

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

早発老化の発生機序に関する遺伝的・生物学的研究

平成10年度

高 嶋 幸 男

(国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第2部 部長)

厚生科学研究費補助金総括研究報告書
早発老化の発生機序に関する遺伝的・
生物学的研究

高嶋幸男（国立精神・神経センター
神経研究所疾病研究第2部 部長）

Werner症候群の遺伝子を発見し、WSにおける各種老化徴候の発現機構解明の糸口を築いた。若年の肥満のモデル動物が、遺伝子工学的に開発され、早期から視床下部を中心にエネルギー代謝を制御していることが分った。コッケイン症候群におけるDNA修復障害の機序に除去修復遺伝子が関与し、また、紫外線照射によるアポトーシスを引き起こすシグナル伝達がサイトカインにより調節されることを見いだした。ダウン症モデルマウスの分子生物学的検討によって、ヒト染色体21番にコードされるEts-2遺伝子がダウン症脳におけるperipherinの過剰発現を介して早発老化発症に関連していること明らかにした。更に、ダウン症神経系細胞株が樹立され、Ets2遺伝子による早発分化が知的障害や神経細胞の早発老化と関係していることが示唆された。また、新しく発見されたDSCAMDSは、脳、特に老人斑における発現の増強が確認された。プレセニリンPS-1および2の全長鎖cDNAを神経細胞に導入し、A β (1-42)の分泌が亢進した。アルツハイマー病脳では、bleomycin hydrolaseによってA β ペプチドが分解され、治療への応用が期待される。アミロイド沈着を伴わない神経原線維およびグリア線維変化の早期発現は小児神経疾患で特異な部位に認められ、COX2の誘導は神経原線維形成に先行し、フリーラジカルが変性に関与していることが示された。老化にみられる軸索変性に関連して、GAD遺伝子の局在領域が狭められ、一方、ヒト後索核の軸索変性の機序として末梢神経側の障害に基づくことが証明された。

〔研究組織〕

- 高嶋幸男（国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第2部部長）
和田圭司（同上疾病研究第4部部長）
高橋慶吉（同上疾病研究第6部室長）
小野寺一清（工学院大学応用化学科
教授）
大野耕策（鳥取大生命科学科神経生物
教授）
杉田克生（千葉大教育学部臨床医学科
助教授）
塚田昌滋（国療中信松本病院院長）
難波吉雄（東京大学老年医学科）
三木哲郎（愛媛大学医学部老年医学）

A. 研究の目的

早発老化は小児期から始まると考えられ、遺伝的・縦断的研究が必要である。ダウン症候群では、30才を過ぎると、アルツハイマー型痴呆が必発するので、早発痴呆の病態の解明は必須であり、予防と治療の研究も行いやすい。本症におけるアミロイド早期沈着の前の病態を解明し、進行の機序を追跡し、早期診断や早期治療法を開発する。一方、小児神経疾患に早発する神経細胞の神経原線維変化の機序を検討し、痴呆の本体を解明する。さらに、早老症候群の病因を解析し、多彩な老化の病態解明に役立たせる。早老の機序は

複雑であり、小児期から老化の機序を解明し、予防法を開発する。

B. 研究方法

1. 早老症症候群のリンパ球や皮膚線維芽細胞を用いて、遺伝学的、生物学的に検討し、また、モデル動物を作成して、早老の成因と機序を追求する(杉田、和田)。2. ダウン症候群の脳、髄液および培養皮膚線維芽細胞ならびにダウン症モデルマウス脳を用いて、分子病理学的、分子生物学的に、年齢別に検索する。さらに、ダウン症モデル神経系細胞を樹立し、痴呆の発生機序と早期診断を検討する(高嶋、小野寺、大野)。3. 家族性アルツハイマー病遺伝子による早発老化と神経細胞変性の機序を解明し、予防法を開発する(高橋、難波)。4. 小児神経疾患における早発老化の機序を縦断的に検索し、特異な部位の早発老化現象の発生機序を追求する(塚田、高嶋)。

C. 研究結果

1. 早老症症候群の早発老化発生機序

ウェルナー症候群の責任遺伝子が発見され、そのWRN-Hの転写活性の有無を検索した結果、全長のWRN-Hは酵母においてTATAプロモーターからの転写を約20倍に増強することが明らかになった。本症患者由来線維芽細胞では自然老化細胞と同じように様々な遺伝子のmRNAレベルにおける発現変化(転写異常)がみられ、これがウェルナー症候群における各種老化徴候の発現解明につながる。

新しい肥満モデルマウスを開発し、早発老化の機序を検討した。ボンベシン様ペプチド受容体サブタイプ3(BRS-3)欠損マウスを発生工学的に作成し、肥満および代謝異常を見いだした。肥満は生後15週頃から顕著となり、高血圧、耐糖能異常を伴っていた。BRS-3欠損マウスの病態形成には低代謝率、過食、糖脂質代謝異常が関与しており、BRS-3欠損マウスでは成人型の一つの病態が早期から出

現していると考えられた。さらに、BRS-3は視床下部に強く発現していることが分かった。

紫外線高感受性のCockayne症候群(CS)由来線維芽細胞において、Human interferon- β (HuIFN- β)前処理により紫外線照射後のコロニー形成能が前処理なしの紫外線照射単独の場合より上昇した。この上昇の原因を解明するために、紫外線照射前にHuIFN- β により発現が誘導される遺伝子をdifferential display法を用いて検出した。7クローンがえられ、その既知遺伝子の中で機能が判明したのはxeroderma pigmentosum-Gであった。CSにおいて、HuIFN- β による紫外線抵抗化の機序に、除去修復遺伝子の発現誘導のあることが示唆された。

更に、紫外線高感受性を呈するCockayne症候群(CS)由来細胞において紫外線応答に関わり、HuIFN- β により誘導されてくるDNA修復関連蛋白質を解析した。CS細胞ではP53は正常コントロール細胞に比し高値で、紫外線照射72時間後も持続的高発現していた。HuIFN- β によりBax蛋白質の発現が低下することより、紫外線によるアポトーシスがHuIFN- β により抑制される可能性が示唆された。

2. ダウン症候群の早発老化の発生機序。

ダウン症候群モデルマウス(Ts65Dn)の脳におけるmRNAをdifferential display法で解析し、peripherin遺伝子が過剰発現していることが明かとなり、ヒトのダウン症候群脳でも増加していた。peripherin遺伝子の上流領域には、ヒト染色体21番上にコードされる転写因子Ets-2の結合ドメインがあり、ダウン症候群におけるperipherinの過剰発現はEts-2のトリソミー効果によると考えられた。さらに、peripherinとEts-2の免疫組織化学によって、自律神経系に関連深いことが明らかになり、細胞内遺伝子挿入によって、マウス16番上に存在しているEts-2が3コピーあるために生じた結果であることが確定された。また神経特異的中間径フィラメントのタンパクであるペリフェリンは加齢に伴うリン酸化を

