

周囲に集合し、PML bodyに類似したリング状の超微形態像を呈することが示された。核内に複数のNIIが形成される場合でも、PMLの変化が一個のNIIに限定される意義は今後の検討課題である。

他方、coiled bodyはsnRNPの調整に関与することが推測されている核内構造である。PMLと異なり、NII形成に伴う存在様式ならびに形態に変化が認められなかったことから、coiled bodyの機能異常が引き起こされているか否かは今後の検討課題である。今回の観察から、NIIには普遍的にcoiled bodyが密着している可能性が高く、NIIの形成部位として関与している可能性も考慮される。今回観察されたNIIとnuclear bodyの密接な関連は、NII形成に伴う神経細胞核の機能不全を示唆する可能性があり、細胞変性機序を解明する上で重要な所見と考えられた。

E. 結論

DRPLA、MJDのNIIにはPML nuclear bodyとcoiled bodyの少なくとも2種類のnuclear bodyが関与していることが示された。PML nuclear bodyは正常の核内分布を大きく変化させることから、その機能異常が示唆される。一方、coiled bodyはNIIへの隣接から、核内でのNII形成部位に関与している可能性が考慮された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, M., Wood, J.D., Shimohata, T. et al. (2001) Widespread occurrence of intranuclear atrophin-1 accumulation in the central nervous system neurons of patients with dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Ann Neurol*, 49, 14-23.

Yamada, M., Tsuji, S., Takahashi, H. (2000) Pathology of CAG repeat diseases. *Neuropathol*, 20, 319-325.

Yamada, M., Piao, Y.S., Toyoshima, Y. et al. (2000) Ubiquitinated filamentous inclusions in cerebellar dentate nucleus neurons in dentatorubral-pallidoluysian atrophy contain expanded polyglutamine stretches. *Acta Neuropathol*, 99, 615-618.

Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M. et al. (2000) Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat Genet* 26, 29-36.

2. 学会発表

山田光則、林 森太郎、豊島靖子、辻 省次、高橋 均

CAGリピート病の病理：ポリグルタミンを指標とした検討

第41回日本神経病理学会、米子、2000

山田光則、下畑享良、佐藤俊哉、辻 省次、高橋 均

CAGリピート病における神経細胞核内封入体へのPML nuclear bodyの関与

第41回日本神経病理学会、米子、2000

山田光則、佐藤俊哉、小宅睦郎、辻 省次、高橋 均

DRPLAトランスジェニックマウスの病理組織学的解析

第41回日本神経病理学会、米子、2000

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)における atrophin-1 遺伝子 CAG リピート
の体細胞モザイク；レーザーマイクロアブレーション法による単一細胞レベルでの検討

分担研究者 祖父江元 名古屋大学大学院神経内科

共同研究者 渡邊英孝¹⁾、田中章景¹⁾、吉原剛¹⁾、安藤嘉朗¹⁾、陸重雄²⁾、
道勇学¹⁾、祖父江元¹⁾

1)名古屋大学大学院神経内科

2)社会保険中京病院神経内科

研究要旨

レーザーマイクロアブレーション法を用いて細胞系統種別に CAG リピート数を決定、解析することにより、DRPLA における体細胞間のリピート不安定化現象を直接検討した。ニューロン系細胞である小脳顆粒細胞や小脳プルキンエ細胞、大脳皮質神経細胞に比べて、グリア細胞では CAG リピートがより不安定性を示し、特に小脳顆粒細胞は他の中枢神経細胞に比べ、CAG リピートがより安定なことを明らかにした。

A. 研究目的

DRPLA をはじめとする CAG リピート病に共通する現象として、体細胞レベルにおける CAG リピートの不安定性 (somatic instability)、即ち体細胞モザイク現象が知られている。この不安定性について調べることは、リピートの伸長機序を考える上で有用な情報を与えると思われる。これまでリピート不安定性についての研究は、種々の体細胞の集合体である各組織ごとの CAG リピート数を調べることにより、間接的に検討がなされてきた。今回、レーザーマイクロアブレーション法を用いることにより単一細胞レベルでリピート数を決定、解析することによ

り体細胞間のリピート不安定化現象を直接検討することを目的とした。

B. 研究方法

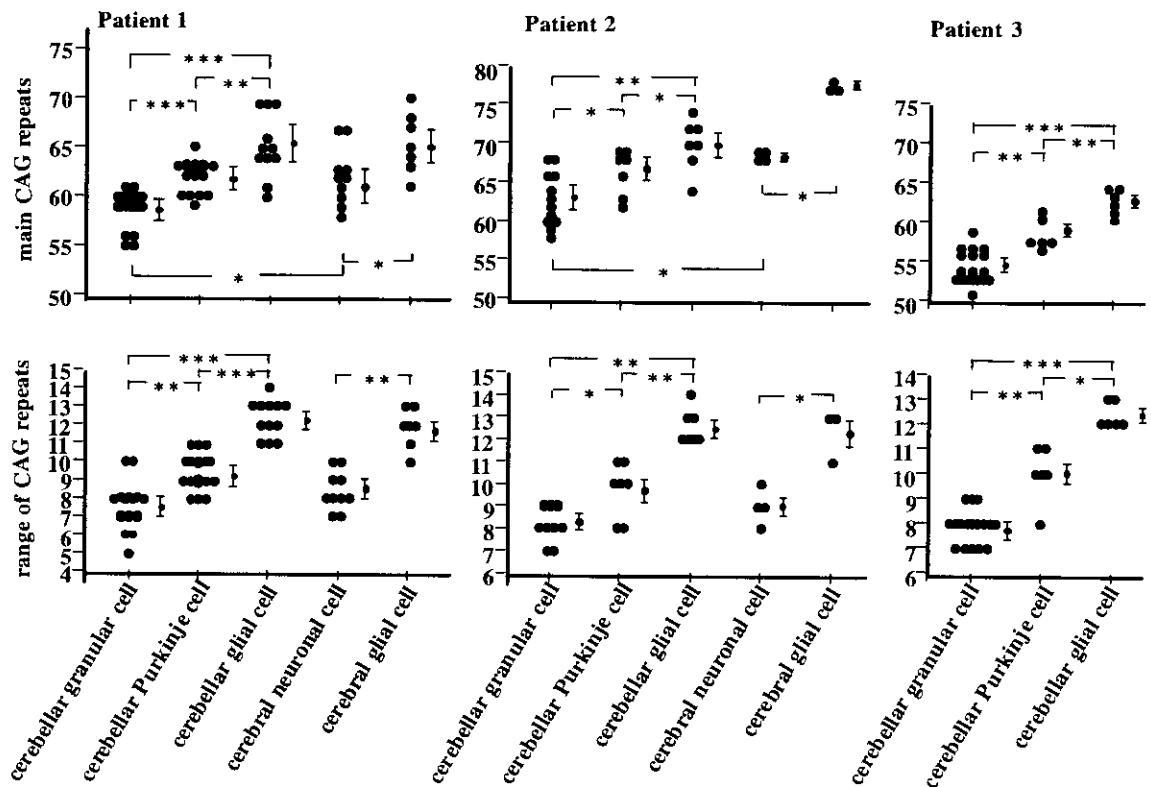
遺伝子解析にて確定した DRPLA 3 例の大脳、小脳各凍結組織を対象とした (症例 1; 16/61 リピート, 発症/検査時年齢 22/45 歳. 症例 2; 17/66 リピート, 40/60 歳. 症例 3; 18/57 リピート, 55/69 歳.). なお対象の使用、解析にあたっては予め同意を得ている。厚さ 10 μm で各凍結切片を作成。レーザーマイクロアブレーション法により、個々の細胞を cell lineage 毎に切り出し分

