

AMPA受容体サブユニット GluR 2 の RNA編集と ALS における神経細胞死

西本 祥仁 日出山 拓人 河原 行郎 郭 伸

神経細胞死とグルタミン酸興奮仮説

哺乳類における中枢神経系のほとんどのニューロンは、速い神経伝達や可塑性に関してグルタミン酸を神経伝達物質にもつ。グルタミン酸受容体は α -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体を構成するサブユニットであり、4種のサブユニット GluR 1~GluR 4 がホモあるいはヘテロな4量体 heteromeric, homomeric tetramer を形成し、サブユニット構成の違いや、選択的スプライシング alternative splicing による flip 型/flop 型 variant をとることにより多様なチャネル特性を現す。グルタミン酸受容体はイオンチャネル型と代謝調節型に分類され、イオンチャネル型受容体はさらに AMPA 受容体、カイン酸 (KA) 受容体、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体に分けられる。急性の神経細胞死には主として NMDA 受容体が関与するのに対し、慢性遅発性の細胞死には AMPA 受容体の関与が大きいことが明らかになってきている。特に脊髄運動ニューロンは、培養細胞系で長期にわたる AMPA 受容体アゴニストへの暴露により Ca^{2+} 流入を引き金とした選択的な細胞死をもたらすことから、AMPA 受容体の関与する神経細胞死に特に脆弱であることが示唆され、加えてラットを用いた in vivo での動物実験においても、AMPA 受容体アゴニストである KA 持続随注によって遅発性発症、緩徐進行性の細胞死が認められることから¹⁾、運動ニューロンを選択的に侵す遅発性発症の神経疾患、すなわち ALS との関連機序の解明が重要であると認識されるようになった。

GluR 2 Q/R 部位と RNA 編集の生物学的意義

AMPA 受容体はホモあるいはヘテロなグルタミン酸受

容体サブユニットの4量体として形成される。これらのサブユニットの中で、神経細胞死の引き金となる Ca^{2+} 流入を規定する最も重要な役割を担うのは GluR 2 である²⁾。すなわち AMPA 受容体が GluR 2 をサブユニットにもつと Ca^{2+} 透過性は低く、GluR 2 以外の GluR 1, 3, 4 のみからなると Ca^{2+} 透過性は高くなる³⁾。この GluR 2 の特性は、第2膜領域のチャネルポアに面する Q/R 部位の RNA 編集(後述)による(図1)。GluR 2 は他のサブユニット同様、遺伝子上においては(Q) : CAG がコードされているが、pre-mRNA の段階で哺乳類のニューロンでは、ほぼ100% RNA 編集を受けて(R) : CI(G)G として翻訳される。この Q/R 部位が編集されることが、GluR 2 の Ca^{2+} 透過性チャネル特性の決定因子として重要である。したがって、未編集の GluR 2(Q) は他のサブユニット同様に、AMPA 受容体に組み込まれても Ca^{2+} 透過性は高い。

一般的に真核生物の細胞では、遺伝子から pre-mRNA が転写されると同時にプロセッシングも起こっている。その際に1塩基置換あるいは多塩基置換という形式で遺伝情報が書き換えられることがある。これを RNA 編集と呼ぶ⁴⁾。1塩基置換の RNA 編集には、シトシン(C)→ウラシル(U)、アデノシン(A)→イノシン(I)の2種類が知られており、前者は植物から哺乳類まで種を越えて保存されている。一方、後者は線虫、ショウジョウバエ、イカ、哺乳類においては中枢神経系で活発に行われていることが知られている。Exon 内の RNA 編集によって、翻訳時のアミノ酸が変わりタンパク質の構造あるいは機能変化を引き起こしたり(例：GluR 2)、コドンが終止コドンに変わることによって翻訳時のタンパク質が短くなり活性の変化を引き起こすことがある。そして後述のように特に GluR 2 Q/R 部位で RNA 編集が行われないと、その細胞の生死に直接的に影響を与えることから考えても、RNA 編集は生物学的に非常に重要な調節機構であるといえる。

GluR 2 Q/R 部位の RNA 編集が神経細胞の生存にとって重大な意味をもつことは、GluR 2 が Q/R 部位で RNA 編集されない変異マウスが、ホモ接合体・ヘテロ接合体い

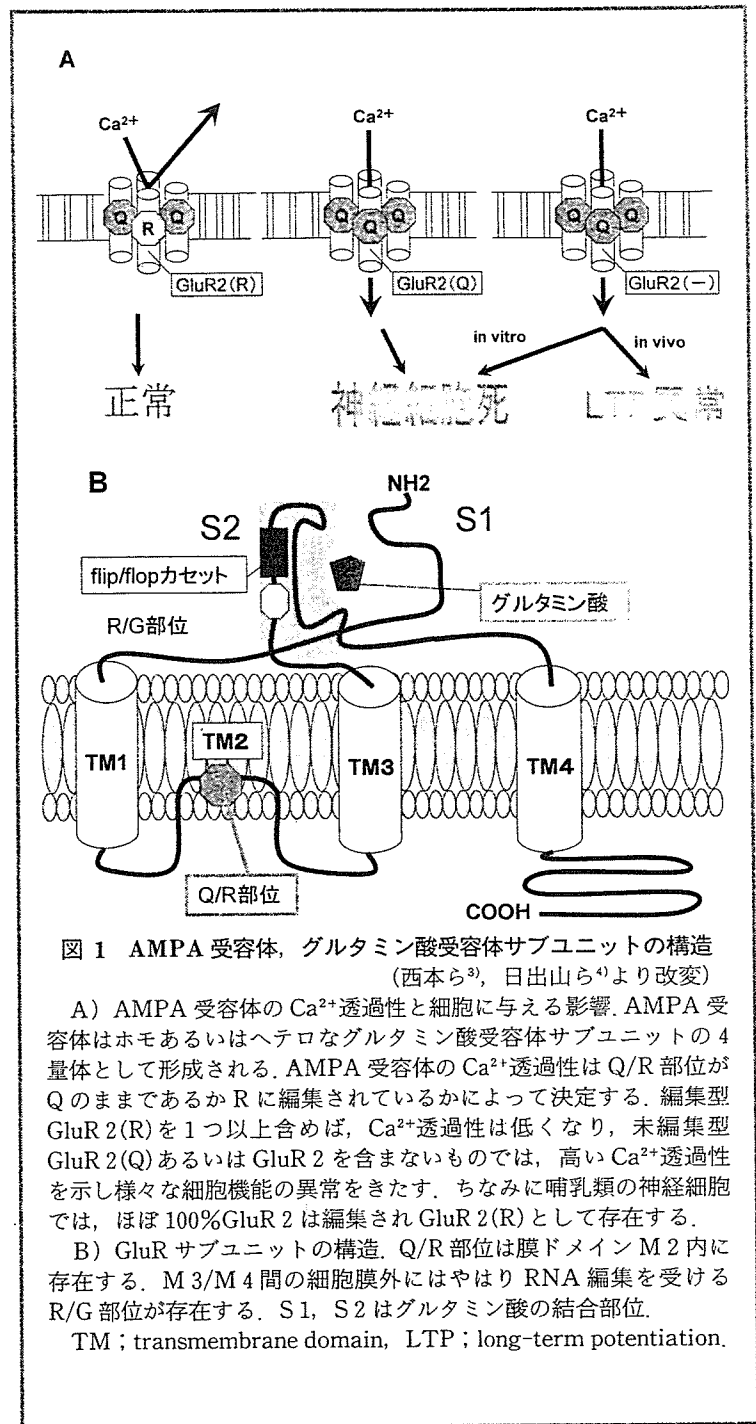
にしもと よしり 東京大学/大学院医学系研究科神経内科学
慶應義塾大学/神経内科
ひでやま たくと 東京大学/大学院医学系研究科神経内科学
かわはら ゆきお 同
The Wistar Institute, Philadelphia, PA
かく しん 東京大学助教授/大学院医学系研究科神経内科学

ずれにおいてもけいれん重積に伴う神経細胞死により生後20日以内に死亡すること⁷⁾, およびQ/R部位をQと同様の意義をもつアスパラギン(N)に置換した人工的 minigene を遺伝子導入し, 編集型 GluR 2(R)が約76%に減少したモデルでは, 海馬 CA 1 領域の錐体細胞の Ca²⁺透過性の増加を認めるが, 初期には目立った異常所見を呈さず, 生後12ヵ月に遅発性の運動ニューロン死を引き起こすこと⁸⁾より示されている。GluR 2の欠損と神経細胞死との関連は, in vivo では GluR 2 ノックアウトマウスが長期増強 long-term potentiation(LTP)亢進, 探索行動異常, 協調運動障害および海馬神経細胞の著明な Ca²⁺透過性の増加などを認めるが, 神経細胞死を引き起こさないもの⁹⁾, in vitro では GluR 2(R)を含まない AMPA 受容体のみを発現する培養小脳 Purkinje 細胞が, Ca²⁺透過性の亢進とともに神経細胞死を引き起こすので一定ではない。この他, alternative splicing variants である flip 型, flop 型は異なる脱感作時間をもち開口チャネル数を変えることで, また細胞表面の AMPA 受容体密度は個々の受容体からの Ca²⁺流入は変えないが, 全体としての細胞内 Ca²⁺流入に影響を及ぼすことで, 細胞全体としての Ca²⁺流入を変える。しかし, これらは細胞死の直接原因とはならない。以上の知見から, GluR 2 の発現量の低下および GluR 2 の編集率低下が in vivo における神経細胞死の直接原因であることが推測されたが, 後者の及ぼす影響の方がはるかに大きい。

孤発性 ALS における GluR 2 RNA 編集

筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) は, 人口10万あたり発症率0.5~3人/年, 有病率2~8人程度の頻度でみられ, 90%以上は孤発性に発症する運動ニューロン疾患である。発症後の病状は一切をもって不可逆的, 進行性に上位, 下位の運動ニューロンが障害を受け, 数年のうちに呼吸不全におちいる。高齢発症, 球麻痺型においてはとりわけ予後が不良である。終末期まで意識, 感覚を始めとする運動ニューロン以外の機能は保持されるために患者の苦痛は筆し難きものであり, 最も早急に治療開発が望まれている疾患の一つである。しかしながら, その独立概念の確立から140年間, 様々な原因仮説が謳われてきたが, いずれもその特徴的な病態を説明するものではなかった。そのような停滞した流れの中で, AMPA 受容体を介しての興奮性神経細胞死をモデルとした遅発性運動ニューロン死についての重要な知見が得られてきた。

Kwak らは, AMPA 受容体を介した神経細胞死のメカニズムが ALS 脊髄運動ニューロンで働いているかどうか



を確定するために, GluR 2 発現量の低下および GluR 2 の RNA 編集率低下の有無を明らかにする目的で, laser beam を用いた micro-dissection 法により切り出した単一ニューロン組織での, AMPA 受容体各サブユニットの mRNA 定量および GluR 2 Q/R 部位 RNA 編集率の測定法を確立した。その結果, ALS 脊髄運動ニューロンにお

