體 3q13 位置可能為多巴胺D3 接受子基因(Jeanneteau *et al.*, 2006)。至

於無家族史、偶發性的原發性顫抖症之病因可能由環境因子造成，飲食習慣或是烹飪方法等等，鑑定出暴露在哪些環境因子可防止病情發展(Thanvi *et al.*, 2006)。

## 五、*PPP2R2B* 基因與去磷酸酶 PP2A

*PPP2R2B* 基因又稱爲 *PR55 $\beta$* 、*B55 $\beta$*  基因，位在人類第五號染色體上，總共包含 10 個表現子(表現子 1.1、1.2、2~9)，表現子 1.1、1.2 分別由鄰近上游的啓動子(promoter)啓動，經選擇性裁接(alternative splicing)後，包含表現子 1.1 及 2~9 的 mRNA，將轉譯出含 443 個氨基酸的 B $\beta$ 1 蛋白；而包含表現子 1.2 及 2~9 的 mRNA，則轉譯出含 446 個氨基酸的 B $\beta$ 2 蛋白。B $\beta$ 1 及 B $\beta$ 2 蛋白僅在 N 端 21 或 24 個氨基酸不同，後面 422 的氨基酸皆相同。B $\beta$ 1 蛋白在細胞的表現量較豐富，約爲 B $\beta$ 2 蛋白的 10 倍(Dagda *et al.*, 2003)。

去磷酸酶 PP2A (protein phosphatase 2A)爲去絲胺酸(serine)和蘇胺酸(threonine)上磷酸根的酵素，在演化上高度保留(Shenolikar, 1994)。PP2A 扮演多種調控角色，包括細胞生長、分化、細胞質分裂、細胞型態、離子孔道、神經傳導物的釋放、微管組成、去氧核糖核酸的複製和細胞自戕等(Santoro *et al.*, 1998 ; Price and Mumby, 1999 ; Virshup,

2000)。完整的 PP2A 酵素包含三個次單位：骨架的 A 次單位、調控的 B 次單位、催化功能的 C 次單位。哺乳類動物中 PP2A 的 A 及 C 次單位分別有兩型，普遍的表現在全身，而 B 次單位至少存在有 18 型，為組織或細胞表現專一性，所以在自然界中至少存有 75 種以上不同型式的 PP2A (Martens *et al.*, 2004)。調控的 B 次單位可調節 PP2A 對受質、組織或細胞的專一性，及在細胞內作用的位置(Strack *et al.*, 1998；Virshup, 2000)。PPP2R2B 基因即為專一表現在腦部的調節 B 次單位(Mayer *et al.*, 1991)，所 encode 的 B $\beta$  蛋白可調控 PP2A 將微絲蛋白(vimentin) (Turowski *et al.*, 1999)、組織蛋白(histone-1) (Ferrigno *et al.*, 1993)、Tau 蛋白(Sontag *et al.*, 1996)等受質去磷酸化。B $\beta$  蛋白的兩種 isoform 中，B $\beta$ 1 蛋白使 PP2A 作用在細胞質，B $\beta$ 2 蛋白則引導 PP2A 至粒腺體外膜作用，但兩者調控的去磷酸酶活性並無顯著差異 (Dagda *et al.*, 2003)。

當酵母菌中 PPP2R2B 的同源基因 CDC55 產生突變時，酵母菌細胞分裂會發生問題(Healy *et al.*, 1991)；果蠅 PPP2R2B 同源基因 *twins* 的突變株，在細胞分裂的中期及神經的發育皆會出現問題(Shiomi *et al.*, 1994)。另外以哺乳類神經細胞作為實驗材料的實驗發現，抑制 PP2A 的活性，會造成類似阿茲海默氏症症狀的過度磷酸化的 Tau 蛋

白堆積(Sontag *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 2000)。過磷酸化的 Tau 蛋白的產生有兩個原因,其一為去磷酸化機制的缺失;其二為調節 PP2A 蛋白活性的激酶之活化,包括了 CaM KII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)、MAP kinases 以及會被壓力所活化的蛋白激酶等 (Bennechib *et al.*, 2001; Kins *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2003)。故過磷酸化的 Tau 蛋白在阿茲海默氏症所帶有的神經毒性上扮演重要的角色。另外在阿茲海默氏症患者的腦部發現 PP2A 蛋白的活性有明顯的下降趨勢 (Gong *et al.*, 1995)。

