

199800360A

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
各種トリプレットリピート病に共通する
治療法の開発に関する研究

（研究課題番号 H10—脳—008）

平成 10 年度 研究報告書

平成 11 年 3 月

主任研究者 辻 省次

1. 研究組織一覽表

「各種トリプレットリピート病に共通する治療法の開発に関する研究」

研 究 組 織

区 分	氏 名	分担する研究項目	所 属 施 設	職 名
主任研究者	辻 省次	トリプレットリピート病 の治療法の開発	新潟大学脳研究所 神経内科	教 授
分担研究者	祖父江 元	変異アンドロゲン受容体 aggregates の形成と細胞 死の阻止に関する研究	名古屋大学医学部 神経内科	教 授
	貫名 信行	ハンチントン病における 神経細胞死制御因子 in vitro での検討	理化学研究所脳科 学総合研究センタ ー病因遺伝子研究 グループ	グループ ディレク ター
	宮下 俊之	ポリグルタミンによって 誘導される細胞死の機序 解明とその抑制法の研究	国立小児病院小児 医療研究センター 先天異常研究部遺 伝染色体研究室	室 長

II. 総括研究報告書

各種トリプレットリピート病に共通する治療法の開発に関する研究

辻 省次（新潟大学脳研究所神経内科）

研究要旨

伸長したポリグルタミンを有するタンパクについて、*in vitro* aggregation assay, 大腸菌を用いた凝集体形成の解析系, 細胞死の解析系, 一過性発現による凝集体形成の解析系, 細胞死の解析系, stable transformant を用いた発現系, 細胞死の解析系が確立した。凝集体形成過程に分子シャペロンの一つである熱ショックタンパク (HSP70, HSP40) が緩和作用のあることを明らかにした。ポリグルタミン鎖により誘導される細胞死の過程において, カスパーズ 8, カスパーズ 3 が活性化することを明らかにした。神経細胞では, ポリグルタミン鎖を有するタンパクがより高率に核移行しやすいこと, 核内凝集体の形成能が高いことを見だし, 選択的な神経細胞障害の機序に関連する可能性を見いだした。

A. 研究目的

本研究の目的は, トリプレットリピート病に共通する新たな治療法を開発することにある。トリプレットリピート病の中でも最も種類の多い CAG リピート病に焦点を当て, 1. 凝集体の形成機序とその緩和方法の開発, 2. 核内凝集体の形成機序の解明とその緩和方法の開発, 3. 神経細胞に選択的な障害機序の解明と, 神経細胞障害の緩和方法の開発, 4. 核内凝集体の形成によりアポトーシスが生じる機序の解明とその緩和方法の開発, を目的とする。

B. 研究方法

神経細胞に選択的な障害機序の解明と, 神経細胞障害についての研究: アデノウイルス ベクターを用いて, 全長の DRPLA cDNA (野生型および変異型), CAG リピートの両端を欠失させた部分 DRPLA cDNA cDNA (野生型および変異型) を用いた発現系を構築した。これらのアデノウイルスベクターを用いて, 神経細胞に分化させた PC12 細胞と皮膚線維芽細胞に全長および部分 DRPLA タンパク (野生型, 変異型) を発現させ, DRPLA タンパクの細胞内局在, 凝集体の形成, 細胞障害性についての検討を行った。

huntingtin タンパクによる細胞死解析のための

モデル系の研究: CAG リピートの存在する huntingtin 遺伝子エクソン 1 を用いて, 大腸菌での発現系と細胞障害機序の解析系を確立した。この huntingtin 遺伝子エクソン 1 を用いて GST 融合タンパクの発現系を構築し, 相互結合反応 (凝集体形成) についての検討を行った。変異アンドロゲン受容体による凝集体の形成とその抑制の研究: 伸長したポリグルタミンを有するアンドロゲン受容体部分タンパクを GST 融合タンパクとして大腸菌を用いて作成, 精製し, *in vitro* aggregation assay により凝集体の形成と熱ショックタンパクによる凝集体形成の抑制について検討を行った。Neuro2a cell line を用いて変異アンドロゲン受容体部分タンパクを一過性に発現させ, 熱ショックタンパクの cDNA (HSP70, HSP40, HSDJ) の co-transfection により, 共発現させ, 凝集体形成とその抑制効果について検討を行った。ポリグルタミンによって誘導される細胞死に関わるカスパーズの研究: PC12, IGROV-1 の培養細胞を用いて, 伸長したポリグルタミンを発現する stable transformant を作成し, 凝集体の形成を解析すると共に, カスパーズ活性の活性の変化と, カスパーズ阻害剤による細胞死抑制についての解析を行った。

C. 研究結果

神経細胞に選択的な障害機構の解明と、神経細胞障害機構については、アデノウイルスベクターを用いて変異 DRPLA タンパクの高発現系を確立した。その結果、ポリグルタミンを有するタンパクの細胞内局在が、分化型 PC12 細胞と皮膚線維芽細胞では大きく異なることが判明した。すなわち、分化型 PC12 細胞では、皮膚線維芽細胞に比べて DRPLA タンパクは核内に移行しやすい傾向があること、伸長したポリグルタミンを有するタンパクは、ポリグルタミン鎖が短い場合に比してより核移行しやすいことが示された。また、分化型 PC12 細胞は凝集体形成に対して、皮膚線維芽細胞よりも脆弱でアポトーシスを生じやすいことが示された。

huntingtin 遺伝子エクソン 1 を大腸菌で発現させたところ、23 リピートに比較して 48 リピートを発現させた場合に、大腸菌の細胞死が強く誘導されることが判明した。さらに Western blotting による解析では、23 リピートの場合は予測されるサイズのタンパクが観察されたのに対して、48 リピートの場合は、stacking gel のところに凝集したタンパクが認められた。GST 融合タンパクとして huntingtin エクソン 1 を大腸菌で発現させたところ同様に Western blotting で凝集体の形成が示された。

変異アンドロゲンを用いて *in vitro* aggregation assay を行い、Western blotting により、monomer と aggregate のバンドを検出することができた。HSP70、HSP40 の添加により aggregate の形成が部分的に抑制されることが示された。さらに Neuro2a 細胞を用いた一過性発現の実験系において、97 リピートのアンドロゲン受容体部分タンパクは高率に凝集体を形成したが HSP70 cDNA、HSP40 cDNA の共発現により、aggregate の出現率が有意に低下した。

