

CAG リピート 病研究チーム

Laboratory for CAG Repeat Diseases

チームリーダー 貫 名 信 行

NUKINA, Nobuyuki

Fragile X 症候群, 筋緊張性ジストロフィー, 球脊髄性筋萎縮症はそれぞれ CCG, CTG, CAG などの三塩基(トリプレット)が異常に伸長することにより疾患の発症を来すことが見いだされ, トリプレットリピート病という疾患概念が確立された。これらの疾患にはトリプレットのリピートの伸長という DNA レベルでの共通の発症機序が存在する。一方トリプレットリピート病の中にはその遺伝子のコーディング領域に異常に伸長した CAG のリピートを認める疾患群が存在し, CAG リピート病と呼ばれる。CAG リピート病にはハンチントン病, マシャドジョゼフ病(MJD), DRPLA, 球脊髄性筋萎縮症(ケネディ病)などが含まれる。本疾患群は異なる臨床症状を呈するが, CAG リピートの伸長が発症と関わっていること, 伸長した CAG が翻訳された, 伸長したポリグルタミンを含む遺伝子産物が出現すること, さらに最近病理学的に CAG リピート病疾患脳の神経細胞の核に封入体が存在することが確認され, これらがユビキチン化されたポリグルタミン鎖を含む遺伝子産物(またはその一部)であることが分かってきており, 共通の機序を基盤とした神経変性疾患であることが示唆される。これらの神経細胞死の過程はこれまで既知の細胞死とは異なるものであると考えられ, その解明は重要である。本研究ではこの神経細胞変性過程を解明し, その発症予防をめざす。さらにこの研究をいわゆるコンフォメーション病研究のモデルとして, 他のコンフォメーション病研究へ応用する。

1. 細胞モデルの解析(Kotliarova, Jana, 坂本, Wang, 澤井, 新保, 長尾, 木村)

mammalian cell に関してポリグルタミン(ハンチンチン exon1)を発現する系を確立し, 解析した。ポリグルタミンに関しては最長 150 リピートのものを作製した。マウス Neuro2a を ecdysone inducible な系として, これに GFP-huntingtin exon1 の発現する系を作製した。細胞死を起こす系と起こさない系とで differential display(DD)を行い, 異なる遺伝子発現を解析し, アポトーシス・ミトコンドリア関連遺伝子である NIP3, ANT1 の抑制を見いだした。現在その他のアポトーシス関連遺伝子の変化を定量的 RT-PCR(TaqMan)を用いて検討し, いくつかの変動パターンを確認したがポリグルタミン発現細胞では一般的に転写抑制傾向が認められた。この系は ecdysone によってタンパク発現をコントロールできるため, 遺伝子発現に対する異常タンパク発現の影響を検出しやすい。現在 DD によって得られた約 1500 クローンおよび subtraction 法を用いて得たクローンをを用いて DNA チップの作製を準備中である。この細胞系においてシャペロン系の影響を検討し, HDJ2, HSP40, HSC70, HSP70 などが異常遺伝子産物と結合していること

を確認し, 報告した。さらにプロテアソーム系が分解系として重要であり, 異常伸長ポリグルタミンは分解が遅延していることを確認した。さらにそのためミトコンドリア障害を引き起こすことも確認した。また小胞体ストレスとポリグルタミンの関連について検討し, 関連性が示唆されている。

2. 動物モデルの作製と解析(Kotliarova, 三井, 上出, 猫沖, 内田, 長尾)

現在までに Bates 等が作製したハンチントン病のエクソン 1 を導入したトランスジェニックマウスがあるが, このマウスは核内封入体が出現しており, CAG リピート病のモデルといえる。同マウスを Jackson 研究所に依頼して購入し(Tg61, Tg62)繁殖させた。このマウスは肝臓にも核内封入体が出現するため, 核内封入体の存在が細胞のタンパク合成などに影響があるかどうかを初代培養系において検討し, タンパク合成については全体としては変化がないことを確認した。この肝細胞初代培養系では核内封入体がすでに存在する状態であり, 一過性発現実験などとは異なる転写調節の異常の検討が可能となった。

一方 GFP-huntingtin exon1 を導入したトランスジェニックマウスを huntingtin promoter を用いて作製しており, いくつかのトランスジェニックマウスを得た(HD150-1)。これらのマウスは 10 週ぐらいから歩行障害などを発症し, 脳には GFP の蛍光を発する凝集体を形成する。現在このマウスを用いて GeneChip を用いた遺伝子発現の検討および Tg62 との比較検討を開始している。

3. 凝集体結合タンパクの解析(Wang, 澤井, 三井, Zemskov)

