

391.0885
厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

CAGリポート病に対する治療法の開発に関する研究

(H13-こころ022)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 貫谷 信行

平成15(2003)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

CAG リpeat病に対する治療法の開発に関する研究 貫名 信行	----- 3
-------------------------------------	---------

II. 分担研究報告書

1. CAG リpeat病モデルシステムを用いた治療法の開発 貫名 信行	----- 13
2. CAG リpeat病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発 辻 省次	----- 17
3. 球脊髄性筋萎縮症の治療法の開発 祖父江 元	----- 21
4. Machado-Joseph 病原因タンパク質切断酵素の解析 垣塚 彰	----- 23
5. ポリグルタミンにより誘導される細胞死の機序解析とその抑制法の開発 宮下 俊之	----- 25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 29
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35
-----------------	----------

I. 総括研究報告書

CAG リピート病に対する治療法の開発に関する研究

主任研究者 貫名 信行

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

研究要旨

ポリグルタミン病の病態について伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディングが重要であることを示した。アンフォールディングを促進する因子としてプロセッシングの存在が示唆された。この点に関して治療のための制御対象となるプロセッシング因子の同定の可能性が出てきた。ポリグルタミンの転写調節障害仮説に基づく治療の可能性についても転写障害の解析が進み、その薬物による回復の可能性が示唆された。さらに SBMA では抗アンドロゲン療法の可能性を示した。

A. 研究目的

CAG リピート病（ポリグルタミン病）はハンチントン病、遺伝性脊髄小脳変性症、球脊髄性筋萎縮症などの代表的な神経変性疾患を含み、近年病因遺伝子が同定された後その病態解明が急速に進歩した疾患群である。しかしながら本疾患は未だ治療法に関しては十分な進展が見られていない。本研究では従来の研究で蓄積した本疾患群のモデルシステム（分子モデル、細胞モデル、マウスモデル）を有効に用い、従来の仮説の検証、病態解明の展開、治療法の開発を行おうというものである。具体的には1) ポリグルタミンによる凝集体形成過程の解明とその抑制、2) ポリグルタミンによる細胞死、あるいは細胞機能障害機構の解明とその抑制、3) 動物モデルを用いた神経細胞死、神経細胞機能障害の抑制の試みを中心的な課題として行う。

B. 研究方法

CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発

伸長したポリグルタミン鎖を挿入した変異ミオグロビンの構造解析によって、すでに伸長したポリグルタミン鎖が分子内βシート構造をとっていることが示した。また、35、50のリピート数をもつミオグロビンは凝集体を形成し始めると分子間βシート構造を含んでいることが明らかになった。本研究ではさらに理

研播磨研究所の Spring8 を用いて X 線回折と X 線小角散乱法による解析を進めた。

CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発

内在性 cAMP 遺伝子の活性化を解析する細胞としては、Neuro2a 細胞を用いた。伸長ポリグルタミン鎖を発現させるプラスミドとして、部分 DRPLA タンパクをコードする cDNA、核移行シグナル、GFP をコードする cDNA を組み込んだ。c-Fos、リン酸化 CREB については、Western blotting により解析した。

球脊髄性筋萎縮症の病態解明と治療法開発

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）のモデルマウスとして、チキンベータ-プロモーター調節下に 97CAG を有するヒトアンドロゲン受容体（AR）を導入したトランスジェニックマウス（Tg）を作製した。このマウスを用いて解析を進めるとともに、去勢処理、LHRH アナログ処理、HSP70 高発現マウスとの交配などを行い解析した。

Machado-Joseph 病原因蛋白質切断酵素の解析

MJD 蛋白質がプロセッシングされた細胞で薬剤耐性遺伝子が発現するシステムを構築し、MJD 蛋白プロセッシング活性を有する細胞を単離し、親株に比して mRNA の発現レベルが上昇および低下している遺伝子群を DNA チップを用いて同定した。

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

伸長したポリグルタミンを発現させる細胞として、ヒト奇形腫由来細胞株 hNT2 細胞を用いた。レチノイン酸を用いて神経細胞に分化させ、シトシンアラビノシド等で post mitotic な神経細胞を純化した。分裂のとまった細胞は通常の方法では遺伝子導入が困難なため、ポリグルタミンをコードする遺伝子を組み込んだ組み替えアデノウイルスを作製し、培養神経細胞にこのウイルスを感染させ、伸長したポリグルタミンによって発現量の変化する遺伝子を、DNA チップ (Affymetrix 社) を用いて網羅的に解析した。

C. 研究結果

CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発

Mb-Q50 を X 線小角散乱法で解析する過程で線維形成前に特異な重合体の形成を検出し、これが Mb-Q35 では認められないことを確認した。この重合体は分子間 β シート形成前に出現し、その形成は温度依存性であった。さらに X 線小角散乱法でその重合体の存在が確認された時間帯で電子顕微鏡像によって観察すると、この重合体は線維を形成していないことを認めた。非線維形成凝集体はその表面にポリグルタミンが露出していることが 1C2 抗体の染色性から示唆され、一方このエピトープは線維形成に伴い隠される。一方線維形成後の X 線回折像は層状の β シートの存在を示した。

CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発

内在性の cAMP 応答遺伝子を指標にして、伸長ポリグルタミン鎖が、cAMP 応答遺伝子の活性化を抑制することを初めて明らかにした。この cAMP 応答遺伝子の発現抑制は、高濃度の cAMP により可逆性に回復すること、従って、cAMP 応答遺伝子の活性化をターゲットにした治療法開発が可能であることを示した。

球脊髄性筋萎縮症の病態解明と治療法開発

SBMA モデルマウスの症状は雄の Tg において重篤かつ急速に進行したが、雌では症状は遥かに軽症であった。ウエスタンブロットおよび 1C2 による免疫染色では、核内への変異 AR の集積を雄でより高頻度に認めた。去勢および LHRH アナログの投与により変異 AR の核内

