

ーで各バンドの放射能レベルを測定した。

2) カルシウムの動員の測定

5 x 10⁶ の細胞を 20 mM HEPES pH 7.2、5 mM glucose、0.025 % BSA、および 1 mM CaCl₂ を含む PBS 溶液に入れて 3 mM Fura-2/AM を加え、37℃で 45 分培養した。細胞を 2 回洗浄し、10⁶ cells/ml になるよう浮遊させ、M4 抗体 (2 mg/ml) で細胞を刺激した。細胞内フリーカルシウムのレベルは spectrophotometer (F-2000 型 ; Hitachi, San Jose, CA) で持続モニターした。

3) イノシトールリン酸の生成

1 x 10⁶/ml の細胞を myo-[3H] inositol (10 mCi/ml, 105 Ci/mmol ; Amersham) を含む RPMI 1640, 10 % dialyzed FCS で 37 °C, 4 時間培養した。その後 37 °C, 5 分のプレインキュベーション後、10 mM LiCl の存在下で細胞を M4 抗体 (15 mg/ml) で刺激した。刺激終了時点で TCA を加え、生じた沈澱物を除き、抽出液をジエチルエーテルで洗浄した。0.1M ギ酸で平衡化した AG1-X8 (formate form) イオン交換カラム(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) 1 ml に洗浄後のサンプルをアプライし、10 ml の H₂O で 1 回、10 ml の 60 mM ギ酸アンモニウム + 5 mM 四ぼう酸ナトリウム + 0.1 M ギ酸で 1 回カラムを洗浄した。その後、0.2 M ギ酸アンモニウム + 0.1 M ギ酸でイノシトール 1 リン酸を、0.4 M ギ酸アンモニウム + 0.1 M ギ酸でイノシトール 2 リン酸を、0.7 M ギ酸アンモニウム + 0.1 M ギ酸でイノシトール 3 リン酸をこの順で溶出し、この溶出液の放射能レベルをシンチレーションカウンターで測定した。

結果

1) Sab による Btk の活性の抑制

我々は、*in vitro* キナーゼアッセイを用いて Sab が Btk のトランスインヒビターとして働く可能性を検討し

た。T7-Btk pAuro ベクターを 293T 細胞に導入することによってヒト Btk 蛋白質を一過性に発現させ、この Btk 蛋白質を抗 T7 抗体で免疫沈降した。精製した Btk に、CKKVVALYDYMPMN の配列をもつペプチド (Btk の 217-229 番のアミノ酸に該当する配列に N 末端のシステインが付加されたもの) を加えてこれを Btk の基質とした。このペプチドは Btk のチロシンリン酸化作用をみるのに有用であることが報告されているものである。このペプチドのチロシン残基の周辺配列は Btk の自己リン酸化部位であるチロシン 223 番のそれと同じであり、またセリンやスレオニンなどリン酸化され得るアミノ酸残基を含まないため他のリン酸化酵素による非特異的なリン酸化反応を検出する可能性が無く、Btk によるチロシンリン酸化反応だけを特異的に検出する基質と考えられる。キナーゼ活性は上記ペプチドに取り込まれる ³²P の量で比較した。ペプチドのバンドに該当する部分のゲルを切り出してシンチレーションカウンターで放射能レベルを測定し、カウントの強さを Table 1 に示すように GST 融合蛋白質の存在しないときのキナーゼ活性に対する相対的な値で示した。GST-Sab 蛋白質を反応液に加えると量依存的に Btk のキナーゼ活性が抑制された (Table 1 上段)。それに対して Btk との結合に関与しない部位の Sab 配列と GST との融合蛋白質 [GST-Sab(T) ; 結合に関与しない部位として、Sab の 1-99 番アミノ酸に該当する部分を用いた。] あるいは、GST 蛋白質のみ (GST only) を加えた場合には、このような抑制はみられなかった (Table 1 中段、下段)。

Table 1. Relative radioactivity of the substrate peptide. (10 min. reactions) (transphosphorylation)

Amount of protein (μg)	Btk activity (relative radioactivity)			
	0	0.2	1	5
GST-Sab	1.00	0.864	0.373	0.033
GST only	1.00	1.17	1.11	1.11
GST-Sab (T)	1.00	1.00	0.988	1.00

従って、この抑制は GST 融合蛋白質を大量に加えたことによる非特異的な現象ではなく、Sab と Btk の結合を介した特異的な現象であることが示唆された。また、経時的に Btk による基質ペプチドのリン酸化レベルを観察したところ、GST のみ、あるいは GST-Sab(T) を添加した場合は ^{32}P のペプチドへの取り込みが時間依存的に増加することが観察されたが、同量(5 μg)の GST-Sab を添加した場合は ^{32}P のペプチドへの取り込みの増加はほとんどみられなかった (Table 2)。

Table 2. Time course of radioactive incorporation into substrate peptide. (5 μg GST proteins)

Time (min.)	Btk activity (relative radioactivity)			
	0	3	5	10
GST-Sab	0	0.032	0.044	0.079
GST only	0	0.233	0.750	1.00
GST-Sab (T)	0	0.511	0.900	1.02

基質ペプチドのリン酸化レベルが減少するメカニズムとして Sab が Btk のキナーゼ活性を抑制する可能性以外に、GST-Sab (GST と Sab との融合蛋白質) が Btk と結合することにより Btk と基質との会合を阻害し基質のリン酸化が減少するという可能性、あるいは GST-Sab が基質と結合する為に基質と Btk の会合が減少する可能性も考え得るが、Table 3 に示したように基質ペプチドのリン酸化レベル (transphosphorylation) のみならず Btk の自己リン酸化

レベル (autophosphorylation) も添加した GST-Sab の量依存的に抑制されることより、Sab が Btk のキナーゼ活性自体を抑制していると考えられる。また、このようなリン酸化レベルの減少は、加えた GST-Sab 蛋白質に何らかの phosphatase が混入したことによるアーチファクトとして観察されたという可能性も考えられたため、GST-Sab 蛋白質を加えずにリン酸化反応を行った後、加熱して反応を終了させ、その後でサンプルに GST-Sab 蛋白質を加え、25℃で 10 分インキュベートして ^{32}P 取り込みのレベルを比較した。Table 4 上段に示す通り、取り込んだ ^{32}P の量に差はみられなかった。従って、リン酸化の減少は phosphatase の混入による脱リン酸化ではないと考えられた。

これらの結果より、Sab は Btk のキナーゼ活性を *in vitro* で抑制すると結論した。

Table 3. Relative radioactive incorporation into Btk. (10 min. reactions) (autophosphorylation)

Amount of protein (μg)	Btk activity (relative radioactivity)			
	0	0.2	1	5
GST-Sab	1.00	0.864	0.437	0.041
GST only	1.00	0.940	1.12	1.30
GST-Sab (T)	1.00	0.990	0.904	1.14

Table 4. Radioactivity of phosphorylated substrate peptide was not altered as a result of the addition of GST-Sab protein after the reaction.

Amount of protein (μg)	Btk activity (relative radioactivity)			
	0	0.2	1	5
GST-Sab	1.00	1.01	1.07	1.07
GST-Sab (T)	1.00	0.849	0.773	0.935

3) B 細胞における Sab の強発現は B 細胞レセプター (BCR) 刺激によって生じる初期シグナル伝達を抑制する。

DT40 細胞で Btk 遺伝子をノックアウトすると BCR

のクロスリンクに引き続く初期現象であるカルシウムの動員およびイノシトール 3 リン酸の生成が起らなくなることが示されている(文献 28, および Table 5. 下段)。

Table 5. Production of inositol 1,4,5-triphosphate following BCR crosslinking is reduced in Sab-overexpressed DT40 cells.