受け、細胞骨格である中間径フィラメントの構造と機能が大きく変化していることがTs65 Dnの脳で明らかになった。

さらに、遺伝子早期発現を細胞レベルで解析する目的で、ダウン症モデル神経系細胞を樹立し、解析した。分化能を持つ神経系細胞に、ヒト染色体21番を1本過剰に導入し、分化に伴う21番染色体の過剰の影響を生物学的に解析し、数個のクローンが得られた。また、ヒト染色体21番導入細胞株において、ヒト染色体特異的PCR primerを用いて、ダウン症候群critical region (21q22.2)、Ets2領域(21q22.3)、SOD1領域(21q22.1)の存在を確認し、4クローンでperipherinの発現が増強していた。また、分化・成熟過程を検討し、ヒト21番原因遺伝子領域およびEts2遺伝子領域の存在が、PC12細胞のNGF刺激後の神経突起形成が早いことを見だし、この早発分化が知的障害や神経細胞の早発老化と関係している可能性が示唆された。

また、21番染色体Down症候群(DS)責任領域に発見された細胞接着因子(DSCAM)について、ヒト脳における発達・加齢的变化を観察し、同症候群に見られる早発痴呆の病態形成におけるDSCAMの関与につき検討した。老人斑を有する成人期DS例において、DSCAM免疫反応性はしばしば老人斑の周辺に、また時にそのcoreの中心部・core内部に認められた。

3. プレセニリンやNotch3による早発老化の発生機序

家族性アルツハイマー病(FAD)原因遺伝子プレセニリン-1(PS-1)と2の細胞内機能やアミロイド沈着の機序を明らかにするために、まず切断部位を同定し、更にN末およびC末断片を導入したstable transfectantを作成してA β アミロイド産生に対する影響を検討した。A β 産生はPS-1、PS-2全長鎖cDNAを導入した場合、A β (1-42)の分泌がA β (1-40)に比し2-3倍に亢進したが、N末あるいはC末断片cDNAを導入した場合にはそのような変化は認められなかった。このことはプロセ

ッシングによりプレセニリンの活性の一部が失われることを示しており、重要である。

CADASIL 様症状を呈する日本人患者について原因遺伝子Notch3の遺伝子変異スクリーニングを行った。4家系のうち1例でNotch3エクソン4にミスセンス変異(Arg133Cys)が見いだされた。

アルツハイマー病脳では、APPあるいはA β の分解に関与している可能性が示唆されているBleomycin hydrolase 免疫原性が老人斑変性突起に存在していることが明らかとなった。

4. 小児神経疾患における神経原線維変化の早期出現の機序

小児神経疾患である福山型先天性筋ジストロフィー症、亜急性硬化性脳炎、緊張性筋ジストロフィー症、Hallervorden-Spatz病およびCockayne症候群剖検脳などで、神経原性線維およびグリア線維変化の早期出現が認められ、すべてで、COX2強陽性の神経細胞が認められた。多症例検討したFCMDでのCOX2陽性の神経細胞は、神経原線維変化よりも早期に出現し、加齢と共に増加した。COX2陽性細胞は、大脳皮質、海馬傍回、Meynert核、縫線核、青斑核を中心に認められ、海馬では低頻度であり、Down症候群(DS)やAlzheimer病(AD)と比較して好発部位も特徴的であった。FCMD患者大脳皮質では、western blottingにてCOX2の増加が確認され、oligonucleotide probeによるin situ hybridizationでも、一部の神経細胞に局限したCOX2mRNAの増加が認められた。

5. 後索核の軸索腫大の発生機序

後索核に好発する軸索腫大は老化と共に増加する。神経軸索機能の老化モデルであるgracile axonal dystrophy mouse (略してgadマウス)の原因遺伝子のポジショナルクローニングを行った。gad遺伝子の有力候補遺伝子配列を単離した。遺伝子連鎖解析に基づき候補遺伝子領域を特定し、gad遺伝子を含む領域の大腸菌人工染色体(BAC)クローンのcontigを作成した。さらにエクソントラップ

法により当該contigから複数のエクソン配列を単離し、その内の一つがgad マウスと正常対照マウスで異なった結果を示すことを見出した。

一方、ヒトの後索核の検索では、後索核の軸索変性の機序として、末梢神経障害がtransganglionicに関与していることが分かった。

D. 考察・結論

1. Werner症候群の遺伝子が発見された。酵母の系でのTATAプロモーターにおいて全長のWRN-H は転写を約20倍に増強すること、転写活性は酸性領域を含むアミノ酸配列に存在し、さらに酸性領域とヘリカーゼ領域を含むアミノ酸配列は転写活性領域存在下において転写活性増強作用を示すことが判明した。これはWSにおける各種老化徴候の発現機構解明の糸口となる。

若年の肥満のモデル動物として、遺伝子工学的に、BRS-3 マウスが開発された。これでは、早期に肥満が発現し、視床下部を中心として、中枢性にエネルギー代謝を制御していることが分かり、早発肥満を代謝と神経調節の面より検討できるようになった。老化に伴う中枢性機能低下の分子機構を解析する上でも有用性が高い。

C SにおけるDNA 修復障害の機序に除去修復遺伝子が関与していることが分かり、分子病態の解明へ発展できる。また、HuIFN- β によりBax 蛋白質の発現が低下することの発見は、紫外線高感受性細胞において紫外線照射によるアポトーシスを引き起こすシグナル伝達がサイトカインにより調節されることを見いだした点が重要であり、今後、DNA 障害による細胞死を抑制させる観点よりサイトカインの臨床応用が期待される。

2. ダウン症候群モデルマウスの分子生物学的検討によって、ヒト染色体21番にコードされるEts-2 遺伝子がダウン症候群におけるperipherinの過剰発現を介して、自律神経系の早発老化に関連し、重要な働きをしてい

ることが明らかになった。本モデルマウスによって分子生物学的縦断的研究が可能となる。

また、ダウン症神経系細胞株の樹立とダウン症critical region の遺伝子存在の確認によって、研究が細胞レベルで発展できる。これを用いて、ヒト21番原因遺伝子領域およびEts2遺伝子領域の遺伝子存在が、PC12細胞のNGF刺激後の神経突起形成が早いことを見だし、この早発分化が知的障害や神経細胞の早発老化と関係していることが示唆された。

新しく発見されたDSCAMDS の、脳における発現の増強、また老人斑とのトポグラフィカルな関係が確認され、DSにおける精神遅滞・早発痴呆の病態にDSCAM が関与していることが示唆された。