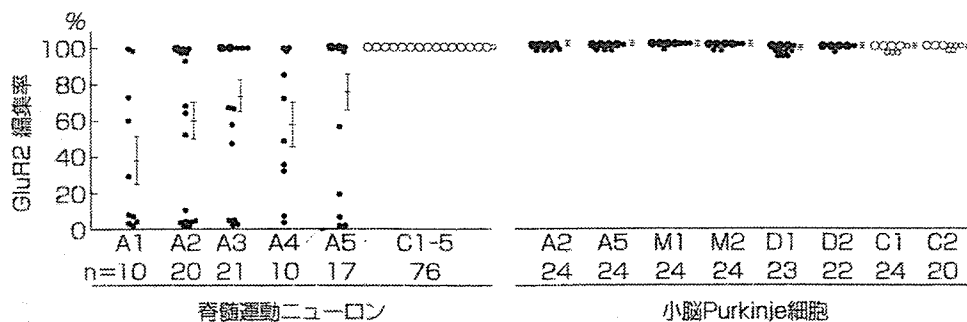


図2 孤発性ALSにおけるRNA編集率低下の疾患特異性・細胞選択性(Kawaharaら¹²⁾より改変)
 各点(大点:5細胞, 小点:1細胞)は, ALS(A1-A5)群, 正常コントロール(C1-C5)群, 多系統萎縮症(M1, M2)群, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(D1, D2)群における単一神経細胞(左:脊髄運動ニューロン, 右:小脳Purkinje細胞)のGluR2 Q/R部位の編集率を表す。各群における平均値±標準偏差および1検体あたり解析した細胞数(n)も示す。脊髄運動ニューロンでは正常コントロール群のすべての細胞ではほぼ100%編集されているのに対し, ALS群の細胞では明らかに正常コントロール群に対して有意に低下しており(Mann-Whitney U-test, $P < 0.001$), 1検体内でも細胞ごとに大きなばらつきを示していた。小脳Purkinje細胞ではALS群, 多系統萎縮症群, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症群と正常コントロール群との間で編集率に有意差はなかった(Mann-Whitney U-test, $P > 0.05$)。

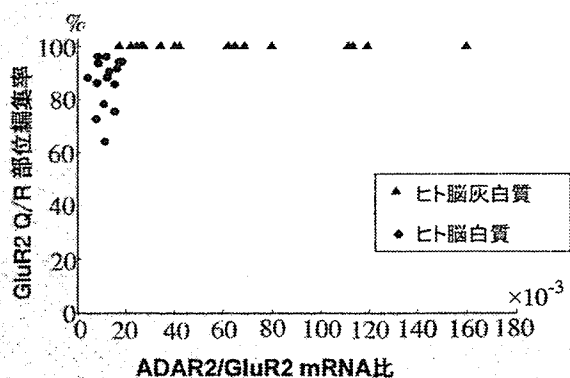


図3 GluR2 Q/R部位編集率とADAR2 mRNA発現量の関連性(Kawaharaら¹⁰⁾より改変)
 GluR2 mRNAに対するADAR2 mRNAの発現比が 20×10^{-3} 以下の時は, GluR2 Q/R部位の編集率は100%に至らない。 20×10^{-3} 以上になる時は, GluR2 Q/R部位は100%編集される。正常白質組織においてはGluR2 Q/R部位のRNA編集率は64~99%であり, 白質のグリア細胞を発生母地とする悪性膠芽腫においても69~88%に留まることが知られている。

るGluR2 mRNAの発現量自体は低下していないこと¹⁰⁾, しかし脊髄前角組織レベルで疾患特異的・部位選択的にGluR2 Q/R部位RNA編集率が低下しており¹¹⁾, その変化が前角組織内の運動ニューロン単位での特異的变化に起因するものであることを報告した¹²⁾。すなわち, 正常対照群の脊髄運動ニューロン, ALS群および脊髄小脳変性症

の小脳Purkinje細胞では, GluR2 Q/R部位RNA編集率がほぼ100%に保たれているのに対し, ALS群脊髄運動ニューロンでは0~100%(平均値38~75%)と, その多くが100%に達していなかった(図2)。さらに運動ニューロンが変性するSOD1遺伝子変異による家族性ALS(ALS1), 球脊髄型筋萎縮症spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)の変性した運動ニューロンにおいてもGluR2 Q/R部位のRNA編集は100%に保たれていることを明らかにした¹³⁾。この疾患特異性・細胞選択性の高い分子変化から, GluR2 Q/R部位のRNA編集異常が孤発性ALSの遅発性神経細胞死の病因解明の大きな手がかりの一つとなりうると考えた¹⁴⁾。

ADAR2—その作用と発現制御

哺乳類におけるRNA編集を司る酵素としては, adenosine deaminase acting on RNA(ADAR)1~ADAR3の3種類が知られているが, ADAR3の基質に関しては現在まだ見つかっていない。いずれのtypeも, 2~3カ所のRNA結合部位と1カ所の触媒活性をもつ編集酵素部位を有している。GluR2 Q/R部位におけるRNA編集は, このうちADAR2によって行われている。ADAR2は核小体あるいは核内に存在しており, 編集部位を含むexonと下流のintron内にある不完全な相同配列exon complementary sequence(ECS)とによる, あるいはexon内のhairpin構造により形成される2本鎖RNAに対して編集作用をもつ。ADAR2のノックアウトマウスは, GluR2 ECS削除

により RNA 編集を阻害したマウスと同様の表現型を示し、さらに、この ADAR2 ノックアウトマウスに編集型 GluR2 を発現する遺伝子導入を行うと表現型は正常化するため¹⁵⁾、ADAR2 の活性低下は GluR2 の編集異常を通じて神経細胞死を引き起こすと考えられる。

ADAR2 と GluR2 の RNA 編集との関連は、ヒト脳白質では GluR2 Q/R 部位の編集率は 100% ではなく低下しており、灰白質では 100% に保たれることに対応して、前者では ADAR2 mRNA (酵素)/GluR2 mRNA (基質) 比が後者より低いことから予想される¹⁶⁾(図 3)。即ち GluR2 Q/R 部位の編集率は ADAR2 mRNA 発現量に依存し、ある閾値以上であれば、100% に編集率が飽和していると考えられる。したがって GluR2 の RNA 編集はもっぱら in vivo ADAR2 活性に依存し、ADAR2 mRNA 発現レベルが ADAR2 活性を規定する因子の一つとなっている可能性があげられる。

また ADAR2 は、alternative splicing から計算すると 48 通りの mRNA variants が存在する可能性があるが、実際の各 variant の存在比は均等ではなく大きな偏りがある

る¹⁷⁾。Variants の存在比の変化が in vivo ADAR2 酵素活性を大きく左右している可能性があり、この酵素の調節制御機構の複雑さを予想させる。以上により、ALS 脊髄運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下の原因は、ADAR2 活性が何らかの理由で低下したためと考えられる。

孤発性 ALS の治療への応用と今後の課題

疾患特異的・細胞選択的な遅発性神経細胞死が GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下に関与しているという切り口をつかみ、ようやく孤発性 ALS の原因解明への入り口が開かれた。上述したように ADAR2 の活性を規定する要因の一つに、基質に対する ADAR2 の mRNA 発現レベルの関与があると推測される。ただし ADAR2 活性の調節には、複雑な ADAR2 mRNA プロセッシング機構をはじめ解明すべき課題は山積している。将来の展望としては、ADAR2 の活性修飾による治療法へと応用される日がくるかもしれない。医学は孤発性 ALS の特異的治療法の開発実現にむけて、今確かな足どりをもって進んでいる。

文 献

- 1) Kwak S, et al. An ALS rat model by AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *Neurosci Res.* 2004; 50 : S145.
- 2) Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 1991; 252 : 851-3.
- 3) 西本祥仁, 日出山拓人, 河原行郎, 他. ALS における分子生物学的変化. *医学のあゆみ.* 2005; 215 : 3514-8.
- 4) 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸. ALS と AMPA 受容体. *脳と神経.* 2005; 57 : 585-98.
- 5) Burnashev N, Monyer H, Seeburg P, et al. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron.* 1992; 8 : 189-98.
- 6) 河原行郎, 郭 伸. 脳科学における RNA 編集の重要性. *Clin Neurosci.* 2004; 22 : 250-1.
- 7) Brusa R, Zimmermann F, Koh D, et al. Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science.* 1995; 270 : 1677-80.
- 8) Kuner R, Groom AJ, Bresink I, et al. Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *PNAS.* 2005; 102 : 5826-31.
- 9) Jia Z, Agopyan N, Miu P, et al. Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron.* 1996; 17 : 945-56.
- 10) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, et al. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA : an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem.* 2003; 85 : 680-9.
- 11) Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, et al. Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1999; 46 : 806-15.
- 12) Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Glutamate receptors : RNA editing and death of motor neurons. *Nature.* 2004; 427 : 801.
- 13) Kawahara Y, Sun H, Ito K, et al. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *NSR.* 2006; 54 : 11-4.
- 14) Kwak S, Kawahara Y. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med.* 2005; 83 : 110-20.
- 15) Higuchi M, Maas S, Single F, et al. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature.* 2000; 406 : 78-81.
- 16) Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci.* 2003; 18 : 23-33.
- 17) Kawahara Y, Ito K, Ito M, et al. Novel splice variants of human ADAR2 mRNA : skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene.* 2005; 363 : 193-201.

特集 第41回脳のシンポジウム

運動ニューロン疾患をめぐる最近の進歩

ALS の運動ニューロン死とグルタミン酸受容体の分子変化*

郭 伸**

運動ニューロンの神経細胞死には、AMPA 受容体を介したメカニズムが中心的な役割を果たしており、この神経細胞死には Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の割合が増加し、AMPA 受容体を介する Ca^{2+} の流入が増大することが主要な役割を果たしている。AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性亢進には、未編集型 GluR2 サブユニットを含む AMPA 受容体割合の増加の他に、編集型 GluR2 サブユニットを含まない AMPA 受容体割合の増加、のメカニズムがある。孤発性 ALS 運動ニューロンの神経細胞死には前者の分子変化が起こり、神経細胞死の一次原因となっているが、変異 *SOD1* に関連した家族性 ALS (ALS1) では後者のメカニズムが働き、変異 *SOD1* の細胞毒性を増強させていると考えられる。また、運動ニューロン死には、AMPA 受容体を介さない神経細胞死もあり、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) がその代表である。このように、運動ニューロン疾患により細胞死の分子機構が異なるので、治療法もそれぞれに特異的なものが求められる。孤発性 ALS における GluR2 の RNA 編集異常は、疾患特異性が高いので、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を快復することが孤発性 ALS の特異治療につながると考えられる。GluR2 の RNA 編集は ADAR2 が触媒するので、孤発性 ALS 運動ニューロンではこの酵素活性が何らかの原因で部位特異的に低下したためと考えられ、ADAR2 活性を快復することが、GluR2 RNA 編集の正常化を通じて特異治療の標的になると期待される。

キーワード：amyotrophic lateral sclerosis, AMPA receptor, GluR2, neuronal death, RNA editing

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病因研究は、一部の家族性 ALS で遺伝子異常が同定されたものの、なぜ運動ニューロンが死ぬのかというメカニズムは責任遺伝子の同定 (Rosen et al, 1993) より 13 年が経過した変異 copper-zinc superoxide dismutase (*SOD1*) 遺伝子関連家族性 ALS (ALS1) でも依然として解明されていない。一方、ALS の大多数を占める孤発性 ALS については、長年にわたる精力的な病因研究の中で、興奮性細胞死

が最も有力視されてき、運動ニューロン死には、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体を介した、 Ca^{2+} の過剰な流入が引き金となる興奮性細胞死が主として関わることが、徐々に明らかにされてきた (Kawahara & Kwak, 2005; Kwak & Kawahara, 2005)。筆者らは、孤発性 ALS の運動ニューロンには、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を亢進させる分子変化の中でも、サブユニットの 1 つである GluR2 の Q/R 部位に RNA 編集が起こらない未編集 GluR2 が増えていることを明らかにした (Takuma et al, 1999;

2006年8月29日受稿

* Molecular mechanism underlying death of motor neurons in sporadic ALS : towards specific therapy.

** 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学教室 (〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1): Shin Kwak : Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.