Time (min.)	IP ₃ production (fold)			
	0	3	5	10
DT40 (wild)	1.00	3.96	15.2	22.9
DT40 (Sab(+))	1.00	3.33	8.03	14.2
DT40 (Btk(-))	1.00	1.69	1.61	1.89

我々は、DT40 細胞に Sab を強発現させることにより BCR のクロスリンクに引き続くカルシウムの動員およびイノシトール 3 リン酸の生成に変化が生じるか否かを検討した。DT40 細胞に Sab の cDNA を導入し、CMV プロモーター²⁶⁾で Sab 遺伝子を恒常的に強発現させた。まず、この DT40 細胞における BCR の発現レベルが、何も導入しない野生型 DT40 細胞 [DT40(wild)]のそれと同じであることをフローサイトメトリーで確認した。また、Sab 強発現 DT40 細胞 [DT40(Sab(+))と野生型 DT40 細胞をそれぞれ抗ニワトリ IgM 抗体 M4 で刺激し、刺激前後での細胞質蛋白質のリン酸化パターンを抗リン酸化チロシン抗体 4G10 によるウエスタンブロットで比較したところ、両細胞間で差は見られなかった。次に、BCR のクロスリンク後に引き続いて起こる細胞内カルシウムの上昇レベルを Sab 強発現 DT40 細胞と野生型 DT40 細胞で比較したところ、Sab 強発現 DT40 細胞での上昇レベルは野生型 DT40 細胞での上昇レベルの約 30%に減少していた。また、イノシトール 3 リン酸の生成レベルを Sab 強発現 DT40 細胞と野生型 DT40 細胞で比較したところ、Sab 強発現 DT40 細胞での生成レベルは野生型 DT40 細胞での生成レベルに比して有意(約 60%)に減少していた(Table 5. 中段、

上段)。これらの結果は、B 細胞に Sab を強発現させることによって、BCR 経由の初期シグナル伝達が抑制されることを示している。

考察

他の非レセプター型のチロシンキナーゼと同様に Btk は in vivo でその活性が厳密に制御されていると考えられる。この制御メカニズムの解明については従来の研究ではリン酸化など転写後修飾に重点が置かれてきた。すなわち Btk は Src ファミリーのキナーゼによってそのキナーゼドメイン内に存在するチロシン 551 番がリン酸化されることにより活性化され、それに引き続いてその SH3 ドメイン内に存在するチロシン 223 番の自己リン酸化が起こると報告されている⁸⁾。但し、このチロシン 223 番のリン酸化の意義は現在不明である。一方、Btk の活性はプロテインキナーゼ C によるリン酸化により負の制御を受けるとも報告されている。また Btk の活性は細胞への刺激後の膜分画への移行とそれに続くリン酸化によって制御されると報告されている。更に、高分子量三量体 G 蛋白質の α サブユニット (Gq クラス) が直接 Btk の活性を増大させることが最近報告され、Btk の活性が他の分子によって制御されうることが示唆されている。しかし、現在まで Btk のトランスインヒビターについての報告は存在しない。一方、Abl については AAP-1 が、Jak については SSI-1/JAB/SOCS が、また Syk については Cbl が γ トランスインヒビターとして報告されている。Sab は Far Western 法で GST-BtkSH3 (Btk の SH3 ドメインと GST との融合蛋白質)と結合する分子として同定され⁵⁾、共発現系においても Btk が Sab と共沈することが確かめられたので Sab は in vitro および in vivo で Btk と直接会合することがわかる。また、in vitro キナーゼアッセイにおいて免疫精製した Btk のリン

酸化能が GST 融合 Sab 蛋白質の添加により阻害されることから、Sab は Btk のキナーゼ活性を抑制することがわかる。直接会合し、活性を抑制することから Sab は Btk のトランスインヒビターであると考えられる。

今回の我々の結果では BCR のクロスリンクに続いておこるカルシウムの動員とイノシトール 3 リン酸の生成が Sab 強発現 DT40 細胞では野生型に比して有意に減少し、一方細胞質蛋白質のリン酸化については有意な変化を認めなかった。これは Btk 欠損 DT40 細胞で見られた変化のパターンと類似しており、Sab が BCR を介するシグナル伝達を Btk のレベルで阻害することを示唆している。また、BCR 経由の初期シグナル伝達が Sab によって抑制されるという結果は *in vitro* において Sab が Btk の活性を抑制するという結果とよく一致するが、一方ではまた、細胞内においては Sab が Btk と結合することによって Btk の下流の基質となる分子との会合と競合し、カルシウムの動員、イノシトール 3 リン酸の生成を阻害する可能性も残されている。

Sab は非レセプター型チロシンキナーゼの内でもより Btk に選択的に結合する 5) が、一方、Btk の発現は血球系に限られている 2) のに対し Sab の発現は広範な組織にわたって認められる。したがって、血球系以外の細胞においても Sab が Btk 以外の分子と相互作用し、機能している可能性は否定できない。さらに、Btk のプロトタイプは *Drosophila* にも存在し (Tec 29) その初期発生に重要な役割を演じていることが示されているが、Sab の相同分子もまた *Drosophila* に存在しており、これらの分子の相互作用は進化の過程で高度に保存され広範な生理現象に関与している可能性も考えられる。また一方、このような Btk 活性のインヒビターの変異によって B 細胞の分化増殖の脱制御が生じ、何らかの免疫疾患の

病因となる可能性も考えられる。

文献

1. Tsukada S, Rawlings DJ, Witte ON. : Role of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency. *Curr Opin Immunol* 6: 623-630, 1994.
2. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al.: Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72: 279-290, 1993.
3. Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, et al. : Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 91: 595-602, 1998.
4. Hashimoto S, Tsukada S, Matsushita M, et al.: Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of Btk deficiency in Japan. *Blood* 88: 561-573, 1996.
5. Matsushita M, Yamadori T, Kato S, et al.: Identification and characterization of a novel SH3-domain binding protein, Sab, which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (Btk). *Biochem Biophys Res Commun* 245: 337-343, 1998.
6. Baba, Y., Nonoyama, S., Matsushita, M, et al.: Wasp is involved in the tyrosine kinase pathway in B-lineage cells. *Blood* in press, 1999.
7. Takata M, Kurosaki T. : A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med* 184: 31-40, 1996.
8. Park H, Wahl MI, Afar DE, et al.: Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* 4: 515-525, 1996.

Abstract

Regulation of Bruton's tyrosine kinase (Btk) activity by Sab, Btk-SH3 domain binding protein

by Satoshi Tsukada

from

Department of Molecular Medicine

Osaka University Medical School.

Bruton's tyrosine kinase (Btk) is the cytoplasmic tyrosine kinase which is involved in the pathogenesis of human X-linked agammaglobulinemia and murine X-linked immunodeficiency. The phenotype of these diseases (maturation arrest of B-lineage cells) indicates the crucial role of Btk in B cell development and the absence of redundancy of the Btk function with other tyrosine kinases. This report describes the function of the Btk-binding protein Sab (SH3 domain-binding protein which preferentially associates with Btk), which we previously reported as a novel SH3 domain-binding protein. Sab was shown to inhibit the auto- and transphosphorylation activity of Btk, which prompted us to propose that Sab functions as a transregulator of Btk. Overexpression of Sab in B cells led to the reduction of both B cell receptor-coupled calcium mobilization and inositol phosphate production. These combined results indicate the negative regulatory role of Sab in the B cell cytoplasmic tyrosine kinase pathway.