離した。即ち小脳顆粒細胞、小脳 Purkinje 細胞、小脳グリア細胞、大脳皮質神経細胞、大脳グリア細胞を各々50個ずつ分離採取した。各々から DNA を抽出したのち、nested PCR 法にて増幅した産物をポリアクリルアミドゲルにて泳動し、CAG リピートのピーク値 (リピート数) およびリピートの分布幅 (メインピークの高さの10分の1以上をとるリピートの範囲) を決定、それぞれを比較検討した。1症例につき各々3~20回の検討を行ない、有意差検定の解析には Mann-Whitney U-test を用いた。

C. 研究結果

解析結果をプロットしたものを下図に示す。

CAG リピート数のピーク値は大脳皮質神経細胞で 67.2 ± 2.9 repeat, 小脳顆粒細胞 61.4 ± 3.7 repeat, 小脳プルキンエ細胞 66.2 ± 2.4 repeat, 大脳グリア細胞 72.0 ± 3.9 repeat および小脳グリア細胞 69.5 ± 3.3 repeat であった。またリピートの分布幅は各々 8.6 ± 0.9 , 7.8 ± 1.0 , 9.6 ± 1.1 , 11.9 ± 1.1 , 12.4 ± 0.8 であり、個々の cell lineage におけるリピート数、リピート分布幅が異なっていた。すなわちニューロン系細胞はグリア系細胞に比べてリピート数、リピート分布幅とも有意に小さかった ($p < 0.01$)。またニューロン系細胞の中でも顆粒細胞は他の神経細胞に比べてリピート数、モザイクの程度とも小さい傾向が認められた ($p < 0.05$)。これらの傾向は検討した3例に共通した結果であった。



D. 考察

CAGリピート病のリピート不安定現象についてのこれまでの研究では、小脳皮質が小脳白質や他の中枢神経組織に比べて異常アレルのリピート数が短く、ばらつきも小さいことが示されてきた。しかしながらこれらの研究はすべて、個々の細胞の集合体である組織ごとに解析がなされたものであった。本研究では、従来の方法では不可能であった細胞系統ごとの解析を、レーザーマイクロディセクション法を用いて行い、その結果これまでの仮説を直接証明することができた。即ちニューロン系細胞である小脳顆粒細胞や小脳ブルキンエ細胞、大脳皮質神経細胞に比べて、グリア細胞ではリピートがより不安定性を示し、さらに小脳顆粒細胞においては他の中枢神経細胞よりも実際にリピートが安定であることを直接示した。グリア細胞がニューロン系細胞よりもリピートが伸び、不安定であることは生後の細胞分裂頻度を反映しているものと考えられる。今回明らかになったもう一つの重要な点は、神経細胞の中でもその系統によってリピートの安定性が異なることが示された点である。小脳顆粒細胞が最も安定性を示す理由については本研究からは不明であるが、リピートを安定化させるような細胞特異的な蛋白の存在が推定される。

E. 結論

レーザーマイクロディセクション法を用いることにより、DRPLAにおいて、細胞系統種別における体細胞モザイク現象を直

接的に証明し、特に小脳顆粒細胞は他のニューロンに比べリピートはより安定性を示すことを明らかにした。今後は、さらに病変部位においてもリピート不安定現象をみていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2000) Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell lineage in dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)-based analysis. *Hum Genet.* 107: 452-457

2. 学会発表

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)における atrophin-1 遺伝子の体細胞モザイク;レーザーマイクロディセクション法による単一細胞レベルでの検討 第41回日本神経学会総会. 2000.5.松本

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳変性症（EOAHA）の分子遺伝学的解析

分担研究者 小野寺 理 新潟大学脳研究所神経内科
共同研究者 辻 省次1)、伊達英俊1)、横関明男1)、田中 一2)
小池亮子3)、湯浅龍彦4)、植川和利5)、福原信義6)
弘井 正7)、岩淵 潔8)、関島良樹9)、池田修一9)

- 1) 新潟大学 脳研究所 神経内科 2) 信楽園病院 神経内科 3) 水原郷病院 神経内科
4) 国立精神・神経センター国府台病院 神経内科 5) 国立療養所熊本南病院
6) 国立療養所犀潟病院神経内科 7) 細木病院
8) 神奈川総合リハビリテーションセンター 9) 信州大学医学部第三内科

研究要旨

我々は低アルブミン血症を伴う早発型脊髄失調変性(以下EOAHA)を、低アルブミン血症とフリードライヒ失調症(以下FRDA)類似の神経症状を示す、常染色体劣性遺伝形式をとる単一の疾患と考え報告してきた。本年FranceのKoenigらのグループが劣性遺伝形式をとる失調症 ataxia-oculomotor apraxia (AOA) の9p13への有意な連鎖を報告した。解析された家系中にEOAHAと考えられる本邦の家系が含まれていた。我々はAOAとEOAHAの病像を明らかとし、EOAHAの疾患遺伝子を明らかとする目的で、9p13への連鎖につき我々の集積した家系において解析を加えた。その結果9p13領域への連鎖を強く指示する結果を得た。さらに6家系に founder haplotypeを認めた。9p13領域のゲノム情報に基づいて、病因遺伝子同定に向けてのアプローチを行った。

A.研究目的

我々は低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳変性症（以下EOAHA）を、低アルブミン血症とフリードライヒ失調症（以下FRDA）類似の神経症状を示す、常染色体劣性遺伝形式をとる単一の疾患と考え報告してきた。その臨床像は失調、眼振、筋萎縮・筋力低下、末梢神経障害、深部腱反射低下・消失、足変形を呈し、症候学的にはFRDAに類似する。EOAHAに特徴的な点として、著明なアルブミン血症（平均2.4 g/dl）を呈する事、画像所見上著明な小脳萎縮を認める点が挙げられる。その遺伝子座については今まで明らかにされてはいなかった。米国人類遺伝子学会誌においてFranceのKoenigらの

グループが劣性遺伝形式をとる失調症 ataxia-oculomotor apraxia (AOA) の9p13への有意な連鎖を報告した。解析された家系の主たるものはポルトガルの家系であったが、その中にEOAHAと考えられる本邦の家系が含まれていた。我々はAOAとEOAHAの病像を明らかとし、EOAHAの疾患遺伝子を明らかとする目的で、AOAで報告のあった9p13への連鎖につき我々の集積した家系において解析を加えた。

B.研究方法

EOAHA 10家系、計40名（患者20名）の末梢血白血球より抽出したゲノムDNAを用い連鎖解析を行った。Koenigらにより今回報告された7種類

のマイクロサテライトマーカを用い解析した。連鎖解析は既報告に準じて行った。

(倫理面での配慮)

協力していただいた被験者にはインフォームドコンセントを行った。また、プライバシーを守るため、十分な情報保全を行った。

C.研究結果

10家系中7家系に9p13領域への連鎖を強く支持する結果をえた。2点連鎖解析により、 $\theta = 0$ で7.7。また7家系中6家系にfounder haplotypeを認めた。

D.考察

EOAHAは同領域に疾患関連遺伝子が存在することが強く示唆された。一方AOAはもう1ヶ所(9q34)への連鎖が報告されており、従来AOAとして報告されているものには少なくとも遺伝学的に2種類のもの存在し、その一方がEOAHAとallelic variantである可能性が考えられた。

E.結論

AOAとEOAHAは表現型に違いはあるものの、原因遺伝子は同じとみられる結果を得た。今後、9p13領域の遺伝情報を用い、原因遺伝子の絞り込みを展開する。

F.研究発表

該当なし

G知的所有権の取得状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

第 16 番染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝型皮質性小脳萎縮症遺伝子座内の
異常伸長 CAG リピートの検索