3. プレセニリン-1と2 (PS-1, 2)は細胞内でN末とC末断片に速やかに切断されるが、それらの機能やアミロイド沈着との関連は不明である。PS-1および2の全長鎖cDNAを導入した際のみ、A β (1-42)の分泌が亢進したことは、プロセシングによりプレセニリンの活性の一部が失われることを示しており、FADのアミロイド沈着の機序解明にとって重要である。

CADASIL 様症状を呈する日本人患者について原因遺伝子Notch3の遺伝子変異スクリーニングを行い、Notch3エクソン4にミスセンス変異(Arg133Cys)が見いだされ、これは欧米患者以外で発見された初めてのものであり、本遺伝子が人種を越えて疾患原因となっていることを示している。

また、アルツハイマー病脳では、老人斑にBleomycin hydrolase 免疫原性が存在することが明らかとなった。ごく最近、bleomycin hydrolaseはA β ペプチドを分解するという報告があり、治療法の開発が期待される。

4. 老人斑やアミロイド沈着を伴わない神経原線維およびグリア線維変化の早期発現は遺伝性、代謝性、感染後および破壊性疾患で特異な部位に認められ、病因の異なるこれらの神経疾患でも神経原線維変化より前にCOX2

の誘導が認められ、フリーラジカルが変性に関与していることが示唆された。

5. 老化にみられる軸索変性は神経病理学的に後索核などに好発する。軸索変性のGAD遺伝子の局在領域が狭められ、複数のエクソン候補配列が見出され、軸索変性の分子病態を追求された。一方、ヒト剖検例を用いて、軸索変性の機序として末梢神経側の障害に基づくことが証明された。

F. 研究発表

- 1) Obonai T, Mizuguchi M, Takashima S
Developmental and aging changes of Bak expression in the human brain.
Brain Res 783:167-170, 1998
- 2) Oka A, Kurachi Y, Mizuguchi M, Hayashi M, Takashima S:
Expression of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) gene product
in human brains.
Neuroscience Letters 256:1-3, 1998
- 3) Takashima S, Mizuguchi M, Arai N:
Neuronal migration disorder: expression of gene products in the neocortex.
Neuropathology 18:427-432, 1998
- 4) Oka A, Takashima S
Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and
dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurons and axons.
NeuroReport 8:1161-1164, 1997
- 5) Arai Y, Suzuki A, Mizuguchi M, Takashima S
Developmental and aging changes in the expression of amyloid precursor protein
in Down syndrome brains. Brain Dev 19:290-294, 1997
- 6) Arai Y, Uchida Y, Takashima S
Developmental immunohistochemistry of growth inhibitory factor in normal brains
and brains of patients with Down syndrome.
Pediatr Neurol 17:134-138, 1997
- 7) Ueki A, Otsuka M, Namba Y, Ishii T and Ikeda K.
 α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E polymorphism In Alzheimer's disease.
In : "Progress In Alzheimer's and Parkinson's disease " (ed by Fisher et al)
pp757-764, Plenum Press, New York, 1998.
- 8) Sakai, Y., Nakabayashi, O., Kikuchi, T. and Wada, K.
Identification of break points in mutated PMP22 gene in a new trembler (Tr-Ncnp)
mouse.
Neuroscience, 88, 989-991, 1998
- 9) Yamanaka H, Kamimura K, et al: Genetic risk factors in Japanese Alzheimer's
disease patients: α 1-ACT, VLDLR, and ApoE. Neurobiol Aging 19: S43-S46, 1998
- 10) Kamimura K, Tanahashi H, et al: Familial Alzheimer's disease genes in Japanese.
J Neurol Sci 160:76-81, 1998
- 11) Chui D-H, Shirotani K, et al
Both N-terminal and C-terminal fragments of presenilin 1 colocalize with
neurofibrillary tangles in neurons and dystrophic neuritis of senile plaques in
Alzheimer's disease.

- J Neurosci Res 53: 99-106, 1998
- 12) Iijima M, Tabira T, Takahashi K
A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene.
NeuroRep 10:1-5, 1999
 - 13) Kamimura K, Takahashi K, et al
Identification of Notch3 mutation in a Japanese CADASIL family.
Alzheim Dis Assoc Dis 13: in press, 1999
 - 14) Ye L, Nakura J, Morishima A, Miki T
Transcriptional activation by the Werner syndrome gene product in yeast.
Exp Gerontol 33, 805-812, 1998.
 - 15) 名倉 潤、三木哲郎、萩原俊男
ヒトの老化機構とウェルナー症候群の発症機構、
MOLECULAR MEDICINE 35 : 616-626、1998.
 - 16) 名倉 潤、三木哲郎
早発老化-最近の進歩、脳と神経、50 (11) : 977-987、1998.
 - 17) 名倉 潤、三木哲郎
ヒト老化マウスとその原因遺伝子の発見、
蛋白質核酸 酵素、43 : 251-257、1998.
 - 18) 名倉 潤、三木哲郎
老化遺伝子
医学のあゆみ 185 : 627-632、1998.
 - 19) 名倉 潤、叶 林、森島淳之、三木哲郎 : ヘリカーゼ変異と早老症-転写異常症候群
最新医学、53 : 2110-2117、1998.
 - 20) Sugita K, Suzuki N, et al.
Detection of UV- induced K-ras codon 12 mutation by PCR and differential dot-
blot hybridization in cells from Down syndrome and Cockayne syndrome,
Oncology Reports 6:145-147, 1999.
 - 21) Sugita K, Suzuki N, et al
Enhancement of XPG mRNA expression by human interferon- β in Cockayne syndrome
cells, Mutation Res 408:67-72, 1998.
 - 22) Higuchi Y, Kita K, et al
Search for genes involved in UV-resistance in human cells by mRNA differential
display: increased transcriptional expression of nucleophosmin and T-plastin
genes in association with the resistance
Biochem Biophys Res Commun 248:597-602, 1998.
 - 23) Suzuki Y, Sugita K, et al
Enhancement of XPG mRNA transcription by human Interferon- β in Cockayne
syndrome cells with complementation group B
Int J Mol Med 3:87-89, 1999.

