

E. 結論

Machado-Joseph 病蛋白質を特異的に限定分解する蛋白質の候補を同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

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

5. 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

分担研究者 宮下 俊之
国立成育医療センター研究所

研究要旨

責任遺伝子内に存在する CAG リピートの伸長によって発症する CAG リピート病について、伸長したリピートによりどのような分子機構によって神経細胞が死に至るのか、また疾患ごとに特定の脳部位（あるいは特定の神経細胞群）で神経細胞死が見られるが、その組織特異性を決定する分子機構は何かに関して、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）に焦点を当てて研究を進めてきた。前者に関しては、培養神経細胞にアデノウイルスベクターを用いて伸長したポリグルタミンを発現させ、発現が変化する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて解析することにより、発現が誘導される遺伝子 5 個と、抑制される遺伝子 28 個を得た。後者の課題に関連して、DRPLA 蛋白質（atrophin-1）の正常機能の解明も重要と考え解析を進めた結果、atrophin-1 が JNK によってリン酸化されることを見出した。

A. 研究目的

遺伝性神経変性疾患の範疇に属する CAG リピート病は、責任遺伝子が発見された後も、発症機序に関しては不明な点が多く、従って治療法も確立されていない。最近、DRPLA 蛋白質のショウジョウバエにおける相同分子 Atro が転写因子の corepressor であるという報告がなされた。ポリグルタミンによって影響を受ける可能性のある転写因子に関しては CREB-binding protein 等いくつか報告されているが、実際にどのような遺伝子が標的になっているかは明らかでない。そこで我々は、伸長したポリグルタミンの発現により神経細胞の転写プロフィールがいかに変化するかを DNA マイクロアレイ法を用いて解析した。

一方で 8 種類ほど知られているポリグルタミン病それぞれの病変部位の特異性に関しては、伸長したポリグルタミンによる gain of function のみでは説明できないと考えられる。そこで我々は atrophin-1 の正常機能を探る目的で atrophin-1 のリン酸化について解析した。

以上の研究は CAG リピート病の病態の解明に基づいた治療法の開発に貢献すると考えられる。

B. 研究方法

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。

一方、*in vitro* で翻訳合成した atrophin-1、または GST-atrophin-1 融合蛋白質を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と共に活性化型 JNK3 と *in vitro* で反応させ、リン酸化された Atrophin-1 をオートラジオグラフィで検出した。この方法で明らかとなったリン酸化部位を用いてリン酸化 Atrophin-1 に特異的な抗体を作製し、内因性の Atrophin-1 のリン酸化をウェスタンブロット法で解析した。

（倫理面への配慮）

ヒトの検体を用いた実験は行わなかった。実験

動物を用いた解析では、麻酔等により苦痛の除去に努めた。

C. 研究結果

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。

また、GST-Atrophin-1 融合蛋白質(野生型と Ser734 を Ala に置換した変異体)を活性化型 JNK と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の存在下で反応させ、リン酸化された GST-Atrophin-1 をオートラジオグラフィで検出したところ、野生型のみがリン酸化されたことより、Atrophin-1 の Ser734 が JNK によってリン酸化を受けることを見出した。興味あることに、ポリグルタミンが伸長しているとリン酸化されにくくなることが明らかとなった。またリン酸化された Atrophin-1 の特異的な抗体を用いてラットの脳を解析したところ、内因性の Atrophin-1 も確かにリン酸化されていることが判明した。

D. 考察

伸長したポリグルタミンによる遺伝子発現プロフィー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

培養神経細胞にアデノウイルスベクターを用いて伸長したポリグルタミンを発現させ、発

現が変化する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて解析することにより、発現が誘導される遺伝子5個と、抑制される遺伝子28個を得た。また Atrophin-1 は Ser734 が JNK によってリン酸化を受けることが明らかとなり、それはポリグルタミンの伸長である程度抑制された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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.

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: キイロショウジョウバエ Spin のヒト相同蛋白質によるカスパーゼ非依存的な細胞死. 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮下俊之	アポトーシスに関与する遺伝子とその異常に起因する疾患	伊藤文之	小児内科	東京医学社	東京	2002	1725-1730

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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., and Onodera, O.	Expanded polyglutamine stretchers 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		

Niwa, J., Ishigaki, S., Hishikawa, N., Yamamoto, M., Doyu, M., Murata, S., Tanaka, K., Taniguchi, N., and Sobue, G.	Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity	J. Biol. Chem.	277	36793 -36798	2002
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
Ishigaki, S., Liang, Y., Yamamoto, M., Niwa, J., Ando, Y., Yoshihara, T., Takeuchi, H., Doyu, M., and Sobue, G.	X-linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD-1 mediated neuronal degeneration	J. Neurochem.	82	576 -584	2002
Watanabe, H., Saito, Y., Terao, S., Ando, T., Kachi, T., Mukai, E., Aiba, K., Abe, Y., Tamakoshi, A., Doyu, M., Hirayama, M., and Sobue, G.	Progression and prognosis in multiple system atrophy. An analysis of 230 Japanese patients	Brain	125	1070 -1083	2002
Mori, K., Hattori, N., Sygiura, M., Koike, H., Misu, K., Ichimura, M., Hirayama, M., and Sobue, G.	Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features of GBS	Neurology	58	979 -982	2002
Ikeda, S., Nakazato, M., Ando, Y., and Sobue, G.	Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan	Neurology	58	1001 -1007	2002
Yoshihara, T., Ishigaki, S., Yamamoto, M., Liang, Y., Niwa, J., Takeuchi, H., Doyu, M., and Sobue, G.	Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis	J. Neurochem.	80	158 -167	2002
Koike, H., Misu, K., Ikeda, S., Ando, Y., Nakazato, M., Ando, E., Yamamoto, M., Hattori, N., and Sobue, G.	Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form	Arch. Neurol.	59	1771 -1776	2002
Takeuchi, H., Kobayashi, Y., Ishigaki, S., Doyu, M., and Sobue, G.	Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis	J. Biol. Chem.	277	50966 -50972	2002
Hattori, N., Yamamoto, M., Yoshihara, T., Koike, H., Nakagawa, N., Yoshikawa, H., Ohnishi, A., Hayasaka, K., Onodera, O., Baba, M., Yasuda, H., Saito, T., Nakashima, K., Kira, J., Kaji, R., Oka, N., Sobue, G. and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan	Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients	Brain	126	134 -151	2003
Koike, H., Iijima, M., Sugiura, M., Mori, K., Hattori, N., Ito, H., Hirayama, M., and Sobue, G.	Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy	Ann. Neurol.	in press		

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., 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.	in press		
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
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
Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., and Kakizuka, A.	Identification of ter94, <i>Drosophila</i> VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in <i>Drosophila</i>	Cell Death Differ.	9	264-273	2002
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
Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A. and Okamoto, K.	Vacuole-creating protein in neurodegenerative diseases	Neurosci. Lett.	in press		2003
Kobayashi, T. and Kakizuka, A.	Molecular analyses of Machado-Joseph disease.	Cytogenet. Genome Res.	in press		2003
Shikama, Y., Shen, L., Yonetani, M., Miyachi, J., and Miyashita, T.	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
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
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
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 <i>Drosophila patched</i> in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients	Hum. Mutat.	in press		
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		
Yanagisawa, H., Miyashita, T., Nakano, Y., and Yamamoto, D.	HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death	Cell Death Differ.	in press		

20020885

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.31- P.33の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。