0001-8724/06/¥500/論文/JCLS

Kawahara et al, 2004)。この分子変化は、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を亢進させる要因の 1 つであり、神経細胞死の一次原因になるが、GluR2 を含まない AMPA 受容体もまた Ca^{2+} 透過性が高い。単一運動ニューロンにおける筆者らの検討では、AMPA 受容体サブユニット GluR2 の発現量は ALS と正常対照とで有意差がないので (Kawahara et al, 2003b)、ALS の運動ニューロンで AMPA 受容体を介する神経細胞死を促進している分子異常は、もっぱら未編集 GluR2 の増加によるものと考えられる。未編集 GluR2 を含む AMPA 受容体、編集型 GluR2 を含まず GluR1, 3, 4 より形成される AMPA 受容体とも、正常のヒト中枢神経組織に発現しているが、その分布は異なり、前者は白質組織 (オリゴデンドログリア) には存在するがニューロンには存在せず、後者はアストロサイトや海馬の GABA 作動性介在ニューロンなど一部の神経細胞に存在し、少量ながら運動ニューロンにも発現している (Kwak & Weiss, 2006)。AMPA 受容体を介する神経細胞死の研究から、これらの分子変化により神経細胞死を引き起こしうることが徐々に明らかになり、分子機構を基礎に置いた検討が必要になってきている。

本概説では、個々の運動ニューロン疾患の運動ニューロン死には上記を含め、どのような分子異常が関与しているのかについて、筆者らの得た知見を中心に概要を述べ、孤発性 ALS に生じている疾患特異的分子変化に基づいた、特異治療法開発のための戦略・問題点について概説したい。AMPA 受容体を介する神経細胞死のメカニズムや孤発性 ALS と GluR2 RNA 編集異常の関連に関しては、既報の概説を参照されたい (郭, 2004; Hideyama et al, 2005; Kawahara & Kwak, 2005; Kwak & Kawahara, 2005; 西本 et al, 2006)。

1. 運動ニューロン疾患における神経細胞死の分子メカニズム

1. 変異 SOD1 に関連した家族性 ALS (ALS1)

これまでの検討では、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、脊髄小脳変性症・孤発性 ALS の小脳プルキンエ細胞、アルツハイマー病大脳皮質、ピック病側頭葉皮質、ハンチントン病線条体、脊髄小脳変性症 (Machado-Joseph 病・歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症・多系統萎縮症) の小脳 (Suzuki et al, 2003; Kawahara et al, 2004) など、様々な神経変性疾患の病的ニューロンや病変組織では正常ニューロン同様 100% に保たれていた。ただし、病的運動ニューロンにおける検討が欠けていたので、孤発性 ALS 以外の運動ニューロン疾患で同様の分子変化が生じていないことを示す必要があっ

た。特に、変異 SOD1 に関連する家族性 ALS (ALS1) は、その動物モデル (ヒト変異 SOD1 導入動物) が ALS 全体の疾患モデルとして汎用されているので、病因の異同を明らかにするためにも RNA 編集異常の有無を検討する必要がある。

この目的のため、変異ヒト SOD1 トランスジェニックラット (SOD1^{G93A}Tg および SOD1^{H46R}Tg) の発症個体および同腹の野生型同胞を用いて、運動ニューロンに発現している GluR2 mRNA Q/R 部位編集効率を定量した。その結果は、発症個体であっても検索した全ての運動ニューロン [SOD1^{G93A}Tg 発症ラット (n=55) SOD1^{H46R}Tg 発症ラット (n=62)] で、同腹の野生型同胞同様に、編集率は 100% に保たれていた。すなわち、変異 SOD1 による運動ニューロン死には GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は関わっていないことが明らかになった (Kawahara et al, 2006)。

ALS1 では、AMPA 受容体を介する神経細胞死が関与していることを支持する知見が、モデル動物を用いた検討で示されている。すなわち、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を規定する GluR2 を欠損したマウスと、変異 SOD1 トランスジェニックマウスの掛け合わせにより、興奮性アミノ酸であるカイニン酸に対する毒性が増加したこと (Van Damme et al, 2005)、GluR2 の過剰発現によりモデル動物の生存が延長したこと (Tateno et al, 2004) 等である。さらに、Q/R 部位をアスパラギン (N) に置換し、 Ca^{2+} を透過する人工的 GluR2 (GluR-B (N)) を遺伝子導入したマウスと、変異 SOD1 遺伝子の double transgenic マウスでも神経細胞死が促進した (Kuner et al, 2005) ことから、ALS1 の神経細胞死にも AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性亢進が関与していることが想定される。筆者らの検討では、ALS1 モデルラット運動ニューロンには GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常はみられないので、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を亢進させるメカニズムとして、GluR2 の RNA 編集異常以外の分子異常が起こっているはずである。

プロテオミクス検索により、変異 SOD1Tg マウスで AMPA 受容体サブユニットである GluR3 の発現が増加しているという報告があり、GluR3 mRNA の発現上昇が運動ニューロンでみられ、前角組織では GluR2 タンパクの発現が減少していることが報告されている (Spalloni et al, 2004; Tortarolo et al, 2006)。さらに、変異 SOD1Tg マウスに GluR3 に対するアンチセンス mRNA を投与すると、生存が延長することが報告されている (Rembach et al, 2004) [ただしこの論文では、GluR3 のタンパク減少は確認できていないので、実際

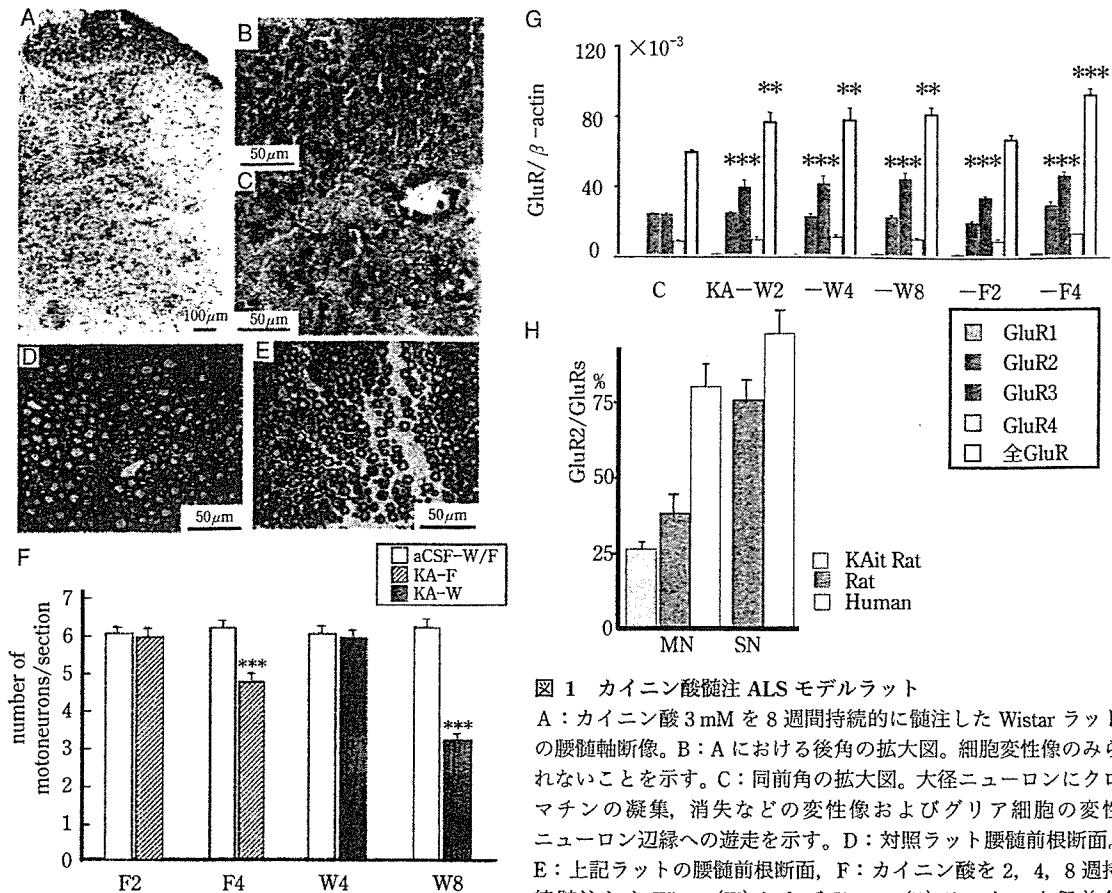


図1 カイニン酸髄注 ALS モデルラット

A: カイニン酸 3 mM を 8 週間持続的に髄注した Wistar ラットの腰髄軸断像。B: A における後角の拡大図。細胞変性像のみられないことを示す。C: 同前角の拡大図。大径ニューロンにクロマチンの凝集、消失などの変性像およびグリア細胞の変性ニューロン辺縁への遊走を示す。D: 対照ラット腰髄前根断面。E: 上記ラットの腰髄前根断面。F: カイニン酸を 2, 4, 8 週持続髄注した Wistar (W) および Fischer (F) ラットの 大径前角ニューロン数。前者では 4~8 週の間、後者では 2~4 週の間で、細胞数の減少がみられる。G: カイニン酸髄注ラット脊髄運動ニューロンにおける AMPA 受容体サブユニット mRNA の発現変化。GluR3 のみが上昇している。H: 正常ニューロンにおける GluR2 mRNA の、全 AMPA 受容体サブユニット mRNA に対する発現比率。ヒトでもラットでも運動ニューロン (MN) では脊髄後角ニューロン (SN) に比べ、GluR2 の発現比率が低い。カイニン酸髄注ラットではこの比率がさらに低下している。(文献 Sun et al, 2006 より、筆者改変)

に GluR3 のノックダウンによるメカニズムかどうかを明確に示してはいないという批判があるが、運動ニューロンにおけるタンパク発現の増減を、前角組織より定量的に検出することは感度の問題から不可能に近いので、運動ニューロンに選択的な GluR3 タンパクの発現上昇を定量的に捉えることは極めて困難である。後述するカイニン酸髄注ラットにおける運動ニューロンの GluR3 mRNA 発現上昇 (Sun et al, 2006) も、前角組織では検出できず、単一運動ニューロン組織を用いて初めて可能であった。GluR3 は Ca^{2+} 透過性のサブユニットなので、GluR3 の増加は AMPA 受容体サブユニットの中での GluR2 の相対的減少をもたらし、GluR2 を含まない Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体の割合を増やし、これにより運動ニューロン全体として

AMPA 受容体を介した Ca^{2+} の流入を増加させ、細胞死につながると予想される。したがって、予想通り、未編集 GluR2 の増加ではなく、既編集 GluR2 により、GluR2 を含まない AMPA 受容体割合が増加したことが、細胞死の促進因子になっていると考えられる。

運動ニューロンにおける GluR3 mRNA の発現増加は、筆者らが作製したカイニン酸髄注によるラットの ALS モデルにおいてもみられた (Sun et al, 2006)。このラット ALS モデルは、カイニン酸を 4~8 週間、持続的に脊髄も膜下腔に投与することにより作製するもので、運動ニューロンに選択的な変性脱落が 4~8 週間の経過で緩徐に起こり、後角ニューロン、介在ニューロンには変性がみられない (図 1A-F)。症状変化としても運動麻痺のみで、感覚、膀胱直腸機能は保たれて

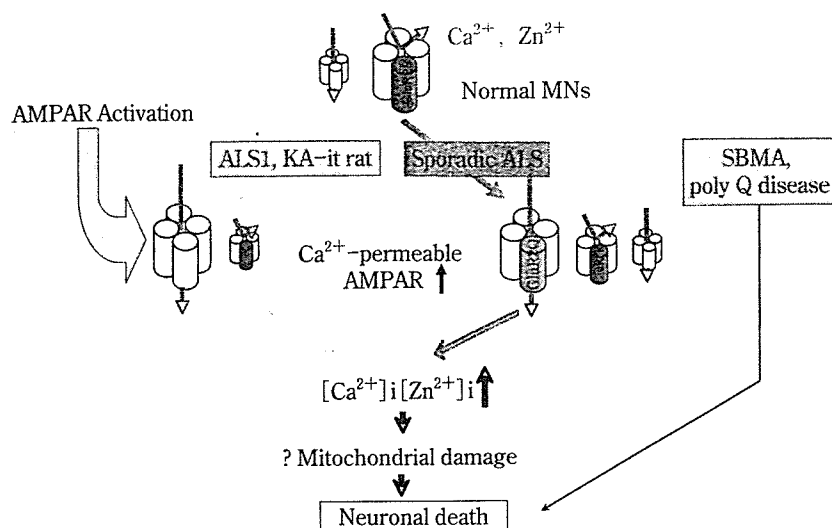


図2 運動ニューロン死の分子機構の種々：AMPA 受容体を介する神経細胞死を中心に正常の神経細胞ではほとんどのAMPA 受容体(AMPA)は編集型GluR2を含みCa²⁺非透過性である。運動ニューロン(MN)などではGluR2を含まないCa²⁺透過性のAMPA受容体が、少数ながら存在していることが示されている。孤発性ALS、変異SOD1関連家族性ALS(ALS1)のいずれにもAMPA受容体を介する細胞死のメカニズムが働いている証拠があるが、両者の分子機構は異なり、ALS1ではGluR2の割合の減少により編集型GluR2を含まないAMPA受容体の割合が増えることにより(左)、孤発性ALSでは未編集型GluR2を含むAMPA受容体が増えることにより(中)、Ca²⁺透過性のAMPA受容体が増加し、細胞内Ca²⁺(Zn²⁺)濃度が上昇することが神経細胞死を引き起こす。ただし、後者が単独で神経細胞死を引き起こすのに対し、前者には変異SOD1の細胞毒性などの因子がさらに加わる必要がある。これに対して、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)の運動ニューロン死には、AMPA受容体を介するメカニズムは働いていない。