- 24) Osaka H, Kawanishi C, Sugita K, et al
 Pelizaeus- Merzbacher disease: Three novel mutations and implication for locus heterogeneity, *Ann Neurol* 45:59-64, 1999.
- 25) 小野寺一清.
 ダウン症候群のマウスモデルー精神遅滞の分子生物学ー
 SUT BULLETIN. 印刷中 (1999)
- 26) 高嶋幸男、荒井康祐、岡明、元永耕三、小野寺一清. ダウン症候群と脳の老化
 神経研究の進歩, 42:844-853, 1998
- 27) 元永耕三、小野寺一清. ダウン症のモデルマウス
Bio clinica 12:73-77, 1997
- 28) Ikeda K, Urakami K, Isoe K, Nakashima K, Ohno K.
 High concentration of PS-1 mRNA in skin fibroblasts of patients with Down's syndrome.
J Neurol Neu rosurg Psychiatr 64: 690-691, 1998
- 29) Ikeda K, Urakami K, Isoe K, Ohno K, Nakashima K,
 The expression of pres enilin-1 mRNA in skin fibroblasts from Alzheimer's disease.
Dementia 9:145-148, 1998
- 30) Sugita K, Suzuki N, Ohno K, Suzuki Y, Takanashi J, Kita K, Yamamori H, Nakashima N.
 Detection of UV-Induced K-ras codon 12 mutation by PCR and differential dot-blot hybridization in cells from Down syndrome and Cockayne syndrome.
Oncol Rep 6:145-147, 1999

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

早発老化脳におけるDown症候群細胞接着因子(DSCAM)の発現と意義

分担研究者 高嶋幸男 国立精神・神経センター神経研究所
研究協力者：斎藤義朗，岡 明，伊藤雅之 同上
水口 雅 自治医科大学小児科
元永耕三，森 裕司 東京大学農学生命科学研究科

研究要旨：Down症候群(DS)では、大脳皮質シナプス密度は少なく、加齢と共に減少し、老人斑や神経原線維変化を呈するアルツハイマー型痴呆が出現するが、その機序は不明である。21番染色体、DS責任領域に遺伝子が確認されたDSCAM 蛋白はダウン症候群では若年では髄鞘に過剰発現し、老人斑のcoreや辺縁にも発現し、DSにおける生後の精神運動発達遅滞やシナプス形成の低下に関与しているのみならず、早発痴呆における老人斑の形成病態にDSCAM が関与していることが示唆された。特に、老人斑の中心のcore部にDSCAM が認められ、変性した軸索の存在が示された。

A. 研究目的

ダウン症候群における早発老化の機序を解明するために、21番染色体Down症候群(DS)責任領域の遺伝子蛋白の加齢変化を検索してきた。今年度、新たに発見された細胞接着因子(DSCAM)について、ヒト脳における発達・加齢的变化を観察し、同症候群に見られる早発痴呆の病態形成におけるDSCAMの関与につき検討する。

B. 対象及び方法

DS 23例(胎生19週-成人例)と対照18例(胎生35週-70歳)の前頭葉・小脳を、抗DSCAM抗体を用いて免疫染色を施行した。アルツハイマー型痴呆では、アミロイド前駆体蛋白(APP)やニューロフィラメント抗体を用いて、DSCAMと比較検討した。また、DS 1例(2歳)、対照4例、またマウスおよびラットの大脳・小脳を用いてウェスタンブロットを施行した。

C. 結果

1. ウェスタンブロットでは、ヒト、マウ

ス、ラットの大脳と小脳で190kDa、130kDa、100kDaの3本のバンドが検出された。対照例では190kDaのバンドは胎生30週では見られず、加齢に伴って次第に増強した。2歳DSの大脳・小脳で、190kDa、130kDaのバンドは対照に比べ強く発現していた。

2. 対照の抗DSCAM 免疫組織化学では乳児期以降の大脳・小脳の白質に免疫反応性が見られた。その発現部位の発達的变化は、髄鞘化と強く関係しており、内包・基底核・一次運動野・小脳白質等に新生児期より分布し、乳児期後期には大脳白質にびまん性に発現していた。年長例・成人では、小脳皮質顆粒層・大脳皮質内の線維にも免疫反応性が見られた。円形または railroad track 様の、軸索を縁取る形の免疫反応性が見られた。また、主として乳児期に、Purkinje細胞や大脳皮質錐体神経細胞の一部の胞体に免疫反応性が見られたが、年長例では消失していた。

3. DSでは大脳・小脳白質内の免疫反応性の分布は対照とほぼ同様の発達的变化を呈した。前頭葉皮質内のDSCAM 免疫反応陽性

線維も対照と同様に発達したが、小脳顆粒細胞層では乳幼児期に対照よりも速い発達を示した。また、前頭葉皮質の神経細胞は成人期に、Purkinje細胞は新生児期から成人期まで一貫して、対照に比べ強い免疫反応性を呈した。

4. 老人斑を有する成人期DSの3例において、DSCAM免疫反応性はしばしば老人斑の周辺に、また時にそのcoreの中心部・core内部に認められた。APP695は老人斑の辺縁の軸索に、Affi28はcoreを中心に、ニューロフィラメントは老人半周辺の神経線維に認められた。

D. 考察

ウェスタンブロットの3本のバンドは、いずれもDSCAM遺伝子産物と考えられる。190kDaのバンドは加齢とともに強くなり、免疫組織化学における白質の免疫反応性の変化と一致している。成熟に伴い発現が増強するDSCAM分子の主成分と推測される。白質および皮質内線維における発現は軸索周囲に存在し、髄鞘形成と共に増加する。DS脳における発現の増強、また老人斑とのトポグラフィカルな関係が確認され、DSにおける精神遅滞のみならず、早発痴呆における老人斑の形成病態にDSCAMが関与していることが示唆された。特に、老人斑の中心のcore部にDSCAMが認められ、変性した軸索の存在が示された。今後軸索伸展・シナプス形成や軸索修復、老人斑形成における同分子の役割はさらに解明される必要がある。

E. 結論

21番染色体、DS責任領域に遺伝子が確認されたDSCAM蛋白はダウン症候群では若年では髄鞘に過剰発現し、老人斑のcoreや辺縁にも発現し、DSにおける生後の精神運動発達遅滞やシナプス形成の低下に関与しているのみならず、早発痴呆における老人斑の形成病態にDSCAMが関与していることが示唆された。特に、老人斑の中心のcore部

にDSCAMが認められ、変性した軸索の存在が示された。

F. 研究発表

- 1) Obonai T, Mizuguchi M, Takashima S : Developmental and aging changes of Bak expression in the human brain. *Brain Res* 783:167-170, 1998
- 2) Oka A, Kurachi Y, Mizuguchi M, Hayashi M, Takashima S: Expression of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) gene product in human brains. *Neuroscience Letters* 256:1-3, 1998
- 3) Takashima S, Mizuguchi M, Arai N : Neuronal migration disorder: expression of gene products in the neocortex. *Neuropathology* 18:427-432, 1998
- 4) Oka A, Takashima S: Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurons and axons. *NeuroReport* 8: 1161-1164, 1997
- 5) Arai Y, Suzuki A, Mizuguchi M, Takashima S: Developmental and aging changes in the expression of amyloid precursor protein in Down syndrome brains. *Brain Dev* 19:290-294, 1997
- 6) Arai Y, Uchida Y, Takashima S: Developmental immunohistochemistry of growth inhibitory factor in normal brains and brains of patients with Down syndrome. *Pediatr Neurol* 17:134-138, 1997