ポリグルタミンにより誘導される細胞死の過程でどのカスパーが活性化するかという点については、変異型部分 DRPLA タンパクを安定に発現する PC12 細胞、IGROV-1 細胞を作成した。凝集体の形成に伴ってアポトーシスが生じる過程でカスパーの活性を検討したところカスパー 8 がまず活性化され、ついでカスパー

3 が活性化することが示された。合成カスパー 3 阻害剤 (Ac-DEVD-CHO, zVAD-fmk) により凝集体形成は抑制はされないものの、アポトーシス用の核変化は阻害できることが判明した。

D. 考察

本年度の研究により着実な成果が得られた。まず、伸長したポリグルタミンを有するタンパクについて、*in vitro* aggregation assay、大腸菌を用いた凝集体形成の解析系、細胞死の解析系、一過性発現による凝集体形成の解析系、細胞死の解析系、stable transformant を用いた発現系、細胞死の解析系が確立したことが重要である。このような解析系が確立されたことにより、伸長したポリグルタミン鎖が凝集体を高率に形成し、大腸菌、培養細胞に対して強い毒性を示すことが確認された。今年度の研究で明らかにされた興味深い点は、HSP70、HSP40 といった熱ショックタンパクが凝集体の形成を抑制し、培養細胞の生存率を改善した点である。熱ショックタンパクは分子シャペロンの一つで、これら熱ショックタンパクを共発現することにより、凝集体形成過程をこれらの分子シャペロンが積極的に抑制することは伸長ポリグルタミン鎖のコンフォーメーションに大きな異常が生じている可能性を示し、さらにこのような熱ショックタンパクの作用は治療法を開発していく上で大きな手がかりになると考えられる。

CAG リピートの伸長によって発症するトリプレットリピート病は、病因遺伝子は神経系でなく広く多臓器に発現しているにもかかわらず、神経系が選択的に障害されるという特徴がある。この点に関して、アデノウイルスベクターを用いて神経細胞を含んで幅広い細胞に DRPLA タンパク (部分および全長タンパク) を高発現できる実験系が確立されたことは、今後培養神経細胞のみならず、実験動物の脳に接種することにより、高発現が可能になるという点でも、重要な成果である。今年度の成果としては、分化型 PC12 細胞は、皮膚線維芽細胞と比較した場合、分化型 PC12 細胞において、より核移行しやすいこと、より高率に核内凝集体を形成することが示され、神経細胞が選択的に障害されや

すい現象によく対応するものと考えられた。この点に関しては、さらに分子レベルでその機序を明らかにしていく必要がある。

ポリグルタミン鎖による凝集体形成、細胞死の誘導の過程で活性化されるカスパーが同定されたことも重要な成果である。今年度の研究によりカスパー8、カスパー3の順序で活性化されることが見いだされた。今後、これらのカスパーの活性化が細胞障害にどのように関わるか、さらにこれらのカスパーの特異的な阻害剤により、細胞死の抑制が可能かどうか、治療法開発に向けての応用が可能かどうかを検討していく必要がある。

E. 結 論

in vitro aggregation assay, 大腸菌を用いた凝集体形成の解析系, 細胞死の解析系, 一過性発現による凝集体形成の解析系, 細胞死の解析系, stable transformant を用いた発現系, 細胞死の解析系を確立した。凝集体形成過程に分子シャペロンの一つである熱ショックタンパク(HSP70, HSP40) が緩和作用のあることを明らかにした。ポリグルタミン鎖により誘導される細胞死の過程において、カスパー8、カスパー3が活性化することを明らかにした。神経細胞では、ポリグルタミン鎖を有するタンパクがより核移行しやすいこと、核内凝集体の形成能が高いことを見だし、選択的な神経細胞障害の機序に関連する可能性を見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Igarashi, S., Koide, R., Shimohata, T., Yamada, M., Hayashi, Y., Takano, H., Date, H., Oyake, M., Sato, T., Sato, A., Egawa, S., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Nakano, R., Tanaka, K., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H. and Tsuji, S.: Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nature Genet.* 18:111-117, 1998

Onodera, O., Idezuka, J., Igarashi, S., Takiyama, Y., Endo, K., Takano, H., Oyake, M.,

Tanaka, H., Inuzuka, T., Hayashi, T., Yuasa, T., Ito, J., Miyatake, T. and Tsuji, S.: Progressive atrophy of cerebellum and brainstem as a function of age and the size of the expanded CAG repeats in the MJD1 gene in Machado-Joseph disease. *Ann. Neurol.* 43:288-296, 1998

Takahashi, H., Ikeuchi, T., Honma, Y., Hayashi, S. and Tsuji, S.: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6): clinical, genetic and neuropathological study in a family. *Acta Neuropathol* 95:333-337, 1998

Ikeuchi, T., Sanpei, K., Takano, H., Sasaki, H., Tashiro, K., Cancel, G., Brice, A., Bird, T. D., Schellenberg, G. D., Pericak-Vance, M., Welsh-Bohmer, K. A., Clark, L. N., Wilhelmsen, K. and Tsuji, S.: A novel long and unstable CAG/CTG trinucleotide repeat on chromosome 17q. *Genomics* 49:321-326, 1998

Takiyama, Y., Shimazaki, H., Morita, M., Soutome, M., Sakoe, K., Esumi, E., Muramatsu, S., Yoshida, M., Igarashi, S., Tanaka, H., Tsuji, S., Sasaki, H., Wakisaka, A., Nakano, I. and Nishizawa, M.: Maternal anticipation in Machado-Joseph disease (MJD): some maternal factors independent of the number of CAG repeat units may play a role in genetic anticipation in a Japanese MJD family. *J. Neurol. Sci.* 155:141-145, 1998

Zhou, Y.-X., Wang, G.-X., Tang, B.-S., Li, W.-D., Wang, D.-A., Lee, H.-S., Sambuughin, N., Zhou, L.-S., Tsuji, S., Yang, B.-X. and Goldfarb, L. G.: Spinocerebellar ataxia type 2 in China: Molecular analysis and genotype-phenotype correlation in nine families. *Neurology* 51:595-598, 1998