分担研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学
共同研究者 富満弘之、李 明順、高島 実、石川欽也
東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学

研究要旨

我々が昨年報告した第 16 番染色体長腕に連鎖する優性遺伝型皮質性小脳萎縮症の原因遺伝子を同定する目的で、候補領域内の CAG リピートについて検索した。対象は当遺伝子座に連鎖する 6 家系 56 名（発症者 28 名）と正常コントロール 33 名。方法は候補領域内の BAC クローンを(CAG)₁₅オリゴヌクレオチドプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションで CAG リピートを検出し、塩基配列を同定する。それを対象者ゲノム DNA を用いて PCR、電気泳動により CAG リピート数を算定して検討した。結果、小脳に発現している比較的長い CAG リピートが 3 つ検出された。しかしいずれのリピートも発症者において異常伸長を認めなかった。このことより今回検索した CAG リピートは本疾患の原因遺伝子の可能性は低いと思われた。今後はリピートの異常伸長ばかりでなく点変異も考慮して、候補領域内を詳細に検索していく必要があると思われた。

A. 研究目的

近年、常染色体優性遺伝型脊髄小脳変性症の原因遺伝子が次々に同定されている。その多く(SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, SCA12, SCA17 および DRPLA)は、異常伸長した CAG リピートが原因と考えられている。

昨年、我々は既知の遺伝子変異を認めない本邦 6 家系が第 16 番染色体長腕に連鎖し、マーカー D16S3089 と D16S515 の間の約 10.9cM 領域に原因遺伝子が存在する可能性が高いことを報告した。また当遺伝子座は SCA4 と同一であったが、本家系内発症者は純粋小脳失調症状のみを呈し、末梢神経障害、錐体路徴候を特徴とする SCA4 とは臨

床的に大きく異なることも報告した。

そこで本疾患の原因遺伝子を同定するため、候補領域内の CAG リピートについて検討した。

B. 研究方法

対象は既に報告している 6 家系、発症者 28 名を含む合計 56 名と、正常コントロール 33 名である。すべての対象者に対して、遺伝子診断および遺伝子解析についてあらかじめ詳しく説明し、同意を得た上で解析を行った。

方法は、まず候補領域内の種々のマーカーでスクリーニングされた BAC クローンと、コントロールとして SCA6 の原因遺伝子で CAG リピートをもつ $\alpha 1A$

カルシウムチャンネル遺伝子を含む BAC クローンを準備した。それぞれの BAC クローンを精製して、制限酵素にて消化反応後、アガロースゲル電気泳動を行った。メンブレンに転写後、non-RI システムのジゴキシゲニンで標識された (CAG)₁₅ オリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。陽性部位をクローニングして、また公開されているデータベースを用いてリピート部位の内部塩基配列を決定後、PCR プライマー(一方を FITC でラベル)を設定した。対象者のゲノム DNA を用いて PCR 反応後、ALF オートシーケンサーにて電気泳動を行い、その結果から CAG リピート数を算定して検討した。

C. 研究結果

サザンハイブリダイゼーションの結果、 α 1A カルシウムチャンネル遺伝子が存在する BAC を含む 6 つの BAC クローンで陽性部位を認めた。その CAG リピートの塩基配列は以下の通りであった。

- (1) (CAG)₁₃
- (2) (CAG)₃(CAA)(CAG)₅(CAA)(CAG)₂
(CAA)(CAG)₅(CAA)(CAG)₁₀
- (3) (CAG)₁₃(CAA)(CAG)(TAA)(CAG)₃
- (4) (CAG)₅(CAA)(CAG)₃(CAA)(CAG)₃
(CAA)₃(CAG)
- (5) (GCT)₈
- (6) (GCT)₈

(1)はコントロールであり、 α 1A カルシウムチャンネル遺伝子の CAG リピートでリピート数は 13 回であった。比較的長い(2), (3), (4)の CAG リピートは、小脳由来の cDNA にて PCR 陽性であった。また(5), (6)は既に公表されている

GCT マーカーであった。今回は(2), (3), (4)の CAG リピートについて、対象者ゲノム DNA を用いて PCR 反応を行い、リピート数について検討した。

(2)の CAA を含む合計 29 回の CAG リピートについては、健常染色体は 27 回から 30 回の範囲で多型が認められたが、発症者で共通しているアレルは 29 回のリピートであった。

(3)の CAA と TAA を含む合計 19 回の CAG リピートについては、健常染色体は 19 回から 22 回の範囲で多型が認められたが、発症者で共通しているアレルは 19 回のリピートであった。

(4)の CAA を含む合計 17 回の CAG リピートについては、健常染色体は 16 回、17 回の多型が認められたが。発症者で共通しているアレルは 17 回のリピートであった。またクローニングの結果、このフラグメントには他に CAA と CAG からなる合計 10 回のリピートが存在した。このリピートについて 1 家系で検討した結果、全染色体でリピート数は 10 回であった。

以上の結果から、今回検索できた CAG リピートは発症者において異常伸長は認められなかった。また(5), (6)の GCT マーカーについても明らかな伸長は認められなかった。

D. 考察

ジゴキシゲニンで標識された(CAG)₁₅ オリゴヌクレオチドプローブを用いて、BAC クローンのサザンハイブリダイゼーションによる CAG リピート検出系は、繰り返し回数が 8 回以上の CAG (GCT) リピートは検出していると考えられた。また最も短い CAG リピート病と考えら

れている SCA6 の CAG リピートを検出していることから、本検出系は CAG リピート病を検索する方法として有用と考えられた。

今回検出した CAG リピートは、小脳で発現している遺伝子であり、本疾患の原因遺伝子候補と考えられた。しかしながら検討の結果、発症者において異常伸長を認めなかったため、本疾患の原因遺伝子でないことが判明した。

近年、SCA10 にみられる ATTCT の 5 塩基リピートのように CAG 以外のリピートの異常伸長が、原因と考えられる優性遺伝型脊髄小脳萎縮症も同定されている。このことから本疾患の原因遺伝子を同定するためには、今回検出できなかった短い CAG リピートだけでなく、その他の塩基配列によるリピートの異常伸長、さらに点変異も考慮して、候補領域内 BAC クロームをより詳細に検索していく必要があると思われた。

E. 結論

今回検索できた候補領域内 CAG リピートは、発症者において異常伸長を認めなかったため、本疾患の原因遺伝子としては可能性が低いと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

U. Nagaoka, M. Takashima, K. Ishikawa, K. Yoshizawa, T. Yoshizawa, M. Ishikawa, T. Yamawaki, S. Shoji, H. Mizusawa. A gene on SCA4 locus causes dominantly inherited pure cerebellar ataxia. *Neurology* 54: 1971-1975, 2000

S. Toru, T. Murakoshi, K. Ishikawa, H. Saegusa, H. Fujigasaki, T. Uchihara, M. Osanai, H. Mizusawa, T. Tanabe. Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *J. Biol. Chem.* 275: 10893-10898, 2000

H. Fujigasaki, T. Uchihara, S. Koyano, K. Iwabuchi, S. Yagishita, T. Makifuchi, A. Nakamura, K. Ishida, S. Toru, S. Hirai, K. Ishikawa, T. Tanabe, H. Mizusawa. Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Experimental Neurology* 165: 248-256, 2000

M. Takashima, K. Ishikawa, U. Nagaoka, S. Shoji, H. Mizusawa. A linkage disequilibrium at the candidate gene locus for the 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia type III in Japan. *Journal of Human Genetics* (in press)