集積は著明に減少し、雄 Tg の運動障害は劇的に改善した。一方、テストステロン投与により核内の変異 AR が著明に増加し、雌 Tg の運動機能は著しく低下した。Hsp70 高発現マウスとの交配によってもマウスの運動機能は改善した。病理学的には核内封入体の減少を認め、ウエスタンブロットでは凝集した変異 AR のみならず AR モノマーも減少した。

Machado-Joseph 病原因蛋白質切断酵素の解析

発現上昇が見られた遺伝子の一つが蛋白質分解酵素をコードしていることが判明した。さらに、この遺伝子は、MJD の障害部位である小脳基底核に明確な発現が認められ、現在、この蛋白質を MJD プロセシング酵素の候補と想定し、機能解析を進めている。

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

組み替えアデノウイルスによって培養神経細胞 hNT2 に伸長したポリグルタミンをコードする遺伝子を導入し、発現させることができた。DNA マイクロアレイ法を用いて、伸長のないポリグルタミンを発現させたときと比べ、発現量が 2 倍、あるいは 1/2 倍以上変化した遺伝子をスクリーニングした。発現量が低くて比較に信頼性がおけない遺伝子は除外した。その結果 5 個の遺伝子発現が誘導され、28 個の遺伝子発現が抑制された。発現の抑制が見られた遺伝子の中には代謝、転写、シグナル伝達に関わる遺伝子が複数存在した。

D. 考察

本年度の研究によって CAG リピート病に対する治療法の開発のための幾つかの着実な成果が得られた。

アルツハイマー病をはじめとして蛋白質の蓄積を主要病変とする疾患においてはアミロイド線維の形成が同定されているが、このような線維形成以前のオリゴマーが細胞毒性があるといわれている。ポリグルタミン病におけるアミロイド形成についてはそのような重合体の存在するかどうかに興味のあるところであるが、存在は明確ではなかった。本研究によってその存在及びその特性が明確になり、さらにその非線維凝集体が独自の毒性の構造上の基盤を持つことを示唆した。このような構造体の存

在から我々はポリグルタミン凝集体の細胞内機能分子のリクルートには二つのメカニズムが存在すると考える。すなわち β シートを形成した表面に露出したポリグルタミン鎖に結合する形でのポリグルタミン病共通のリクルートおよびホスト蛋白に結合する蛋白のリクルートである。同疾患の治療戦略はこの両方の凝集体形成阻止が必要と考えられた。

内在性 cAMP 応答遺伝子の活性化の障害は、これまでにわれわれが報告してきた TAF130 と伸長ポリグルタミン鎖の結合に加えて、伸長ポリグルタミン鎖による CREB のリン酸化の障害が関与している可能性が示された。

我々の SBMA モデルトランスジェニックマウスは、著しい性差をもった進行性の運動障害と神経病理所見を呈し、これらの所見はヒト SBMA に同等であった。マウスへの内分泌学的介入により、SBMA の病態にテストステロンが深く関与していることが示唆された。去勢および LHRH アナログはテストステロン分泌を減少させることで変異 AR の核内移行を抑え、症状や病理所見を改善したと考えられた。SBMA の治療薬として期待できる LHRH アナログは、すでに前立腺癌の治療薬として広く臨床で使用されており、安全性も確立されている。現在我々は、LHRH アナログを用いた SBMA 患者への臨床試験を計画中である。

発現上昇が見られた遺伝子の一つが蛋白質分解酵素をコードしていることが判明した。さらに、この遺伝子は、MJD の障害部位である小脳基底核に明確な発現が認められ、現在、この蛋白質を MJD プロセシング酵素の候補と想定し、機能解析を進めている。

伸長したポリグルタミンによる遺伝子発現プロファイルの乱れを解析することは、CAG リピート病に共通する病因と病態の解明につながると思われ、治療法の開発にも貢献できると考えられる。今までの言われているように CAG リピート病には共通点が多いが、しかしながら全ての CAG リピート病が全く同じ機序で発病し、同じ方法で治療できるとは限らない。Atrophin-1 のリン酸化はポリグルタミンの長さに影響を受けるという点からも、本研究は DRPLA に特異的な発症機序の解明と治療法の開発につながる可能性があると思われる。

E. 結論

ポリグルタミン病の病態について伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディングが重要であることを示した。アンフォールディングを促進する因子としてプロセシングの存在が示唆された。プロセシング因子の同定の可能性はこのような病態仮説に基づく治療戦略からも有効な制御対象の同定につながる。ポリグルタミンの転写調節障害仮説に基づく治療の可能性についても転写障害の解析が進み、その薬物による回復の可能性が示唆された。さらに SBMA では抗アンドロゲン療法の可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Morishima, I., Hashikawa, T., Fujisawa, T., and Nukina, N.: The effects of aggregation-inducing motifs on amyloid formation of model proteins related to neurodegenerative diseases. *Biochemistry* 41, 10277-10286, 2002.

Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1 α and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J. Neurosci.* 22, 9267-9277, 2002.

Park, T-J., Hamanaka, H., Ohshima, T., Watanabe, N., Mikoshiba, K., and Nukina, N.: Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 671-678, 2003.

Lee, J-A., Lim, C-S., Lee, S-H., Kim, H., Nukina, N., and Kaang, B-K.: Aggregate formation and the impairment of long-term synaptic facilitation by ectopic expression of mutant huntingtin in *Aplysia* neurons. *J.*

Neurochem. 85, 160-169, 2003.

Toyoshima, I., Sugawara, M., Kato, K., Wada, C., Shimohata, T., Koide, R., Onodera, O. and Tsuji, S.: Time course of polyglutamine aggregate body formation and cell death: Enhanced growth in nucleus and an interval for cell death. *J. Neurosci. Res.* 68, 442-448, 2002.

Shimohata, T., Sato, A., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Tsuji, S., Onodera, O.: Expanded polyglutamine stretches form an 'aggresome'. *Neurosci. Lett.* 323, 215-218, 2002.