Sasaki, H., Wakisaka, A., Sanpei, K., Takano, H., Igarashi, S., Ikeuchi, T., Iwabuchi, K., Fukazawa, T., Hamada, T., Yuasa, T., Tsuji, S. and Tashiro, K.: Phenotype variation correlates with CAG repeat length in SCA2 - A study of 28 Japanese patients. *J. Neurol. Sci.* 159:202-208, 1998

Takano, H., Cancel, G., Ikeuchi, T., Lorenzetti,

- D., Mawad, R., Stevanin, G., Didierjean, O., Durr, A., Oyake, M., Shimohata, T., Sasaki, R., Koide, R., Igarashi, S., Hayashi, S., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Zoghbi, H., Brice, A., Tsuji, S.: Close associations between prevalence rates of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1060-1066, 1998
- Sidransky, E., Burgess, C., Ikeuchi, T., Lindblad, K., Long, R. T., Philibert, R. A., Rapoport, J., Shalling, M., Tsuji, S. and Ginns, E. I.: A triplet repeat on 17q accounts for most expansions detected by the repeat expansion detection technique. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1548-1551, 1998
- Tsuchiya, K., Oyanagi, S., Arima, K., Ikeda, K., Akashi, T., Ando, S., Kurosawa, T., Ikeuchi, T. and Tsuji, S.: Dentatorubralpallidolysian atrophy: clinicopathological study of dementia and involvement of the nucleus basalis of Meynert in seven autopsy cases. *Acta Neuropathol.* 96:502-508, 1998
- Ito, Y., Tanaka, F., Yamamoto, M., Doyu, M., Nagamatsu, M., Riku, S., Mitsuma, T. and Sobue, G.: Somatic mosaicism of the expanded CAG trinucleotide repeat in mRNAs for responsible gene of Machado-Joseph disease (MJD), dentatorubral-pallidolysian atrophy (DRPLA), and spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Neurochem. Res.* 23:25-32, 1998
- Watanabe, H., Tanaka, F., Matsumoto, M., Doyu, M., Ando, T., Mitsuma, T. and Sobue, G.: Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Clin. Genet.* 53:13-19, 1998
- Itoh, T., Niwa, H., Nagamatsu, M., Mitsuma, T., Miyakawa, A., Pleasure, D. and Sobue, G.: Nerve growth factor maintains regulation of intracellular calcium in neonatal sympathetic neurons but not in mature or aged neurons. *Neuroscience* 82:641-651, 1998
- Tanaka, F., Kachi, T., Yamada, T. and Sobue, G.: Auditory and visual event-related potentials and flash visual evoked potentials in Alzheimer's disease: correlations with mini mental state examination and revent's coloured progressive matrices. *J. Neurol. Sci.* 156:83-88, 1998
- Niwa, H., Takeda, A., Wakai, M., Miyata, T., Yasuda, Y., Mitsuma, T., Kurokawa, K. and Sobue, G.: Accelerated formation of N-(carboxymethyl) lysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:93-97, 1998
- Li, M., Miwa, S., Kobayashi, Y., Merry, D. E., Yamamoto, M., Tanaka, F., Doyu, M., Hashizume, Y., Fischbeck, K. H. and Sobue, G.: Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann. Neurol.* 44:249-254, 1998
- Li, M., Nakagomi, Y., Kobayashi, Y., Merry, D. E., Tanaka, F., Doyu, M., Mitsuma, T., Hashizume, Y., Fischbeck, K. H. and Sobue, G.: Nonneural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Am. J. Pathol.* 153:695-701, 1998
- Abe, Y., Tanaka, F., Matsumoto, M., Doyu, M., Hirayama, M., Kachi, T. and Sobue, G.: CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease. *Neurology* 51:882-884, 1998
- Kobayashi, Y., Miwa, S., Merry, E. D., Kume, A., Mei, L., Doyu, M. and Sobue, G.: Caspase-3 cleaves the expanded androgen receptor protein of spinal and bulbar muscular atrophy in a polyglutamine repeat length-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252:145-150, 1998
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers,

D., Mikuni, M., Kumahiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, T. and Alan Permutt, M.: A gene encoding a transmembrane proteins is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genet.* 20:143-148, 1998

貫名信行：トリプレットリピート病の最近の進歩。最新内科学体系プロGRESS 12 神経・筋疾患，中山書店，東京，1998，pp29-35
Yamashita, A., Watanabe, Y., Nukina, N., and Yamamoto, M.: RNA-assisted nuclear transport of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Cell* 95:115-123, 1998

Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, Yanagisawa H, Okamura-Oho Y, Yamada M. Intracellular aggregate formation of dantatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:96-102, 1998.

Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M, Reed JC. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res.* 58:3116-3131, 1998.

Nishita M, Inoue S, Tsuda M, Tateda C, Miyashita T. Nuclear translocation and increased expression of Bax and disturbance in cell cycle progression without prominent apoptosis induced by hyperthermia. *Exp. Cell Res.* 244:357-366, 1998.

Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvesen GS, Reed JC, Inoue T, Yamada M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: Processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* 5:1034-1041, 1998.

2. 学会発表

S. Tsuji: Molecular mechanisms of neurodegenerative diseases. International Seminar on Neurobiology X (第10回国際セミナー：神経系の分子生物学—脳科学の進歩と病気—), 1998.1.20, Tokyo

S. Tsuji: Update on dominant ataxias. 9th International Congress on Neuromuscular Diseases, 1998.9.2, Adelaide

S. Tsuji: CAG repeat instability in dominant ataxias. 9th International Congress on Neuromuscular Diseases, 1998.9.2, Adelaide

S. Tsuji: Dentatorubral-pallidolusian atrophy: genetics and phenotype. 5th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 1998.10.13, New York

S. Tsuji: Molecular genetics of hereditary ataxias caused by expansion of CAG repeats. Japan-Canada Neuroscience Symposium on NeuroGenes "Functional Genomics of Neurodegeneration - Triplet Repeat Diseases" 1998.11.18, Tokyo

辻 省次：トリプレットリピート病の分子遺伝学。第39回日本神経学会総会サテライトシンポジウム7「神経・筋関連臨床的検査の進歩と実際」1998.5.20, 京都

佐藤俊哉，辻 省次：CAGリピートの不安定性を示すDRPLAモデルマウスの作成。日本人類遺伝学会第43回大会シンポジウム「変異導入マウスを用いた遺伝病の発症機構の解析」1998.10.14, 甲府