2. 学会発表

高島 実, 長岡詩子, 石川欽也, 庄司進一, 水澤英洋. 本邦の non-SCA6 ADCCA の連鎖解析. 第 41 回日本神経学会総会. 松本. 2000

長岡詩子, 高島 実, 石川欽也, 庄司進一, 水澤英洋. 第 16 番染色体に連鎖する常染色体優性遺伝性の皮質性小脳萎縮症の臨床的特徴. 第 41 回日本神経学会総会. 松本. 2000

G. 知的所有権の取得状況

なし

Spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) の遺伝子座と臨床所見

分担研究者：佐々木秀直 北海道大学大学院脳科学専攻神経病態学講座神経内科学分野

共同研究者：山下 功¹⁾、矢部一郎¹⁾、田中 一²⁾、辻 省次³⁾、高田明生⁴⁾、白石一也⁵⁾、田代邦雄¹⁾

所 属：1) 北海道大学大学院脳科学専攻神経病態学講座神経内科学分野、2) 信楽園病院神経内科、3) 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科、4) 札幌市立病院病理科、5) 白石脳神経外科

研究要旨：遺伝学的に既知の疾患を除外診断した優性遺伝性脊髄小脳変性症(SCA)1家系について、常染色体の全領域を網羅できるマーカーを用いて連鎖解析を行った。対象は3世代にわたる19人である。その結果、この遺伝子座は19q13.4に位置し、D19S206-D19S605に境された10.2cMに存在していた ($Z_{max}=4.08$)。この新しいSCA遺伝子座はSCA14として登録された。患者の発症年齢は12歳から42歳にわたり、症状も発症年齢により異なっていた。すなわち、20歳以下では発作的におきる頭頸部のミオクローヌスで初発し、ついで、軽度の小脳性運動失調が加わる経過であった。一方、40歳以降では、緩慢進行性の小脳性運動失調のみに終始していた。画像診断では小脳萎縮、特に上虫部の萎縮が認められたが、小脳半球の萎縮は軽度であった。脳幹萎縮は認められず、大脳半球、基底核に異常を認めなかった。

A. 研究目的

我が国の優性遺伝性運動失調症(SCA)においては、発症機序に関する遺伝学的手がかりの得られていないものが残されている。そこで、我々は遺伝学的に既知のSCAと異なるものについて、遺伝子座を決定し、臨床所見について検討した。

B. 研究方法

対象家系は現在までに3世代にわたって発症者が確認されている、北海道内在住の1家系である(図1)。十分な説明の後、同意が得られた19人を対象に連鎖解析を行った。

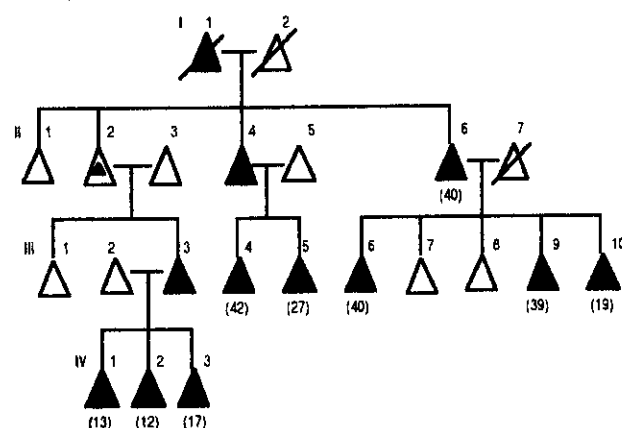


図1.対象の家系図。括弧内に発症年齢を示した。

始めに、遺伝子異常や遺伝子座が知られている既知のSCA (SCA1, SCA2, MJD, DRPLA, SCA4, SCA5, SCA6, SCA7, SCA8, SCA10, SCA11, SCA12)について、各々、遺伝子分析もしくは候補領域の連鎖解析により除外診断した。ついで、常染色体の全領域を網羅できるマーカーについて検討した後、候補領域からマーカーを選んでさらに詳しく検討した。最終的には369個のマイクロサテライトについて解析を行った。スクリーニングの2点連鎖LOD値はLIPEDにより算出した。候補領域の多点連鎖解析はFASTLINK program packageを用いた。LOD値はどれも年齢依存性浸透率で補正して算出した。

(倫理面での配慮)

本研究においては、研究の目的と意義について研究協力者に説明し、あらかじめ了解を得た上で行った。研究の遂行に当たっては倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

遺伝子座：疾患遺伝子座に関する最初の手がかりはD19S418で得られた。年齢依存性浸透率で補正した最大LOD値は3.28 ($\Theta=0.00$)であった。周辺のマイクロサテライトを分析しハプロタイプ解析を行った結果、このSCAはD19S206-D19S605に境された10.2cMに位置していると結論された。多点連鎖解析の最大LOD値は4.08であった(図2)。この候補領域は第19染色体長腕の末端側19q13.4に位置していた。

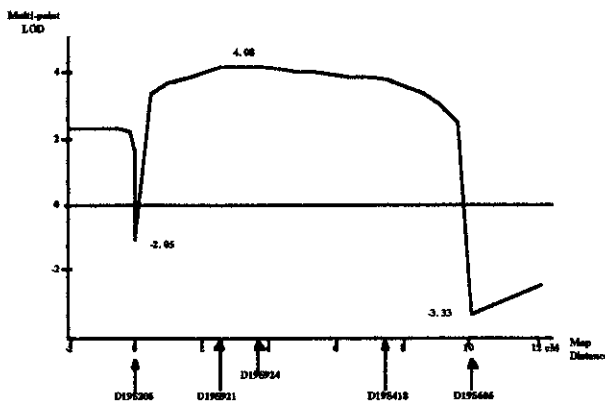


図 2. 常染色体 19q13.4 マーカーとの多点連鎖解析

臨床所見：患者の発症年齢は 12 歳から 42 歳にわたり、平均 27.7 ± 12.7 歳 ($n=9$) であった。症状は発症年齢により異なっていた。すなわち、20 歳以下では発作的におきる頭頸部の不規則かつ間欠的に出現するフルエが認められた。ついで、軽度の小脳性運動失調が加わる経過であった。このフルエは数分～2 時間程度の持続時間で、意識障害を伴わず、一部に就眼前に頻発した。一方、40 歳以降の発症では、緩慢進行性の小脳性運動失調のみであり、発作症状を認めていない。進行は極めて緩慢であり、罹病期間 30 年の例では、杖歩行可能であった。

画像診断では小脳萎縮、特に上虫部の萎縮が認められたが、小脳半球の萎縮は軽度であった。脳幹萎縮は認められず、大脳半球、基底核に異常を認めない。SPECT 検査では小脳に限局して脳血流の低下が認められた。脳波では突発性異常波を認めない。発作的フルエはパルプロ酸やクロナゼパムで抑制された。

D. 考察

本家系では観察例が少ないが、発病年齢のみならず臨床像から判断して、促進現象があるものと推定される。本家系の臨床的な特徴は、緩慢進行性の小脳性運動失調、若年発症例に認められた発作的なフルエ、促進現象、他の系統障害を欠くこと、などに要約される。北海道での経験例から判断する限り、類似の臨床像をきたす運動失調の見られなかったことから、稀な疾患であると推定される。

最近、第 19 染色体長腕には SCA13 として登録された遺伝性運動失調症がある。この家系の候補領域は報告された SCA13 の候補領域と重複はないが、極めて近接している。両者の間には臨床症状に相違点が多い。したがって、本家系の SCA 遺伝子座は従来には知られていなかったものである。