再生不良性貧血--発作性夜間血色素尿症症候群の モデルマウス作製

木下 タロウ, 村上 良子, 竹田 潤二*

はじめに

再生不良性貧血に免疫抑制療法が適用され、多くの症例に有効である事が示されてきた。しかし、時間の経過とともに高率に発作性夜間血色素尿症が発症してくる事が明らかになってきた。発作性夜間血色素尿症は造血幹細胞においてPIG-A遺伝子に体細胞突然変異が生じ、その異常造血幹細胞クローンが増加してくる事によって起こる。この異常造血幹細胞が拡大するメカニズムをまずマウスモデルを用いて明らかにし、その条件が再生不良性貧血患者に備わっているかを次ぎに検索し、再生不良性貧血患者における発作性夜間血色素尿症の高発生のメカニズムを明らかにする事を本研究の目的とする。我々は、すでに、PIG-Aのマウス相同遺伝子Pig-aに変異をもつキメラマウスを作製し、Pig-aの変異だけでは造血幹細胞の異常な拡大は起こらず、第2の要因がさらに必要であることを示した(1)。経過観察中に、異常幹細胞の拡大を起こしたマウスが見つかった。このことは、Pig-aの変異が起こっていれば、第2の要因が発生して異常造血幹細胞の拡大が起こり得ることを示している。この拡大現象を再現し、そのメカニズムを解析して第2の要因の本体を明らかにしなければならない。そのために多数のキメラマウスを作製したいが、通常の手法では強い致死性のためキメラマウスが多数得られないので、Cre-loxPシステムを用いてコンディショナル遺伝子ターゲティングによりこの問題を解決する。

対象および方法

Pig-aのエクソン6をはさむようにloxP配列を導入したターゲティングコンストラクトを用い、ES細胞でPig-aをターゲットした。得られたES細胞クローンを用い、loxPでエクソン6がはさまれたPig-a(Pig-a-loxPと呼ぶ)を持つマウスの系統を得た(2)。CreリコンビナーゼをヒトCMVプロモーターで全身に広く発現するトランスジェニックマウスはトロント大学Nagy教授より提供された。Pig-a-loxP(X染色体上に存在)を持つ雄とhCMV-Creを持つ雌をかけあわせた。できた胎児のうち、Pig-a-loxPをヘテロに持ち、かつhCMV-Creを受けとった雌の胎児では、Pig-aのエクソン6の欠落が効率よく起こり、染色体レベルでは、Pig-aが正常アレルと異常アレルのヘテロになっていた(3)。これにX染色体の不活化が重なり、これらの雌胎児の体は、GPI欠損細胞と正常細胞のモザイクになった。すなわち、正常アレルが不活化されるとその細胞はPig-a欠損細胞になり、異常アレルが不活化されると正常細胞になったと考えられる(3)。

14日目の胎児肝細胞中にはGPIアンカー欠損赤血球が多数存在し、Pig-a欠損の造血幹細胞と正常造血幹細胞が共存していると考えられたので、胎児肝細胞を致死量照射したマウスに移植した。移植6週間ごとに採血し、各種血液細胞上のGPIアンカー型タンパク質の発現をフローサイトメトリーで解析した。一部のマウスからは胸腺を得、胸腺細胞上のGPIアンカー型タンパク質の発現を解析した。

大阪大学微生物病研究所, 難治疾患バイオ分析部門
免疫不全疾患研究分野,
大阪大学医学部, 修士環境医学

結果

移植後6週から42週にわたって、赤血球、単球、顆粒球、CD4、CD8リンパ球、Bリンパ球にGPIアンカー型タンパク質欠損の細胞集団が存在した。すなわち、このマウスは、GPIアンカー型タンパク質欠損の多能性造血幹細胞を持っていることがわかった。この手法により、同様のマウスが多数得られた。GPIアンカー型タンパク質欠損細胞の割合は、42週まで増加する個体は出現しなかった。Tリンパ球では、CD4、CD8どちらも他の系統の細胞よりGPIアンカー型タンパク質欠損細胞の割合が常に高かった。

Tリンパ球の分化過程のどの段階でGPIアンカー欠損細胞の割合が高くなるかを知るため胸腺細胞を解析したところ、CD4、CD8とも陰性の段階、すなわち胸腺における初期段階ですでに起こっていることがわかった。CD4、CD8ダブルネガティブの細胞をさらにCD44とCD25の発現で細分化して調べたところ、もっとも未熟なCD44陽性、CD25陰性の段階ですでにGPI欠損細胞の割合が高いことがわかった。

考察

本研究で用いた手法により、Pig-a欠損の多能性造血幹細胞を持つマウスが安定に得られることがわかった。これらのマウスを観察することにより、Pig-aの変異だけでは異常造血幹細胞の拡大は起こらないことが確認された。今後、これらのマウスに再生不良性貧血で想定されている造血幹細胞に対する免疫反応を起こさせ、Pig-a欠損細胞の拡大が起こるか検討する。これらのマウスは、再生不良性貧血—発作性夜間血色素尿症症候群の発症機構解明に役立つと考えられる。

造血幹細胞においてはGPI欠損細胞が拡大する現象はみられなかったが、Tリンパ球においてはGPIアンカー欠損細胞の割合が非常に高かった。さらに、Tリンパ球の初期段階であるCD44陽性CD25陰性細胞においてすでにGPI

欠損細胞の割合が高いことがわかった。このことは、Tリンパ球分化の初期段階において、GPIアンカー型タンパク質が増殖を制御していることを示唆している。GPI欠損細胞は、この制御を受けないため陽性細胞より増加したと解釈できる。

文献

- 1) Kawagoe K et al : Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: Implication for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87, 3600-3606, 1996
- 2) Tarutani M et al : Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7400-7405, 1997
- 3) Nozaki M et al : Developmental abnormalities of glycosylphosphatidylinositol-anchor deficient embryos revealed by Cre/loxP system. *Lab. Invest.* in press.

Abstract

Analysis of hematopoietic stem cells in the model mice of aplastic anemia paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome.

by

Taroh Kinoshita 1), Yoshiko Murakami 1), Junji Takeda 2)

from

Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University 1), Department of Environmental Medicine, Osaka University Medical School 2)

[Introduction] Aplastic anemia is often associated with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). There are two key events that lead to PNH: Somatic mutation in the X-linked PIG-A gene in the hematopoietic stem cell(s) and expansion of the mutant clone(s). These events result in the production of the large number of abnormal erythrocytes that are sensitive to complement. [Methods] To determine whether mutation in the PIG-A gene also causes the expansion of the mutant cells, we generated mice that bear GPI-anchor-deficient hematopoietic stem cells and monitored whether GPI-anchor-deficient cells spontaneously increase. We used conditional gene targeting for reproducible generation of hematopoietic stem cells defective in GPI-anchor synthesis due to disruption of *Piga* gene, a mouse homologue of PIG-A gene. We generated mice in which loxP sites were introduced into introns 5 and 6 of *Piga* gene with a conventional gene targeting. These male mice were mated with female transgenic mice expressing Cre recombinase widely by human CMV promoter (provided by Dr. A. Nagy, University of Toronto). [Results] In female embryos bearing the loxP-targeted *Piga* and the Cre transgene, disruption of one *Piga* allele efficiently occurred and due to the X-chromosome inactivation the body became mosaic of GPI-anchored protein negative and positive cells. We transferred day 14 fetal liver cells that included hematopoietic stem cells into lethally irradiated mice. Six weeks after transplantation, peripheral blood erythrocytes, monocytes, granulocytes and T and B lymphocytes were mosaic. Percentages of GPI-anchor-deficient cells were constant for 42 weeks. [Conclusions] *Piga* mutation alone is not sufficient to cause expansion of GPI-deficient hematopoietic stem cells. These mice should be useful to study the second event that causes expansion of GPI-anchor-deficient cells.