Silveria, I., Miranda, C., Guimarães, L., Moreira, M.-C., Alonso, I., Mendonça, P., Ferro, A., Pinto-Basto, J., Coelho, J., Ferreirinha, F., Poirier, J., Parreira, E., Vale, J., Januário, C., Barbot, C., Tuna, A., Barros, J., Koide, R., Tsuji, S., Holmes, S.E., Margolis, R.L., Jardim, L., Pandolfo, M., Coutinho, P. and Sequeiros, J.: Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia. A small expanded(CAG)_n allele at the SCA17 locus. *Arch. Neurol.* 59: 623-629, 2002.

Yamada, M., Tsuji, S. and Takahashi, H.: Involvement of lysosomes in the pathogenesis of CAG-repeat diseases. *Ann. Neurol.* (in press).

Katsuno, M., Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G.: Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35: 843-854, 2002.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G.: HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *J. Neurosci.* 2003 (in press).

Katsuno, M., Adachi, H., Inukai, A., and Sobue,

G.: Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Cytogenet. Genome Res.* 2003 (in press).

Sang, C., Kobayashi, Y., Du, J., Katsuno, M., Adachi, H., Doyu, M., and Sobue, G.: c-Jun N-terminal kinase pathway mediates Lactacystin-induced cell death in a neuronal differentiated Neuro2a cell line. *Mol. Brain Res.* 2003 (in press).

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H.: ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Dev.* 16: 1345-1355, 2002.

Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., and Kakizuka, A.: Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 9: 264-273, 2002.

Kobayashi, T., Tanaka, K., Inoue, K., and Kakizuka, A.: Functional ATPase activity of p97/VCP is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 47358-47365, 2002.

Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., and Fujita, T.: Circumvention of chaperone requirement for aggregate formation of a short polyglutamine tract by the co-expression of a long polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 277: 37536-37541, 2002.

Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A., and Okamoto, K.: Vacuole-creating protein in neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.* 2003 (in press).

Kobayashi, T., and Kakizuka, A.: Molecular

analyses of Machado-Joseph disease. *Cytogenet. Genome Res.* 2003 (in press).

Shikama, Y., Shen, L., Yonetani, M., Miyauchi, J., Miyashita, T., and Yamada, M.: Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 484-493, 2002.

Inoue, H., Takemura, H., Kawai, Y., Yoshida, A., Ueda, T., and Miyashita, T.: Dexamethasone-resistant human pre-B leukemia 697 cell line evolving elevation of intracellular glutathione level: an additional resistance mechanism. *Jpn. J. Cancer Res.* 93: 582-590, 2002.

Yoshida, N.-L., Miyashita, T., U, M., Yamada, M., Reed, J. C., Sugita, Y., and Oshida, T.: Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 1254-1261, 2002.

Fujii, K., Miyashita, T., Omata, T., Kobayashi, K., Takanashi, J., Kouchi, K., Yamada, M., and Kohno, Y.: Gorlin syndrome with ulcerative colitis in a Japanese girl. *Am. J. Med. Genet.* (in press).

Fujii, K., Sugita, K., Kohno, Y., Nakamura, M., Moroi, Y., Urabe, K., Furue, M., Yamada, M., and Miyashita, M.: Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum. Mutat.* (in press).

Yanagisawa, H., Miyashita, T., Nakano, Y., and Yamamoto, D.: HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-x_L, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ.* (in press).

2. 学会発表

Nukina, N., Jana, N-R., and Mitsui, K.:

Chaperone and proteasome system in polyglutamine disease. Cold Spring Harbor Laboratory 2002 Meeting on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response (Cold Spring Harbor, USA), May 2002.

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Morishima, I., and Hashikawa, T.: Structural and biochemical properties of aggregation-inducing motifs in chimera myoglobins as a model for neurodegenerative diseases. Cold Spring Harbor Laboratory 2002 Meeting on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response (Cold Spring Harbor, USA), May 2002.

Nukina, N., Jana N-R., Tanaka M., Maruyama M., and Machida Y.: Misfolding triggers the ubiquitination of polyglutamine-expanded protein. 7th European Congress of Neuropathology NEUROPATHOLOGY 2002 (Helsinki, Finland), July 2002.

Oyama, F., Kotliarova, S-E., Harada, A., Ito, M., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N., and Ihara, Y.: Gene expression alterations in tau-deficient mice. The American of Human Genetics 52nd Annual Meeting (Baltimore, USA), Oct. 2002.

Mitsui, K., Itakura, C., and Nukina, N.: Analysis of protein expression pattern in hepatocytes isolated from HD transgenic mice by 2D-DIGE method. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., Tsuji, S., and Nukina, N.: Generation of model mice for multiple system atrophy. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Nukina, N., Jana, N-R., Tanaka, M., Maruyama, M., Miyazaki, H., Machida, Y., and Taniguchi, H.: Misfolding triggers the ubiquitination of polyglutamine-expanded ataxin-3, the defective

gene product in SCA3/MJD. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Sakurai, T., Okuno, M., Akagi, T., Kobayashi, Y., Kaneko, K., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Association of amyloid precursor protein with specialized lipid rafts in brain: possible involvement in its physiological functions and processing. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Nukina, N.: Structural basis for polyglutamine disease pathogenesis. 1st International Workshop "Frontiers in Molecular Neuropathology" (Wako, Japan), Nov. 2002.

Nukina, N.: Molecular pathomechanism of polyglutamine disease. 20th Annual Session of Indian Academy of Neuroscience (Udaipur, India), Feb. 2003.

Katsuno, M., Adachi, H., Kume, A., and Sobue, G.: Transgenic mouse model of spinal and muscular atrophy. The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2002 (Baltimore, USA), Oct. 2002.

Adachi, H., Katsuno, M., Kume, A., and Sobue, G.: Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. The Society for Neuroscience Annual Meeting 2002 (Orlando, USA), Nov. 2002.