## 六、*PPP2R2B* 基因 CAG 三核苷酸重複變異與 SCA12、AD 的相關性

*PPP2R2B* 基因表現子 1.1 上游、啓動 B $\beta$ 1 蛋白轉錄的調節序列上,並沒有明確的 TATA box, CAG 重複序列位於表現子 1.1 的 5'端上游 133 個鹼基的位置(Holmes *et al.*, 1999),而 CAG 重複序列的 3'端 65 個鹼基處,有 MED-1 (multiple start-site element downstream-1)序列 GCTCCC,和多個轉錄起始點(multiple alternative transcription start site)相關(Ince and Scotto, 1995)。人類及老鼠的 EST 分析亦顯示,*PPP2R2B* 基因有數個轉錄起始點(Holmes *et al.*, 2003),故 CAG 三核苷酸重複可能為啓動子的一部份,或為 mRNA 的 5'UTR (untranslational region) 序列(Dagda *et al.*, 2003)。老鼠與人類的 *PPP2R2B* 基因序列及表現情



形在演化上是保守的(Schmidt *et al.*, 2002)。當以網路上的軟體(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)分析人類及老鼠 *PPP2R2B* 基因高度保守的啓動子序列，發現 CAG 三核苷重複上下游序列包含轉錄因子 CREB (cAMP responsible element binding protein)、MZF1 (myeloid zinc finger 1)、CP2 等的可能結合部位。故推測 CAG 三核苷重複變異可能改變鄰近轉錄因子的交互作用，進而影響 B $\beta$ 1 的表現量(侯，2005)。CAG 重複次數擴增可能導致 B $\beta$ 1 的表現量增加及 PP2A 的活性增加，造成小腦細胞病變及 SCA12 (Holmes *et al.*, 2000)。擴增的 CAG 三核苷重複亦可能影響 *PPP2R2B* mRNA 的選擇性裁接，使得 B $\beta$ 1 與 B $\beta$ 2 蛋白的相對量改變，造成神經細胞死亡。

先前本實驗室在對台灣族群的阿茲海默氏症病人，進行 *PPP2R2B* 基因 5'端 CAG 三核苷重複分析，發現很短的 7 個 CAG 三核苷重複等位基因，較常出現於台灣人的阿茲海默氏症患者中，且此等位基因的啓動子活性顯著降低(侯，2005)。故推測 CAG 三核苷重複的減少會使 B $\beta$ 1 的表現量降低及 PP2A 的活性降低，進而使 PP2A 無法正常將其受質 Tau 去磷酸化，產生過度磷酸的 Tau 蛋白，增加阿茲海默氏症的感受性。

## 七、啓動子多型性與疾病感受性

對於晚發性阿茲海默氏症，*APP* 基因爲 candidate gene；2005 年 Lahiri DK 在 *APP* 基因的啓動子區域發現兩處單一鹼基多型性點，分別是-3829C>T 以及-1023T>C，尤其是-1023 T>C 此多型性點，與阿茲海默氏症患者的子代有顯著的相關性。而一個鹼基的改變，會增加一些轉錄因子(Transcriptional factor)在啓動子上的結合位置，或失去轉錄因子的結合序列(Lahiri DK *et al.*, 2005)。另外，位於中國的 Lv H 也搜尋到 *APP* 基因啓動子上的三個單一鹼基多型性點，-955A/G、-877T/C、-9G/C，大量篩選個體之後得到-955A/G 和-877T/C 的基因型以及等位基因頻率，在偶發型阿茲海默氏症病人與正常人之間有顯著的差異，並且兩者間有強烈的連鎖不平衡，作者推測此兩個多型性點與阿茲海默氏症的發展有關聯，而-9G/C 則與此疾病沒有相關性(Lv H *et al.*, 2006)。

*PPP2R2B*啓動子-870 ~ +23 片段可調節*PPP2R2B*基因的基礎表現量(侯，2005)，但更上游啓動子片段可能調節細胞專一性表現。經上網查詢資料庫，對*PPP2R2B*基因 4 kb長的啓動子片段進行多條序列比對(AC011386、AC091919、NM\_004576)後，發現可能存在多個單一鹼基多型性(single nucleotide polymorphism，簡稱SNP)，其中 4 個SNP

(-3170 C/T、-2923 A/G、-1905 T/A、-428 A/G)經確認後確實存在於台灣人的族群中，再經過網路資料庫(<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)查詢此四個單一鹼基多型性是否位於轉錄因子調控區域，發現-3170 的位置包含在一個在肝及腦中均會表現的轉錄因子HNF-3 $\beta$ 的結合序列(Overdier *et al.*, 1994)。