分子インデックス法による神経変性疾患病態関連分子の探索

道 勇 学 丹羽 淳一 澤田 浩一
石垣 診祐 加藤 菊也* 祖父江 元

はじめに

神経変性疾患は神経細胞の系統選択的な細胞死をきたす疾患群である。その中でも家族性筋萎縮性側索硬化症、家族性アルツハイマー病などの単一遺伝子病の原因遺伝子あるいは多因子遺伝病の関連遺伝子が分子遺伝学的手法の進歩により同定されてきている。これらの遺伝子と各疾患の神経細胞変性、神経細胞死の分子機構との関わりについては、既知の分子を手がかりに縦断的な研究が精力的に行われているが未だ明らかとなっておらず、また孤発性の病態との関連についても不明である。一方、癌研究の分野をはじめとして疾患特異的に発現している遺伝子の同定が盛んに行われており、最近では発現遺伝子のプロファイリング技術の開発がめざましい進歩を遂げている。そこで我々はその中の有力な方法のひとつである分子インデックス法¹⁾を用いて、代表的神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)およびアルツハイマー病(AD)の病変組織における遺伝子発現プロファイルを作成し、遺伝子発現の変化を横断的、且つ包括的に把握することによって両疾患の分子病態をとらえ、神経細胞変性死に関わる遺伝子を探索することを目的とした。

対象および方法

本研究の対象は、AD剖検脳の側頭葉皮質組織と、対照として非神経疾患患者剖検脳の側頭葉皮質、そしてALSおよび非神経疾患患

名古屋大学医学部神経内科

* 奈良先端科学技術大学院大学ゲノム解析

者の剖検脊髄前角組織とした。方法は、これらの組織より抽出した total RNAをもとに二重鎖cDNAを合成し、分子インデックス法による遺伝子発現プロファイルを作成した^{1,2)}。分子インデックス法の原理は、サンプル組織における全ての発現遺伝子由来cDNAを3種類のクラスII制限酵素、64種類のアダプターおよび3種類のオリゴdTプライマーを用いることによって合計576グループに重複することなくインデックス化し、その各々について polymerase chain reaction 法 (PCR) で得られた発現プロファイルをポリアクリルアミドゲル上で展開するというものである。得られた全576プロファイルは、各々疾患と正常対照との間で比較し、疾患特異的にみられるあるいは疾患で発現が著減しているフラグメントピークを選択し、クローン化した後塩基配列を決定した。得られた各フラグメントの塩基配列はデータベースをもとにその分子情報を検索するとともに、ノーザンブロット分析、ATAC-PCR³⁾、あるいは定量RT-PCRを用いてAD脳と対照脳の各5例およびALS6例と対照4例の脊髄前角について定量的スクリーニングをおこなった。また未知の遺伝子については、ノーザンブロット分析によりmRNAのサイズを決定するとともに、神経系組織および一般臓器における発現分布を検討した。さらに脊髄前角組織由来のmRNAから作成したcDNAおよび胎児脳由来のcDNAを基にRACE法、あるいはライブラリースクリーニングによって完全長cDNAの取得を試みた。

結果および考察

ADについては、分子インデックス法により既知、未知を含め合計94個のcDNAを選択した。その中、現在までに40個について多数例での定量スクリーニングが終了しており、正常対照脳での発現量に対するAD脳での発現比は0.1-14であった。この中には既知のESTが9個、全く未知のcDNAが11個含まれており、現在5つの既知ESTについて完全長cDNAの取得を試みている。そしてこれまでに全長が約1.5kbのcDNAを取得、この全塩基配列を決定した。この遺伝子は、255アミノ酸、推定分子量が約26kDのORFをもち、なかにロイシンジッパー構造のモチーフとそれに続くプロリンが豊富な配列をもった新規遺伝子であった。ノーザンブロット分析では、大脳皮質特異的でなく一般臓器においても広く発現が見られ、特に骨格筋、心筋での発現が豊富であった。この遺伝子の機能については、ロイシンジッパー構造の部分でのホモログはいくつかみられるが^{4,5)}、それ以外では特異な類似分子はみあたらず全く不明である。ただしプロリンが豊富な配列にPXXPのパターンが見られることから、この部位にSH3のドメインをもった他の分子が結合する可能性があり、細胞内での情報伝達に関わるものかもしれない^{6,7)}。またこの遺伝子の発現をノーザンブロット分析で検討すると、AD症例の大脳皮質において明らかに低下しており、今後この遺伝子の機能、特に神経系組織における機能、さらにはADの病態への関与についての詳細な検討が急がれる。

ALSについては全576プロファイリングについての比較検討により合計84個のcDNAを選択し、今年度までに全てのcDNAフラグメントについて塩基配列を決定した。その中これまでに13個についてALS6例、正常対照4例での定量スクリーニングが終了した。その結果、正常対照脊髄前角での発現量に対するALS脊髄前角での発現比は0.1-10の範囲に分散しており、これらの中にALSの病態に関わって変化しているものが少なからず存在していると考えられる。

ALSの病態に関わる未知の遺伝子の探索は、現在5つのcDNAについて完全長cDNAの取得を試みている。BsmA I / 61Cは、正常対照脊髄前角組織のプロファイル由来で塩基配列が全く未知のcDNA断片であり、分子インデックス法によって得られた114bpをもとに5'RACEを行い、現在910bpのcDNAを取得している。このcDNAをプローブとして行ったノーザンブロット分析では、正常対照の脊髄および脳にのみ特異的に約4kbのトランスクリプトが明らかに認められ、各種一般臓器、あるいはALS脊髄では有意な発現は確認できなかった。さらに脊髄前角より、レーザーマイクロダイセクション法 (ZEISS社、PALM) を用いて前角運動ニューロンを20個ピックアップしてRNAを抽出後RT-PCRを行い、BsmA I / 61Cが確かに脊髄前角ニューロンで発現していることを確認した。これらのことよりこのBsmA I / 61Cがニューロンの機能に深く関わる新規の特異的遺伝子である可能性が示唆され、しかもALS6例、正常対照4例で行った定量RT-PCRでの検討では、正常対照に比べALS脊髄前角組織での発現が1/10に低下していたことから、ALSの病態、運動ニューロン死の機序を解明する上において重要な遺伝子 (分子) である可能性が考えられる。

またFok I / 3Gは、正常対照脊髄前角より得られた118bpのcDNAであり、しかも既知のより長い約500bpのESTに合致したため、これをプローブとしてノーザンブロット分析を行い、5.5kb付近に2つのトランスクリプトが確認された。さらにこのESTをもとに5'RACEを行い、さらに長い1.8kbのcDNAを取得した。この塩基配列を検討したところ、これまで約4kbと報告されていた既知のヒト膜蛋白分子の未知の3'-UTRであることが判明した。この膜蛋白分子の神経系における機能については今のところ明らかではない。しかも先のノーザンブロット分析の結果では末梢神経での発現は見られず、神経細胞体の存在する脊髄灰白質、大脳皮質、交感神経節、後根神経節において有意な発現がみられることから、この分子の神経系における機能

を検討することはALSの病態解明にとって新たな一助となるかもしれない。

現在これら2つのcDNA以外にも、ノーザンブロット分析においてALS脊髄前角にのみ5kbのmRNAが見られるBsmFI / 39A、脊髄および大脳にのみ10kbのバンドを持つBsmAI / 5Cなどについても完全長cDNAの取得を試みており、今後これらの遺伝子が明らかとなることはALSの分子病態にとって重要な布石となると考える。