Miyashita, T.: Polyglutamine-mediated cell death and caspases. 1st International Workshop "Frontiers in Molecular Neuropathology" (Wako, Japan), Nov. 2002.

Shikama, Y., Yamada, M., and Miyashita, T.: NF- κ B activation pathways induced by caspase-8 and -10 prodomains. APOPTOSIS 2003 - From signaling pathways to therapeutic tools (Luxembourg, Luxembourg), Jan. 2003.

岩田 淳, 丸山美枝子, 金澤一郎, 貫名信行. 多系統萎縮症モデルマウス作成の試み. 第43回日本神経学会総会(札幌), 2002年5月

貫名信行. ポリグルタミン病の分子病態と治療戦略. 第5回兵庫神経セミナー(神戸), 2002年7月

貫名信行, 櫻井 隆. アミロイド前駆蛋白質と膜ラフト. 埼玉大学・群馬大学合同シンポジウムーポストゲノム時代における神経・内分泌系の分子細胞生物学(前橋), 2002年9月

山田将輝, 平澤明, 勝間進, 塩島聡, 伊川浩司, 山下絢子, 宮下俊之, 辻本豪三: グルココルチコイドによるヒト白血病細胞のアポトーシス誘導に関与する遺伝子. 第75回日本薬理学会年会(熊本), 2002年3月

井上 仁, 武村晴行, 吉田明, 河合泰一, 上田孝典, 宮下俊之: 697白血病細胞株におけるdexamethasone及びVincristine同時薬剤耐性株の樹立と耐性機序の解明. 第61回日本癌学会総会(東京), 2002年10月

山田孝之, 山田聖子, 菅原祐之, 小野真, 澤正之, 三宅智, 湯浅保, 宮下俊之, 寺岡弘文, 水谷修紀: HDARTはp53の正常な機能発現に必須の遺伝子である. 第61回日本癌学会総会(東京), 2002年10月

鹿間芳明, 宮下俊之, 山田正夫: カスパーゼ8, 10のプロドメインによるNF- κ B活性化メカニズムの検討. 第61回日本癌学会総会(東京), 2002年10月

宮下俊之, 鹿間芳明, 山田正夫: 白血病細胞におけるグルココルチコイド標的遺伝子の解析. 第61回日本癌学会総会(東京), 2002年10月

藤井克則, 山田正夫, 河野陽一, 宮下俊之: Gorlin症候群日本人家系におけるPTCH遺伝子解析. 第25回日本分子生物学会年会(横浜), 2002年12月

於保祐子, 山崎麻由, 宮下俊之, 山田正夫:
DRPLA 蛋白の翻訳後修飾. 第 25 回日本分子
生物学会年会(横浜), 2002 年 12 月

禹麻美, 宮下俊之, 宮内潤, 吉田寧, 杉田雄
二, 押田忠弘, 山田正夫: グルココルチコイ
ドによって誘導される標的遺伝子の解析.
第 25 回日本分子生物学会年会(横浜), 2002
年 12 月

長尾和右, 於保祐子, 宮下俊之, 山田正夫:
DRPLA 蛋白の機能解析. 第 25 回日本分子生
物学会年会(横浜), 2002 年 12 月

柳澤比呂子, 宮下俊之, 中野芳朗, 山元大輔:
キイロシヨウジョウバエ Spin のヒト相同蛋
白質によるカスパー非依存的な細胞死.
第 25 回日本分子生物学会年会(横浜), 2002
年 12 月

山田孝之, 山田聖子, 菅原祐之, 小野真, 中
田慎一郎, 勝木陽子, 長澤正之, 三宅智, 湯
浅保, 宮下俊之, 寺岡弘文, 水谷修紀:
HDART は p53 の正常な機能発現に必須の遺

伝子である. 第 25 回日本分子生物学会年会
(横浜), 2002 年 12 月

山田聖子, 山田孝之, 菅原祐之, 小野真, 中
田慎一郎, 勝木陽子, 宮下俊之, 寺岡弘文,
水谷修紀: 核内レセプターの新規転写抑制
因子 HDART の機能解析. 第 25 回日本分子
生物学会年会(横浜), 2002 年 12 月

宮下俊之: 細胞死を制御する遺伝子のアイ
ソフォームとその機能解析. 平成 14 年度 基
礎生物学研究所 共同利用研究会(岡崎),
2002 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト
動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤. 2002
年 8 月 19 日出願(特願 2002-238599).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

1. CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発

主任研究者 貫名 信行

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

研究要旨

ポリグルタミンの伸長による宿主蛋白構造変化を X 線小角散乱法によって解析した。Mb-Q50 を X 線小角散乱法で解析する過程で線維形成前に特異な重合体の形成を検出し、電子顕微鏡像ではこの重合体は線維を形成していないことを認めた。非線維形成凝集体はその表面にポリグルタミンが露出していることが 1C2 抗体の染色性から示唆され、一方このエピトープは線維形成に伴い隠される。このような現象は非線維形成凝集体が独自の毒性の構造上の基盤を持つことを示唆し、この構造変化はポリグルタミン病治療のターゲットとなると考えられた。

A. 研究目的

CAG リピート病の病態においてポリグルタミン凝集体の形成が、重要な役割を果たす可能性が、疾患脳の病理やモデルマウスの病理において核内封入体が形成されること、細胞モデルにおいて凝集体形成が細胞死と関連することから示唆されている。我々は 1) 細胞モデル系においてシャペロン系がこれらの凝集体形成以前の可溶性の伸長ポリグルタミン含有蛋白を認識すること、2) さらにこの細胞モデル系ではプロテアソームが伸長したポリグルタミンの発現とともに不溶性分画にシフトし、これによってプロテアソーム活性が低下し、P53 などの基質の上昇が認められることを示した。さらにポリグルタミンをミオグロビンに挿入した分子モデルを用いた検討によって伸長したポリグルタミンは分子内ベータシートを形成すること、時間とともに分子間ベータシートを形成してアミロイド線維となることを示した。また伸長したポリグルタミンの宿主蛋白は部分的アンフォールディングの状態をとっていることを示した。このような結果から我々は伸長したポリグルタミンはこれを含む遺伝子産物の部分的アンフォールディングを引き起こし、この変化をシャペロン系が認識し、リフォールディングを試みるが、これが十分働かない場合タンパク分解系としてプロテアソームが働くが、伸長したポリグルタミンの沈着がこ