いる。興味深いことに、運動ニューロンのみでGluR3 mRNAの発現上昇が、少なくとも2週目以降にみられる(図1G)。GluR3以外のAMPA受容体サブユニットには発現量の変化がみられない。さらにこの分子変化はAMPA受容体のアンタゴニストにより阻止される。GluR2 Q/R部位のRNA編集異常はみられない。以上のことから、このモデルラット運動ニューロンの神経細胞死には、AMPA受容体のCa²⁺透過性亢進が関わっているものの、その分子メカニズムは、孤発性ALSとは異なり、GluR3が増加したためにGluR2のAMPA受容体サブユニットに占める割合が減少(対照40%に対しモデルラットでは29%)し、GluR2を含まないCa²⁺透過性のAMPA受容体が運動ニューロンで増加するためと考えられる(図1H)。もともと脊髄運動ニューロンにおけるGluR2 mRNAの発現は、他の神経群に比べ低いので(図1H)、GluR3の発現増加によるGluR2割合の減少は運動ニューロンでは比較的大きなものになる。この分子異常はALS1モデルマウスにみられる

ものと同等であり、ALS1では、AMPA受容体を介した細胞死のメカニズムが働いており、SOD1の細胞毒性を促進する因子になっていると考えられる。さらに、AMPA受容体アンタゴニストにより抑制されることから、AMPA受容体を持続的に刺激することがGluR3 mRNAの高発現につながることを予想され、ALS1では、グルタミン酸システムが過剰に機能している可能性がある。

このように、AMPA受容体を介する細胞死には、少なくとも2種類の分子メカニズムが独立に働いていると考えられる(図2)。1つはQ/R部位未編集型GluR2の増加であり、他方は編集型GluR2の相対的減少であり、いずれもAMPA受容体のCa²⁺透過性を増すことで細胞死を引き起こす(Kwak & Weiss, 2006)。ただし、GluR2のノックアウトマウスでは、神経細胞死が起こらないとされているので(Jia et al, 1996)、編集型GluR2の減少による神経細胞死には、AMPA受容体の過剰な興奮や、変異SOD1による細胞死カスケード

ドの開扉など、神経細胞生存に不利な条件がさらに加わることが必須のようである。これに対し、未編集型 GluR2 増加による神経細胞死の場合には、変異マウスによる検討からも (Brusa et al, 1995), この分子異常のみで神経細胞死を引き起こすに足りると考えられる。

2. 球脊髄性筋萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy: SBMA)

SBMA は、X 染色体遺伝形式をとる運動ニューロン疾患であり、他方では、複数の変性性神経疾患の原因として明らかにされた、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患であるという点からも、孤発性 ALS の神経細胞死のメカニズムとの異同を検討することは、神経変性疾患における神経細胞死のメカニズムを解明する上で大きな意義がある。特に、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患のいずれもが長い臨床経過をたどるのに対し、孤発性 ALS は進行が速い点で、臨床的観察からも神経細胞死のメカニズムが共通であるとは考えにくく、運動ニューロン死の多様性の理解にもつながり、神経細胞死の機構全般への神経科学者全般の理解を高めるものと考えられる。

筆者らは、SBMA3 症例 (死亡時年齢 60~78 歳、アンドロゲン受容体遺伝子 CAG リピート数 42~48) の凍結脊髄から、100 個以上の運動ニューロンを切り出した。そのうち、計 44 個 (各例 12~16 個) で GluR2 mRNA に由来する PCR 産物が得られ、その全てで Q/R 部位は 100% 編集されていた (Kawahara et al, 2006)。SBMA の残存運動ニューロンは極めて少なく、採取した細胞でも GluR2 に対する RT-PCR が可能であったものは、そのうち 3 割前後であった。検索できた運動ニューロンは比較的変性過程が早期であることが予想されるものの、疾患の進行が緩徐であることを考えると、変性に至る過程が緩徐で、残存ニューロンでも変性過程を完全に免れているとは考えにくい。本研究で GluR2 mRNA Q/R 部位の編集率が、検索した SBMA 運動ニューロン全数で 100% に保たれていることが明らかになり、SBMA では RNA 編集異常が細胞死に関与している可能性は極めて低いといえる。以前報告した、歯状核レイ体淡蒼球萎縮症プルキンエ細胞における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が保たれていたこと (Kawahara et al, 2004) と考え合わせると、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患の細胞死は、GluR2 RNA 編集異常によるものではないといえ、神経細胞死の過程が極めて緩徐であることと相まって、孤発性 ALS のものとは異なるメカニズムによることを示唆する。

ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患に興奮性

細胞死が関与しているかどうかに関する知見は、主にハンチントン病の疾患モデルにより得られており、AMPA 受容体感受性は野生型と変わらないか (Levine et al, 1999; Zeron et al, 2002; Snider et al, 2003; Zeron et al, 2004), むしろ低い (Morton & Leavens, 2000) という。したがって、ポリグルタミン鎖伸長に伴う神経変性疾患の神経細胞死には、AMPA 受容体を介するメカニズムが関与しているとは考えにくい (図 2)。

3. 運動ニューロン疾患の神経細胞死

以上に述べたように、運動ニューロン疾患における神経細胞死のメカニズムは多様であり、しかも AMPA 受容体を介するメカニズムにも少なくとも 2 種類存在し、孤発性 ALS と ALS1 における分子メカニズムは異なる。このことは、ALS の治療薬開発においては、SOD1Tg モデルを用いる場合注意を要することを示唆している。

ALS は臨床像が多彩であり、孤発性 ALS といえども、単一疾患なのか、症候群であるとしたらどこまでを疾患単位と捉えるべきなのかに関しても議論の分かれるところである。ALS1 との間に、神経細胞死につながる分子変化に大きな違いが見出されたことから、孤発性 ALS の様々な表現型における分子変化の異同を調べることにより、疾患単位を捉え直すことが可能かもしれない。この観点から、運動ニューロンにおける未編集 GluR2 mRNA の増加は、経過 10 年以上の臨床的な SPMA、抗塩基性封入体が出現する若年発症 (Aizawa et al, 2000) などでも認められ、臨床像の異なるこれらの ALS でも共通の分子異常が発症のメカニズムになっていることが想定される。

II. GluR2 の RNA 編集異常を引き起こす分子メカニズム

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、神経細胞の生存にとって必須であり、胎生期より 100% に保たれている。この部位の RNA 編集が起らない変異マウスは、けいれん重積のため生後 20 日で死亡してしまう (Brusa et al, 1995)。この分子異常により運動ニューロンに変性が生じるかどうかを直接明らかにした報告はないが、GluR2 の Q/R 部位をアスパラギン (N) に置換した GluR2 をコードする mini-gene GluR-B (N) を遺伝子導入した変異マウスは、1 年を経過して運動機能障害と脊髄前角細胞数の減少を引き起こす (Feldmeyer et al, 1999; Kuner et al, 2005)。この 1 アミノ酸置換は、未編集 GluR2 の増加と同じチャネル特性を AMPA 受容体にもたすので、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が特に運動ニューロンを好んで障害することを示して

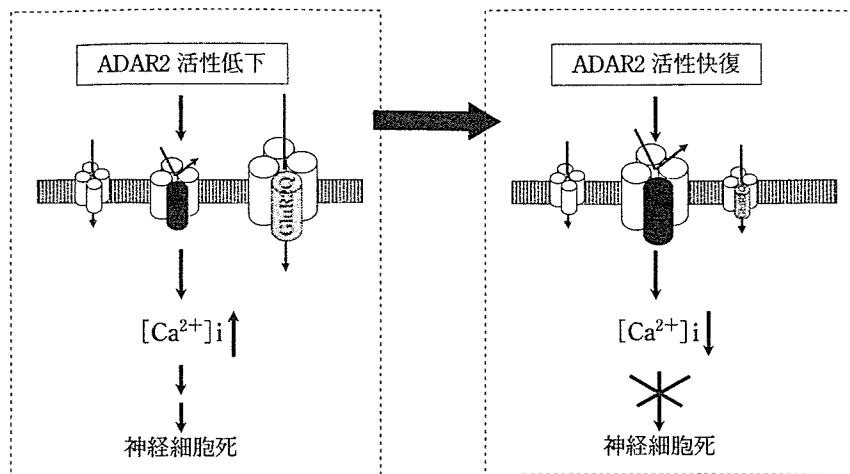


図3 孤発性 ALS (筋萎縮性側索硬化症) の治療戦略

孤発性 ALS では、ADAR2 活性の低下により、未編集型 GluR2 を含む AMPA 受容体割合が増え、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に引き続く細胞死のカスケードが開扉すると考えられるので、ADAR2 活性を運動ニューロンで回復することができれば、編集型 GluR2 を増やすことにより運動ニューロン死を阻止でき、孤発性 ALS の治療が可能になると考えられる。

いる。

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は、RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) と呼ばれる 2 本鎖 RNA に作用する酵素によって触媒されることが齧歯類で示され、ADAR2 のノックアウトマウスは、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が起こらないために、前述の変異マウス同様、けいれん重積により生後 20 日で死亡してしまう (Higuchi et al, 2000)。また、最近の報告で、一過性脳虚血後に遅発性細胞死を起こす海馬 CA1 錐体細胞では ADAR2 mRNA の発現量が低下し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が起こっていること、また、この細胞死は ADAR2 の遺伝子導入により回避できることが示され (Peng et al, 2006)、ADAR2 活性低下が GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常および神経細胞死の原因になることが明らかにされた。この報告では、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は細胞ごとに異なり、0%~100%まで広く分布しており、筆者らが ALS 運動ニューロンで明らかにした編集率分布と極めてよく似ている点に興味深い。従来、脳虚血後の遅発性神経細胞死には GluR2 mRNA の発現量が落ちるためであるとする説が強かったが (Pellegrini-Giampietro et al, 1997; Kwak & Weiss, 2006)、同じ AMPA 受容体を介するメカニズムであっても、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常による細胞死であることが明らかになった。したがって、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は、(1) 神経細胞死の原因であるこ

と、(2) 少なくとも運動ニューロンや海馬 CA1 錐体細胞に選択的な脱落変性を引き起こすこと、(3) その神経細胞死は遅発性の緩徐進行性であること、(4) ADAR2 活性の低下によりもたらされるものであること、が結論できる。

齧歯類のみならずヒト脳でも、ADAR2 mRNA は灰白質を中心に発現しており、ADAR2 mRNA 発現量の低い白質では GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は必ずしも 100%に保たれていない。詳細に検討すると、ADAR2 mRNA の対 GluR2 mRNA 比での発現量がある閾値より低くなると、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が 100%を割ることが明らかになり、白質では正常脳でも 60%台のものもある (Kawahara et al, 2003a)。このことは、ヒト脳でも GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を触媒するのは ADAR2 であり、ADAR2 mRNA の発現量が編集率を規定している要因の 1 つであることを示している (Kawahara et al, 2003a; Kwak & Kawahara, 2005)。

