

図1 SCA6患者小脳プルキンエ細胞の細胞質内の $\alpha 1ACa$ チャンネル蛋白による封入体形成

定で, anticipationが認められないことにも一致する。さらに, SCA6の脳内の各部位でもリピート数は一定で, somatic mosaicismは見られない^{1, 2)}。

2. SCA6の病態機序

なぜ, この短いCAGリピートが小脳のプルキンエ細胞を選択的に障害し, 進行性の小脳失調をおこすのかという疑問に対し, 我々はいくつかのアプローチをしてきた。

1) 中枢神経系の $\alpha 1ACa$ チャンネルの発現およびSCA6における異常

SCA6患者脳内で, CAGリピートが, mRNA・蛋白レベルでどのように発現しているかを調べた⁴⁾。

RT-PCRによる, CACNA1A mRNA発現量の相対的比較において, 大脳皮質・海馬・視床・橋と比べると, 小脳皮質に非常に多く発現していることが示された。さらに, 正常脳ではCAGリピートが翻訳されるものとされないものの2種類のスプライスバリエントがみられるが, SCA6患者脳ではCAGリピートが翻訳されるものがより多くなっており, すなわち, SCA6患者脳では異常伸長したポリグルタミンを持つ $\alpha 1ACa$ チャンネルが主に発現していると考えられた。

また, CAGリピートを含む部分をプローブとして行った*in situ*ハイブリダイゼーションでは, 脳内の広い範囲の神経細胞に発現を認めたが, プルキンエ細胞において最も強い発現を確認した。

従って, SCA6において最も障害されるプルキンエ細胞において, 変異遺伝子が最も強く発現すると考えられ, プルキンエ細胞の障害の選択性を原因遺伝子の発現量の違いで, 少なくとも一部は説明可能であることを示している。

次に, 蛋白レベルでの発現をみるために, この部分の蛋白, すなわち $\alpha 1ACa$ チャンネルに対する抗体を作製し, ヒトの脳について免疫組織科学的検索を行うと, 正常脳では, mRNAでの結果と同様に, 小脳プルキンエ細胞で最も強い免疫反応を認めた。SCA6患者脳では, 前述した通り, 残存するプルキンエ細胞の多くで, 細胞質内に凝集体を認めた。一方, ポリグルタミンに対する抗体(IC2)を用いた染色では, やはりプルキンエ細胞の細胞質内封入体を認めたが, 核内にも少数存在する可能性がある⁵⁾。

他のCAGリピート病では, 翻訳されたポリグルタミン鎖が核内に移行し, 凝集するとともに神経細胞死をもたらす可能性が考えられている。SCA6においてみられる細胞質内凝集体は, 最も障害されるプルキンエ細胞のみで認めることが