の機能を阻害し、その基質の蓄積をもたらし、細胞死をもたらすという病態仮説をうち立てた。この仮説からポリグルタミンの発症予防の方針としては 1) 異常ポリグルタミンの発現を抑える、2) 異常ポリグルタミン含有蛋白の分解を促進する、3) 異常ポリグルタミン含有蛋白のアンフォールディングを抑えるといった方向が考えられる。本研究ではポリグルタミン含有蛋白の構造解析をさらに進め、ポリグルタミン伸長に伴い非線維性凝集体が形成されることを示し、この構造はポリグルタミンが表面に露出し、種々の蛋白のリクルートをおこしやすくなる可能性を示した。

B. 研究方法

われわれはポリグルタミン鎖を安定性の極めて高い蛋白質の一つであるマッコウクジラミオグロビンへ挿入し、ポリグルタミン鎖の構造およびポリグルタミン挿入に伴う宿主蛋白の構造変化を検討した。その結果変異型ミオグロビンに挿入された伸長したポリグルタミン鎖は分子内ベータシート構造をとっていることが判明した。また、35、50 のリピート数をもつミオグロビンは凝集体を形成し始めると分子間ベータシート構造を含んでいることが明らかになった。我々は線維形成過程の解析で中間体形成が他のアミロイド形成タンパクと同様に認められるかどうかを分析用超遠心

などを用いて検討したが、検出できなかった。アミロイドベータタンパクなどでは *protofibril* の方が毒性は強いといわれており、ポリグルタミンにおいても同様のものが存在するか、存在するとすればその構造上の特性は何かという点は重要である。そこで理研播磨研究所の Spring8 を用いて X 線回折と X 線小角散乱法による解析を行った。

(倫理面への配慮)

蛋白を用いた実験系であり、倫理面での問題は生じないと考える。

C. 研究結果

Mb-Q50 を X 線小角散乱法で解析する過程で線維形成前に特異な重合体の形成を検出し、これが Mb-Q35 では認められないことを確認した。この重合体は分子間ベータシート形成前に出現し、その形成は温度依存性であった。さらに X 線小角散乱法でその重合体の存在が確認された時間帯で電子顕微鏡像によって観察すると、この重合体は線維を形成していないことを認めた。非線維形成凝集体はその表面にポリグルタミンが露出していることが 1C2 抗体の免疫電顕による染色性から示唆され、一方このエピトープは線維形成に伴い隠される。一方線維形成後の X 線回折像は層状のベータシートの存在を示した。

D. 考察

アルツハイマー病をはじめとして蛋白の蓄積を主要病変とする疾患においてはアミロイド線維の形成が同定されているが、このような線維形成以前のオリゴマーが細胞毒性があるといわれている。ポリグルタミン病におけるアミロイド形成についてはそのような重合体の存在するかどうかに興味のあるところであるが、存在は明確ではなかった。本研究によってその存在及びその特性が明確になり、さらにその非線維凝集体が独自の毒性の構造上の基盤を持つことを示唆した。このような構造体の存在から我々はポリグルタミン凝集体の細胞内機能分子のリクルートには二つのメカニズムが存在すると考える。すなわちベータシートを形成した表面に露出したポリグルタミン鎖に結合する形でのポリグルタミン病共通のリクルートおよびホスト蛋白に結合する蛋白のリ

クルートである。同疾患の治療戦略はこの両方の凝集体形成阻止が必要と考えられた。

E. 結論

ポリグルタミン病の病態について伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディングに伴い、非線維性凝集体が形成されることを示した。このような凝集体はポリグルタミンが凝集体表面に存在するため、種々の細胞内因子のリクルートを引き起こすことが想定され、ポリグルタミン病の治療における主要なターゲットとなると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Morishima, I., Hashikawa, T., Fujisawa, T., and Nukina, N.: The effects of aggregation-inducing motifs on amyloid formation of model proteins related to neurodegenerative diseases. *Biochemistry* 41, 10277-10286, 2002.

Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1 α and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J. Neurosci.* 22, 9267-9277, 2002.

Park, T-J., Hamanaka, H., Ohshima, T., Watanabe, N., Mikoshiba, K., and Nukina, N.: Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 671-678, 2003.

Lee, J-A., Lim, C-S., Lee, S-H., Kim, H., Nukina, N., and Kaang, B-K.: Aggregate formation and the impairment of long-term synaptic facilitation by ectopic expression of mutant huntingtin in *Aplysia* neurons. *J. Neurochem.* 85, 160-169, 2003.

2. 学会発表

Nukina, N., Jana, N-R., and Mitsui, K.: Chaperone and proteasome system in polyglutamine disease. Cold Spring Harbor Laboratory 2002 Meeting on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response (Cold Spring Harbor, USA), May 2002.

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Morishima, I., and Hashikawa, T.: Structural and biochemical properties of aggregation-inducing motifs in chimera myoglobins as a model for neurodegenerative diseases. Cold Spring Harbor Laboratory 2002 Meeting on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response (Cold Spring Harbor, USA), May 2002.

Nukina, N., Jana N-R., Tanaka M., Maruyama M., and Machida Y.: Misfolding triggers the ubiquitination of polyglutamine-expanded protein. 7th European Congress of Neuropathology NEUROPATHOLOGY 2002 (Helsinki, Finland), July 2002.