神経軸索機能老化モデルマウスの分子遺伝学的研究(II)

和田 圭司

(国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第4部長)

神経軸索機能の老化モデルである gracile axonal dystrophy mouse (略して gad マウス) の原因遺伝子のポジショナルクローニングを行った。遺伝子連鎖解析に基づき候補遺伝子領域を特定し、gad 遺伝子を含む領域の大腸菌人工染色体 (BAC) クローンの contig を作成した。さらにエクソントラップ法により当該 contig から複数のエクソン配列を単離し、その内の一つが gad マウスと正常対照マウスで異なった結果を示すことを見出した。

キーワード：神経軸索、モデル動物、遺伝子、ポジショナルクローニング、エクソントラップ

A. 研究目的

神経軸索機能の新しい老化促進モデルである gracile axonal dystrophy mouse (略して gad マウス) を用いて 1) その成因となる遺伝子異常を分子遺伝学的に同定し、その成果をもとに、2) 加齢に伴う神経軸索機能低下の一実体を分子レベルで解明することを目的に研究を行なった。脊椎動物では加齢とともに、延髄薄束核周辺など広範囲の神経軸索端において spheroid 体形成を特徴とする軸索ジストロフィー現象が生じ、シナプス機能が低下する。神経研究所が保有する gad マウスは遺伝的にこの形態・機能変化が早期から出現するため神経軸索の老化モデル動物としての評価が高く軸索ジストロフィーの分子実体を解明するための良きツールと考えられている。これまでの研究から遺伝形式は常染色体劣性で、第5番染色体上

にその責任遺伝子が存在することが知られていた。そこで私は gad 遺伝子のポジショナルクローニングを行なうために gad マウスと正常マウス (C57BL/6J) 間の戻し交配により作成された 520 余匹からなるパネルの連鎖解析から研究を始めた。昨年度までに gad 遺伝子はマイクロサテライト DNA マーカーの D5Mit197 と D5Mit270 に挟まれた領域で、D5Mit197 より 0.4 cM テロメア側に存在することを見出している。

B. 研究方法

1) BAC contig の作成

連鎖解析の結果判明した gad 遺伝子座近傍のマーカーである D5Mit197、ならびに D5Mit197 のすぐテロメア側に位置すると考えられる D5Mit151 あるいは D5Mit270 を使用して大腸菌人工染色体 (BAC) ライブラリー (いずれも Research Genetics 社より購

入) をスクリーニングした。陽性クローンについてResearch Genetics社の薦めるプロトコルに従ってBAC DNA抽出し、インサート両端の配列をDNAシーケンスにより決定した。決定された配列結果に基づいてPCRプライマーを設計しBACライブラリーをさらにスクリーニングすることで単離されたクローンからのwalkingを行なった。各クローンの重複状況をPCRにて解析しcontigの作成を行なった。

2) エクソントラップ

単離されたBACクローンから抽出されたDNAを用いてライフテックオリエンタル社のエクソントラッピングシステムで当該クローン内のエクソンを単離した。手技の詳細は同社のプロトコルに従った。概略的には、BAC DNAをEco RI、Pst I等の制限酵素で消化しpSPL3プラスミドベクターにサブクローニングし大腸菌の形質転換を利用してプラスミドDNAを回収した。回収されたDNAをCOS-7細胞に遺伝子導入し細胞内RNAを抽出した。抽出されたRNAを鋳型にcDNAを合成し、特異的プライマーでトラップされたエクソンを含む領域を増幅した。増幅されたエクソンのDNA配列はシーケンシングにて決定した。

3) RT-PCR法による候補遺伝子の選別

決定された各エクソン配列につきPCRプライマーを設計し、gadマウス、正常対照マウスの脳mRNAから逆転写酵素により作製されたcDNAを鋳型にしてPCRを行い、両遺伝子型における差異の有無を検討した。

C. 研究結果

1) gad遺伝子座を含む領域のBAC contigの作成

テロメア側のD5Mit270側を起点にしてD5Mit197とD5Mit151に挟まれた領域の大

部分をカバーするBAC contigをセントロメア側に向けて作製した。

2) エクソントラップ

上記1) で作成されたBAC contigを構成する各クローンを使用してエクソントラップを試み数十個のエクソン配列を単離した。

3) RT-PCR

決定された各エクソン配列につきPCRプライマーを設計し、gadマウス、正常対照マウスの脳mRNAを用いてRT-PCRを行ったところ一つのエクソン配列がgadマウスと正常対照マウスで異なった結果を示した。

D. 考察

神経軸索機能の新しい老化モデル動物であるgadマウスについてはこれまで主に形態学的な研究が展開されていたが、そのモデル動物としての重要性から原因遺伝子の分子実体の解明が待ち望まれたいた。とりわけ神経軸索変性の分子機序の解明、さらには神経軸索機能再生の新しい治療法の確立などが期待されるからである。gadマウスの遺伝学的研究としてはこれまでに生化学的マーカーを用いた連鎖解析が行なわれたことがあるが遺伝子の単離を目指すにはデータとして不十分であった。gad遺伝子のポジショナルクローニングを行なった結果gad遺伝子の有力候補遺伝子配列を単離した意義は大きい。今後はmRNA上の差異を説明しうる変異がgadマウスのゲノム上に実際存在するかどうかを確認していく予定である。

E. 結論

神経軸索機能の老化促進モデルマウスであるgracile axonal dystrophy mouse (略してgadマウス) の原因となる遺伝子異常を

分子遺伝学的に同定するためgad遺伝子座近傍のBAC contigの作成を行ない、同contigを構成するクローンを用いたエクソントラップからgad遺伝子の有力候補を見出した。

F. 研究発表

1. 発表論文

Sakai, Y., Nakabayashi, O., Kikuchi, T. and Wada, K., Identification of break points in mutated PMP22 gene in a new trembler (Tr-Ncnp) mouse. *Neuroscience*, 88, 989-991, 1998

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

CADASIL 日本人家系における Notch3 変異解析

高橋慶吉

(国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第6部 室長)

本研究ではCADASIL 様症状を呈する日本人患者について原因遺伝子 Notch3 の遺伝子変異スクリーニングを行った。4 家系のうち 1 例で Notch3 エクソン 4 にミスセンス変異(Arg133Cys)が見いだされた。この変異は病気を連鎖しており、また欧米家系で見いだされたものと同様であった。この結果は欧米患者以外で発見された初めてのものであり、本遺伝子が人種を越えて疾患原因となっていることを示している。