辻 省次，下畑享良，佐藤 晶，小出玲爾，五十嵐修一，小野寺理：ポリグルタミン病における神経細胞の障害機構。文部省「神経細胞死制御」(水野班)平成10年度公開シンポジウム，1998.12.8, 東京

辻 省次：神経疾患のゲノム解析。第21回日本分子生物学会年会シンポジウム「ヒトゲノム解析」1998.12.16, 横浜

小林 靖，李 攻，祖父江元，D. Merry, K. H. Fischbeck：球脊髄性筋萎縮症の異常アンドロゲン受(AR)蛋白の *in vitro* aggregation と細胞毒性。第39回日本神経学会総会 1998.5.19, 京都

祖父江元, 小林 靖, 李 攻, 大塚健三, 竹内英之: 球脊髄性筋萎縮症における変異アンドロゲン受容体の熱ショック蛋白(HSP)による凝集体形成抑制効果. 厚生省特定疾患「神経変性疾患調査研究班」平成 10 年度班会議, 1999.2.5, 東京

貫名信行: 神経細胞の死に方一見えるものと見えないもの. 第 39 回日本神経学会総会, 1998.5.21, 京都

Nukina, N.: Molecular pathology of CAG repeat diseases. The Fourth Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, The Annual Meeting of the Korean Society for Neuroscience, 1998.6.25, Seoul

貫名信行: CAG リピート病と核内封入体. 第 21 回日本神経科学学会・第 41 回日本神経化学会合同大会, 1998.9.22, 東京

Nagao, Y., Ishiguro, H., Nagatsu, T. and Nukina, N.: 'Death' of *E. coli* induced by expression of truncated peptide of huntingtin harboring expanded polyglutamine. The 48th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 1998.10.27-31, Denver

Nukina, N.: CAG repeat diseases. The 10th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases, 1998.11.1, Shonan

山下 朗, 渡辺嘉典, 貫名信行, 山本正幸: 分裂酵母の meiRNA は減数分裂制御因子 Mei2 の核移行を促進する. 第 21 回日本分子生物学会年会, 1998.12.16-18, 横浜

Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, Okamura-Oho Y, Yamada M. Dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) protein is cleaved during apoptosis. American Association for Cancer Research Special Conference, Molecular Mechanisms of Apoptosis Regulation, Palm Springs, January 9-13, 1998.

藤井克則, 高梨潤一, 宮下俊之, 山田正夫. Gorlin 症候群における遺伝子解析および細胞生物学的検討. 第 8 回 Medical Genetics 研究会, 東京,

7 月 18-19 日, 1998.

藤井克則, 宮下俊之, 高梨潤一, 杉田克生, 安元慎一郎, 永江祥之介, 山田正夫. Nevoid basal cell carcinoma syndrome における遺伝子解析および細胞生物学的検討. 第 57 回日本癌学会総会, 横浜, 9 月 30 日-10 月 2 日, 1998.

宮下俊之, 山田正夫. グルココルチコイドによるアポトーシスにおけるカスパーゼの活性化. 第 57 回日本癌学会総会, 横浜, 9 月 30 日-10 月 2 日, 1998.

柳澤比呂子, 宮下俊之, 於保祐子, 大見和宏, 文東美紀, 徳永勝士, 山田正夫. DRPLA 遺伝子と相同性の高い RERE1 の機能解析. 日本人類遺伝学会第 43 回大会, 甲府, 10 月 14-16 日, 1998.

於保祐子, 宮下俊之, 山田正夫. DRPLA 蛋白に結合し, 細胞内シグナル伝達に関わる遺伝子産物の解析. 日本人類遺伝学会第 43 回大会, 甲府, 10 月 14-16 日, 1998.

於保祐子, 宮下俊之, 山田正夫. DPRLA 蛋白はインスリン/IGF-I シグナル伝達機構に関与する. 第 21 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 16-19 日, 1998.

宮下俊之, 長尾和右, 山田正夫. グルココルチコイドによるアポトーシスでみられるカスパーゼの限定分解. 第 21 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 16-19 日, 1998.

柳澤比呂子, 宮下俊之, 於保祐子, 大見和宏, 文東美紀, 徳永勝士, 山田正夫. DRPLA 蛋白と高い相同性を持ち, また RE リピートを持つ RERE1 蛋白の機能. 第 21 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 16-19 日, 1998.

藤井克則, 宮下俊之, 高梨潤一, 河野陽一, 安元慎一郎, 永江祥之介, 山田正夫. Gorlin 症候群における遺伝子解析および細胞生物学的検討. 第 21 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 16-19 日, 1998.

禹 麻美, 宮下俊之, 松井 淳, 於保祐子, 井上 正, 山田正夫. 誘導可能なポリグルタミンの発現系の確立と細胞内凝集の解析. 第 21 回

日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、
1998.

G. 知的所有権の取得状況
該当なし

III. 分担研究報告書

トリプレットリピート病の治療法の開発

辻 省次 (新潟大学脳研究所神経内科)

研究要旨

アデノウイルスベクターを用いて神経細胞にポリグルタミン鎖を有する DRPLA タンパクの高発現系を確立した。分化型 PC12 細胞では、全長の DRPLA タンパクが高率に核移行することを示し、DRPLA タンパクが核タンパクであることを示した。伸長したポリグルタミン鎖を有する DRPLA 部分タンパクについては、分化型 PC12 細胞では早期から高率に核内凝集体を形成し高率にアポトーシスを示すことを見いだした。伸長したポリグルタミン鎖を有する全長の DRPLA タンパクについては、分化型 PC12 細胞では核内凝集体を形成するのに対して、皮膚線維芽細胞では細胞質内に凝集体を形成し、分化型 PC12 細胞では核内凝集体を形成しやすいことを明らかにした。これらの特徴は、ポリグルタミン病において神経系が選択的に障害を受けることを説明できる可能性がある。

A. 研究目的

本研究の目的は、CAG リピートの異常伸長に基づく遺伝性神経変性疾患を対象として、その治療法開発することである。CAG リピートの伸長による疾患においては、CAG リピートはポリグルタミンをコードしており、異常に伸長したポリグルタミンが細胞に対して障害性に作用することが示されてきている。最近までの研究成果から、1. 伸長したポリグルタミンを有するタンパクは凝集体を形成しやすい、2. 細胞障害性を示すためには伸長したポリグルタミンを有するタンパクが核移行することが必要であるらしい、3. 核内凝集体を形成する細胞は高率にアポトーシスを示す、などの点が明らかにされてきている。