以上のことから、ALS の運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下して RNA 編集異常が起こっている可能性が高いので、ALS 前角組織で検討してみると、ADAR2 mRNA 発現レベルは基質である GluR2 mRNA の発現量比でみる限り有意に低下しており (Kawahara and Kwak, 2005)、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率と ADAR2/GluR2 比との間に相関がみられる。前述したように、ADAR2 mRNA 発現量は ADAR2 活性

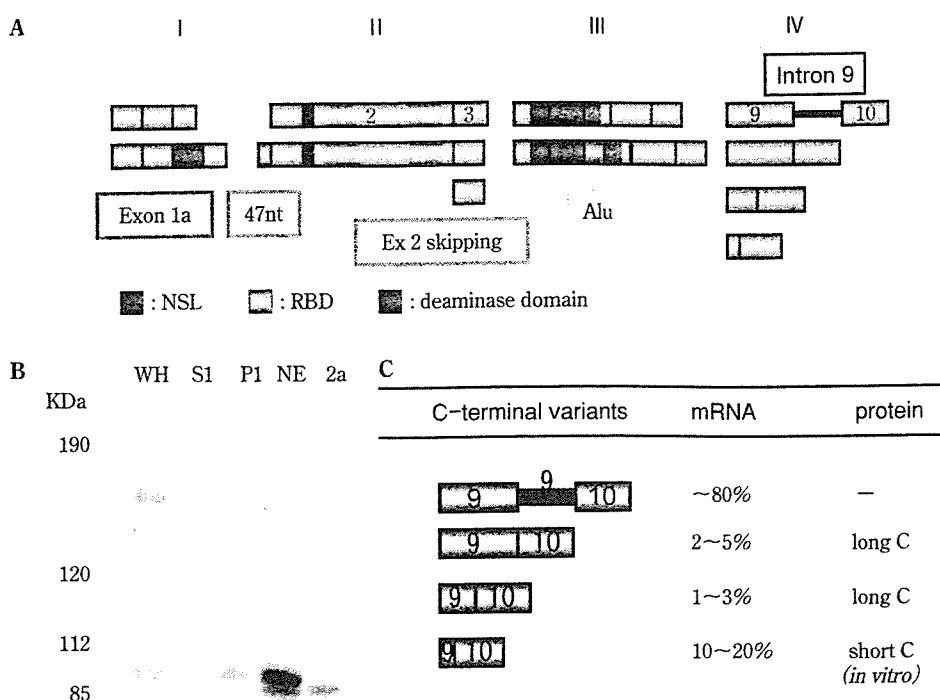


図4 ヒト脳の adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2)

A: ADAR mRNA ヴァリエント。第Iドメインには2種類 (exon 1aを含むものと含まないもの) 第IIドメインには3種類 (47ヌクレオチドカセットを含むものと含まないもの、および exon 2 skipping), 第IIIドメインには2種類 (Alu 配列を含むものと含まないもの), 第IVドメインには4種類 (intron 9 retention, 全長 exon 9, 短縮型 exon 9 二種) のヴァリエントが存在する。これらは独立にスプライシングを受けるので、理論的には $2 \times 3 \times 2 \times 4 = 48$ 種類の mRNA ヴァリエントが存在することになる。B: ヒト小脳分画に対するイムノプロット。抗 ADAR2 抗体が認識するバンドは2本あり、核分画に局在する。この2本は、第IIIドメインに Alu 配列が含まれるかどうかでサイズが決まり、ドメイン I, II の最上段、第IVドメインの第2, 3段に示したヴァリエントから形成される4種の mRNA のみから翻訳されると考えられる。WH: whole homogenate, S1: first supernatant, P1: first pellet, NE: nuclear extract, 2a: recombinant ADAR2a。C: 第IVドメインのヴァリエントのヒト小脳における発現比率。イントロン 9 retention タイプの発現量が最も多いが、このヴァリエントを持つ mRNA はタンパクに翻訳されない。次に多いのは、短縮型 exon 9 を持つ mRNA であるが、これもタンパクに翻訳されない。したがって、全 mRNA のうち、翻訳されうる第IVドメインを持つ mRNA は全体の3~8%にすぎない。さらに、第IIドメインで、exon 2 skipping タイプは活性型タンパクにはなり得ないにもかかわらず、第IIドメインの20%を占めるので、活性型タンパクに翻訳される mRNA は2~6%程度と考えられる。(文献 Kawahara et al, 2005 より、筆者改変)

を規定する因子の1つであり、ALS 運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は、ADAR2 活性の低下によると考えられる。

このような検討から、既編集 GluR2 割合を運動ニューロンで増やすことが、孤発性 ALS の特異治療につながると考えられる。そのための戦略として、RNA 編集酵素である ADAR2 活性を快復することが1つの可能性であり (図3)、他方、ADAR2 活性の調節機構

をより詳細に検討して、真の病因を解明することがより特異的治療法の開発につながる。

ADAR2 活性調節機構については、未解明の部分が多い。筆者らの検討では、ADAR2 mRNA には、48種にもなる ADAR2 mRNA スプライスヴァリエントが存在する (Kawahara et al, 2005) (図4A)。ヒトの小脳組織の検討では、ADAR2 タンパクとして同定できるのは2種のみであり (Kawahara et al, 2005) (図4B)、い

ずれも *in vitro* での活性を持つ (Gerber et al, 1997; Liu et al, 1997)。これらの活性タンパクをコードする mRNA ヴァリエントは 48 種中 4 種に過ぎず、しかもその発現量は、ADAR2 総 mRNA の 5% 前後である。総 mRNA 発現量の 80% 以上を占めるのは、イントロン 9 retention のあるヴァリエントであり、タンパクに翻訳されない (Kawahara et al, 2005) (図 4C)。このような mRNA が大量に存在する理由として、スプライシング速度が遅い、nonsense-mediated decay (NMD) が働かないなどの他にも、生理的なストレスにより大量のタンパクが必要になったときのためのストックである、とする生物学的な意味付けをする考え方もある (Prasanth et al, 2005)。この考え方が正しければ、大量に存在する翻訳されないヴァリエントは、いざ鎌倉のための貯蔵品であり、細胞環境の変化に伴い翻訳型のヴァリエントを直ちに産生するためのものであると考えられる。この場合、生理的には翻訳型ヴァリエントの割合は極めて小さいので、わずかにスプライシング効率を上げるだけで効果的に RNA 編集を調節できる。ALS 運動ニューロンではこの調節機構に微妙な変調を来し、活性型ヴァリエントの産生が落ちても調節機構が働かない可能性がある。

擱筆を前に

疾患として世に出て以来 140 年が経過しようとしている時点で、ALS の病因が解明され始め、疾患分類、診断についても疾患を引き起こす分子メカニズムから行われる時代によくやつある。孤発性 ALS についても、病因の糸口が捉えられたことにより、疾患特異的な分子機構についての研究から特異治療への道もみえてきた時代である。多くの神経変性疾患は、孤発例が大多数を占めるが、家族例の研究により病態の理解は飛躍的に進んだ。しかし、ALS の場合には、ALS1 を代表とする家族性 ALS の研究からは運動ニューロンはなぜ死ぬかの理解は必ずしも深まらず、むしろ、グルタミン酸を中心とした興奮性細胞死のメカニズムの神経薬理・生理・生化学研究の中からの掘り下げの方がわれわれ神経内科医の理解を深めた感がある。この研究の流れが、脳内活性物質としてのグルタミン酸システムの異常が神経疾患の細胞死に働いているという認識を深め、機能からの治療法開発戦略につながっている。この分子異常の解明に向けた研究が、実際の治療への反応に結びつくまでの時間は、Charcot 以来経過した時間を考えると、はるかに短くて済むという予感がする。

謝辞

この研究は、文部科学省科学研究費特定領域研究、厚生労働科学研究費、ALS 協会、三菱財団などの援助を受けて行ったものである。

文献

- 1) Aizawa H, Kimura T, Hashimoto K, Yahara O, Okamoto K, Kikuchi K: Basophilic cytoplasmic inclusions in a case of sporadic juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuro Sci* 176: 109-113, 2000
- 2) Brusa R, Zimmermann F, Koh D, Feldmeyer D, Gass P, Seeburg P, Sprengel R: Early-onset epilepsy and post-natal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* 270: 1677-1680, 1995
- 3) Feldmeyer D, Kask K, Brusa R, Kornau HC, Kolhekar R, Rozov A, Burnashev N, Jensen V, Hvalby O, Sprengel R, Seeburg PH: Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat Neurosci* 2: 57-64, 1999
- 4) Gerber A, O'Connell M, WK: Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette. *RNA* 3: 453-463, 1997
- 5) 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸: ALS と AMPA 受容体. *脳神経* 57: 585-598, 2005
- 6) Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, Feldmeyer D, Sprengel R, Seeburg PH: Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406: 78-81, 2000
- 7) Jia Z, Agopyan N, Miu P, Xiong Z, Henderson J, Gerlai R, Taverna F, Velumian A, MacDonald J, Carlen P, Abramow-Newerly W, Roder J: Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17: 945-956, 1996
- 8) Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S: Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: Skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene* 363: 193-201, 2005
- 9) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S: Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427: 801, 2004
- 10) Kawahara Y, Ito K, Sun H, Kanazawa I, Kwak S: Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci* 18: 23-33, 2003a
- 11) Kawahara Y, Kwak S: Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6: 131-144, 2005
- 12) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong SY, Kanazawa I: Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 85: 680-689, 2003b
- 13) Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue

- G, Tsuji S, Kwak S : Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* 54 : 11-14, 2006
- 14) Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovskva V, Muller G, Hartmann B, Tschauner K, Waibel S, Ludolph AC, Ikonomidou C, Seeburg PH, Turski L : Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 5826-5831, 2005
 - 15) 郭 伸 : ALS のグルタミン酸受容体異常と病因との関連について. *運動障害* 14 : 33-41, 2004
 - 16) Kwak S, Kawahara Y : Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med* 83 : 110-120, 2005
 - 17) Kwak S, Weiss JH : Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16 : 281-287, 2006
 - 18) Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, Vargas ME, Jokel ES, Carpenter EM, Zanjani H, Hurst RS, Efstratiadis A, Zeitlin S, Chesselet MF : Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 58 : 515-532, 1999
 - 19) Liu Y, George CX, Patterson JB, Samuel CE : Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J Biol Chem* 272 : 4419-4428, 1997
 - 20) Morton AJ, Leavens W : Mice transgenic for the human Huntington's disease mutation have reduced sensitivity to kainic acid toxicity. *Brain Res Bull* 52 : 51-59, 2000
 - 21) 西本祥仁, 日出山拓人, 河原行郎, 郭 伸 : AMPA 受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集と ALS における神経細胞死. *Clini Neurosci* 24 : 222-225, 2006
 - 22) Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS : The GluR2 (GluR-B) hypothesis : Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20 : 464-470, 1997
 - 23) Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, Lau L, Liu S, Liu F, Lu Y : ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* 49 : 719-733, 2006
 - 24) Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL : Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 123 : 249-263, 2005
 - 25) Rembach A, Turner BJ, Bruce S, Cheah IK, Scott RL, Lopes EC, Zagami CJ, Beart PM, Cheung NS, Langford SJ, Cheema SS : Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci Res* 77 : 573-582, 2004
 - 26) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. : Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362 : 59-62, 1993
 - 27) Snider BJ, Moss JL, Revilla FJ, Lee CS, Wheeler VC, Macdonald ME, Choi DW : Neocortical neurons cultured from mice with expanded CAG repeats in the huntingtin gene : unaltered vulnerability to excitotoxins and other insults. *Neuroscience* 120 : 617-625, 2003
 - 28) Spalloni A, Albo F, Ferrari F, Mercuri N, Bernardi G, Zona C, Longone P : Cu/Zn-superoxide dismutase (GLY93->ALA) mutation alters AMPA receptor subunit expression and function and potentiates kainate-mediated toxicity in motor neurons in culture. *Neurobiol Dis* 15 : 340-350, 2004
 - 29) Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S : Slow and selective death of spinal motor neurons *in vivo* by intrathecal infusion of kainic acid : implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 98 : 782-791, 2006
 - 30) Suzuki T, Tsuzuki K, Kameyama K, Kwak S : Recent advances in the study of AMPA receptors. *Folia Pharmacol Jpn* 122 : 515-526, 2003
 - 31) Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, Kanazawa I : Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 46 : 806-815, 1999
 - 32) Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itoharu S, Shin RM, Miura M, Masuda M, Aosaki T, Urushitani M, Misawa H, Takahashi R : Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 13 : 2183-2196, 2004
 - 33) Tortarolo M, Grignaschi G, Calvaresi N, Zennaro E, Spaltro G, Colovic M, Fracasso C, Guiso G, Elger B, Schneider H, Seilheimer B, Caccia S, Bendotti C : Glutamate AMPA receptors change in motor neurons of SOD1G93A transgenic mice and their inhibition by a noncompetitive antagonist ameliorates the progression of amyotrophic lateral sclerosis-like disease. *J Neurosci Res* 83 : 134-146, 2006
 - 34) Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, Robberecht W, Van Den Bosch L : GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 : 605-612, 2005
 - 35) Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, Baimbridge KG, Hayden MR, Raymond LA : Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 25 : 469-479, 2004
 - 36) Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA : Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease

Neuron 33 : 849-860, 2002

Abstract

Molecular mechanism underlying death of motor neurons in sporadic ALS : towards specific therapy

Shin Kwak

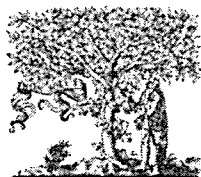
from

*Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.*

AMPA receptor-mediated neuronal death plays a pivotal role in motor neuron diseases, and an increase of Ca^{2+} influx has been proposed to initiate the death cascade. Both a decrease of RNA editing at the GluR2 Q/R site and a decrease of relative GluR2 level among AMPA receptor subunits result in an increase of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors expressed on neurons. The former mechanism plays in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), whereas the latter is the mechanism underlying familial ALS (ALS1) linked to mutated copper-zinc superoxide dismutase gene (*SOD1*). On the other hand, AMPA receptor-mediated mechanism does not seem to play any role in death of motor neurons in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). The difference of molecular mechanism underlying neuronal death in sporadic ALS and ALS1 implies that the effective therapy to ALS1 may not be applicable to sporadic ALS and a specific strategy may be necessary to develop specific therapy for sporadic ALS.

(Received : August 29, 2006)

Shinkei Kenkyu no Shinpo (Advances in Neurological Sciences), Vol. 50, No. 6, pp902-911, 2006.
IGAKU-SHOIN Ltd., Tokyo, Japan.

available at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

www.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Short Communication

Localization of Id2 mRNA in the adult mouse brain

Kazuhito Kitajima^{a,b,c}, Ryosuke Takahashi^c, Yoshifumi Yokota^{a,*}^aDepartment of Molecular Genetics, School of Medicine, University of Fukui, 23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, Fukui 910-1193, Japan^bDepartment of Neurology, Fukui Red Cross Hospital, 2-4-1 Tsukimi, Fukui 918-8501, Japan^cDepartment of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo 606-8507, Kyoto, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 12 December 2005

Available online 27 January 2006

Keywords:

Helix-loop-helix protein

Id2

Gene expression

Adult brain

Mouse

Abbreviations:

bHLH, basic helix-loop-helix

HLH, helix-loop-helix

DEPC, diethylpyrocarbonate

ABSTRACT

Id proteins are negative regulators of basic helix-loop-helix transcription factors and are involved in cellular differentiation and proliferation. Four members of the Id gene family exhibit closely related but distinct expression patterns in various mammalian organs of not only embryos but also adults. Among them, Id2 is known to be expressed in Purkinje cells and neurons in the cortical layers of the adult mouse brain, suggesting that Id2 is involved in some neural functions in the adult. To get insight into the role of Id2 in the nervous system, we investigated the localization of Id2 mRNA-expressing cells in the adult mouse brain in detail by *in situ* hybridization with the radiolabeled antisense probe and compared it with the localization of other Id gene family members. The results indicated that Id2 mRNA is detected in more varied brain regions than previously reported. These regions include the amygdaloid complex, caudate putamen, globus pallidus, substantia nigra pars reticulata, suprachiasmatic nucleus, and the anterior part of the subventricular zone. These results suggest the possibility that Id2 plays a role in the neural activity and cognitive functions. On the other hand, Id1 was barely detectable. Although moderate or low expression of Id3 was observed diffusely, high expression was observed in some specific regions including the molecular layer of the dentate gyrus and the external capsule. Id4 mRNA was detected in the regions such as the caudate putamen and the lateral amygdaloid nucleus. Thus, the expression pattern of Id2 is distinct from those of other Id gene family members.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Transcription factors play essential roles in various biological processes including cellular differentiation and proliferation by regulating gene expression. They are categorized according to their structural similarities. The basic helix-loop-helix (bHLH) protein family is a typical example. The members of this family share structural characteristics of the basic region and the helix-loop-helix (HLH) domain, which are required for DNA binding and dimerization, respectively (Massari and Murre, 2000). In general, tissue-specific bHLH factors form

heterodimers with ubiquitously expressed bHLH factors, so-called E proteins consisting of E2A gene products (E12 and E47), HEB and E2-2, and regulate the expression of their respective target genes via the consensus-binding site, the E box (Massari and Murre, 2000). Tissue-specific bHLH factors that exhibit a high degree of sequence conservation constitute subfamilies and are involved in similar biological processes (Kageyama and Nakanishi, 1997; Massari and Murre, 2000). For example, neurogenic bHLH factors, such as NeuroD and Mash1, play

* Corresponding author. Fax: +81 776 61 8164.

E-mail address: yyokota@fmsrsa.fukui-med.ac.jp (Y. Yokota).

important roles in cell fate determination, specification and proliferation control during neurogenesis in a wide variety of species by constituting gene regulatory cascades and carrying out their specific functions (Kageyama and Nakanishi, 1997; Massari and Murre, 2000).

Id proteins, inhibitors of DNA binding/differentiation, are negative regulators of bHLH transcription factors, and four members of this protein family, Id1-Id4, have been identified in mammals (Massari and Murre, 2000; Ruzinova and Benezra, 2003). They possess HLH domains and form heterodimers with bHLH factors, but the resultant heterodimers are unable to bind DNA due to the lack of a DNA-binding domain in Id proteins (Massari and Murre, 2000; Ruzinova and Benezra, 2003). Thus, Id proteins inhibit the functions of bHLH factors in a dominant negative manner and suppress bHLH factor-dependent cellular differentiation (Massari and Murre, 2000; Ruzinova and Benezra, 2003). On the other hand, Id proteins have the ability to stimulate cell cycle progression. Although the mechanism remains unclear, Id proteins have been reported to have abilities to inhibit the enhanced expression of cyclin-dependent inhibitors such as p21 by bHLH factors and to antagonize the activity of Rb family proteins (Ruzinova and Benezra, 2003; Yokota and Mori, 2002). Based on these functional characteristics, Id proteins are thought to be involved in the regulation of cell differentiation and in the expansion of immature cell populations (Ruzinova and Benezra, 2003; Yokota and Mori, 2002). In fact, each member of the Id gene family is expressed in a wide range of embryonic tissues including the central nervous system, and different members show similar but distinct expression patterns (Andres-Barquin et al., 2000; Jen et al., 1996, 1997; Neuman et al., 1991; Rubenstein et al., 1999; Tzeng and de Vellis, 1998). Id genes are also expressed in the adult central nervous system (Andres-Barquin et al., 2000; Elliott et al., 2001; Neuman et al., 1991; Riechmann et al., 1994; Rubenstein et al., 1999; Tzeng and de Vellis, 1998), although there is a tendency for the expression levels to decrease (Andres-Barquin et al., 2000; Neuman et al., 1991; Tzeng and de Vellis, 1998). For example, Id2 is expressed in neurons in all layers of the cerebral cortex except layer 4, Purkinje cells of the cerebellum, the olfactory bulb (the mitral cell, glomerular and internal granule cell layers), the hippocampus, and the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the adult rodent brain (Andres-Barquin et al., 2000; Elliott et al., 2001; Neuman et al., 1991; Rubenstein et al., 1999; Tzeng and de Vellis, 1998; Ueda et al., 2002). These observations suggest that Id proteins are involved in cellular functions in terminally differentiated and non-dividing cells, in addition to playing roles in cell differentiation and proliferation control.

To get insight into the role of Id2 in neural functions, we investigated the distribution of Id2 mRNA in the adult mouse brain by *in situ* hybridization. Adult male mice of ICR or the mixed genetic background between NMRI and 129/Sv were used in this study. Similar results were obtained from the two strains. Mice were deeply anesthetized with diethyl ether and perfused transcardially with PBS followed by fixative containing 4% paraformaldehyde in PBS. After perfusion, the brain was taken out of the skull, immersed in the same fixative for 24 h at 4 °C, transferred to 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated 20% sucrose in PBS for 48 h at 4 °C, and then frozen with OCT compound at -80 °C. The brain was cut into 10- μ m-thick

sections on a cryostat and mounted on glass slides. Sections were stored at -80 °C until use. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the University of Fukui for animal experiments. *In situ* hybridization was performed as described (Ishii et al., 1990; Mori et al., 2000). Briefly, 10- μ m-thick coronal sections were treated with 5 μ g/ml proteinase K and acetylated before hybridization. An ³⁵S-labeled RNA probe spanning nt 61-759 of the mouse Id2 cDNA was generated by transcription with RNA polymerase using the pBS-Id2 plasmid as template (Mori et al., 2000). The sections were hybridized in the presence of 50% formamide at 60 °C overnight, washed at high stringency, dipped with NTB2 emulsion (Kodak), and autoradiographed. The sections were then counterstained with the Cresyl Fast Violet solution to allow morphological identification. Anatomical determinations were made according to a standard atlas (Paxinos and Franklin, 2001). *In situ* hybridization of brain sections with the ³⁵S-labeled sense probe gave no appreciable signal and confirmed the specificity of the ³⁵S-labeled antisense probe for the detection of the Id2 mRNA (data not shown).

In the main olfactory bulb, Id2 mRNA was expressed in the mitral, glomerular, and granule cell layers (Mi, Gl, GrO) (Fig. 1A and Table 1), as reported (Neuman et al., 1991). In the anterior olfactory nucleus, both medial (AOM) and posterior (AOP) parts were stained (Fig. 1B). In the septum, Id2 mRNA was moderately expressed in the lateral septal nucleus, intermediate and ventral part (LSI and LSV, respectively) (Fig. 1C), although the expression level was lower in the lateral septal nucleus, dorsal part (LSD), and medial septal nucleus (MS) (Fig. 1C). Some Id2-expressing cells were distributed in the corpus callosum (cc) (Figs. 1C, 3E), in accordance with the report about Id2 mRNA expression in S100⁺GFAP⁻ astrocytes and GFAP⁻ and O4⁻ cells in the rat corpus callosum (Tzeng and de Vellis, 1998).

In the cerebral cortex, Id2 mRNA was detected in all layers except layer 4, and scattered cells were positive for Id2 mRNA in layer 1 (Figs. 1B-G, 2A-C). Strong Id2 mRNA expression was observed in layer 5 of the neocortex as reported (Figs. 1C-F) and in layer 2 in the piriform cortex (Pir) (Figs. 1B-D). In the cingulate (Cg/RS) and retrosplenial cortices (RS), the level of Id2 mRNA expression was high in layers 2 and 3 (Figs. 1E and F).