文 献

- 1) Kato K: Description of the entire mRNA population by a 3' end cDNA fragment generated by class IIS restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 23: 3685-3690, 1995
- 2) Kato K: RNA fingerprinting by molecular indexing. *Nucleic Acids Res* 24: 394-395, 1996
- 3) Kato K: Adaptor-tagged competitive PCR: a novel

method for measuring relative gene expression. *Nucleic Acids Res* 25: 4694-4696, 1997

4) Komarnitski SI, Chiang YC, Luca FC et al.: DBF2 protein kinase binds to and acts through the cell cycle-regulated MOB1 protein. *Mol Cell Biol* 18: 2100-2107, 1998

5) Luca FC, Winey M: MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Mol Biol Cell* 9: 29-46, 1998

6) Wang B, Golemis EA, Kruh GD: ArgBP2, a multiple Src homology 3 domain-containing, Arg/Abl-interacting protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed cells and located in stress fibers and cardiocyte Z-disks. *J Biol Chem* 272: 17542-17550, 1997

7) Nakamura T, Muraoka S, Sanokawa R et al.: N-Shc and Sck two neuronally expressed Shc adapter homologs: their differential regional expression in the brain and roles in neurotrophin and Src signaling. *J Biol Chem* 273: 6960-6967, 1998

Abstract

Detection of expression profiles in the affected tissues of neurodegenerative diseases using the molecular indexing method

by

Manabu Doyu, Jun-ichi Niwa, Ko-ichi Sawada,
Shinsuke Ishigaki, Kikuya Kato*, Gen Sobue

from

Department of Neurology, Nagoya University School of Medicine

*Taisho Laboratory of Functional Genomics, Nara Institute of Science and Technology

The molecular indexing is an excellent method of assessing the expression profiles of the total gene population in various cells and tissues. We applied this method to the neurodegenerative diseases, including Alzheimer disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We obtained ninety-four cDNAs and eighty-four cDNAs which were drastically altered in their expression levels in the AD brain and ALS anterior horn of the spinal cord, respectively. Among these cDNAs, we have further quantified the expression levels of 40 in AD and 13 in ALS in many cases of both diseases, using Northern blot analysis, adaptor-tagged competitive PCR and quantitative RT-PCR. Their expression ratios by AD and ALS against the controls ranged from 0.1 to 14, which was not merely reflected by the cell population in the tissues, but was rather related to the pathology of the diseases. We are going on to obtain the full cDNAs of several unknown genes picked up from the indexing profiles of both diseases. In AD, we found a novel gene, which included the leucine zipper motif and putative Src homology 3-binding site, despite of unknown function. Moreover, we are now trying to determine the full sequence of cDNAs, maybe neuron-specific and/or relating to the ALS pathology. These are all attractive, implying that they would be the candidate genes which link to the molecular pathology of AD and ALS, respectively.

鉄代謝のマスター蛋白、IRP2の神経変性疾患への関与

岩井 一宏 山中 宏二 湊 長博

はじめに

アルツハイマー病等の神経変性疾患においては病巣部での鉄等の金属イオン、ユビキチン化蛋白の沈着、蛋白の酸化変性が認められ、その病態形成との関連が注目されている。しかしながら、鉄イオンの蓄積機序に関する研究は進んでいないのが現状である。我々はこれまで高い相同性を有した2種のRNA結合蛋白、IRP1及びIRP2を中心に哺乳類細胞における鉄イオン代謝の解析を進めてきた。IRPは細胞内鉄イオン濃度が低い場合にのみ鉄代謝に関与する分子をコードするmRNA上にあるstem-loop構造をしたiron responsive element(IRE)と特異的に結合することにより細胞内遊離鉄イオン濃度を一定に保つように制御している鉄代謝のマスター制御因子である(1)。鉄イオンの有無に関わらず安定な蛋白であるIRP1はiron-sulfur clusterがassembly/disassemblyすることによりIRE結合活性が制御されているのに対し(2)、IRP2は鉄イオン存在下で鉄イオンが結合することにより受ける酸化変化がシグナルとなり、ユビキチン依存性にプロテアソームで急速に分解されることによりその活性が制御されている(3-5)。鉄イオン存在下でもIRE結合活性を有するIRP1ミュータントを細胞株に導入することにより細胞質内の鉄イオン濃度が高くなり、preliminaryではあるが細胞死が観察されることから(6)、鉄イオン以外の要因でIRP1またはIRP2のIRE結合活性が増強されることにより細胞内遊離鉄イオン濃度の亢進するを介して、フリーラジカル産生が高まることが、神経細胞死に関与していると考えられる。実際、NOやH₂O₂によりIRP1のIRE結合活性は増強されることが報告されている(7,8)。しかしながら、神経系においてはIRP2の発現が高

く、アルツハイマー病巣においてIRP2蛋白の蓄積が報告されている(9)。それゆえ、神経変性疾患の病巣における鉄イオンの蓄積、神経細胞死にはIRP2の関与が考えられる。そこで、IRP2の神経変性疾患への関与について検討することを目指し、IRP2のRNA結合活性増強を介したトランスフェリン受容体(TfR)発現亢進、フェリチン(Ft)発現抑制により細胞内遊離鉄イオン濃度の上昇によるフリーラジカル産生を高める鉄イオン以外の因子の検索、また、発生工学的手法を用いて、IRP2蛋白の神経変性疾患における意義を検索を進めた。

方 法

1. 神経芽細胞腫株Neuro2Aを、鉄イオン、鉄イオンキレーター、Al, Zn等の金属イオンの存在下で培養し、IRP2のRNA結合活性をRNA gel shift assayで、また、IRP2より発現が制御されるトランスフェリン受容体(TfR)、フェリチン(Ft)の産生量を免疫沈降法で検索した。2. バキュロウイルス発現系を用いて精製したIRP2を用い、IRP2の酸化変化をin vitro oxidation assay系を用いて解析した。3. 常法に従い、IRP1及びIRP2ノックアウトマウスを作製した。

結 果

IRP2のIRE結合活性を増強させる因子の報告はこれまでにはない。前述のように、IRP2は鉄イオンが結合することにより生じる酸化変化がシグナルとなって分解されることによって制御されていることから、他の金属イオンがIRP2の鉄結合部位に競合的に結合することにより安定化しIRE結合活性が増強することが考えられる。そこで、マウス神経芽細胞腫株Neuro 2Aを各種金属イオン存在下で

培養したところ、アルミニウムの添加によりIRP2のRNA結合活性、蛋白量ともに増加することが観察された。加えてアルミニウム添加によるIRP2のIRE結合活性の増強を介する、TfRの産生増強、Ftの産生低下が認められ、アルミニウムにより誘導されるIRP2のIRE結合活性により細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇し、フリーラジカル産生を高める可能性が示唆された。また、精製IRP2を用いた*in vitro oxidation assay*で鉄イオンによるIRP2の酸化修飾がアルミニウムの共存により抑制されたことから、IRP2の鉄結合部位にアルミニウムが競合的に結合することにより、IRP2のユビキチン修飾に抑制的に働き、IRP2を安定化することにより、IRP2のIRE結合活性が増強すると考えられた。

IRP1ノックアウトマウスは、少なくとも15カ月齢まで異常が認められず、IRP1ノックアウトマウスより樹立した胎児線維芽細胞は鉄イオンの有無によるTfR、Ftの発現調節には異常が認められなかった。これに対し、IRP2ノックアウトマウスは樹立されて間もないため今後の検討を待たねばならないが、加齢により十二指腸上皮での鉄イオンの蓄積が認められるのに加え、歩行異常を来すことから神経系にも異常が生じている可能性を考えられ、現在解析を進めている。