CAG リピート病の治療法を開発していくためには、核内凝集体の形成機構、伸長したポリグルタミンを有するタンパクによる細胞障害機構、を分子レベルで明らかにしていく必要がある。これらの分子病態機序を解明し、その緩和法を開発し治療法開発につなげていくためには、神経細胞を含む培養細胞系で変異蛋白質を高発現できる実験系を開発することが必須である。

培養細胞系での発現実験系に関しては、研究分担者はこれまでに歯状核赤核・淡蒼球

イ体萎縮症 (DRPLA) 遺伝子の cDNA を用いて、COS 細胞における一過性発現の実験系を確立し; truncate した DRPLA 変異タンパクが核内、及び核周囲に凝集体を形成し、アポトーシスを誘導することを明らかにしてきた [1]。CAG リピート病においては、病因遺伝子は広く発現しているにもかかわらず、神経系が選択的に障害されるという特徴がある。これまでの実験系では、主として COS 細胞が用いられてきているが、神経細胞での凝集体形成、細胞障害機構を解析する必要があり、神経細胞へと分化させた PC12 細胞や初代培養系などを用いて高発現系が求められる。このことを実現するために、アデノウイルスベクターを用いて、全長および部分 cDNA (野生型および変異型) をアデノウイルスベクターに組み込み、分化型の PC12 細胞を用いた発現系を樹立し、非神経細胞の一つとして皮膚線維芽細胞との比較を行い、神経細胞における凝集体形成、アポトーシスについて検討を行った。

B. 研究方法

アデノウイルスベクターの作成

truncated した DRPLA cDNA については、CAG リピートの上流、および下流にそれぞれ 7 アミノ酸をコードする形にまで truncation さ

せ、N末側に FLAG tag を付加した cDNA を作成し、cassette cosmid (pAdex1CAwt) に挿入し、homologous recombination によりアデノウイルスベクターを作成した [2-4]。全長の DRPLA cDNA [5] については同様に N 末側に FLAG tag を付加して、truncate した DRPLA cDNA と同様にアデノウイルスベクターを作成した。コードするグルタミンの数については、全長、truncate したものともに野生型については、19 個のグルタミンをコードし、変異型は 82 個のグルタミンをコードしている。

アデノウイルスベクターを用いた発現実験

非分化型の PC12 細胞は 10% 馬血清、5% 牛胎児血清を含む DMEM で培養し、神経細胞への分化は 1% 馬血清、2.5S NGF (50 ng/ml) を含む DMEM を用いて行った [6]。細胞は、8-well chamber slide (Nunc) を用いて、 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ の密度で、上記の培地を用いて 37°C 、5% CO_2 で培養を行った。皮膚線維芽細胞の培養は同じ chamber slide を用いて、 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ の密度で、10% 牛胎児血清を含む DMEM を用いて培養した。

C. 研究結果

まず最初に、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入の効率を調べるために、lacZ を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、10, 50, 100, 500 の MOI (multiplicity of infection) において、分化型 PC12 細胞に感染させ、lacZ の発現効率を検討した。その結果、MOI 100, 500 において 100% の発現効率を得られることが示された。皮膚線維芽細胞の場合には、MOI 100 で感染 3 日後に 60%、6, 9 日後に 100% の感染効率を得られた。MOI 500 の場合も同様の結果であった。以上の結果から、MOI 100 を用いて次の実験を行った。

Q19 を含む DRPLA タンパク断片をアデノウイルスベクターを用いて発現させた場合、分化型 PC12 細胞においては、細胞質および核に一様に発現が認められた。これに対して皮膚線維芽細胞では、細胞質に存在し、分化型 PC12 細胞では核により高率に移行することが示された (Table 1)。Q82 を含む DRPLA タンパク断片を発現させた場合には、分化型 PC12 細胞、皮膚線維芽細胞ともに凝集体の形成が

認められたが、分化型 PC12 細胞では感染 3 日後から、高率に (ほぼ 100%) 核内凝集体の形成が認められたのに対して、皮膚線維芽細胞では、感染 3 日後では $31 \pm 21\%$ ($n=3$) の細胞に核内凝集体の形成が認められ、6, 9 日後では、それぞれ、 $52 \pm 34\%$ 、 $71 \pm 23\%$ と徐々に核内凝集体を有する細胞が増加した。TUNEL 反応を用いてアポトーシスの頻度を調べたところ、分化型 PC12 細胞に Q82 を含む DRPLA タンパク断片を発現させた場合、感染 3, 6, 9 日後に、それぞれ $4.7 \pm 3.1\%$ 、 $39 \pm 16\%$ 、 $64 \pm 10\%$ ($n=3$) の細胞が TUNEL 反応陽性であった。これに対し、皮膚線維芽細胞に Q82 を含む DRPLA タンパク断片を発現させた場合、感染 3, 6, 9 日後に、それぞれ $8.0 \pm 5.0\%$ 、 $13 \pm 3.5\%$ 、 $13 \pm 5.3\%$ ($n=3$) の細胞の TUNEL 反応が陽性であった。以上の結果は、分化型 PC12 細胞が凝集体形成に対しより脆弱である可能性を示している。

野生型の全長 DRPLA タンパク (Q19) を発現させた場合、分化型 PC12 細胞では、細胞質に比較して核が抗 FLAG 抗体で非常に強く染色された (Table 1)。一方皮膚線維芽細胞では、 $90 \pm 4.3\%$ ($n=3$) の細胞では核が濃染され、細胞質が選択的に染色される細胞も 10% 程度観察された。変異型の全長 DRPLA タンパク (Q82) を発現させた場合、分化型 PC12 細胞では感染 3 日後に $73 \pm 31\%$ ($n=3$) の細胞に 1~3 個の核内凝集体が認められたのに対して、皮膚線維芽細胞では、細胞質にのみ凝集体の形成が認められ核内凝集体は観察されなかった。アポトーシスについて TUNEL 反応で調べてみると、分化型 PC12 細胞は核内凝集体を有するにも関わらず TUNEL 反応陰性で、アポトーシスを惹起するものではないことが示された。細胞質内凝集体を有する皮膚線維芽細胞についても、TUNEL 反応陰性であった。