Oyama, F., Kotliarova, S-E., Harada, A., Ito, M., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N., and Ihara, Y.: Gene expression alterations in tau-deficient mice. The American of Human Genetics 52nd Annual Meeting (Baltimore, USA), Oct. 2002.

Mitsui, K., Itakura, C., and Nukina, N.: Analysis of protein expression pattern in hepatocytes isolated from HD transgenic mice by 2D-DIGE method. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., Tsuji, S., and Nukina, N.: Generation of model mice for multiple system atrophy. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Nukina, N., Jana, N-R., Tanaka, M., Maruyama, M., Miyazaki, H., Machida, Y., and Taniguchi, H.: Misfolding triggers the ubiquitination of

polyglutamine-expanded ataxin-3, the defective gene product in SCA3/MJD. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Sakurai, T., Okuno, M., Akagi, T., Kobayashi, Y., Kaneko, K., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Association of amyloid precursor protein with specialized lipid rafts in brain: possible involvement in its physiological functions and processing. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA), Nov. 2002.

Nukina, N.: Structural basis for polyglutamine disease pathogenesis. 1st International Workshop "Frontiers in Molecular Neuropathology" (Wako, Japan), Nov. 2002.

Nukina, N.: Molecular pathomechanism of polyglutamine disease. 20th Annual Session of Indian Academy of Neuroscience (Udaipur, India), Feb. 2003.

岩田 淳, 丸山美枝子, 金澤一郎, 貫名信行. 多系統萎縮症モデルマウス作成の試み. 第43回日本神経学会総会 (札幌), 2002年5月

貫名信行. ポリグルタミン病の分子病態と治療戦略. 第5回兵庫神経セミナー (神戸), 2002年7月

貫名信行, 櫻井 隆. アミロイド前駆蛋白質と膜ラフト. 埼玉大学・群馬大学合同シンポジウム-ポストゲノム時代における神経・内分泌系の分子細胞生物学(前橋), 2002年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発

分担研究者 辻 省次

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科

研究要旨

内在性の cAMP 応答遺伝子を指標にして、伸長ポリグルタミン鎖が、cAMP 応答遺伝子の活性化を抑制することを明らかにした。この cAMP 応答遺伝子の発現抑制は、高濃度の cAMP により可逆的に回復すること、従って、cAMP 応答遺伝子の活性化をターゲットにした治療法開発が可能であることを示した。内在性 cAMP 応答遺伝子の活性化の阻害は、これまでにわれわれが報告してきた TAF130 と伸長ポリグルタミン鎖の結合に加えて、伸長ポリグルタミン鎖による CREB のリン酸化の阻害が関与している可能性が示された。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の治療法開発のためには、伸長ポリグルタミン鎖によって引き起こされる細胞障害機構を明らかにする必要がある。われわれの研究室では歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症を対象として、培養細胞系、トランスジェニックマウスのモデルを用いて細胞障害機構の解析を行ってきた。その結果、伸長ポリグルタミン鎖の核移行と、核内集積が細胞障害機構に必須であること、さらに、伸長ポリグルタミン鎖が核内転写アクティベーターの1つである TAF130 と結合して、CREB-依存性転写活性化を障害することを明らかにしてきた。

これまでの研究では、CREB-依存性転写活性化を GAL4 レポーター遺伝子を用いて解析してきた。しかしながら、実際に内在性の cAMP-依存性遺伝子の活性化が伸長ポリグルタミン鎖によって障害されるかどうかについての解析は行われておらず、レポーター遺伝子を用いての解析がどの程度生理的なメカニズムを反映しているかが不明であった。

そこで、代表的な cAMP 遺伝子の1つである、c-Fos 遺伝子に着目して、その転写活性化が伸長ポリグルタミン鎖によって阻害されるかどうか、その阻害を緩和することができるかどうかについて検討を行った。

B. 研究方法

内在性 cAMP 遺伝子の活性化を解析する細胞としては、Neuro2a 細胞を用いた。伸長ポリグルタミン鎖を発現させるプラスミドとして、部分 DRPLA タンパクをコードする cDNA、核移行シグナル、GFP をコードする cDNA を組み込んだ。ポリグルタミン鎖としては 0, 19 または 57 を用いた (pT-DRPLA (Q0, 19, or 57)-NLS-GFP)。transient expression によって伸長ポリグルタミン鎖を発現する細胞を選択的に enrich するために、CD4 surface marker を発現する pMACS4.1 を co-transfection し、the MACSelect4 を用いて、CD4 surface marker を発現する細胞を enrich した。

c-Fos, リン酸化 CREB については、Western blotting により解析した。

C. 研究結果

Neuro2a 細胞を、膜透過性 cAMP analogue である CPT-cAMP 存在下に培養した。0.1mM あるいは 2mM CPT-cAMP 存在下で培養した場合、c-Fos の発現は 2-3 時間でピークに達し、6 時間まで持続した。CREB のリン酸化 (p-CREB) は、c-Fos よりも少し早く 1-2 時間でピークに達し、3 時間持続した。

次に、pT-DRPLA (Q0)-NLS-GFP、pT-DRPLA (Q19)-NLS-GFP、pT-DRPLA (Q57)-NLS-GFPのいずれかを導入して、部分DRPLAタンパクを発現させ、c-Fos、p-CREBの挙動を解析した。この実験系では、transient expressionであるために、部分DRPLAを発現する細胞と、発現しない細胞が混在する。cAMP刺激による、cAMP応答遺伝子の挙動を見る場合、両者の細胞が混在するとデータの解釈が非常に困難となる。そのために、部分DRPLAタンパクを発現させる場合に、同時にCD4 surface markerを発現するプラスミドをco-transfectし、CD4 surface markerを発現する細胞をMACSelect4を用いてenrichした。このenrichmentにより、DRPLA部分タンパクを発現する細胞が $38.2 \pm 2.6\%$ (n=15)から $80.6 \pm 3.4\%$ (n=15)にenrichすることができた。