キーワード：家族性脳血管性痴呆症、CADASIL, Notch3, シグナル伝達

研究組織

小島居聡(国立精神・神経センター神経

研究所疾病研究第6部,研究員)

上村光平(同、研究員)

田平 武(同、部長)

宇山英一郎(熊本大学医学部神経内科助手)

内野 誠(同、教授)

A. 研究目的

CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)は常染色体優生遺伝様式を示す家族性脳梗塞性痴呆症で、1991年に Tournier-Lasserre により提唱された新しい疾患単位である(1)。本症は臨床的には中年期以降に発症し、反復性卒中発作、前兆をともなう片頭痛、仮性球麻痺、皮質下痴呆を呈し、病理学的には大脳白質の多発性脳梗塞と好酸性・PAS (periodic acid Schiff) 陽性顆粒沈着を特徴とする細・小動脈中膜変性を認める。また、患者は一般に高血圧等の卒中危険因子を持たず、脳動脈には粥状硬化やアミロイド沈着を認めない特徴を示し、血管変性や白質病変の形成メカニズムが従来の脳血管障害性痴呆症とは異なることが判明している。

最近、本疾患原因遺伝子として 19 番染色体短腕(p13.1)にマップされる Notch3 受容体遺伝子が同定され(2, 3)、現在までに 25 種類のミスセンス変異が欧米患者に発見された(4)。本遺伝子は脳血管障害性痴呆症の原因遺伝子として明らかにされた唯一のものであるため、脳動脈変性に関する分子・細胞レベルの研究の糸口として注目されている。一方、10%の欧米 CADASIL 患者には Notch3 の変異が認められず、新規病因遺伝子の存在が示唆されている。また、Notch3 と他の血管変性を示す脳血管痴呆症との関係はほとんど分かっていない。本研究はこの様な Notch3 変異の出現頻度や CADASIL 発症機序を明らかにする試みとして、先ず CADASIL 様症状を呈する日本人患者の Notch3 変異解析を行った。

B. 研究方式

患者：遺伝子検査の対象者は次のように選別した。現在まで集めた家族性痴呆症患者の中から先ず優性遺伝様式を示す家系で、高血圧等の卒中危険因子を持たず、MRI 画像診断により白質病変を認める患者を選び出した。さらに、CADASIL 臨床症状(反復性卒中発作、前兆をともなう片頭痛、仮性球麻痺、感情障害)のう

ち2種類以上を呈する患者4名をCADASIL 様患者とした (Km-1, Km-2, Km-3, Ng-1)。患者ゲノムDNAは同意のもとに採取された血液よりDNA分離カラムキット(QIAGEN)を用いて調整した。

SSCP解析: Notch3 遺伝子の各エクソンの塩基配列を解析するために、先ず遺伝子のゲノム構造を検索した。ゲノムDNAはヒトゲノムライブラリーをNotch3 cDNAでスクリーニングして分離した。得られたゲノムクローン4個は制限酵素地図を作成した後、適当な長さのDNAに制限酵素で消化してpUCベクターにサブクローンした。これらDNAの塩基配列はBcaBest sequencing kit (TaKaRa)を用いて行い、cDNA塩基配列と比較してエクソンイントロン境界を決定した。エクソン(exon2-exon23)を増幅するSSCP用プライマーペア(sense and anti-sense)はイントロン配列中に設定した(Table 1)(5)。

Exon	Sense primer sequence	Antisense primer sequence	Product size (bp)	Tm (°C)
2	ttcctgggacactggctgac	acacacagggccactggtggc	166	64
3	cgcccaaccaagccactctctg	ggtgagtttagactgaccaca	231	64
4	ctaaactcaccctgctctg	cctctgactctctgagtagg	399	62
5	cctactcaggagagtcagagg	acacagatgcagcagtcagcca	237	65
6	gtggctggactgtgcatctgtg	accatccatggctcctcag	303	65
7	agcaggaaagatcgcctatgac	cagcccattcacagacagcag	231	65
8	acgccacacagatgacact	ccatccgcgggctctctgt	284	65
9	ccgttcacaccatagggtagcc	ccagacatgtctttcgggct	209	65
10	gttactctctcacccttcc	attctgtcggactgtcattg	199	65
11	gcggagcctgacccctctgg	ctccagggtgctgttctgc	301	65
12	cagtggtggccactccatgc	agtgacttcaccctgatcctaag	202	65
13	ctgctgactttgttgatga	ggcagtgctgagctgagaa	268	65
14	cttcacgctcagacactgcc	tgagaaggccatgggttgg	273	62
15	gagtcctcaaaagctatct	cccagatcaccctgatagg	235	65
16	gtaaccctaggtgtaacctgc	acagttcaagcttaagactgt	254	65
17	ggtgaccagaccgcttct	gccagagtcctctcttcaa	295	65
18	gggagcagcctgacccctcc	tctaggatcccaggcaggc	294	65
19	cacagtactgactctgagtgct	ctagcaggaggtacgtcatg	248	65
20	gggttacctctgttctgtgc	tgtccagacgcacccaag	285	65
21	ctgtgtccactaagctgag	aggaaatgaagacagcctctcat	232	65
22	ggctgtcttcttctctgac	ggagcatgtagatcagccaca	381	65
23	ccattgtgctgatctacatgct	cctactactccagagccac	214	65

Table 1. SSCP 解析に用いた Notch3 エクソン増幅用プライマー。塩基配列は5'→3'方向で示す。

各エクソンペア(1 nmole)は 50 mM Tris-HCl, pH7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0.1 mM spermidine, 0.1 mM EDTA, 5 unit T4

polynucleotide kinase (TOYOBO)および[γ-³²P] ATP(20 μci)を含む 20 μl 反応液中で 37 °C, 30 分間保温して放射ラベルした。エクソン DNA の増幅は 20 mM TAPS buffer, pH9.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, 200 μM dNTP, 0.8 pmole 5'-labeled primers, 5 unit Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa) 及び 50-100 ng ゲノム DNA を含む 4 μl 反応液中で 94 °C で 1 分間、Tm °C (Table 1) で 20 秒間、72 °C で 30 秒間の条件で 35 回 PCR を行った。PCR 反応液には 20 μl の反応停止液 (95 % formamide, 0.5 mM Tris-Acetic acid, pH7.5, 0.05 mM EDTA, 0.05 % キシレンシアノール, 0.04 % プロモフェノールブルー)を加えた後、91 °C 5 分間加熱して DNA を変性させた。PCR 産物は 5 % ポリアクリルアミドゲル (0.5xTBE) で 20 °C 1 時間 40 分電気泳動を行い、また 5 % のグリセリンを含むゲルでも 5 °C 3 時間電気泳動をおこなった。泳動後、ゲルは X 線フィルムに露光して、一本鎖エクソン DNA の移動度を検索した。移動度の変化した DNA バンドを含むエクソンについてはその PCR 産物を pUC ベクターにクローニングした後、塩基配列を決定した。