D. 考察

今回の実験で、アデノウイルスベクターを用いて、DRPLA 部分タンパク (Q19 および Q82)、全長タンパク (Q19 および Q82) を分化型 PC12 細胞に高発現が可能となった。今回の実験で、

Table 1 Expression patterns, aggregate body formation and apoptosis in neuronal PC12 cells and fibroblasts expressing truncated or full-length DRPLA proteins

		truncated DRPLA protein			full-length DRPLA protein		
		expression pattern	aggregates	TUNEL reaction	expression pattern	aggregates	TUNEL reaction
neuronally differentiated PC12 cells	Q19	nuclear and cytoplasmic	-	-	nuclear	-	-
	Q82	nuclear	+ many/nucleus (nuclear)	++	nuclear	+ 1-2/nucleus (nuclear)	-
fibroblasts	Q19	cytoplasmic	-	-	predominantly nuclear	-	-
	Q82	cytoplasmic and nuclear	+ (cytoplasmic ~nuclear)	+++	cytoplasmic and nuclear	+ (cytoplasmic)	-

まず野生型タンパクの細胞内分布が分化型 PC12 細胞と皮膚線維芽細胞で異なっていることが示された。すなわち、部分タンパクの場合、皮膚線維芽細胞では細胞質に発現するのに対し、分化型 PC12 細胞では、核及び細胞質に発現することが示された。全長 DRPLA タンパクを発現させると分化型 PC12 細胞で選択的に核に発現し、皮膚線維芽細胞では、多くは核に発現するものの一部は細胞質に発現することが示された。全長の DRPLA タンパクについては、N 末に近いところに核移行シグナルと考えられる配列（アミノ酸残基 16-32 [7], 87-93）が機能している可能性があり、DRPLA タンパクは生理的にも核移行しうるタンパクである可能性がある。また、部分 DRPLA タンパクについては、これら核移行シグナルは欠失しており、分子量も小さいことから拡散により核膜孔を通過する可能性が示唆されるが、分化型 PC12 細胞で高率に核移行が観察されることは、神経系の細胞において、伸長したポリグルタミン鎖に対して何らかの核移行を促進する機構がある可能性がある。

核内凝集体の形成については部分 DRPLA タンパク (Q82) を発現させた場合に分化型 PC12 細胞では皮膚線維芽細胞に比べて早期から高

率に核内凝集体が形成され、またアポトーシスの頻度も高くなることから、神経系の細胞が、核内凝集体を形成しやすく、核内凝集体の形成に対してもより脆弱である可能性が示された。しかしながら、凝集体の形成の機構については、タンパクの発現量、タンパクのプロセッシング、細胞内局在の違い、細胞分裂の有無など多くのパラメーターが関与すると考えられ、これらの点についてはさらに詳細な検討が必要である。

全長の DRPLA タンパク (Q82) の発現により、分化型 PC12 細胞で核内凝集体を形成するもののアポトーシスは示さないという興味深い結果が得られた。このことは、最近の研究でも示されており [8, 9]、核内凝集体の形成と細胞障害機構が直接結びつかない可能性もある。

今回の実験により、分化型の PC12 細胞と皮膚線維芽細胞を用いた比較実験により、全長および部分 DRPLA タンパクの発現分布、凝集体の細胞内での形成部位や頻度、アポトーシスの惹起性などについて大きな差があることが判明した。この結果は DRPLA 遺伝子が広く発現しているにもかかわらず、神経系のみが選択的に障害される現象に結びつく可能性が

あり、神経系においてこのような特性を規定している因子を具体的に明らかにしていく必要がある。神経系の培養細胞を用いて変異 DRPLA タンパクによる凝集体形成、アポトーシスの解析系が実現したことにより、凝集体形成の抑制、細胞障害の緩和など治療法開発に向けての研究を具体的に進める必要がある。

参考文献

1. Igarashi S, Koide R, Shimohata T *et al.* Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet* **18**: 111-117, 1998
2. Kanegae Y, Makimura M and Saito I A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol* **47**: 157-166, 1994
3. Miyake S, Makimura M, Kanegae Y *et al.* Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1320-1324, 1996
4. Sato A, Shimohata T, Koide R *et al.* Adenovirus-mediated Expression of Mutant DRPLA Proteins with Expanded Polyglutamine Stretches in Neuronally Differentiated PC12 Cells.-Preferential intranuclear aggregate formation and apoptosis-. *Hum Mol Genet* in press. , 1999
5. Onodera O, Oyake M, Takano H *et al.* Molecular cloning of a full-length cDNA for dentatorubral-pallidolusian atrophy and regional expressions of the expanded alleles in the CNS. *Am J Hum Genet* **57**: 1050-1060, 1995
6. Greene LA, Aletta JM, Rukenstein A *et al.* PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods Enzymol* **147**: 207-216, 1987
7. Miyashita T, Okamura-Oho Y, Mito Y *et al.* Dentatorubral pallidolusian atrophy (DRPLA) protein is cleaved by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem* **272**: 29238-29242, 1997
8. Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD *et al.* ataxin-1 nuclear localization and aggregation - role in polyglutamine-induced disease in scd1 transgenic mice. *Cell* **95**: 41-53, 1998
9. Saudou F, Finkbeiner S, Devys D *et al.* Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **95**: 55-66, 1998

E. 結論

アデノウイルスベクターを用いて神経細胞にポリグルタミン鎖を有する DRPLA タンパクの高発現系を確立した。分化型 PC12 細胞では、全長の DRPLA タンパクが高率に核移行することを示し、DRPLA タンパクが核タンパクであることを示した。分化型 PC12 細胞では、皮膚線維芽細胞と比較して、伸長したポリグルタミン鎖を有するタンパクの発現に伴って核内凝集体を形成し高率にアポトーシスを示すことを見いだした。このような特徴は、ポリグルタミン病において神経系が選択的に障害を受けることを説明できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Igarashi, S., Koide, R., Shimohata, T., Yamada, M., Hayashi, Y., Takano, H., Date, H., Oyake, M., Sato, T., Sato, A., Egawa, S., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Nakano, R., Tanaka, K., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H. and Tsuji, S.: Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nature Genet.* **18**:111-117, 1998