伸長ポリグルタミン鎖を発現した場合、0.1mM CPTcAMP刺激では、c-Fos、p-CREBの発現が非常に強く抑制されることが示された。興味深いことに、この抑制は、Q0、Q19、Q57と伸長ポリグルタミン鎖の鎖長に依存して強くなることが示された。これに対して、2mM CPTcAMPという高濃度刺激を行った場合には、c-Fos、p-CREBの発現抑制が完全に回復することが示された。

D. 考察

これまでの研究で、伸長ポリグルタミン鎖が転写子アクティベーターの1つであるTAF130と結合してCREB-依存性転写活性化を抑制することを、GAL4レポーター遺伝子を用いて報告してきた。今回の研究では、レポーター遺伝子を用いず、代表的なcAMP応答遺伝子であるc-Fosに着目しその転写活性化を指標に検討した。その結果、c-Fosの発現が伸長ポリグルタミン鎖により強く阻害されることを確認することができた。さらに興味深いことに、c-Fosの発現の抑制は、ポリグルタミン鎖の鎖長に依存することが示され、Q19によっても軽度ながら阻害がかかることが示された。このことは、ポリグルタミン鎖が生理的な鎖長において何らかの生理的な機能を有している可能性が示唆されその点で興味深い。

今回の結果で興味深い点は、伸長ポリグルタミン鎖によって、CREBのリン酸化も強く抑制

されたことである。CREBのリン酸化は、cAMP存在下によってprotein kinase Aが活性化された結果であると考えられる。時間経過を見ると、CREBのリン酸化がc-Fosの発現に先立って観察されており、さらに、CREBのリン酸化とc-Fosの発現は常に並行して動いていることから、c-Fosの発現の阻害がCREBのリン酸化の阻害の結果を反映している可能性がある。すなわち、c-Fosの発現の抑制には、伸長ポリグルタミン鎖とTAF130の結合によって阻害される可能性に加えて、伸長ポリグルタミン鎖が何らかの機序でCREBのリン酸化を直接的に阻害する可能性が考えられる。伸長ポリグルタミン鎖は、TAF130以外にもCBPなど基本転写因子の複数の構成成分と結合することが示されており、このような結合の結果、CREBのリン酸化を間接的に阻害している可能性も考えられる。

伸長ポリグルタミン鎖によるc-Fosの発現の阻害が、cAMP濃度を高濃度にするによって、可逆的に回復したことは、伸長ポリグルタミン鎖によって引き起こされる転写障害が可逆性のものであり、従って、cAMP応答遺伝子の転写を活性化することによりポリグルタミン病の治療法として応用できる可能性を示唆している。

現在、同一のintegration siteで、さまざまな鎖長の(Q76, Q96, Q113, Q129)全長の変異DRPLA遺伝子を単一コピーで有するトランスジェニックマウスが我々の研究室で確立されており、このような治療法の可能性を検討していく予定である。

E. 結論

内在性のcAMP応答遺伝子を指標にして、伸長ポリグルタミン鎖が、cAMP応答遺伝子の活性化を抑制することを初めて明らかにした。このcAMP応答遺伝子の発現抑制は、高濃度のcAMPにより可逆的に回復すること、従って、cAMP応答遺伝子の活性化をターゲットにした治療法開発が可能であることを示した。内在性cAMP応答遺伝子の活性化の阻害は、これまでにわれわれが報告してきたTAF130と伸長ポリグルタミン鎖の結合に加えて、伸長ポリグルタミン鎖によるCREBのリン酸化の阻害が関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toyoshima, I., Sugawara, M., Kato, K., Wada, C., Shimohata, T., Koide, R., Onodera, O. and Tsuji, S.: Time course of polyglutamine aggregate body formation and cell death: Enhanced growth in nucleus and an interval for cell death. *J. Neurosci. Res.* 68, 442-448, 2002.

Shimohata, T., Sato, A., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Tsuji S., Onodera, O.: Expanded polyglutamine stretches form an 'aggresome'. *Neurosci. Lett.* 323, 215-218, 2002.

Silveria, I., Miranda, C., Guimarães, L., Moreira, M.-C., Alonso, I., Mendonça, P., Ferro, A.,

Pinto-Basto, J., Coelho, J., Ferreirinha, F., Poirier, J., Parreira, E., Vale, J., Januário, C., Barbot, C., Tuna, A., Barros, J., Koide, R., Tsuji, S., Holmes, S.E., Margolis, R.L., Jardim, L., Pandolfo, M., Coutinho, P. and Sequeiros, J.: Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia. A small expanded(CAG)*n* allele at the SCA17 locus. *Arch. Neurol.* 59: 623-629, 2002.

Yamada, M., Tsuji, S. and Takahashi, H.: Involvement of lysosomes in the pathogenesis of CAG-repeat diseases. *Ann. Neurol.* (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. 球脊髄性筋萎縮症の病態解明と治療法開発

分担研究者 祖父江 元
名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科

研究要旨

球脊髄性筋萎縮症のトランスジェニックマウスにおいて、症状および病理所見は雄マウスにおいて重篤かつ急速に進行したが、雌ではほとんど認めなかった。雄への去勢や LHRH アナログ投与は、テストステロン分泌を減少させることで変異 AR の核内移行を抑え、症状や病理所見を著明に改善した。また、Hsp70 は、変異 AR を refolding のみならず、その degradation を促進し、病態を改善した。

A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、成人男性のみに発症する下位運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体 (AR) 第 1 エクソン内の CAG リピートの異常延長が原因である。我々は、SBMA のトランスジェニックマウス (Tg) を作成し、その病態を解明し臨床応用可能な治療の開発を行った。

B. 研究方法

チキン B-プロモーター調節下に 97CAG を有するヒト AR を pCAGGS ベクターにサブクローニングし、microinjection にて Tg を作成した。去勢は 4 週齢の雄マウスに、ケタミン-キシラジン麻酔下で経腹腔的に施行した。雌には、20 µg のエナン酸テストステロンを 4 週齢から週 1 回皮下投与した。また、Hsp70 高発現マウスとの交配で、ダブルトランスジェニックマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋大学動物実験指針に基づき、動物の苦痛の緩和除去に十分配慮した。