C. 結果

欧米人 CADASIL 患者では Notch3 の変異はエクソン 2 からエクソン 23 に存在し、全てシステインの増減を起こすことが報告されている(4)。その為、日本人患者についても同様にエクソン 2-23 までを PCR 増幅して SSCP 解析を行った。検索した 4 人の患者にはそれぞれ DNA 断片が異常な移動度を示すエクソンが存在していた。シークエンスの結果 Km-1 のエクソン 4 の変異(475C→T)のみアミノ酸がアルギニンからシステインに変わるミスセンス変異であり (Fig 1)、他の患者に見いだされた DNA 点突然変異はアミノ酸の変わらないサイレント

変異であった(Table 2)。

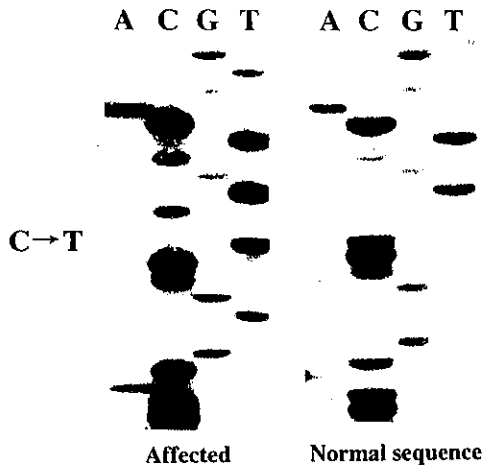


Fig. 1. Km-1 患者エクソン4の塩基配列

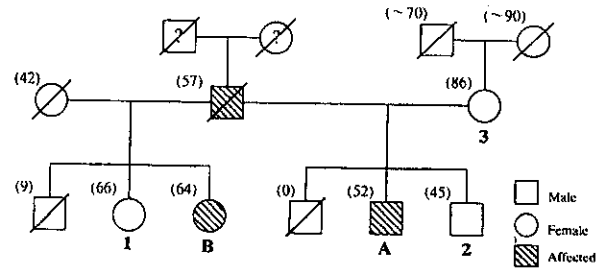
Patients	Exon	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
Km-1	4	475C→T	Arg133Cys
Km-2	4	684G→A	silent
Km-3	2	381G→A	silent
Ng-1	4	684G→A	silent
	16	2616T→C	silent

Table 2. CADASIL 様患者に見出された Notch3 遺伝子の点突然変異。塩基配列番号は開始コドン ATG より76塩基上流を1番とした。

Fig 2 は Km-1 の家系図および構成員のエクソン4 DNA に関する SSCP 解析結果を示す。もう一人の患者 B (lane B)には Km-1 (lane A)と同じ移動度を示す一本のバンド (arrow head) が認められたが、母親 3 は正常型のバンド (lane 3) のみであった。また、Km-1 の姉弟 1 と 2 は健常人であるが、2 名とも Km-1 とは異なる異常な移動度を示すバンド (arrow) が見いだされた。患者 B、健常人 1 および 2 のエクソン4 DNA の塩基配列を決定したところ、患者 B には

Km-1 と同じ 475C→T 点突然変異が認められ、この変異は病気と連鎖していることが判明した。一方、姉弟の DNA の変異はアミノ酸が変換しない 684G→A 変異であった。母親のエクソン4は正常であるので、両変異とも父親由来と考えられる。

A : Pedigree



B : SSCP analysis

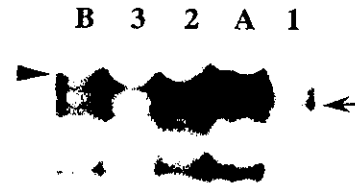


Fig. 2 Km-1 患者の家系図(A)と家系構成員の SSCP 解析(B)

A) ■は患者、□は健常人、/は死亡例を示す。

B) Arrow head は患者のみに見出された移動度の異なるバンド、Arrow は健常人姉弟に認められた移動度の異なるバンドを示す。

D. 考察

今回、我々は Notch3 のミスセンス変異を持つ CADASIL 日本人家系を初めて発見した(5)。本家系の変異(Arg133Cys)は欧米人患者ですすでに報告されたものであり、さらに病気に連鎖していることが判明した。この結果は Notch3 遺伝子が人種を越えて疾患原因となることを示している。

CADASIL 患者の臨床像は変化に富み、フランスの7家系の解析によると、45例中84%に

頻回の皮質下性虚血性発作、31%に進行性あるいは階段状進行性仮性球麻痺を伴う痴呆、22%に前兆を伴う片頭痛、20%にうつ病状態発作を伴う感情障害が認められている(6)。我々が遺伝子診断した Km-1 は痙攣発作の頻発、仮性球麻痺及び痴呆症状を呈するが、片頭痛や明確な虚血性発作は認められていない。このような相違はミスセンス変異の位置や他の遺伝要因、環境要因に関係している可能性が考えられる。一方、他の患者は非常に類似した症状を示すにもかかわらず Notch3 の変異は見出せなかった。このことは家族性脳梗塞性痴呆症の原因遺伝子が複数個存在することを示しており、その鑑別診断には Notch3 の遺伝子解析が非常に有効な方法であることが明らかとなった。最近、CADASIL の病理学上の指標として細動脈平滑筋層や基底膜中への高電子密度顆粒, granular osmiophilic material (GOM) の沈着が重要視され、Notch3 変異が認められた CADASIL 患者では例外なく皮膚生検で GOM の沈着が検出されることが報告されている。従って、このような生検を併用すれば家族性症例にたいする大規模な Notch3 遺伝子スクリーニングが可能と考えられる。