Onodera, O., Idezuka, J., Igarashi, S., Takiyama, Y., Endo, K., Takano, H., Oyake, M., Tanaka, H., Inuzuka, T., Hayashi, T., Yuasa, T., Ito, J., Miyatake, T. and Tsuji, S.: Progressive atrophy of cerebellum and brainstem as a function of age and the size of the expanded CAG repeats in the MJD1 gene in Machado-Joseph disease. *Ann. Neurol.* **43**:288-296, 1998

Takahashi, H., Ikeuchi, T., Honma, Y., Hayashi, S. and Tsuji, S.: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6): clinical, genetic and neuropathological study in a family. *Acta Neuropathol* 95:333-337, 1998

Ikeuchi, T., Sanpei, K., Takano, H., Sasaki, H., Tashiro, K., Cancel, G., Brice, A., Bird, T. D., Schellenberg, G. D., Pericak-Vance, M., Welsh-Bohmer, K. A., Clark, L. N., Wilhelmsen, K. and Tsuji, S.: A novel long and unstable CAG/CTG trinucleotide repeat on chromosome 17q. *Genomics* 49:321-326, 1998

Takiyama, Y., Shimazaki, H., Morita, M., Soutome, M., Sakoe, K., Esumi, E., Muramatsu, S., Yoshida, M., Igarashi, S., Tanaka, H., Tsuji, S., Sasaki, H., Wakisaka, A., Nakano, I. and Nishizawa, M.: Maternal anticipation in Machado-Joseph disease (MJD): some maternal factors independent of the number of CAG repeat units may play a role in genetic anticipation in a Japanese MJD family. *J. Neurol. Sci.* 155:141-145, 1998

Zhou, Y.-X., Wang, G.-X., Tang, B.-S., Li, W.-D., Wang, D.-A., Lee, H.-S., Sambuughin, N., Zhou, L.-S., Tsuji, S., Yang, B.-X. and Goldfarb, L. G.: Spinocerebellar ataxia type 2 in China: Molecular analysis and genotype-phenotype correlation in nine families. *Neurology* 51:595-598, 1998

Sasaki, H., Wakisaka, A., Sanpei, K., Takano, H., Igarashi, S., Ikeuchi, T., Iwabuchi, K., Fukazawa, T., Hamada, T., Yuasa, T., Tsuji, S. and Tashiro, K.: Phenotype variation correlates with CAG repeat length in SCA2 - A study of 28 Japanese patients. *J. Neurol. Sci.* 159:202-208, 1998

Takano, H., Cancel, G., Ikeuchi, T., Lorenzetti, D., Mawad, R., Stevanin, G., Didierjean, O., Durr, A., Oyake, M., Shimohata, T., Sasaki, R., Koide, R., Igarashi, S., Hayashi, S., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Zoghbi, H., Brice, A., Tsuji, S.: Close associations between prevalence rates of

dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1060-1066, 1998

Sidransky, E., Burgess, C., Ikeuchi, T., Lindblad, K., Long, R. T., Philibert, R. A., Rapoport, J., Shalling, M., Tsuji, S. and Ginns, E. I.: A triplet repeat on 17q accounts for most expansions detected by the repeat expansion detection technique. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1548-1551, 1998

Tsuchiya, K., Oyanagi, S., Arima, K., Ikeda, K., Akashi, T., Ando, S., Kurosawa, T., Ikeuchi, T. and Tsuji, S.: Dentatorubralpallidoluyian atrophy: clinicopathological study of dementia and involvement of the nucleus basalis of Meynert in seven autopsy cases. *Acta Neuropathol.* 96:502-508, 1998

2. 学会発表

S. Tsuji: Molecular mechanisms of neurodegenerative diseases. International Seminar on Neurobiology X (第10回国際セミナー: 神経系の分子生物学-脳科学の進歩と病気-), 1998.1.20, Tokyo

S. Tsuji: Update on dominant ataxias. 9th International Congress on Neuromuscular Diseases, 1998.9.2, Adelaide

S. Tsuji: CAG repeat instability in dominant ataxias. 9th International Congress on Neuromuscular Diseases, 1998.9.2, Adelaide

S. Tsuji: Dentatorubral-pallidoluyian atrophy: genetics and phenotype. 5th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 1998.10.13, New York

S. Tsuji: Molecular genetics of hereditary ataxias caused by expansion of CAG repeats. Japan-Canada Neuroscience Symposium on NeuroGenes

"Functional Genomics of Neurodegeneration
Triplet Repeat Diseases" 1998.11.18, Tokyo

辻 省次： トリプレットリピート病の分子
遺伝学. 第 39 回日本神経学会総会サテライト
シンポジウム 7 「神経・筋関連臨床的検査の
進歩と実際」 1998.5.20, 京都

佐藤俊哉, 辻 省次： CAG リピートの不安
定性を示す DRPLA モデルマウスの作成. 日本
人類遺伝学会第 43 回大会シンポジウム「変異
導入マウスを用いた遺伝病の発症機構の解
析」 1998.10.14, 甲府

辻 省次, 下畑享良, 佐藤 晶, 小出玲爾,
五十嵐修一, 小野寺理： ポリグルタミン病
における神経細胞の障害機構. 文部省「神経
細胞死制御」(水野班)平成 10 年度公開シン
ポジウム, 1998.12.8, 東京

辻 省次： 神経疾患のゲノム解析. 第 21 回
日本分子生物学会年会シンポジウム「ヒトゲ
ノム解析」 1998.12.16, 横浜

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

球脊髄性筋萎縮症における変異アンドロゲン受容体の熱ショック蛋白(HSP)による凝集体形成抑制効果

祖父江 元 (名古屋大学医学部神経内科)

研究要旨

CAG リPEAT病の病態発現機序としてポリグルタミン鎖による aggregate の関与が問題となっている。そこで熱ショック蛋白(HSP)による aggregate 形成抑制効果を検討した。In vitro aggregate assay と培養神経系細胞への遺伝子導入実験において、HSP は truncated androgen receptor による aggregate 形成を著明に抑制し、また細胞生存率の改善効果を認めた。この結果は aggregate 形成が CAG リPEAT病の病態発現機序に関与を示唆しており、また HSP の CAG リPEAT病治療応用への可能性をも示している。