考 察

鉄イオンは各種神経変性疾患の病巣に蓄積しているのみならず、フェロオキシダーゼであるセルロプラスミン欠損患者において神経細胞死が認められることから(10)、鉄代謝異常自体が神経細胞死の引金となると考えられる。それゆえ、鉄代謝のマスター制御因子であるIRPの神経変性疾患における意義の検索は重要であるといえる。今回我々はアルミニウムがIRP2のIRE結合活性増強因子であることを示した。アルミニウムと神経疾患についてはこれまでに種々の報告がある。いわゆる透析痴呆におけるアルミニウムの関与は疑う余地はない。しかしながら、病巣でのIRP2の蓄積が示されているアルツハイマー病とアルミニウムの関連については、現在是否定的であると考えられている。我々はアルミニウムにはとらわれず、IRP2の安定化を来す因子の更なる検索を進め、神経変性疾患における鉄代謝異常へのIRP2の関与に関して神経細胞

死との関連との観点から解析を進めていく予定である。また、IRP1ノックアウトマウスは少なくとも15カ月齢までは異常が見られないのに対し、IRP2ノックアウトマウスにおいては十二指腸上皮での鉄の蓄積、歩行異常という症状が認められることから、神経変性疾患におけるIRP2の重要性が示唆される。今後、IRP2ノックアウトマウスのフェノタイプの解析を進め、IRP2の神経系における役割を解析してゆきたい。また、IREに対して同等の親和性、特異性を持った2種のIRPそれぞれの欠損マウスで表現型が異なることから、これらマウスを用いて2種のIRPの生体内における役割、各種疾患における役割を検索し得ると考えている。また、我々の樹立したIRP2に対するモノクローナル抗体を用いて、各種神経変性疾患病巣におけるIRP2量の検討などを進めてゆく予定にしている。

文 献

- 1) Klausner R D, Rouault T A and Harford J B: Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19-28, 1993
- 2) Haile D J, Rouault T A, Harford J B et al.: Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 89: 11735-11739, 1992
- 3) Samaniego F, Chin J, Iwai K et al.: Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post- translational regulation. *J. Biol. Chem.* 269: 30904-30910, 1994
- 4) Iwai K, Klausner R D, and Rouault T A: Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J.* 14, 5350-5357, 1995
- 5) Iwai K, Drake S K, Wehr N B et al.: Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95: 4924-4928, 1998
- 6) DeRusso P A, Philpott C C, Iwai K, et al.: Expression of constitutive mutant of iron regulatory protein 1 abolishes iron homeostasis in mammalian

cells. J. Biol. Chem. 270: 15451-15454, 1995

7) Pantopoulos K, and Hentze M W : Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 92: 1267-1271, 1995

8) Pantopoulos K, and Hentze M W : Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein.

EMBO J. 14: 2917-2924, 1995

9) Smith M A, Wehr K, Harris P L R, et al. : Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. Brain Res. 788: 232-236, 1998

10) Yoshida K, Furihata K, Takeda S, et al. : A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. Nat. Genet. 9:267-272, 1995

Abstract

Roles of IRP2, one of the master regulators in iron metabolism, in neurodegenerative disorders

by

Kazuhiro Iwai, Koji Yamanaka, Nagahiro Minato

from

Department of Immunology and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Accumulation of metals such as iron and deposit of oxidized proteins in the lesions of neurodegenerative diseases has been thought to be involved in the pathogenesis of the diseases. It has been reported that one of the master regulators of iron metabolism, IRP2, was accumulated in Alzheimer lesions. We then analyzed the mechanism of accumulation of IRP2 in neuronal cells. Since the amount of IRP2 has been shown to be regulated by the iron dependent degradation of the protein, we added several kinds of metal ions to cultures to examine whether some metal ions could competitively inhibit the effect of iron. The IRE-binding activity of IRP2 is specifically up-regulated by the administration of aluminum in cultures. The aluminum induced IRE-binding of IRP2 enhances the transferrin receptor expression and suppresses ferritin production, leading to the enlargement of cytoplasmic iron pool. These results showed that IRP2 is stabilized iron-independent way. We are looking for the IRP2 stabilizing agents except aluminum to analyze the role of IRP2 in neurodegenerative diseases. We also examined the amount of IRP2 proteins in the lesion of disease patients other than Alzheimer disease.

相模原地区のパーキンソニスムの遺伝子検索 (1)

長谷川一子 古澤英明 坂井文彦 楠淳一 横山照夫

小幡文弥* 船山 学*

はじめに

近年、家族性パーキンソニスムの遺伝子検索が行われてきている。ここで、家族性パーキンソニスムに含まれる疾患は臨床的にも神経病理学的にも、単一ではなく、遺伝様式も常染色体劣性遺伝様式をとる群、ジストニアが前景にたつ群、Lewy小体を欠く一群などが含まれる。家族性パーキンソニスムの原因遺伝子としては、 α -シヌクレインが世界で初めて報告されたが、この遺伝子異常が見いだされた家系はイタリア・ギリシア由来の家系で、臨床像、病理像ともに極めて孤発性パーキンソン病に類似している。また、Kitadaらの報告したParkinは我が国に多く症例が見いだされている若年型パーキンソニスムの原因遺伝子と考えられ、この群は若年発症でジストニアが顕著で、神経病理学的にはLewy小体が認められない。今回我々が検討を開始したパーキンソニスム家系は神奈川県相模原地区在住の優性遺伝様式をとるパーキンソニスムで、臨床像は薬物療法が有効で孤発性パーキンソン病と何等の差異を認めないが、神経病理学的には孤発性パーキンソン病の診断根拠ともなるLewy小体を認めない特殊な群である。このパーキンソニスム家系の原因遺伝子を明らかにすることは、臨床経過を追っている我々の責務と考え、分子遺伝学的アプローチを開始した。

目的

我々が約20年に亘り経過観察中である相模原地区の5世代に亘るパーキンソニスム家系の原因遺伝子が、既知の遺伝子とは異なることを証明することと、自験家系の原因遺伝子の解明と、その機能を明らかとすることを目的とした。

対象

対象は相模原地区の家族性パーキンソニスム発症者および、発症者の未発症同胞とした発症者および未発症同胞から採血する際には本研究の目的等についてインフォームド・コンセントを充分に行った。

方法

1) 既知遺伝子の検討:

(1) α -Synuclein; イタリア・ギリシア家系の原因遺伝子としてPolymeropoulosら¹⁾により α -Synucleinが報告されている。この家系は常染色体優性遺伝様式をとりLewy小体陽性である。最近、抗 α -Synuclein抗体でLewy小体が染色されることが明らかとなり、 α -Synucleinはパーキンソン病の発症との関連でも注目されている。 α -Synucleinの遺伝子変異部位としてはexon 3, 4が報告されているため、自験例についてもこの両者での変異の有無について検討した。exon 3についてはKrugerら²⁾に従い、exon 4はPolymeropoulosらのprimerを用いてPCR増幅した後、MaeIII siteの有無を検証した。なお、Krugerらの用いた制限酵素であるTsp 45 Iが入手できなかったため、Mva I が同様。

北里大学東病院神経内科

*北里大学医療衛生学部

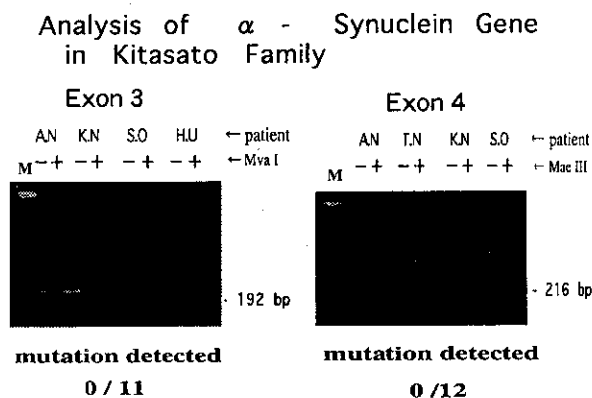


図 1.