Notch は細胞間相互作用を仲介する受容体膜蛋白質(Notch シグナル伝達系)として胚初期発生や形態形成過程で細胞の発生運命の決定に関与していることが知られている(7)。今回、CADASIL 原因遺伝子である Notch3 の発見は Notch シグナルが成熟個体の神経細胞や血管細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていること初めて示したものである。従って、本遺伝子は脳動脈変性に関わる遺伝要因を解明する糸口としてのみならず、発生が完了した成体における Notch シグナルの機能を明らかにする契機として注目されている。ヒト、マウスには4種類の Notch 受容体があり、その構造は種を越えて保存されている(8,9)。Notch3 は分子量 240

kD からなる膜蛋白質で、大きな細胞外部分にはリガンドと結合する 34 個の EGF(epidermal growth factor)-like repeats と全ての Notch 蛋白質に共通に見られる相同性の高い 3 個の Notch /Lin-12 repeats があり、細胞内には転写制御因子と結合する RAM 配列と 6 個の Ankyrin/ Cdc10 repeats、蛋白質の分解速度に関係した PEST ドメインが存在する。EGF repeat は 6 個のシステイン残基を含み、ジスルフィド結合により架橋された特異的立体構造がリガンドとの結合やシグナル伝達等の機能に関係している。また、Notch/Lin-12 repeats 及び Ankyrin/ Cdc10 repeats も多くのシステイン残基を持ち、やはり機能に関係した立体構造が形成されていると考えられている。ところで、CADASIL で見いだされた変異は全て EGF repeat 中のシステイン残基の増減を起こすもので、他のドメインには変異は見いだされていない。従って、CADASIL 発症機序はミスセンス変異による EGF repeat の立体構造の異常とそれに起因する Notch3 受容体のリガンド結合特異性の変化に関係している可能性が考えられる。しかし、Notch3 シグナルが血管細胞でどのような役割をしているか、その変異がどのような影響を細胞に与えるかは今後の課題である。

E. 結語

本研究では CADASIL 原因遺伝子 Notch3 について日本人 4 家系(患者 4 人)の遺伝子変異解析を行い、1 例で Notch3 エクソン 4 にミスセンス変異(Arg133Cys)を見いだした。この変異は病気を連鎖しており、欧米家系で見いだされたものと同じであった。この結果は欧米患者以外で発見された初めてのものであり、本遺伝子が CADASIL 原因遺伝子として重要なものであることを示している。

F. 引用文献

- 1) Tounier-Lasserve E, Iba-Zizen MT et al: Autosomal dominant syndrome with stroke-like episodes and leukoencephalopathy. *Stroke* 22: 1297-1302, 1991
- 2) Tounier-Lasserve E, Joutel A, et al: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nature Genet* 3: 256-259, 1993
- 3) Joutel A, Corpechot C, et al: Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383: 707-710, 1996
- 4) Joutel A, Vahedi K, et al: Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 350: 1511-1515, 1997
- 5) Kamimura K, Takahashi K, et al: Identification of Notch3 mutation in a Japanese CADASIL family. *Alzheim. Dis Assoc Dis* 13: (in press), 1999
- 6) Chabriat H, Vahedi K, et al: Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. *Lancet* 346: 934-939, 1995
- 7) Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, et al: Notch signaling. *Science* 268: 225-232, 1995
- 8) Robey E: Notch in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 7: 551-557, 1997
- 9) Bray S: A Notch affair. *Cell* 93: 499-503, 1998

G. 発表論文

- ① Yamanaka H, Kamimura K, et al: Genetic risk factors in Japanese Alzheimer's disease patients: α 1-ACT, VLDLR, and ApoE. *Neurobiol Aging* 19: S43-S46, 1998
- ② Kamimura K, Tanahashi H, et al: Familial Alzheimer's disease genes in Japanese. *J Neurol*

Sci 160:76-81, 1998

- ③ Chui D-H, Shirotani K, et al: Both N-terminal and C-terminal fragments of presenilin 1 colocalize with neurofibrillary tangles in neurons and dystrophic neuritis of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 53: 99-106, 1998
- ④ 宇山英一郎、内野 誠、他: CADASIL. *神経研究の進歩* 42: 985-993, 1998
- ⑤ Iijima M, Tabira T, et al: A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene. *NeuroRep* 10:1-5, 1999
- ⑥ Kamimura K, Takahashi K, et al: Identification of Notch3 mutation in a Japanese CADASIL family. *Alzheim Dis Assoc Dis* 13: in press, 1999
- ⑦ Shirotani K, Takahashi K, et al: Effects of presenilin N-terminal fragment on production of amyloid β peptide and accumulation of endogenous presenilins. *Neurosci Lett* in press, 1999

小野寺一清 (工学院大学教授)

ダウン症候群のモデルマウスというべき、マウスの16番染色体の部分トリソミーのマウス (Ts65Dn) の脳において、ペリフェリンが正常より早く発現する。これはヒト染色体21番、マウス16番上に存在しているEts-2が3コピーあるためと確定された。また神経特異的中間径フィラメントのタンパクであるペリフェリンは加齢に伴うリン酸化を受け、細胞骨格である中間径フィラメントの構造と機能が大きく変化していることがTs65Dnの脳で明らかになった。

A. 研究目的

ダウン症候群の研究において、モデル動物の開発が待たれていた。Jackson研究所のC.Schmidtらによってモデルマウス (Ts65Dn) が開発され種々の行動を調べることによって、ダウン症のモデルと考えてよいという結果が得られた。我々はTs65Dnマウスの脳におけるmRNA、タンパクの発現及びその修飾を研究することを目的とした。

B. 研究方法

Ts65Dn及び同腹の正常マウスの生後7日目の脳のmRNAをdifferential display法によって比較し、Ts65Dnマウスに過剰発現しているmRNAを同定する。western blot、免疫電気泳動法によってタンパクの発現及びリン酸化の度合を決定する。

C. 研究結果

Ts65Dnマウスの脳に発現しているが、正常脳には発現していないmRNAを同定したところ、それは神経細胞の中間径フィラメントの構成タンパクであるペリフェリンであった。このタンパクは細胞骨格の構成成分であるので、神経細胞の形を決定したり、神経突起の伸展等と関係していると思われる。勿論、正常マウスの脳にも発現するが、その時期がTs65Dnより遅れている

ことが明らかになった。一方、ペリフェリン遺伝子の発現の制御部位にはEtsといわれる転写因子の結合部位が存在している。Ets-2はヒト染色体21番、マウス染色体16番上に存在しているので、ダウン症及びTs65Dnマウスでは3コピー存在している。そこでヒトEts-2cDNAの上流にサイトメガロウイルスのプロモーターを連結したベクターのDNAをラットの神経細胞の一種PC12細胞にtransfectした細胞を作成した。この細胞をNGFで刺激すると、ペリフェリンの発現が誘導されるとともに神経細胞へ分化する。ヒトEts-2が存在していないPC12細胞に比べ分化の時期が早まることが明らかとなった。従ってペリフェリンの過剰発現はEts-2のgene dosage効果の為と考えられる。大変興味深いことにペリフェリンの分子は脳の老化とともに分子量が大きなものへとシフトしてゆく。この現象はタンパクのリン酸化によるものであることが明らかとなった。ペリフェリンのN末端の60個のアミノ酸のうち26個がセリンで構成され約46%を占めている。加齢に伴って新しいセリン、スレオニンキナーゼが誘導されペリフェリンが徐々にリン酸化されてゆくことが確定される。ペリフェリンのリン酸化、脱リン酸化に伴ってペリフェリンと会合するタンパクは異なってくることが考えられる。即ち、Ts65Dnマウ