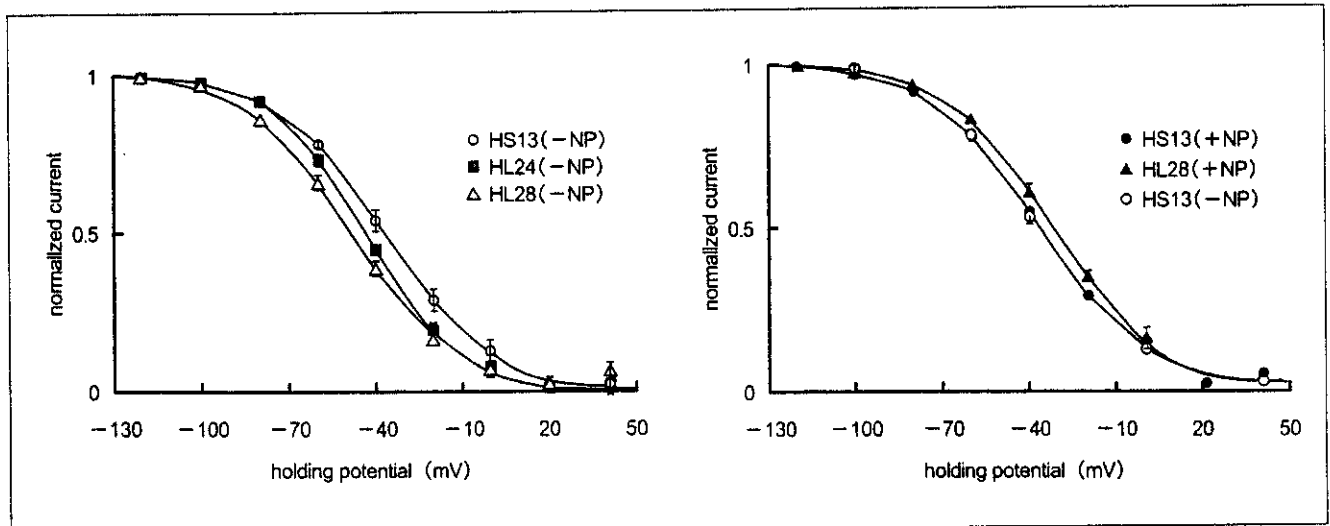


図2 ヒト α 1ACaチャンネルをHEK293細胞に発現させたときの電位依存性不活性化曲線

ポリグルタミンが正常(13回:HS13)と異常伸長(24回:HL24, 28回:HL28)なヒト全長(1ACaチャンネルの機能を, アスパラギン-プロリンの挿入配列の無いもの(-NP)とあるもの(+NP)について比較した。(-NP)のものでは, ポリグルタミン数の伸長に従って不活性化曲線が過分極方向へシフトし, (+NP)では逆に脱分極方向へのシフトが認められた。

ら, プルキンエ細胞変性の機序に何らかの働きを有していると推測できる。他のCAGリピート病とは同一でないにしても, 変異蛋白による conformation の変化が神経細胞死をきたすという conformational disease の範疇に入る可能性がある。

2) SCA6の遺伝子変異のP/Q型チャンネル機能に及ぼす影響

中枢神経系においてはカルシウムが細胞内に流入することが, 神経興奮伝達, シナプス可塑性の発現などへ関与していることが知られている。電位依存性Caチャンネルは, Caの流入経路の中で中心的な役割を果たしており, α 1, α 2/ δ , β , γ のサブユニットから構成され, このうち, (1サブユニットはCaが流入するポアを形成する最も重要なものである。 α 1サブユニットは, 電気生理学的, 薬理学的特性により細分され, SCA6の mutationは α 1Aサブユニットにあり, これはP/Q型チャンネルに相当する。 α 1Aサブユニットの構造は, 分子内に4個の繰り返し構造(ドメイン)をもち, ポリグルタミンはC末端にある。P型, Q型の違いについては, ω -Aga-IVAの感受性の違いにより定義されており, 電気生理学的にも不活性化の過程に違いがみられる。小脳においては, P型はプルキンエ細胞に, Q型はプルキンエ細胞

および顆粒細胞に分布する。P型Q型の機能的な差は, alternative splicingや結合する他のサブユニットの違いによると言われているが, ω -Aga-IVAの感受性の違いに関しては, ドメインIVのアスパラギン-プロリン(NP)の挿入配列の有無がP型とQ型の区別に関与していることが, ラットの α 1Aについて最近明らかにされた⁶⁾。我々は, これをさらに検討するため, マウスのプルキンエ細胞および小脳全体に対しNPの挿入配列のmRNAレベルでの発現を調べた。小脳全体で行った場合は, NP(-)isoformはNP(+)-isoformの2倍以下の発現であったが, プルキンエ細胞の単一細胞RT-PCRではNP(-)isoformが優位であった⁷⁾。これらの結果より, ヒトにおいても, NP(-)isoformはプルキンエ細胞における主な構成成分であると考えられた。

そこで, SCA6にみられるプルキンエ細胞優位の細胞死のメカニズムを調べるために, 様々なポリグルタミン数のNP(-)isoformおよびNP(+)-isoformについてチャンネル活性を調べた⁷⁾。発現系として使用したのはHEK293細胞で, この細胞には, endogenousなカルシウムチャンネル活性はほとんどなく, チャンネル機能をみる系として確立されている。遺伝子導入はリン酸カルシウム法で行い, ヒトの全長 α 1Aを, α 2/ δ および β 1aとともに発現させ, パッチクランプ法により電気生理学的解