の作用を有することを確認後、Mva I を Tsp 45 I の代わりに使用した。

(2) Parkin; Parkinについては前述した様な特徴を示し、常染色体劣性遺伝様式をとる群である。遺伝形式、臨床像は自験例とは異なるが、Lewy小体を欠く群であるため、自験例についても遺伝子欠失の有無を検討した。具体的にはKitadaら³⁾の報告に示されているPCR primerを用い、hot spotsと考えられるParkinのexon 3, 4, 5, 6, 7を増幅し、exon deletionの有無を検討した。

(3) Tau; Tau は神経原線維変化との関連が古くから注目されているが、最近、FTD-P 17 (fronto-temporal dementia with Parkinsonism linked Chr. 17) の原因遺伝子としても注目されてきている。FTD-P 17と自験例とは臨床像および病理像が異なるため、Tau 遺伝子の変異が自験家系の原因遺伝子である可能性は少ないと想定されるが、否定するために検討を加えた。TauについてはSpillantiniら⁴⁾ Huttonら⁵⁾, Poorkajら⁶⁾の使用したprimerを用い、exon 10とその後ろのintronを増幅しdirect sequencingを行った。

exon 12についてはPoorkajらのprimerを用い、direct sequencingを行った。

(4) ubiquitin (UCH-L1遺伝子); Leroyら⁷⁾によりパーキンソニズム家系の中にdeubiquitin enzymeであるUCH-L1のIle 93 → Met変異が報告されている。この変異に

Analysis of Parkin gene in Kitasato Family

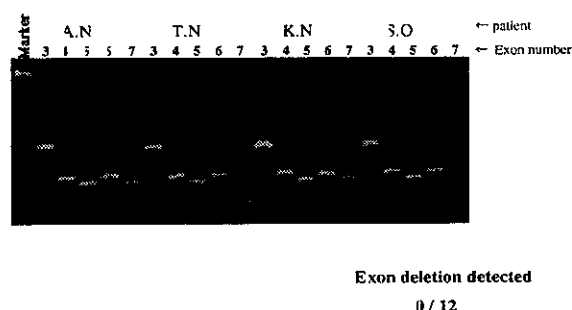


図 2.

ついて、彼らのPrimerを用いてPCR 増幅後、direct sequencingを行った。

2) microsatellite markerによる検討: 諸家の方法に従って、linkage mapping set (Applied Biosystems)および、autosequencer (ABI Prism 377)を使用してLinkage解析を行った。

結果

1) 既知遺伝子の検討:

(1) 図 1 に示すように α -Synuclein 遺伝子での変異を示した患者は、exon 3 および exon 4 をそれぞれ 11 および 12 人について調べたが、exon 3 および exon 4 の双方ともになかった。

(2) Parkin では調べた 12 人の患者では図 2 示すように exon 3 ~ 7 のうち、いずれかの exon について deletion が存在した症例はなかった。

(3) Tau については、exon 10 に続く intron 中に報告されている変異は検出されなかった。また、exon 12 の 279 Val → Met の変異もなかった。

(4) UCH-L1 遺伝子では Leroy らの primer を用いて exon 4 を増幅し、PCR 産物の direct sequencing を行った。その結果、調べた自家系患者 9 人の中で、彼らの報告した変異を示したものはなかった。しかし、検査した患者 9 人すべてに intron 4 内に C 362 → G の塩基置換を認めた。この為、この塩基置換が疾患と関連する可能性が考えられ、血縁者、健常者における塩基置換の有

無を検討した。すると、3人の健常兄弟および2人の非血縁健常者にも検出され、この塩基置換はパーキンソニズム発症とは無関係なpolymorphismであると考えられた。2) microsatellite markerによる検討は現在数名の患者について施行中である。この結果についてはさらに症例を積み重ねた後、連鎖解析を行い、原因遺伝子の染色体座についての決定を行っていく予定としている。

考案

自験パーキンソニズム家系は臨床的および神経病理学的に極めて特異な常染色体優性家系である。今回の検討により自験家系が α -Synuclein遺伝子のpoint mutation, Parkin遺伝子の欠失, Tau遺伝子変異, UCH-L1遺伝子変異と関連している可能性は否定的となった。現在, microsatellite markerによって連鎖解析を行っているが, 病理学的にLewy小体を示さない点, および青斑核には異常を見いだしていない点に着目した, 分子生物学的検討も加えていく必要がある。

結論

相模原地区のパーキンソニズム家系患者の原因遺伝子は α -Synuclein, Parkin, Tau, UCH-L1遺伝子変異のいずれとも異なる可能性が高い。

参考文献

- 1) Polymeropoulos MH, Oavedan C, Leroy E et al : Mutation in the α -Synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 276:2045-2047. 1997
- 2) Kruger R, Kuhe W, Muller T et al : Ala30Pro mutation in the gene encoding α -Synuclein in Parkinson's disease. Nature genetics 18:106-108. 1998
- 3) Kitada T, Asakawa S, Hattori N et al : Mutations in the parkin gene cause

- autosomal recessive juvenile parkinsonism. : Nature 392:605-608. 1998
- 4) Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M et al : Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. Proc Natl Acad Sci USA 95:7737-7741. 1998
 - 5) Hutton M, Lendon CL, Rizzu P et al : Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature 393:702-705. 1998
 - 6) Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E et al : Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. Ann Neurol 43:815-825. 1998
 - 6) Leroy E, Boyer R, Auburger G et al : The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature 395:451-452. 1998

Abstract

Molecular genetical analysis in a large kindred with autosomal dominant Parkinsonism (1)

by

Kazuko. Hasegawa, Eimei Furusawa, Fumihiko Sakai, Junichi
Kusunoki, Teruo Yokayama, Fumiya Obata*, Manabu Fukuyama*

from

Department of Neurology, Kitasato University East Hospital,
and

*Department of Immunology, Kitasato University school of Allied
health sciences

Introduction: We had reported a large kindred with autosomal dominant Parkinsonism in Sagamihara, several years ago. The clinical features of them were similar with those of sporadic paralysis agitans, such as age of onset, initial symptoms of illness, duration of illness, efficacies of several dopaminergic drugs, and showed wearing-off and/or on-off phenomena with elongation of disease. However, this family was different from paralysis agitans in neuropathological findings lack of Lewy bodies all over the central nervous system. Therefore, our familial Parkinsonism was a peculiar one in the world. So, we attempted to molecular genetic analysis in this family.

Materials and Methods: We analyzed 14 patients with Parkinsonism and 10 related normal persons in this family. Our strategies were including 2 methods. Purpose of the first was ruled out reported genes such as α -synuclein, Parkin, Tau, UCH-L1. Another one was linkage analysis using microsatellite markers. For ruled out the reported genes were according to reported methods.

Results: We expected that reported genes were not related our autosomal dominant Parkinsonism because of differences of clinical and pathologic features. So, α -synuclein, Parkin, Tau and UCH-L1 were not related to our family.