E. 結論

新しい優性遺伝性運動失調症の遺伝子座を第 19 染色体 19q13.4 上に決定した。この遺伝子座は、HUGO に SCA14 として登録された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 矢部一郎、佐々木秀直、田代邦雄：北海道における遺伝性脊髄小脳変性症の特異性. 神経内科 2000;53: 91-98.
- (2) Takeichi N, Fukushima K, Sasaki H, Yabe I, Tashiro K, Inuyama Y. Dissociation of smooth pursuit and vestibulo-ocular reflex cancellation in SCA-6. *Neurology* 2000; 54: 860-866.
- (3) Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Kikuchi S, Chin S, Fukazawa T, Okumura H, Tashiro K. Recessively inherited spastic paraplegia associated with ataxia, congenital cataracts, thin corpus callosum and axonal neuropathy. *Acta Neurol Scand* 2000; 101: 1-5.
- (4) Sasaki H, Yabe I, Yamashita I, Tashiro K. Prevalence of triplet repeat expansion in ataxia patients in Hokkaido, the northernmost island of Japan. *J Neurol Sci* 2000; 175:45-51.
- (5) 武井麻子、矢部一郎、深澤俊行、濱田 毅、佐々木秀直、田代邦雄：脊髄小脳変性症の電気生理学的検討. 神経内科 2000;52: 301-308.
- (6) Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Fukazawa T, Nogoshi S, Komeichi K, Takada A, Shiraishi K, Takiyama Y, Nishizawa M, Kaneko J, Tanaka H, Tsuji S, Tashiro K. A Novel Locus for Dominant Cerebellar Ataxia (SCA14) Maps to a 10.2-cM Interval Flanked by D19S206 and D19S605 on Chromosome 19q13.4-pter. *Ann Neurol* 2000; 48:156-163.
- (7) 武井麻子、大川匡子、佐々木秀直、濱田 毅、田代邦雄：メラトニンが不眠に有効であったマシャド・ジョセフ病の 1 例. 臨床神経 2000;40:736-740.

2. 学会発表

- (1) 佐々木秀直. Spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) について. 文部省特定領域研究(A)「神経細胞死制御」平成 12 年度公開シンポジウム. 平成 12 年 12 月 4 日、学士会館、東京.
- (2) H. Sasaki, I. Yamashita, I. Yabe, T. Fukazawa, S. Nogoshi, K. Komeichi, A. Takada, K. Shiraishi, Y. Takiyama, M. Nishizawa, J. Kaneko, H. Tanaka, S. Tsuji, K. Tashiro. A Novel Locus for Dominant Ataxia Maps to Chromosome 19q13.4-pter. *125th Annual Meeting of the American Neurological Association*. *Ann Neurol* 48(3): 470, 2000 (abstract 206)
- (3) 山下功、矢部一郎、佐々木秀直、田代邦雄、田中 一、辻 省次、高田明生、濱田 毅、白石一也：Spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) 遺伝子座の決定. 日本人類遺伝学会第 45 回大会

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

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

TATA 結合蛋白のポリグルタミン伸長による遺伝性脊髄小脳変性症
(SCA17)

分担研究者 金澤一郎 東京大学医学部 神経内科教授
共同研究者 中村浩一郎^{1, 2}
鄭善容²
内原俊記³
安野みどり⁴
長嶋和郎⁵
長嶋淑子⁶
池田修一⁷

所属：¹東京大学医学部 神経内科
²CREST 戦略的基礎研究推進事業
³東京都神経科学総合研究所 神経病理学研究部門
⁴東京都都立松沢病院 神経内科
⁵北海道大学医学部 病理学教室
⁶手稲溪仁会病院 神経内科
⁷信州大学医学部 第三内科

研究要旨: 伸長したポリグルタミン鎖を認識する抗体を用いて、本邦に於ける遺伝子未同定の遺伝性脊髄小脳変性症などのスクリーニングから新規の常染色体優性遺伝する変性疾患を7家系構成員 11 名を見いだした。この疾患は TATA 結合蛋白遺伝子中の CAG リピートの伸長によって引き起こされ、ハンチントン病をはじめとするポリグルタミン病と同様の疾患と考えられる。

A. 研究目的

Trottier ら(1995)が報告した伸長したポリグルタミン鎖を強く認識するモノクローナル抗体は、伸長ポリグルタミン鎖の構造変化を鋭く捉えることが可能であり、この抗体を用いてフランスの Mandel ら(Nature 378: 403-406, 1996)が脊髄小脳失調症 2 型 (SCA2) の遺伝子のクロー

ーニングに成功したのは記憶に新しい。本邦においても、そして当教室の検討においても遺伝性脊髄小脳変性症の表現型を取りながら既知の遺伝子異常の見出せない症例が 1 / 3 近く存在する。昨年度我々は、上記のモノクローナル抗体(1C2 抗体)を用いて、当教室に於ける遺伝子未同定の遺伝性脊髄小脳変性症のスクリーニングから新規の常染色体優性遺伝と思われる変性疾患の 1 家系を見

いだした。この家系における患者リンパ球の TATA 結合蛋白遺伝子中の CAG リピートは 55 リピートと伸長していた。本年度は多数正常者例における TATA 結合蛋白のポリグルタミンリピートの検討をおこない、このリピート伸長が遺伝子変異であるのか、単なる多型であるのかを検討した。以上の研究により、新たに TATA 結合蛋白遺伝子中の CAG リピートの伸長している 7 家系を見出した。そのうちの一家系において剖検脳が得られたので、その病理学的な検討を併せて行った。

B. 研究方法

当教室に保存している正常者 58 名、及び遺伝性神経疾患 317 例のゲノム DNA より、TATA 結合蛋白遺伝子中の CAG リピートの前後に設定したプライマー (TBP-FAM と TBP-R) を用いて PCR を行ない TATA 結合蛋白遺伝子中の CAG リピート数を検討した。遺伝性神経疾患 317 例の内訳は、第一発見例の臨床症状が①痴呆、②小脳症状、③錐体外路症状 (パーキンソニズム、ジストニア)、④腱反射亢進であったことより、遺伝性脊髄小脳変性症、孤発性脊髄小脳変性症、多系統変性疾患、原因不明の痙性脊髄麻痺、chorea、原因不明の遺伝性痴呆性疾患の症例等である。これらの 317 例は遺伝子解析により、既知のポリグルタミン病は除外済みの症例である。

増幅された PCR 産物を分子量マーカーとともに泳動し、GeneScan™ v3.0 を用いて CAG リピート数を決定した。見出した家系の一部に関しては、家系構成員の TATA 結合蛋白遺伝子中の CAG/CAA 多型を検討するため、増幅された PCR 産物をサブクローニングし、直接塩基配列を決定した。

得られた剖検脳に対しては、抗ユ

ビキチン抗体、抗 TATA 結合蛋白抗体、1C2 抗体を用いて、免疫組織学的検討を行った。

(倫理面での配慮)

当教室では Cell line Bank および DNA の保存において患者及びその家族に口頭と文書による説明を行いインフォームドコンセントを得た上で登録するようにしている。

C. 研究結果

正常者の CAG リピート数は 29-42 であった。そのうち 41 と 42 リピートはそれぞれ 1 例ずつ認められ、そのアレル頻度は 0.87% であった。43 リピート以上は認めなかった。一方遺伝性神経疾患を持つ患者群からは 43-55 リピートを持つアレルが 11/634 認められた (43 リピートのアレル頻度は 0.16%)。過去の報告でも正常範囲は 42 リピートまでとされており、その頻度からも 43 リピート以上は病的と考えられた。43 リピート以上のアレルをもつ 11 名 7 家系の臨床像は比較的均一で昨年度報告した兄妹例と酷似しており、若年発症 (平均発症年齢 31.8 歳) が認められ、神経症状は痴呆、小脳症状、錐体外路症状 (パーキンソニズム、ジストニア、コレア)、腱反射亢進であった。家系構成員の TATA 結合蛋白遺伝子中の CAG/CAA 多型を検討したところ、発症者は必ず病的アレルの heterozygote であり、正常者は正常アレルの homozygote あるいは heterozygote であったことから、遺伝形式は常染色体優性遺伝と結論した。48 リピートを持つ剖検脳の検討では、被殻、尾状核に強い神経細胞消失とグリオシスを認めた。1C2 抗体および抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学染色では核内凝集体を認め、さらに共焦点レ