Strong expression of Id2 mRNA was observed in the many regions of the amygdaloid complex: the basolateral amygdaloid nucleus anterior part (BLA), lateral amygdaloid nucleus dorsolateral part (LaDL), ventromedial part (LaVM), ventrolateral part (LaVL), medial amygdaloid nucleus posterodorsal part (MePD), posteroventral part (MePV), posteromedial cortical amygdaloid nucleus (PMCo), and intercalated nuclei of the amygdala (I) (Figs. 1D-G and 3A). In the other subnuclei, moderately expressing cells were distributed (Fig. 3A). In addition, moderate expression was observed in the dorsal and ventral parts of the anterior amygdaloid area (AAD, AAV), anterior cortical amygdaloid nucleus (ACo), and nucleus of the lateral olfactory tract (LOT) (Fig. 1D). High expression was also seen in the dorsal endopiriform nucleus (DEN) (Figs. 1B and F, 3A). Moderate expression was also observed in the bed nucleus of stria terminalis (BST) (Fig. 1D) and the intraamygdaloid division of the bed nucleus of the stria terminalis

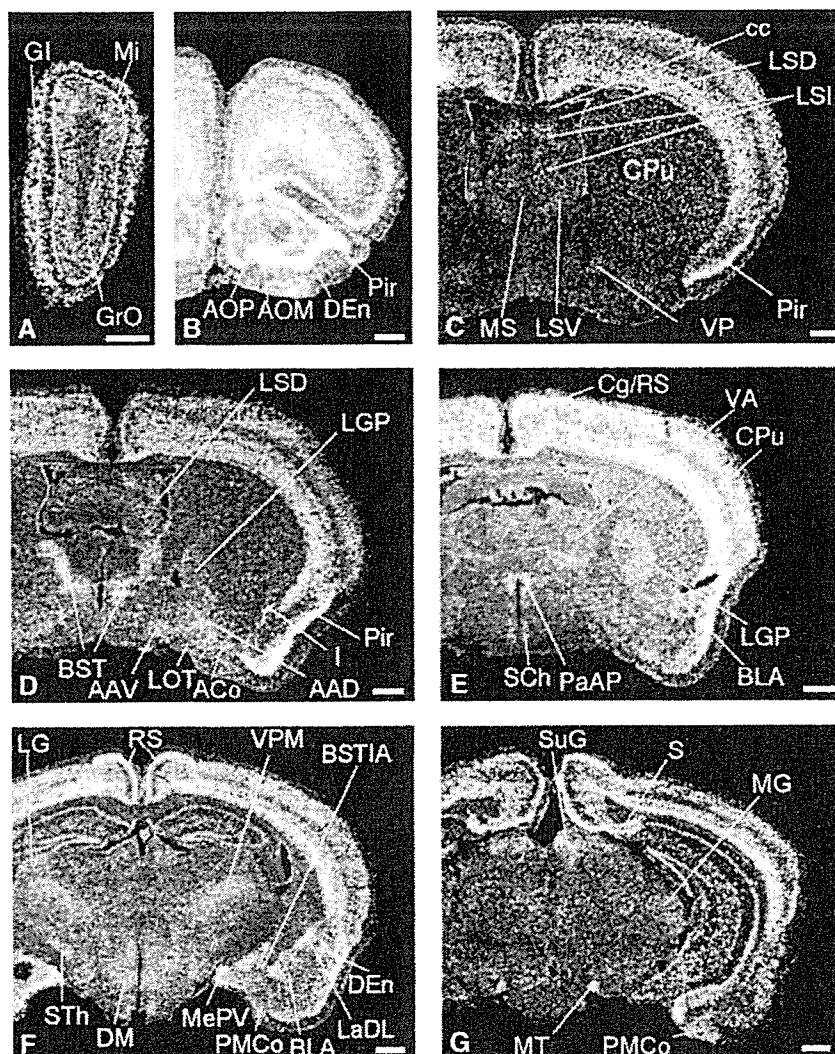


Fig. 1 – Expression of *Id2* mRNA in the forebrain and thalamus. Dark field photomicrographs showing *Id2* mRNA expression in coronal sections. Strong expression was observed in the piriform cortex (B) (C), bed nucleus of the stria terminalis, intercalated nuclei of the amygdala (D), cingulate/retrosplenial cortex (E), dorsal endopiriform nucleus, lateral amygdaloid nucleus dorsolateral part, medial amygdaloid nucleus posterodorsal part (F), subiculum, superficial gray layer of the superior colliculus, and medial terminal nucleus of the accessory optic tract (G). Scale bar, 500 μ m. Abbreviations are listed in Table 1.

(BSTIA) (Fig. 1F). Cells expressing *Id2* mRNA moderately or strongly were dispersed throughout the hippocampus. It has been reported that *Id2*-expressing cells in the hippocampus are interneurons and/or glial cells (Elliott et al., 2001). *Id2* positive cells were found in subgranular zone (SGZ) of the dentate, but most of the granule cells and pyramidal cells were not labeled (Fig. 3B). *Id2* mRNA was clearly detectable in the subiculum (S) (Figs. 1G, 2A and B). Macroscopic observation of the sections demonstrated that the globus pallidus showed the strongest reactivity in the basal ganglia. In the microscopic study of the globus pallidus, most cells were moderately labeled for *Id2* mRNA (LGP) (Fig. 1E). Although medium- to large-sized neurons and some glial cells were moderately labeled in the caudate putamen, the majority of striatal neurons were not positive for *Id2* expression (Figs. 1C–E and 3C).

In the subventricular zone (SVZ) and ependymal region, some cells were labeled (Fig. 3E). In the anterior part of

the subventricular zone (SVZa), which is a source of neuronal progenitor cells for the olfactory bulb (Luskin, 1993), strongly labeled cells were detected (Fig. 3F). In ventral pallidum (VP), moderately labeled cells were detected (Fig. 1C).

Id2 mRNA was expressed in some thalamic subnuclei: moderate expression was seen in the ventral anterior thalamic nucleus (VA) and ventral posteromedial thalamic nucleus (VPM) and weak expression in other regions (Figs. 1E and F). Moderate *Id2* expression was detected in the lateral and medial geniculate nucleus (LG, MG) (Figs. 1F and G) and in the subthalamic nucleus (STh) (Fig. 1F). *Id2* mRNA was also moderately expressed in the suprachiasmatic nuclei (SCh) (Figs. 1E and 3D), paraventricular hypothalamic nucleus anterior parvicellular part (PaAP) (Fig. 1E), and dorsomedial hypothalamic nucleus (DM) (Fig. 1F). In other nuclei located in this area, the expression level was weak or undetectable (Fig. 1E).

Table 1 – Abbreviations

3N	Oculomotor nucleus
4N	Trochlear nucleus
10N	Dorsal motor nucleus of vagus
12N	Hypoglossal nucleus
AAD	Anterior amygdaloid area, dorsal part
AAV	Anterior amygdaloid area, ventral part
aci	Anterior commissure, intrabulbar part
ACo	Anterior cortical amygdaloid nucleus
AOM	Anterior olfactory nucleus, medial part
AOP	Anterior olfactory nucleus, posterior part
BLA	Basolateral amygdaloid nucleus, anterior part
BST	Bed nucleus of the stria terminalis
BSTIA	Bed nucleus of the stria terminalis, intraamygdaloid division
cc	Corpus callosum
cg	Cingulum
Cg/RS	Cingulate/retrosplenial cortex
CPu	Caudate putamen
DC	Dorsal cochlear nucleus
DEn	Dorsal endopiriform nucleus
DM	Dorsomedial hypothalamic nucleus
DR	Dorsal raphe nucleus
DRD	Dorsal raphe nucleus, dorsal part
DRV	Dorsal raphe nucleus, ventral part
ec	External capsule
Gl	Glomerular layer of the olfactory bulb
GrO	Granular cell layer of the olfactory bulb
hbc	Habenular commissure
I	Intercalated nuclei of the amygdala
ic	Internal capsule
InG	Intermediate gray layer of the superior colliculus
Int	Interposed cerebellar nucleus,
IP	Interpeduncular nucleus
IPL	Interpeduncular nucleus, lateral subnucleus
IPR	Interpeduncular nucleus, rostral subnucleus
LaDL	Lateral amygdaloid nucleus, dorsolateral part
Lat	Lateral dentate cerebellar nucleus
LaVL	Lateral amygdaloid nucleus, ventrolateral part
LaVM	Lateral amygdaloid nucleus, ventromedial part
LG	Lateral geniculate nucleus
LGP	Lateral globus pallidus
ll	Lateral lemniscus
LOT	Nucleus of the lateral olfactory tract
LPGi	Lateral paragigantocellular nucleus
LSD	Lateral septal nucleus, dorsal part
LSI	Lateral septal nucleus, intermediate part
LSO	Lateral superior olive
LSV	Lateral septal nucleus, ventral part
LVe	Lateral vestibular nucleus
MePD	Medial amygdaloid nucleus, posterodorsal part
MePV	Medial amygdaloid nucleus, posteroventral part
MG	Medial geniculate nucleus
MHb	Medial habenular nucleus
Mi	Mitral cell layer of the olfactory bulb
MnR	Median raphe nucleus
Mo5	Motor trigeminal nucleus
Mol	Molecular layer of the dentate gyrus
MS	Medial septal nucleus
MT	Medial terminal nucleus of the accessory Optic tract
PaAP	Paraventricular hypothalamic nucleus, anterior parvicellular part
PAG	Periaqueductal gray
Pir	Piriform cortex
PMCo	Posteromedial cortical amygdaloid nucleus (C3)
Pn	Pontine nuclei
PnO	Pontine reticular nucleus, oral part

Table 1 (continued)

Po	Posterior thalamic nuclear group
PO	Periolivary region
Pr5	Principal sensory trigeminal nucleus
RMC	Red nucleus, magnocellular part
RPO	Rostral periolivary region
RS	Retrosplenial cortex
RVL	Rostrovventrolateral reticular nucleus
S	Subiculum
SCh	Suprachiasmatic nucleus
sm	Stria medullaris of the thalamus
SNR	Substantia nigra, reticular part
Sp5	Spinal trigeminal nucleus
st	Stria terminalis
STh	Subthalamic nucleus
SuG	Superficial gray layer of the superior colliculus
TS	Triangular septal nucleus
Tz	Nucleus of the trapezoid body
VA	Ventral anterior thalamic nucleus
VC	Ventral cochlear nucleus
VP	Ventral pallidum
VPL	Ventral posterolateral thalamic nucleus
VPM	Ventral posteromedial thalamic nucleus

While most cells in the pars reticulata of the substantia nigra (SNR) were moderately labeled for Id2 mRNA, no signals were detected in the pars compacta, pars lateralis, or ventral tegmental area (Fig. 2A). Moderate expression was observed in the interpeduncular nucleus (IP) (Fig. 2A). Strongly labeled cells were seen in the medial terminal nucleus of the accessory optic tract (MT) (Fig. 1G). Moderate Id2 mRNA expression was detected in the red nucleus, magnocellular part (RMC) (Fig. 2A). Id2 mRNA was expressed moderately in the superficial gray layer of the superior colliculus (SuG) and weakly in the oculomotor nucleus (3N), the trochlear nucleus (4N) and the intermediate gray layer of the superior colliculus (InG) (Figs. 2A and B).

In the pons, Id2 mRNA was strongly expressed in the pontine nucleus (Pn), while weak expression was observed in the median raphe nucleus (MnR), dorsal raphe nucleus (DR), periaqueductal gray (PAG), and pontine reticular nucleus, oral part (PnO) (Fig. 2B). Id2 mRNA was expressed strongly in the nucleus of lateral lemniscus (ll), rostral periolivary region (RPO), and the ventral and dorsal cochlear nuclei (VC, DC) and moderately in the nucleus of the trapezoid body (Tz), lateral superior olive (LSO), and periolivary region (PO) (Figs. 2C, D, and E). Id2 mRNA was weakly expressed in the motor trigeminal nucleus (Mo5) and principal sensory trigeminal nucleus (Pr5) (Fig. 2D). In the medulla, moderately labeled cells were found in the dorsal motor nucleus of the vagus (10N) (Fig. 2F). Id2 mRNA was weakly expressed in the hypoglossal nucleus (12N), lateral paragigantocellular nucleus (LPGi), spinal trigeminal nucleus (Sp5), and rostroventrolateral reticular nucleus (RVL) (Fig. 2F) In the cerebellum, Id2 was strongly expressed in Purkinje cells, but not in the external granule, molecular, or internal granule cell layers at 8 weeks old of age (Fig. 2E). The cells in the cerebellar nuclei (Int, Lat) showed moderate expression of Id2 mRNA (Fig. 2E). The lateral vestibular nucleus (LVe) displayed moderate expression of Id2 (Fig. 2E).