Conclusion: We thought that we could prove our autosomal dominant Parkinsonism were not caused by reported genes. We must do linkage analysis using microstatellite markers.

沖縄地方に多発する感覚障害を伴う遺伝性神経原性筋萎縮症 (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with Proximal dominant involvement: HMSN-P)の臨床・病理学的検討とその遺伝子連鎖解析

中川正法 高嶋 博 末原雅人** 平田圭子** 綾織誠人
松崎敏男 斉藤峰輝 出雲周二* 納 光弘

はじめに

沖縄地方に多発する感覚障害、神経ミオトニアを伴う近位筋優位の神経原性筋萎縮症 (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with proximal dominant involvement (以下 HMSN-P)¹)は、臨床的に筋萎縮性側索硬化症や球脊髄性筋萎縮症との鑑別を必要とする疾患であり、本症の解明は、これらの神経原性筋萎縮症の病態解明にも重要な知見を与えるものと考え¹⁾。昨年度までの本班会議にて、われわれは、HMSN-P の疾患遺伝子座が、3q13.1 領域にマッピングされることを報告した²⁾。今年度は、その疾患遺伝子座の絞り込みと剖検組織の検討を行ったので報告する³⁾。

対象および方法

本症の臨床像を、神経所見、電気生理学的所見、病理学的所見 (2 例の剖検例を含む) にもとづいて検討した。剖検例の病理組織は、HE 染色、K B 染色、抗ユビキチン抗体による免疫染色にて検討した。疾患遺伝子座の絞り込みのために HMSN-P の罹患者 42 名を含む 17 家系 59 名と本症家系と血縁のない正常沖縄県人 50 名より、同意を得た上で採血を行い、DNA を抽出した。GDB より検索した 3p14-3q13.1 領域の 25 種類の (CA) リピートマイクロサテライト多型マーカーについて、蛍光プライマーを用いた PCR 後、自動シーケンサー (ABI PRISM377) にて電気泳動を行い、各 DNA マーカーのサイズを決定した。決定された DNA マーカーサイズをもとに、本症に連

鎖するアレルタイプを決め、家系内、家系間での組み換えについて検討した。2 点連鎖解析は、Linkage package Ver5.1 の MLINK を用いて行った。連鎖不平衡の検討は、DISLAM ver2.1 と DISMULT ver2.1 を用いて行った。また、本症では世代間で、発症年齢の若年化がみられる家系があることより、CAG リピート病の可能性を考え、DIRECT 法を用いて、CAG リピート異常の有無について検討した。

結 果

本症の臨床的特徴は、①常染色体優性遺伝形式、②成人発症、緩徐進行性の四肢近位筋優位の筋力低下、③四肢、体幹の筋痙攣、fasciculations、④深部腱反射の低下・消失、⑤異常知覚、深部感覚障害を伴う感覚障害、⑥電気生理学的検査にて、軸索優位の運動・感覚神経障害、Neuromyotonia の検出、⑦血清 creatine kinase 値の軽度～中等度の上昇、⑧高脂血症、耐糖能異常の合併、⑨末梢神経有髄神経の著明な脱落であった。剖検例の検討では、1) 脊髄前角神経細胞の著しい脱落とグリオーシスを認め、頸髄・腰髄では外側で脱落が著明。Onuf 核神経細胞は残存、2) 後根神経節細胞は頸髄>腰髄>胸髄の順で脱落が強い、3) 脊髄全長にわたる後索の著明な萎縮、神経線維の脱落、4) 末梢神経有髄線維の著明な脱落、5) 脳神経系では、XII, X, XI で変性を認めたが、動眼神経核は保たれているなどであった。抗ユビキチン抗体染色では、核内封入体は認められなかった。

鹿児島大学第医学部三内科

*鹿児島大学医学部付属難治性ウイルス疾患研究センター

**国立療養所沖縄病院神経内科

遺伝子連鎖解析では、DNAマーカーD3S3652, D3S1591, D3S1281にて、それぞれ最大lod score 4.63, 3.13, 3.09 ($\theta=0.0, 0.043, 0.031$)を得た。D3S3652とD3S3638の間の9 DNAマーカーのハプロタイプを検討し、10家系について疾患連鎖アレルを決定した。家系内における遺伝的乗り換えから、D3S1591とD3S1281の間に疾患遺伝子座がある可能性が示された(図)。DISLAMによるlikelihood ratio test (LRT)では、D3S3652、D3S1591、D3S1291、D3S3654、D3S3638に有意な連鎖不平衡がみられた。この領域の9種類のDNAマーカーを用いたDISMULTによる分析では、lod score 4.93 ($p<0.00000095$)であり、この領域に強い連鎖不平衡が示された。

4家系17例では、疾患と連鎖する3q13.1領域のD3S3652からD3S3638の9個のDNAハプロタイプが完全に一致していた。仮に、このDNAハプロタイプを示すアレルを祖先アレル(ancestral allele)と仮定し、他の家系例についてアレルタイプを比較したところ、D3S1291, A281WA5, D3S1563, D3S3654の4個のDNAマーカーアレルは、他の14例でも完全に一致していた(表)。また、D3S3654の160bpアレルは、検討した42例全例が持っていた。DIRECT法を用いた検討では、CAGリピート異常は現在までのところ認められなかった。

考 察

HMSN-Pは、常染色体優性遺伝、成人発症の近位筋優位の筋萎縮と脱力、感覚障害を示す疾患であり、病理学的には後根神経節細胞の障害を中心とした後索・末梢神経障害と脊髓前角の脱落を主病変とする疾患であると考えられた。鑑別すべき疾患として脊髄性筋萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、遺伝性運動感覚ニューロパチー2型等があるが、HMSN-P遺伝子座は3q13.1領域の3cMに存在し、本症が、臨床的、病理学的、遺伝学的に新しい疾患単位であることを明らかにした。発症年齢に促進現象がみられる家系があることから、DIRECT法を用いて、CAG

リピートの異常延長の有無について検討したが、現在までのところ明らかな異常は見られていない。Huntington病やKennedy症候群などのCAGリピート病では、神経細胞に核内封入体が認められることから、本症でも核内封入体を形成している可能性を考え、大脳、脊髓切片を抗ユビキチン抗体による免疫染色にて検討したが、明らかな異常は見られなかった。今後、抗ポリグルタミン抗体を用いた検討を予定している。

DISMULTによる解析では、この3cM領域の9個のDNAマーカーは、連鎖不平衡を示しており、本症の遺伝子がこの領域に局在することを強く支持する結果であった。HMSN-Pは、現在までのところ沖縄でのみ見られており、本症における創始者の存在が考えられた。現在、HMSN-P遺伝子のクローニングを目指して、この領域にマッピングされるESTのスクリーニング、PAC contigの作成、CAGリピートの検索、neuromyotoniaと関連するチャネル遺伝子類似配列の検索を行っている。

謝 辞

DIRECT法キットを提供して下さいました当班班長新潟大学脳研究所神経内科辻 省次教授に謹んで感謝いたします。

文 献

- 1) Takashima H, Nakagawa M, Nakahara K, et al.: A New Type of Hereditary Motor and Sensory Neuropathy linked to chromosome 3. *Annals of Neurology* 41: 771-780, 1997
- 2) 中川正法, 高嶋 博, 末原雅人他. 沖縄型神経原性筋萎縮症—Fine linkage mapping—. 特定疾患に関する分子病態研究班 平成9年度研究報告書, pp80-83, 1998
- 3) Nakagawa M, Takashima H, Masahito Suehara M, et al: Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P): clinical, pathological and genetic features. *The Annals of the New York Academy of Sciences* (in press)