一ザ一顕微鏡を用いた蛍光2重染色の検討より、これらの凝集体は、ユビキチン、TATA 結合蛋白、伸長したポリグルタミンエピトープからなることが示された。以上の結果より、我々が見出した7家系は、ひとつの疾患単位を形成しており、ポリグルタミン病の範疇に入るものと考えた。

D. 考察

ポリグルタミン病と呼ばれる一群の神経疾患が現在まで9つ報告されており、これらは責任遺伝産物中の伸長したポリグルタミン鎖が何らかの機序により神経細胞死を来すものと考えられている。TATA 結合蛋白は転写遺伝子であるが、正常でも31~42個のグルタミンをその蛋白翻訳領域に持つとされている。過去のポリグルタミン病の報告ではポリグルタミン鎖が約40リピート以上に伸長すると病的範囲であることがほとんどであり、我々の結果もそれと矛盾しない。

近年、ポリグルタミン病の神経細胞死のメカニズムとして、核内の転写調節障害がその一因としてクローズアップされている。TATA 結合蛋白は転写因子 TFIID 複合体の一員であり、直接 DNA に結合して転写開始に重要な役割を果たす蛋白であり、その生理的な機能は良く解析されている。この蛋白のポリグルタミン伸長による転写調節を解析する事によって、ポリグルタミン病の神経細胞死メカニズムひいては治療法に新たな洞察が得られる可能性が高い。

E. 結論

TATA 結合蛋白のポリグルタミン

伸長によると考えられる新しい遺伝性脊髄小脳変性症を報告した。境界例の43、44リピートの linkage study を考慮に入れた詳細な家系調査と病理学的検討が必要である。今後の症例の集積が待たれる。

F. 研究発表

- 1) 論文発表 未
- 2) 学会発表

K. Nakamura, S.-Y. Jeong, Y., et al. SCA15, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by the expanded polyglutamine in TATA-binding protein identified with 1C2 antibody immunoscreening. [Poster 2185; 50th meeting of American Society of Human Genetics (ASHG), Philadelphia, Pennsylvania, Oct 3-7, 2000]

K. Nakamura, S.-Y. Jeong, Y., et al. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by the expanded polyglutamine in TATA-binding protein identified with 1C2 antibody immunoscreening. [Oral session, 30th annual meeting of Society for Neuroscience (SFN), New Orleans, LA, Nov. 6, 2000]

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 未
2. 実用新案登録 未
3. その他

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究
分担研究者 山田正夫 国立小児病院小児医療研究センター 先天異常研究部

研究要旨

いくつかの神経変性疾患は、各責任遺伝子の翻訳領域に位置する CAG リピートの伸長が発症要因である。CAG リピート伸長によって神経細胞が死に至る分子機構と、疾患毎に特定領域を中心に神経変性死が生じる分子機構を解析する。また CAG リピート病の 1 つである歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の責任遺伝子の機能について解析する。伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質を誘導的に強発現できる系を構築し、凝集体形成とアポトーシス誘導を観察した。その過程の早期に caspase8 と 10 が活性化されることを見出し、アポトーシス素過程と、その増悪反応過程を明らかとした。RERE および IRSp53 の機能について解析し、DRPLA 遺伝子産物の機能について研究した。本年度外国の研究室から、CAG リピート伸長病の原因としてポリアラニン説が提唱された。当研究室における従来からの単一アミノ酸鎖の発現研究に基づき、この可能性を検証した。

A. 研究目的

これまでに 8 種類の神経変性疾患で、各責任遺伝子の翻訳領域に位置する CAG リピートが伸長すると発症することが明らかとなっている。疾患責任遺伝子研究から得られたこの結果によつて的確な診断が可能となったが、患者に利益を還元したわけではない。CAG リピート伸長によって神経細胞が死に至る分子機構と、疾患毎に脳の特定期領域を中心として神経細胞死が生じる分子機構を解明して、将来の治療法の開発を目指す必要がある。責任遺伝子産物の機能の解明も、神経細胞死の組織特異性解明に重要であり、CAG リピート病の 1 つである歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子の機能について解析する。

B. 研究方法

- (1) 培養細胞で、伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質を強発現させ、あるいは条件的に強発現させ、生じる凝集体とアポトーシス素過程について解析する。
- (2) DRPLA 遺伝子の正常機能の解析を目的に、DRPLA と高い相同性を持つ RERE 遺伝子や、DRPLA 産物と会合するインスリ

ン受容体チロシンキナーゼ基質 IRSp53 を単離してきた。それらの機能について、培養細胞系を用いて解析する。

- (3) CAG リピート伸長病の原因として、ポリアラニン仮説が最近提唱された。当研究室における従来からの、単一アミノ酸鎖の発現研究に基づき、これを検証する。

(倫理面での配慮)

既に確立されたクローンを使用した試験管内実験であり、本研究課題では患者から採取した検体を使用しないので、倫理の問題に該当しない。

C. 研究結果

- (1) 伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質（あるいはペプチド鎖）を GFP（あるいはその他のタグ）との融合型として、条件的に発現できる細胞株を得た。伸長グルタミン鎖を強発現すると、凝集体が形成され、アポトーシスが誘導されたが、正常範囲内の繰返し数を持つグルタミン鎖は、アポトーシスを誘導しないし、また凝集体も形成しなかった。この系を用いてアポトーシスの素過程を解析し、早期に caspase8 が、次に

caspase3 が活性化されることを見出した。顕微鏡下で観察できる凝集体形成あるいはその核内移行に先立って、アポトーシス反応が進行していることが示され、凝集体形成より、凝集性あるいはミクロ凝集体形成が重要であると結論した（昨年度発表済）。

(2) 上記の実験系で、caspase10 も早期に活性化されることを見出した。またこの時に、caspase8 および 10 とともに、伸長ポリグルタミン鎖と共沈することを確認した。一方、大腸菌および試験管内で作成し、部分精製した caspase8 および 10 と伸長ポリグルタミン鎖の間では直接の相互作用は無く、細胞内での会合（＝凝集）には別の因子が介在すると推定した（発表論文 8）。

(3) caspase8 および 10 は細胞質に存在し、各種のアポトーシス刺激によって活性化されても細胞質に存在するのが一般的である。しかし、伸長ポリグルタミン鎖の発現によるアポトーシスでは、その凝集体とともに核に移行することを確認した。活性型のみを認識する抗体を作成し、核内凝集体に活性型 caspase8 が存在することを確認した（発表論文 8 および 9）。

(4) 我々は、caspase3 によって DRPLA 蛋白質が切断されること、切断された断片は凝集傾向が増すことを報告してきた。ハンチントン舞踏病や脊髄小脳失調症 1 型などの産物でも同様の報告がある。これらのことを併せ考えると、伸長グルタミン鎖による凝集傾向により caspase8 および 10 が活性化され、その結果 caspase3 が活性化され、次にこれらの産物が切断を受けて凝集傾向が一層強くなり、それが再度 caspase の活性化を促進するという憎悪サイクルが回転することになる。