遺伝子産物結合タンパクの検討はその遺伝子産物の機能を知る上でも重要であるが, ハンチンチン以外については十分行われているとはいえない。MJD 遺伝子産物に対する結合タンパクを two-hybrid system を用いて検討した。その結果酵母の RAD23 の human homologue がこれに結合することが分かり, *in vitro*, *in vivo* の結合を確認, さらに MJD タンパクが形成する核内封入体に結合することを確認し, 報告した。

さらにアポトーシスの系の解析のため様々なシグナル系の解析を行い, 凝集体に recruit されるキナーゼなどを検出し, 現在解析している。

凝集体結合タンパクの解析は現在まではポリグルタミンやあるいはポリグルタミンを含む遺伝子産物との結合タンパクの解析として行われてきたが, 我々は GFP 融合タンパクからなる凝集体形成系を作製した点を利用し, セルソーターを用いて細胞モデル系から凝集体を精製することに成

功した。これによって凝集体に結合するタンパクを直接解析することが可能となった。

4. ポリグルタミンの構造生物学解析 (田中, 牛)

現在ポリグルタミン鎖を含むミオグロビン融合タンパクを作製し, この構造解析を行っている。この系を用いることにより, より構造的に安定したタンパクが得られ, かつポリグルタミン部分は疾患特異的に反応する抗体 1C2 と反応するため, 疾患領域に伸長したポリグルタミンの構造解析が可能になった。CD, IR, NMR などのスペクトロスコピーを用いた検討から伸長したポリグルタミンは分子内, 分子間 β 構造を取ることが確認された。さらにこの系を用いて凝集抑制因子の検討を行っている。

5. 細胞死抑制因子の探索 (坂本, 三井)

細胞モデル系を用いて発現クローニングによって細胞死抑制因子のクローニングを試みた。現在のところ有効な因子のクローニングには成功していない。さらに条件を検討している。

6. 他のコンフォーメーション病の検討 (岩田, 三浦, 丸山)

CAG リピート病はポリグルタミンを含む核内封入体を形成することから, 他の封入体を形成する神経変性疾患を含めコンフォーメーション病ともいわれる。このような疾患の 1 つである, 多系統萎縮症に関してそのオリゴデンドログリアに形成される GCI (glial cytoplasmic inclusion) に関する検討を行った。この封入体は synuclein からなることが報告されている。組織化学的検討から GCI に Elk-1 が結合していることを同定し, synuclein が Elk-1 と複合体を形成することを報告した。さらに本症において synuclein から影響を受けるシグナルカスケードを検討している。また synuclein 導入トランスジェニックマウスを作製した。

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Nagao Y., Ishiguro H., and Nukina N.: "DMSO and glycerol reduce bacterial death induced by expression of truncated N-terminal huntingtin with expanded polyglutamine tracts", *Biochim. Biophys. Acta* **1502**, 247–256 (2000). *

Wang G., Sawai N., Kotliarova S. E., Kanazawa I., and Nukina N.: "Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B", *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1795–1803 (2000). *

Jana N. R., Tanaka M., Wang G., and Nukina N.: "Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: Their role in suppression of aggregation and cellular toxicity", *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2009–2018 (2000). *

Uchida Y., Ito S., and Nukina N.: "Sandwich ELISA for the measurement of Apo-E4 levels in serum and the estimation of the allelic status of Apo-E4 isoforms", *J. Clin.*

Lab. Anal. **14**, 260–264 (2000). *

Zemskov E. A., Kang W., and Maeda S.: "Evidence for nucleic acid binding ability and nucleosome association of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus BRO proteins", *J. Virol.* **74**, 6784–6789 (2000). *

Kawai J., Shinagawa A., Shibata K., Yoshino M., Itoh M., Ishii Y., Arakawa T., Hara A., Fukunishi Y., Konno H., Adachi J., Fukuda S., Aizawa K., Izawa M., Nishi K., Kiyosawa H., Kondo S., Yamanaka I., Saito T., Okazaki Y., Bono H., Saito R., Kadota K., Matsuo Y., Sakai K., Okido T., Furuno M., Aono H., Carninci P., Sakamoto N., Schonbach C. D., Suzuki H., Yoshida K., Hayashizaki Y., RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team, and FANTOM Consortium.: "Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection", *Nature* **409**, 685–690 (2001). *

(総説)

貫名信行: "ポリグルタミン病の分子機構", *現代医療* **32**, 2251–2255 (2000).

大島啓一, 坂本尚昭: "フリードライヒ失調症における伸長した GAA・TTC トリプレット・リピート: DNA 3 重鎖構造の形成とその生物学的意義", *脳の科学* **22**, 849–857 (2000).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nukina N.: "A cellular model for Huntington disease", 1st Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics, (RIKEN BSI, KAIST, KNIH), Wako, Oct. (1999).

Kang W., Zemskov E. A., Imai N., and Suzuki M.: "Functional analyses of BmNPV BRO-A: BRO-A is a nucleic acid binding protein and interacts with a host protein, LAMININ", American Soc. for Virology 19th Ann. Meet., Fort Collins, USA, July (2000).