A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症(Spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA)は性染色体劣性遺伝の緩徐進行性の運動ニューロン病である。1991年に La Spada らによりアンドロゲン受容体遺伝子(AR)の第1エクソン内の CAG リPEATが延長することが、SBMA の原因であることを見出された。これがその後相次いで発見される CAG リPEAT病の発端となった。現在のところ CAG リPEAT病としてはハンチントン舞踏病(HD), 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA), 各種脊髄小脳萎縮症(SCA1, 2, 3, 6, 7)などが知られている。これら CAG リPEAT病は延長した CAG リPEATに対応するポリグルタミン鎖によって引き起こされる gain of a toxic function を共通の病態発現機構として持つと考えられている。その病態発現機構としては、各責任遺伝子産物のポリグルタミン鎖部分を核とした部分に processing を受けることが重要な病因の一つであると考えられている。そして processing をうけたポリグルタミン鎖が polar zipper 構造や transglutaminase による cross-linking などにより aggregate を形成し、CAG リPEAT病の病態形成に関与すると考えられている。(processing—aggregate 仮説)。さらに最近の報

告では各 CAG リPEAT病の主要病変部に責任遺伝子産物よりなる核内封入体の存在も確認されている。この核内封入体は基本的には各責任遺伝子産物のポリグルタミン鎖近傍のみより構成されており、processing—aggregate 仮説を支持する根拠となっている。しかし最近、Saudou らは核内封入体は CAG リPEAT病の直接的な病態発現機構とは関係ないと報告しており、この processing—aggregate 仮説にも更なる検証が必要となっている。そこで我々は processing—aggregate 仮説の検証と共に CAG リPEAT病の治療法を探るために熱ショック蛋白によるポリグルタミン鎖の aggregate 形成抑制効果を検討した。

B. 研究方法

In vitro aggregation assay

大腸菌を用い gst-truncated AR 65-HA, HSC70-His, HSP40-His を精製した。gst-truncated AR 65-HA(0.5nM)に対し Mol 比 1:20 で HSC70-His, HSP40-His を加え 30分 incubate 後 Western blotting を施行した。抗 HA 抗体で免疫染色し、ECL で検出した。Densitometry で信号強度を測定した。

Transient expression assay

Neuro2a cell line を用いた。CMV promotor で発現される truncated AR97-GFP と共に HSP70, HSP40, HSDJ の construct を co-transfection した。Transfection 後 24 時間及び 72 時間後に固定した。propidium iodide で核染色後、共焦点レーザーで観察した。

C. 研究結果

In vitro aggregation assay (図 1, 2)

図 1 controle lane で示すように monomer は約 50Kd の位置の信号 (灰矢頭) を認めるが, SDS-PAGE の well 直下に相応する部位に aggregate による信号をも認める (黒矢頭)。HSP の添加によりこの aggregate の信号強度は種々の変化を示している。

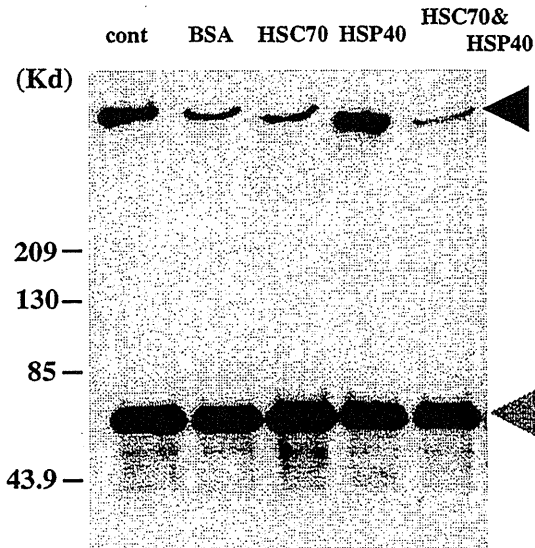


図 1. Western blotting

この変化を aggregate/monomer 比で見ると(図 2), control 0.45, +BSA 0.19, +HSC70 0.08, +HSP40 0.6, +HSC70/HSP40 0.01 であった。HSC70 と HSC70/HSP40 では truncated AR65 による aggregate 形成を著明に抑制した。

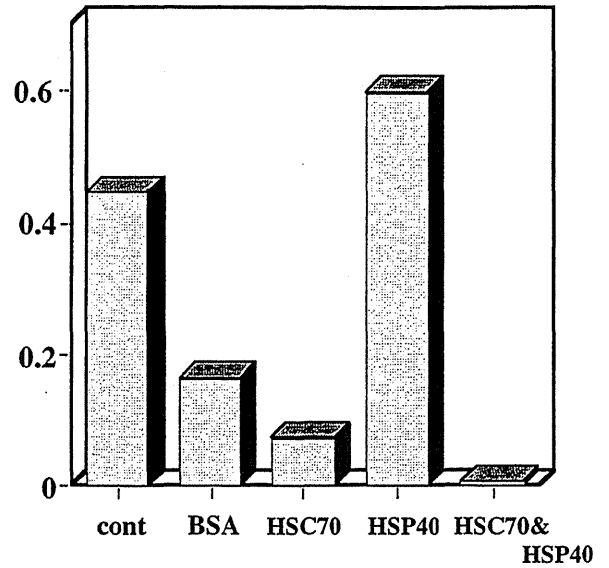


図 2. Aggregate/monomer ratio (=signal intensity of aggregate/signal intensity of monomer)

Transient expression assay (図 3, 4)

Neuro2a に CMV promotor で発現される truncated AR24-GFP および truncated AR97-GFP を transient expression すると, trasfection 後 48 時間後には truncated AR97-GFP 群では trasfection された細胞のほぼ 100%に aggregate を認めるも truncated AR24-GFP 群では全く認めなかった。また 48 時間後の生存細胞数も truncated AR97-GFP 群は truncated AR24-GFP 群の半分程度に減少する(data not shown)。この系に HSP70, HSP40, HSDJ を単独および相互に truncated AR97-GFP と共に co-transfection した。

図 3 で示すように+HSDJ 群以外では細胞内 aggregate の減少効果を見た。特に +HSP70/HSP40 群で著明であった。これは *in vitro* aggregation assay の結果とほぼ同様であった。