(5) DRPLA と高い相同性を持ち、EST-M78755 で代表される遺伝子 (RERE と命名) を単離し、解析した（発表論文 1）。

(6) DRPLA 産物と会合する蛋白質の 1 つとして、インスリン/IGF-1 受容体であるチロシンキナーゼの基質となる IRSp53 を同定した（既報告）。インスリン/IGF-1 は神経栄養因子でもあり、神経変性疾患と神経栄養因子との関連を示唆する点で重要である。本

年度、IGF-1 による神経突起形成における IRSp53 から Rac へのシグナル伝達機構について解析した。IRSp53 には 3 種類のアイソフォームが存在するが、その 3 種は機能的に異なることを明らかにし、シグナル伝達における機能ドメインを決定した。

(7) 本年度、外国の研究者から CAG リピート伸長病の原因としてポリアラニン説が提唱された。まず第 1 は、伸長アラニン鎖の強発現により、伸長グルタミン鎖と同様に凝集体を形成し、アポトーシスを誘導できるという Rankin らの報告である。この研究は眼咽頭筋ジストロフィー (oculopharyngeal muscular dystrophy) を意図して行われたと思われる。同疾患は伸長程度が小さいので、一般的にはトリプレットリピート伸長病に加えられることはないが、同様の機構が伴っている。すなわち、polyA 結合蛋白 2 遺伝子 (PABP2) の翻訳領域に GCG リピートが存在し、アラニンをコードしている。正常染色体の 98% では 6 回繰り返してであり、2% が 7 回である。6 回と 7 回の染色体を持つヒトは正常であるが、7 回の染色体を 2 本持つと発症する (劣性遺伝)。一方、稀に 8 ~ 13 回の繰り返しを持つ染色体が存在し、それを持つヒトは発症する (優性遺伝)。この発症機構は Brais らにより 1998 年に明らかとなった。当研究室では以前から CAG リピートを GCA 翻訳枠でアラニン鎖として強発現したときにもアポトーシスを誘導できることを見出していた。従って、この報告と合致し、かつ、両者の結果を比較すると、アラニン鎖は 10 回程度と短くても他の条件次第ではアポトーシスを誘導できることが判明した。第 2 に、Gaspar らはポリグルタミン病の 1 つである MJD に対しアラニン説を提唱した。CAG リピートによって翻訳枠がずれ (frame shifting) アラニン鎖が形成されるというものである。当研究室ではすでに、アラニン鎖、セリン鎖に対する抗体も作成しており、その解析結果から、大腸菌を宿主とした場合、CAG リピート (およびその他のトリプレットリピート) は相当強度に frame shifting を生じるが、哺乳動物細胞では検出限界以下であった。

従って、CAG リピート伸長病に対するポリアラニン説の可能性は低いと考える。

引用文献

- Rankin et al. *Biochem J* 348:15-19, 2000.
Brais et al. *Nature Genet.* 18:164-167, 1998.
Gaspar et al. *Hum Mol Genet* 9:1957-1966, 2000.

E. 結論

伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質を強発現させるとアポトーシスが誘導され、このときに caspase8 と 10 が重要な役割をすることを示した。神経細胞死の分子機構を推定するためのモデルとなるばかりでなく、治療法開発のターゲットにもなりうると思われる。また DRPLA 産物の機能、特に神経栄養因子との関係について知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Yanagisawa, M. Bundo, T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, K. Tadokoro, K. Tokunaga & M. Yamada. Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic Acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1433-1442, 2000.
2. K. Komatsu, T. Miyashita, H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, M. Yamada, H. B. Lieberman & H.-G. Wang. Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-XL and promotes apoptosis. *Nature Cell Biol.*, 2, 1-6, 2000.
3. N. Azuma, A. Hirakiyama, T. Inoue, A. Asaka, & M. Yamada. Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum. Mol. Genet.* 9, 363-366, 2000.
4. M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, X-K. Li, M. Fujino, H. Hamada, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo & T. Okuyama. Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII : Involvement of cross-correction in wide-spread distribution of

the gene-products and long-term effects of CTLA-4Ig co-expression. *Mol. Therapy* 1, 406-413, 2000.

5. M. Kosuga, S. Enosawa, X-K. Li, S. Suzuki, N. Matsuo, M. Yamada, J. R. Chowdhury, O. Koiwai & T. Okuyama. Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken b-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplant.*, 9: 675-680, 2000.

6. M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, S. Enosawa, X-K. Li, S. Okuyama, M. Fujino, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo, N. Sakuragawa & T. Okuyama. Phenotype correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus-mediated gene transfer. *Cell Transplant.* 9: 687-692, 2000.

7. M. Kosuga, K. Sasaki, X-K. Li, H. Ohkawa, I. Ogino, O. Okuda, H. Arai, N. Sakuragawa, Y. Kamata, N. Azuma, S. Suzuki, M. Yamada & T. Okuyama. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Therapy* (in press)

8. M. U, T. Miyashita, Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & M. Yamada. Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death and Differ.* (in press).

9. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of GFP-tagged eight apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* (in press)

2.学会発表

18 件

詳細は省略

G. 知的所有権の取得状況

無し。

ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析

分担研究者 垣塚 彰（財）大阪バイオサイエンス研究所 研究部長

研究要旨 Machado-Joseph病(MJD)の原因遺伝子から作られる蛋白質を限定分解する活性をPC12細胞がわずかながら有していることを見いだした。PC12細胞のサブクローンをスクリーニングすることによって、元細胞の300倍以上の活性を持つ細胞株を得た。この細胞では、MJD蛋白質がポリグルタミンのN末側でプロセッシングを受けることを生化学的に明らかにした。今後、本細胞を使いMJD蛋白質のプロセッシング酵素の同定を目指したい。

A. 研究目的

我々は、これまでに神経難病Machado-Joseph病(MJD)の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞踏病と同じく、原因遺伝子内のCAGの繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを明らかにした。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内のCAGの繰り返しが共通にポリグルタミンリピートに翻訳される。我々はこのことに着目し、伸長したポリグルタミンリピートを培養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ることを見だし、また、マウスの小脳の神経細胞に発現させると小脳の神経細胞が変性・萎縮し小脳失調を示すことを明らかにしてきた。この結果は、ポリグルタミンが神経変性を引き起こす起因物質であることを示すとともに、全長蛋白から、伸長したポリグルタミンを含む部分蛋白質が切り出されることが、神経変性の第1ステップになることを示唆しており、我々は、この考えを「プロセッシングモデル」として提唱してきた。

本研究では、この「プロセッシングモデル」をさらに支持する結果を得ることを目的として、神経細胞にはMJD蛋白質を限定分解するサブポピュレーションが存

在する可能性を検討し、実際にMJD蛋白質を限定分解する活性を有する神経細胞を分離することを試みた。

B. 研究方法

79リピートのポリグルタミンを含むMJD蛋白質(MJD79)のN末とC末にGFP蛋白質を融合した蛋白質を発現させ、時間の経過とともに観察し、後者のみ凝集体を形成する活性を強く有する神経細胞株を探しだし、実際にそのような細胞でMJD蛋白質を限定分解する活性が存在するかどうかをウエスタンブロッティングで検討した。

本研究は、培養細胞を用いた解析であり、倫理上の問題や動物愛護上の問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

I. 神経細胞株PC12細胞におけるMJD蛋白質を特異的に切断する活性を有する細胞頻度の解析

これまでの解析で、増殖性の強い細胞株では、GFP-MJD79、MJD79-GFP蛋白質のいずれを発現させた場合もその表現型の変化やGFP蛋白質の凝集性を示す細胞を同定することができなかった。我々は、MJD蛋白質をプロセッシングする活性は非