Tanaka M., Morishima I., and Nukina N.: "Studies on sperm whale myoglobin mutants containing inserted glutamine repeats", 18th Int. Congr. of Biochemistry and Molecular Biology, (IUBMB, the Biochemical Society, and FEBS), Birmingham, UK, July (2000).

Iwata A., Miura S., Kanazawa I., and Nukina N.: "Alpha-synuclein associates with transcription factor Elk-1 in glial cytoplasmic inclusion of multiple system atrophy", 27th Int. Congr. of Neuropathology, Birmingham, UK, Sept. (2000).

Nukina N.: "Polyglutamine diseases: molecular model to animal model", 2nd Korea-Japan Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI-2000), (KAIST, KNIH, RIKEN BSI), Kyongyu, Korea, Nov. (2000).

Iwata A., Sawada M., Kanazawa I., and Nukina N.: "α-synuclein associates with transcription factor Elk-1 in glial cytoplasmic inclusion of multiple system atrophy", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Nukina N., Wang G., Sawai N., Kotliarova S. E., and Kanazawa I.: "Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with two human homologues of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Mitsui K., Jana N. R., Kotliarova S. E., Tanaka M., and Nukina N.: "Intranuclear polyglutamine aggregate does not affect protein synthesis in hepatocyte primary culture from Tg61 transgenic mouse strain of Huntington's disease", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Nukina N.: "Toward gene expression analysis of human brain: A lesson from our study on mouse brain", Genes and Minds Initiative Workshop on Ape Genomics (GEMINI), (RIKEN GSC, National Institute of Genetics, RIKEN BSI), Tokyo, Mar. (2001).

Iwata A., Maruyama M., Kanazawa I., and Nukina N.: "Alpha-synuclein affects MAP kinase pathway and accelerate cell death", 5th Int. Conf. on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Mar.-Apr. (2001).

(国内会議)

Zemskov E. A., 姜媛瓊, 鈴木雅京, 前田進: "カイク核多角体病ウイルスの bro 遺伝子の機能解析", 日本蚕糸学会第 70 回学術講演会, 東京, 4 月 (2000).

岩田淳, 三浦聖子, 三井健一, 金澤一郎, 貫名信行: "多系統萎縮症 (MSA) の Glial cytoplasmic inclusion (GCI) における Elk-1 の共存について", 第 41 回日本神経学会総会, 松本, 5 月 (2000).

貫名信行: "ハンチントン病: CAG リピート病の分子病態", 第 15 回日本大脳基底核研究会, 霞ヶ浦, 7 月 (2000).

王光輝, 澤井紀子, Kotliarova S. E., 金澤一郎, 貫名信行: "MJD1 遺伝子の産物である ataxin-3 は, 酵母 DNA 修復蛋白質 RAD23 の 2 つのヒトホモログ HHR23A, HHR23B と結合する", 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9 月 (2000).

姜媛瓊, Zemskov E. A., 今井典子, 鈴木雅京, 松本正吾: "カイク核多角体病ウイルスの BRO-A と相互作用する宿主蛋白質の解析", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

貫名信行: "ポリグルタミン病の発症機序の解析", 第 3 回 Kawasaki Neurological Society ニューロサイエンスフォーラム, (川崎医科大学神経内科), 倉敷, 3 月 (2001).

Research Subjects and Members of Laboratory for CAG Repeat Diseases

1. Analysis of Cellular Model
2. Developing and Analyzing Animal Model
3. Analysis of Aggregation Binding Protein
4. Structural Biological Study of Polyglutamine
5. Looking for Rescue Factor for Cll Death Induced by Polyglutamine
6. Study on Other Conformational Diseases

Laboratory Head

Dr. Nobuyuki NUKINA

Research Scientists

Dr. Yoshiro NAGAO

Dr. Kenichi MITSUI

Dr. Svetlana E. KOTLIAROVA

Dr. Nihar R. JANA

Dr. Evgueni A. ZEMSKOV

Dr. Naoaki SAKAMOTO

Technical Staffs

Ms. Kazuyo UCHIDA

Ms. Yukiko KAMIDE

Ms. Seiko MIURA

Ms. Noriko SAWAI

Mr. Tetsuaki KIMURA

Dr. San-Yong NIU

Ms. Mieko MARUYAMA

Dr. Munenori NEKOOKI

Assistants

Ms. Harumi TANIGUCHI

Special Postdoctoral Researchers

Dr. Motomasa TANAKA

Dr. Naoaki SAKAMOTO

Junior Research Associates

Mr. Atsushi IWATA

Mr. Itsuki SHINBO

Trainees

Mr. Guang-hui WANG (Fac. Med., Univ. Tokyo)