C. 研究結果

症状は雄の Tg において重篤かつ急速に進行したが、雌では症状は遥かに軽症であった。ウエスタンブロットでは、ゲル上部に留まる変異 AR の発現は雄でより大量に認め、その殆どは核分画に存在していた。IC2 による免疫染色では、核のびまん性染色や核内封入体を雄でより

高頻度に認めた。去勢により、雄 Tg の運動障害は著しく改善し、ウエスタンブロットや免疫染色での変異 AR の核内集積は、去勢により劇的に改善した。LHRH アナログの投与では去勢と同等の表現型抑制効果が認められ、運動機能や病理所見は著しく改善したが、アンドロゲンアンタゴニストの投与では治療効果は認めなかった。一方、テストステロン投与により雌 Tg の運動機能は著しく低下し、ウエスタンブロットおよび免疫染色では核内の変異 AR がテストステロン投与により著明に増加した。

Hsp70 高発現によりマウスの運動機能は改善した。病理学的には核内封入体の減少を認め、ウエスタンブロットでは凝集した変異 AR のみならず AR モノマーも減少した。

D. 考察

去勢および LHRH アナログはテストステロン分泌を減少させることで変異 AR の核内移行を抑え、症状や病理所見を改善した。アンドロゲンアンタゴニストは AR 機能は抑制するが AR の核内移行は抑制しないため、表現型を改善できないと考えられた。また、Hsp70 は、変異 AR を refolding することで毒性を軽減するのみならず、その degradation を促進することで、結果として核内に蓄積する変異 AR の量を減少させ、病態を改善させるものと考えられた。

E. 結論

LHRH アナログによるホルモン療法は SBMA の治療として期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Katsuno, M., Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G.: Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35: 843-854, 2002.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama M., Sang, C., Pagoulatos, G., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue G.: HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *J. Neurosci.* 2003 (in press).

Katsuno, M, Adachi, H., Inukai, A., and Sobue, G.: Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Cytogenet. Genome Res.* 2003 (in press).

Sang, C., Kobayashi, Y., Du, J., Katsuno, M., Adachi, H., Doyu, M., and Sobue, G.: c-Jun N-terminal kinase pathway mediates Lactacystin-induced cell death in a neuronal differentiated Neuro2a cell line. *Mol. Brain Res.* 2003 (in press).

2. 学会発表

Katsuno, M., Adachi, H., Kume, A., and Sobue, G.: Transgenic mouse model of spinal and muscular atrophy. The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2002 (Baltimore, USA), Oct. 2002.

Adachi, H., Katsuno, M., Kume, A., and Sobue, G.: Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. The Society for Neuroscience Annual Meeting 2002 (Orland, USA), Nov. 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤。2002年8月19日出願(特願2002-238599)。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

4. Machado-Joseph 病原因蛋白質切断酵素の解析

分担研究者 垣塚 彰
京都大学大学院生命科学研究科

研究要旨

Machado-Joseph 病(MJD)蛋白質を効率よくプロセシングする細胞で親株に比して mRNA の発現レベルが上昇および低下している遺伝子群を DNA チップを用いて同定した。発現上昇が見られた遺伝子の一つが蛋白質分解酵素をコードしていることが判明した。さらに、この遺伝子は、MJD の障害部位である小脳基底核に明確な発現が認められ、現在、この蛋白質を MJD プロセシング酵素の候補と想定し、機能解析を進めている。

A. 研究目的

研究分担者は、これまで、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提唱してきた。本研究では、MJD の発症の第1ステップを担うと考えられる MJD 蛋白質の切断酵素の同定を目指し、さらに、同定した酵素の阻害剤を探ることで、MJD の発症予防の手がかりをつかむことを目的とする。

B. 研究方法

昨年までに同定した Machado-Joseph 病(MJD)蛋白質を効率よくプロセシングする細胞で、親株に比べて発現量の変動している遺伝子について、DNA チップを用いてそれらの同定を行い、その遺伝子がコードする蛋白質の構造解析を行い、MJD 蛋白質のプロセシング酵素の候補遺伝子を探った。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞を使った研究であり、倫理的な問題点は無い。

C. 研究結果

昨年までに分離した MJD 蛋白質の高いプロセシング活性を有する細胞株で親株に比して発現上昇が見られた遺伝子と発現減少が見られた遺伝子を DNA チップを用いてそれぞれ数個同定した。発現上昇が見られた遺伝子の中

にプロセアーゼの構造を持つものが一個あり、現在その分子の機能解析を行っている。この遺伝子は、ラットの脳に対する *in situ* hybridization で、MJD の障害部位である小脳基底核に明確な発現が見られた。

D. 考察

Machado-Joseph 病(MJD)蛋白質を効率よくプロセシングする細胞で親株に比して mRNA の発現レベルが上昇および低下している遺伝子群を DNA チップを用いて同定した。発現上昇が見られた遺伝子の一つが蛋白質分解酵素をコードしていることが判明し、さらに、この遺伝子は、MJD の障害部位である小脳基底核に明確な発現が認められた。現在、この遺伝子産物の過剰発現や RNAi を用いた発現抑制によって MJD 蛋白質のプロセシング活性に与える影響を解析中である。一方、この酵素は遺伝子ファミリーを形成しており、他の類縁蛋白質が介与する可能性も考慮する必要がある。一方、同時に同定された発現変動が認められた遺伝子群は、MJD 蛋白質のプロセシング後に細胞で引き起こされる生体反応に関わる遺伝子群である可能性があり、その詳細な解析も MJD の分子機構を探る上で重要であると考えられる。さらに、この酵素活性の阻害剤を探ることで、Machado-Joseph 病の発症を予防する薬剤を探っていきたい。