常に弱く、分裂に伴い蛋白量が2分される増殖性の細胞では、そのような活性がもし存在しても、検出出来ないと考え、NGFによってポストミトティックなニューロン様細胞に誘導出来るPC12細胞について、NGF添加後にGFP-MJD79、MJD79-GFP蛋白質を発現させ、数日間にわたって細胞を観察した。その結果、MJD79-GFP蛋白質を発現させた後、1週間から10日後にかけてGFPの凝集像を示す細胞が、約0.1%以下の頻度ではあるが存在することが判明した。このような凝集像は、GFP-MJD79蛋白質を発現させた場合には観察されず、ポリグルタミンのN末側で切断が起こっていると予測された。

II. MJD蛋白質を特異的に切断する活性を有するPC12細胞亜株の同定

上記の結果は、非常に頻度が低いPC12細胞には、MJD蛋白質を限定分解する細胞が含まれていることを示唆している。そこで、我々は、PC12細胞をサブクロニングし、強いMJD蛋白質切断活性をもつ細胞を同定することを試みた。上記で示したGFPの凝集活性を指標に大規模なスクリーニングを行った結果、MJD79-GFP蛋白質の発現させた細胞のうちの30%でGFPの凝集活性を示す細胞株（頻度として300倍に上昇）を分離することに成功した。実際にウエスタンブロッティング法で発現させたMJD79-GFP蛋白質を調べてみると全長のバンドに加えて、さらに一本のはっきりとしたバンドが検出された。従って、この亜株では、MJD蛋白質は、ポリグルタミンのN末側で、まさに限定分解を受けることが判明した。一方、この細胞では、コントロールとして発現させたハンチントン舞踏病蛋白質を限定分解する活性は有していないことが判明し、限定分解の活性はMJD蛋白質に特異的であると考えられた。

D. 考察

本年度の研究では、PC12神経細胞にMJD蛋白質を限定分解する活性が弱いながら存在することを見だし、その中で、300倍以上強い分解活性を有する細胞

亜株を分離することに成功した。今後この細胞から、MJDの限定分解酵素の同定を試みる。

E. 結論

MJD蛋白質を限定分解する活性をもつ神経細胞株を分離することに成功した。この結果は、我々が提唱してきた「プロセッシングモデル」をさらに支持する結果であり、今後この細胞からMJD蛋白質のプロセッシング酵素を同定・解析することによって、「プロセッシングモデルの証明」を達成したい。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Maeda, H., Segawa, T., Kamoto, T., Yoshida, H., Kakizuka, A., Ogawa, O., & Kakehi, Y. Rapid detection of candidate metastatic foci in the orthotopic inoculation model of androgen-sensitive prostate cancer cells introduced with green fluorescent protein. *The Prostate*, 45:335-340., 2000
- 2) Kakizuka, A. Molecular mechanisms underlying neuronal cell death in polyglutamine diseases. *Neurochemical Research*, 25: 990, 2000.
- 3) Yasuda, S, Hori, S., Maeda, H., Maeda, R., Gotoh, Y., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Kakizuka, A. As₂O₃ treatment recruits Daxx and ASK1 to re-organized PML bodies and activates the SEK1-JNK cell death kinase cascade in APL cells. (in press)
- 4) Hirabayashi, M., Inoue, K, Nakadate, K., Higashiyama, H., Kamei, Y., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Hori, S., & Kakizuka, A. Identification of PIP-1 as an effector of neurodegenerative phenotypes in polyglutamine-expressing neuronal cells. (in revision)
- 5) Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., & Kakizuka, A. Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. (in revision)
- 6) 垣塚 彰「ヒト疾患の遺伝的解析からのアプローチ：神経変性疾患」

蛋白質・核酸・酵素 45: 792-797, 2000
7) 垣塚 彰「ポリグルタミン病発症の分子機構」脳 21 3: 165-170, 2000
8) 垣塚 彰「遺伝性神経変性疾患の分子解析」北野紀要 45: 42-60, 2000
9) 垣塚 彰「優性遺伝性運動失調症の発症機構」神経研究の進歩 44: 993-998, 2000
10) 垣塚 彰「ポリグルタミン病とポリグルタミン凝集の分子メカニズム」神経難病の分子機構 (石浦章一編) 183-191, 2000

2. 学会等発表

1) 垣塚 彰 「ポリグルタミン病の発症機構の分子解析と治療への展望」東北大学加齢研セミナー
平成12年2月29日 東北大学加齢研 (仙台)
2) 垣塚 彰 「ポリグルタミン病発症の分子機構解析と治療への展望」ニューロサイエンスセミナー 徳島
平成12年3月6日 徳島大学医学部 (徳島)
3) 垣塚 彰 「優性遺伝性運動失調症の発症機構」第35回脳のシンポジウム平成12年3月11日 北海道大学医学部 (札幌)
4) 垣塚 彰 「ポリグルタミン病の分子機構」第一回梅園和彦氏メモリアルコンフェレンス平成12年4月23日けいはんな都ホテル (生駒)
5) 垣塚 彰 「ポリグルタミン病発症の分子機構解析」第41回日本神経病理学会総会平成12年6月2日米子コンベンションセンター (米子)
6) 垣塚 彰 「ポリグルタミン病発症の分子機構」広島大学医学部生化学セミナー平成12年6月15日広島大学医学部
7) 垣塚 彰 「細胞死におけるPML bodyの役割」第3回造血器セミナー平成12年7月1日ホテルニューオータニ札幌 (札幌)
8) 垣塚 彰 「神経変性疾患の分子メカニズムの解明と新しい治療戦略の構築をめざして」第2回京大学生命科学研究科シンポジウム
平成12年7月12日京大会館 (京都)
9) 垣塚 彰 「ポリグルタミン病」第27回岡山脳研究セミナー
平成12年8月1日岡山大学医学部 (岡山)
10) 垣塚 彰 「神経筋疾患におけるアポ

トーシス」第17回小児神経筋疾患懇話会
平成12年8月19日経団連会館 (東京)
11) 垣塚 彰 「ポリグルタミンが引き起こす細胞死の分子機構解析」第59回日本癌学会総会
平成12年10月4日パシフィコ横浜 (横浜)
12) 垣塚 彰 「overview: 神経細胞死研究の過去・現在・未来」第73回日本生化学会大会
平成12年10月12日パシフィコ横浜 (横浜)
13) 垣塚 彰 「神経変性疾患における細胞死研究の新たな潮流」第1回泌尿器科分子病態カンファランス東北 平成12年11月25日秋田グランドホテル (秋田)
14) Akira Kakizuka 「Identification of PIP1 as an effector of neurodegenerative phenotypes in polyglutamine-expressing neuronal cells.」 CSH meeting: Therapeutic opportunities in neurodegenerative diseases.
Dec. 1, 2000 Cold Spring Harbor Lab, U.S.A
15) Akira Kakizuka 「Molecular Analysis of APL cell death」 The 5th Japan-Korea Cancer Research workshop 2000 Dec. 9, 2000 Cheju, Korea
16) 垣塚 彰 「overview」第23回日本分子生物学会年会
平成12年12月13日神戸国際会議場 (神戸)
17) Akira Kakizuka 「Identification of PIP1 as an effector of neurodegenerative phenotypes in polyglutamine-expressing neuronal cells.」 Keystone symposia: Molecular Mechanisms of Apoptosis. Jan. 18, 2001 Keystone Resort, U.S.A
18) 垣塚 彰 「神経細胞死の新しい分子機構: 空胞形成を伴う細胞死」第44回千里神経懇話会 平成13年1月26日千里ライフサイエンスセンター (千里)
19) 垣塚 彰 「神経変性疾患における細胞死」第5回東海アポトーシス研究会
平成13年2月10日名古屋大学医学部 (名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

特になし