Northern blot analysis has revealed that the expression level of Id2 in the adult mouse brain is similar to that in the embryonic brain (Andres-Barquin et al., 2000; Neuman et al.,

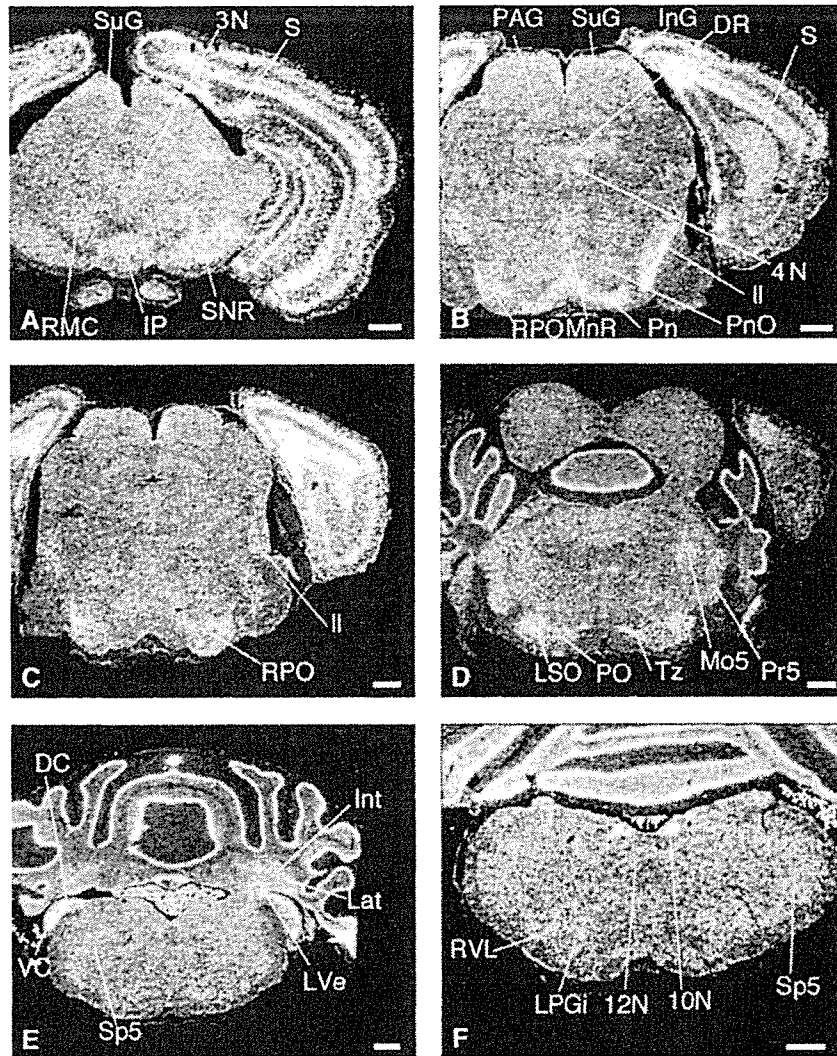


Fig. 2 - Expression of Id2 mRNA in the brainstem. Dark field photomicrographs showing Id2 mRNA expression in coronal sections. Strong expression was observed in the pontine nuclei, lateral lemniscus (B), dorsal and ventral cochlear nucleus (E), and dorsal motor nucleus of vagus (F). Scale bar, 500 μ m. Abbreviations are listed in Table 1.

1991). We examined the regional expression level of Id2 in the adult mouse brain. Total RNA was purified from the cerebral cortex, cerebellum, and caudate putamen of the adult mouse brain. Twenty micrograms of total RNA was separated by electrophoresis on a 1.0% agarose-formaldehyde gel, transferred onto filters, and cross-linked in a UV chamber. Hybridization with the probe derived from the full-length Id2 cDNA and washing were performed under high stringency conditions as described (Mori et al., 2000). X-ray films were exposed with an intensifying screen at -80°C for 72 h. As shown in Fig. 3G, Id2 expression was high in the cerebral cortex and cerebellum and low in the caudate putamen.

The Id gene family consists of 4 members, Id1-Id4. To examine the difference of their expression patterns in the adult mouse brain, we performed *in situ* hybridization with the respective radiolabeled probes. The probes for Id1, Id3, and Id4 corresponded to the regions spanning nt 1-927, nt 560-969, and nt 2927-4701 of the respective cDNAs (Benezra et al., 1990; Christy et al., 1991; Riechmann et al., 1994). Since no apparent signal was detected for Id1 mRNA, we show the results for the

expression of Id3 and Id4 mRNAs. Although Id3 mRNA was detected in many brain regions at a low or moderate level, some specific regions showed higher expression. In the main olfactory bulb, Id3 mRNA was expressed in the glomerular layer (Gl) (Fig. 4A). In the septum, Id3 mRNA was expressed in the medial septal nucleus (MS) and triangular septal nucleus (TS) (Figs. 4B and C). In the stria medullaris of the thalamus (sm), stria terminalis (st), habenular commissure (hbc), and medial habenular nucleus (MHb), Id3 mRNA was moderately expressed (Figs. 4C and D). Some Id3-expressing cells were also distributed in the corpus callosum (cc), external and internal capsule (ec, ic), and cingulum (cg) (Figs. 4B, D, and E). In the cerebral cortex, Id3 mRNA was detected in layers 5 and 6, and scattered cells were positive for Id3 mRNA in layer 1 (Figs. 4B-E). Some cells were moderately labeled in the caudate putamen (CPu) and lateral globus pallidus (LGP) (Figs. 4B and C). In the SVZ-ependymal region, some cells were labeled (Fig. 8B). In the hippocampus, Id3 was expressed in the molecular layer of the dentate gyrus (Mol) (Figs. 4D and E). Moderately labeled cells were scattered in the posterior thalamic nuclear

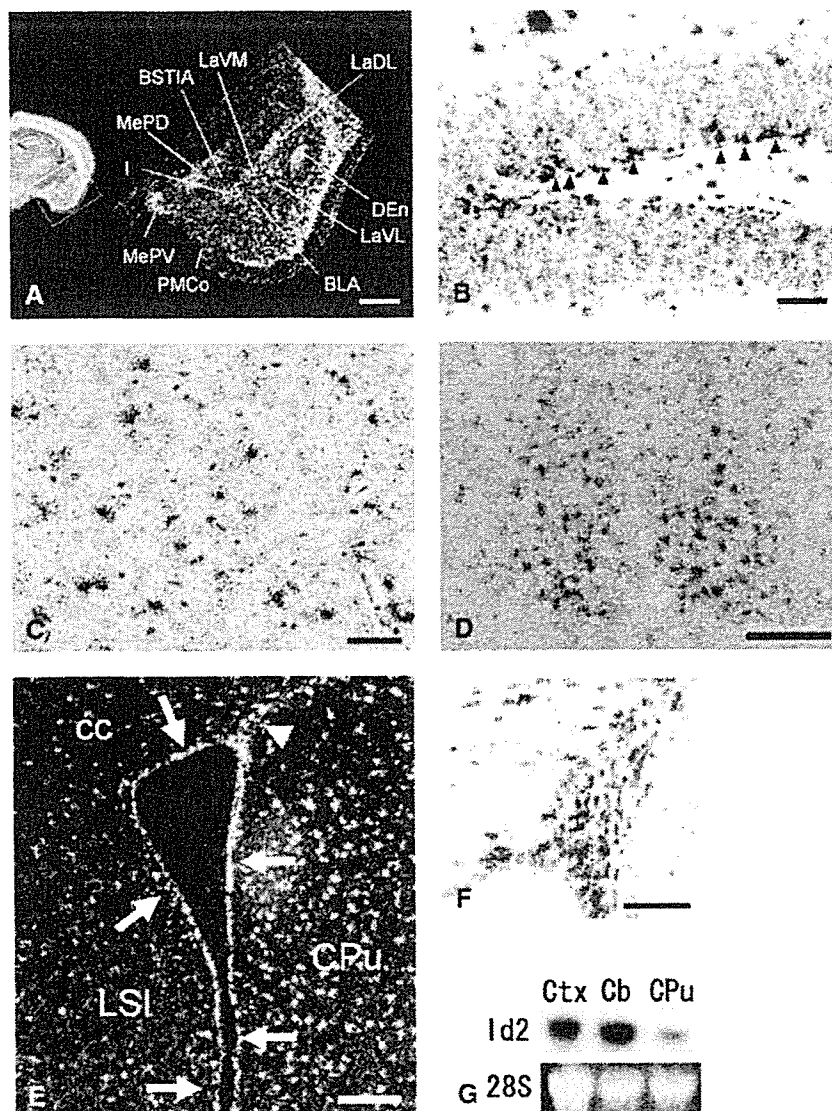


Fig. 3 – Expression of *Id2* mRNA in the brain regions. (A) Dark field photomicrographs showing *Id2* mRNA expression in the amygdala. Coronal sections. High magnification of the area indicated by a square is shown on the right. *Id2* mRNA expression was observed widely in the subnuclei in the amygdala. Strong expression was observed in the dorsal endopiriform nucleus, lateral amygdaloid nucleus dorsolateral part and ventromedial part, medial amygdaloid nucleus posterodorsal part and posteroventral part, intercalated nuclei. Scale bar, 500 μ m. Abbreviations are listed in Table 1. (B) Bright field photomicrograph showing high magnification of the granule layer and subgranular zone of the hippocampus. Note that *Id2* mRNA was detected in the subgranular zone of the dentate where neurogenesis is known to occur (arrowheads). Most of the granule cells and pyramidal cells were not labeled. Scale bar, 50 μ m. (C) Bright field photomicrograph showing *Id2* mRNA expression in the caudate putamen. Strongly labeled cells were scattered sparsely in the caudate putamen. Scale bar, 100 μ m. (D) Bright field photomicrograph showing *Id2* mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. Scale bar, 200 μ m. (E) Dark field photomicrograph showing the expression of *Id2* mRNA in the subventricular zone–ependymal region (arrow) and anterior part of the subventricular zone (SVZa) (arrowhead). Scale bar, 200 μ m. Abbreviations are listed in Table 1. (F) Bright field photomicrograph showing higher magnification of SVZa. Scale bar, 100 μ m. (G) Northern blot analysis for *Id2* expression. Total RNA was isolated from the cerebral cortex (Ctx), cerebellum (Cb), and caudate putamen (CPu) of the adult mouse brain and subjected to Northern blotting. Twenty-eight S ribosomal RNA is shown as a loading control.

group (Po), ventral posteromedial thalamic nucleus (VPM), and ventral posterolateral thalamic nucleus (VPL) (Fig. 4D). In the midbrain, *Id3* was expressed in the interpeduncular nucleus, rostral subnucleus (IPR) (Fig. 4E). On the other hand, the expression level of *Id4* mRNA was low, and long exposure was required to obtain signals. Although we encountered high

background, some regions were identified as positive for *Id4* expression. In the main olfactory bulb, *Id4* mRNA was expressed in the anterior commissure, intrabulbar part (aci), and glomerular layer (Gl) (Fig. 5A). In the caudate putamen, some cells were labeled (Fig. 5B). In the SVZ–ependymal region, some cells were labeled (Fig. 5B). *Id4* mRNA expression