析を行った。

まず、プルキンエ細胞に優位に発現していると想定されるNP(-)isoformを、ポリグルタミン数を変えて発現させて比較すると、電流密度、キネテイクス、電位依存性活性化については差が無いが、電位依存性不活性化に関しては、ポリグルタミンの異常伸長した $\alpha 1A$ チャンネルにおいて、正常のものに比べ、伸長数に従った不活性化曲線の過分極方向へのシフトがみられた(図2)。この結果、静止膜電位付近における利用可能なCaチャンネルは減り、ポリグルタミンが伸びる程、細胞へのCa流入は減ることが予想される。

次にNP(+)isoformについてみると、電流密度、活性化および不活性化のキネテイクス、電位依存性活性化は、ポリグルタミン数により変化しないが、電位依存性不活性化に関しては、28リピートにおいて正常のものに比べ、不活性化曲線の脱分極方向へのシフトが認められた。これは、NP(-)isoformでみられた結果と逆方向の変化で、ポリグルタミンが異常伸長すると利用可能なCaチャンネルは増えている。

以上の結果より、NP(-)isoformが主に発現しているプルキンエ細胞においては、ポリグルタミンの異常伸長により細胞へのCa流入は減ることが予想され、プルキンエ細胞の機能障害や変性脱落に寄与していると想定することが出来る。また、NP(-)isoformおよびNP(+)isoformがともに発現している神経細胞においては、NP(+)isoformにおいてみられる不活性化曲線の脱分極方向へのシフトにより代償されるために、機能障害や細胞死を免れる可能性があると考えられる。

CACNA1Aの他の遺伝子変異によりSCA6と同様の進行性の小脳失調を示すものがあり、ヒトでは、反復発作性失調症2型、家族性片麻痺性片頭痛、進行性失調症、マウスではtottering(tg), leaner(tg^l), rolling mouse Nagoyaがある。tgよりも重度の運動失調を示すtg^lにおいては、プルキンエ細胞へのCa流入もより顕著に減少しているとされ

る⁸⁾。また、反復発作性失調症2型についても、ある変異ではP/Q型電流が消失すると報告された⁹⁾。さらに、 $\alpha 1ACa$ チャンネルのノックアウトマウスにおいてはP/Q型電流は当然認められないが、小脳失調を呈する¹⁰⁾。我々のポリグルタミンの伸長数に伴った変化を認めた結果も併せ考えると、Ca流入の減少が、運動失調という表現型を説明しうると考えられる。以上のことを考えあわせると、SCA6の選択的細胞死には、プルキンエ細胞の多くで細胞質内凝集体を認めること、変異 $\alpha 1A$ チャンネルがプルキンエ細胞に多く発現していること、そのチャンネル機能が変化していることなどが、これに関与しているものと考えられる。

3. 今後の展望

SCA6はポリグルタミン病の一つでもあるが、チャネロパチーともとらえられる。今後は、モデルマウスを使うなどにより、本症のこの2つの側面の病態解明を進める必要がある。

文 献

- 1) Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, *et al.*: Nature Genet. 15: 62-69, 1997.
- 2) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, *et al.*: Am. J. Hum. Genet. 61: 336-346, 1997.
- 3) Ishikawa K, Watanabe M, Yoshizawa K, *et al.*: J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 67: 86-89, 1999.
- 4) Ishikawa K, Fujigasaki H, Saegusa H, *et al.*: Hum. Mol. Genet. 8: 1185-1193, 1999.
- 5) Ishikawa K, Owada K, Ishida K, *et al.*: Neurology. 56(12): 1753-1756, 2001.
- 6) Bourinet E, Soong TW, Sutton K, *et al.*: Nature Neurosci. 2: 407-415, 1999.
- 7) Toru S, Murakoshi T, Ishikawa K, *et al.*: Journal of Biological Chemistry. 275(15): 10893-8, 2000.
- 8) Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H, *et al.*: Journal of Biological Chemistry. 273(52): 34857-67, 1998.
- 9) Guida S, Trettel F, Pagnutti S, *et al.*: American Journal of Human Genetics. 68(3): 759-764, 2001.
- 10) Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, *et al.*: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96(26): 15245-50, 1999.