

培養細胞を用いたポリグルタミン病における 細胞機能障害の検討

高橋 俊昭

新潟大学大学院医学研究科神経内科学分野

(主任：西澤正豊教授)

Cell Dysfunction in Polyglutamine Disease

～ Analysis with Isogenic Tetracycline - Inducible Stable Cell Lines ～

Toshiaki TAKAHASHI

Department of Neurology,

Graduate School of Medicine, Niigata University

(Director: Prof. Msatoyo NISHIZAWA)

要 旨

ポリグルタミン病は、疾患遺伝子内にポリグルタミンをコードする CAG リピート配列を有し、このポリグルタミン鎖が増大することにより細胞毒性を獲得すると考えられている。しかし、ポリグルタミン鎖の詳細な細胞障害機序については現在なお不明な点が多い。ポリグルタミン病での早期の細胞機能障害は可逆的であり、今後の治療開発において重要と考えられる。本研究ではこの早期機能障害を検討するため、生細胞で個々の細胞における細胞機能が検討可能な、発現を誘導可能で安定にポリグルタミン鎖を発現する細胞系を作成した。この系の解析により増大ポリグルタミン鎖の分解抵抗性、細胞内蓄積傾向を明らかとし、凝集体形成に先立った早期のユビキチン・プロテアソーム系の障害および cAMP 反応性配列を介する転写抑制を証明した。

キーワード：ポリグルタミン鎖、伸長数、CRE 関連転写抑制、ユビキチン・プロテアソーム系、分解遅延

はじめに

以下の 9 種の疾病 [球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、脊髄小脳失調症 1 型, 2 型, Machado - Joseph 病, 脊

髄小脳失調型 6 型, 7 型, 17 型] は球脊髄性筋萎縮症 (伴性劣性遺伝) を除き、常染色体優性の遺伝形式を呈し、小脳性失調を中核とした神経症状を呈する。9 疾患とも疾患原因遺伝子が同定されており、原因蛋白質中にグルタミン連続配列領域

Reprint requests to: Toshiaki TAKAHASHI
Department of Neurology
Brain Research Institute
Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585 新潟市旭町通り 1 - 757
新潟大学脳研究所神経内科 高橋 俊昭

(ポリグルタミン鎖)を有し、このポリグルタミン鎖の増大により疾患が引き起こされることが明らかとなっている。ポリグルタミン鎖の伸長は35～40リピートを閾値として発症し、リピート数と発症年齢との間に負の相関を呈する(脊髄小脳失調症6型のみ閾値は20前後)。一部の疾患では、世代を経る毎に、このリピート数の増大が引き起こされ、それに伴い、発症年齢が若年化する特徴がみられる(表現促進現象; anticipation)。病理学的特徴としては、神経系が選択的に障害され、神経細胞の核内に増大ポリグルタミン鎖陽性の凝集体を認める^{1)–5)}。こうした点から、ポリグルタミンの伸長がこれらに共通した原因であると考えられ、ポリグルタミン病という疾患概念で包括されている⁶⁾。

ポリグルタミン病の病態機序は、原因蛋白質内のポリグルタミン伸長がなんらかの細胞障害性を獲得し(gain of toxic function)、神経細胞機能障害を経て最終的に神経細胞死に至ると考えられている。しかし、この神経細胞機能障害獲得性、および、その機能障害の本態は解明されていない。凝集体自身による細胞機能障害性も報告されているが¹⁾、凝集体は細胞保護の結果であるという報告もあり^{7)–9)}、なお統一的な見解にいたっていない。凝集体の免疫組織化学による解析ではTAF_{II}130, CBP, Sp1等の転写因子や転写関連因子の取込みが確認され、増大ポリグルタミン鎖により引き起こされる細胞機能障害の一つとして、転写障害が唱えられてきた^{5)10)–13)}。実際、いくつかのグループにより、伸長ポリグルタミン鎖とCBP, TAF_{II}130, Sp1等の転写因子や転写関連因子との結合が証明され、cAMP反応性配列(以下CRE)を介した転写を阻害することが明らかにされている^{10)–17)}。一方、これらの凝集体はユビキチン陽性であり、かつヒートショックプロテインやプロテアソームの構成成分をも含むことから、転写障害以外の機能障害としてユビキチン・プロテアソーム系(以下UPS)等の蛋白分解系の機能障害も疑われてきた^{18)–20)}。

しかし、これらの機能障害が、いつから、どのような順番で始まるのか、凝集体との関連はどう

か、つまり、機能障害が神経変性をきたす主たる原因であるのか、神経変性後の結果であるのかいまだ証明されていない¹⁴⁾²¹⁾。Yamamotoらのハンチントン病トランスジェニックマウスを用いた検討²²⁾では、変異ハンチンチンの発現を止めることで、既に出現していた表現型の改善や核内凝集体の減少等の病理所見の改善を認め、早期の病態が可逆的に改善しうることを示唆している。加えて本疾患群は発症するまで長期の無症候期間を有する点からも、発症に先立ったもしくは神経変性の早期に認められる機能異常がポリグルタミン病の発病機序および治療のターゲットポイントとして重要であると考えた。この早期機能異常を明らかにするために、ポリグルタミン鎖を発現誘導可能で、鎖長の違いのみで遺伝子導入部位が染色体上で同一な安定細胞株を作成した。細胞疾患モデルは動物疾患モデルにくらべ、発現のコントロールが容易であり、均一な細胞系での解析が可能、かつ解析時期をより早期に設定することが可能である。さらに、蛍光蛋白質を用い、個々の細胞で、目的蛋白質の状態、細胞機能を調べることができる。作成したモデル細胞株を用い、ポリグルタミン鎖発現とCREを介した転写機能解析およびUPS機能解析を行った結果を報告する。

方 法

ポリグルタミン鎖発現プラスミドおよびCREを介した転写レポータープラスミドの作成

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子を患者および健常者ゲノムからpolymerase chain reaction(PCR)法にてprimer(5'-TGATCTCGAGCGCCACCATGGTCTCAACACATCACCATCAC, 5'-TGATGAATTCTAGGAGGGGGCCCA GAGTTTCCGTG)を用い増幅し、得られたDNA断片をXhoI/EcoRIで切断、pHcRed-N1(Clontech)のXhoI/EcoRI切断部位(HcRedの上流)に挿入。これらのplasmidを鋳型としてDRPLA-Q12, 32, 56, 79-HcRedの領域をprimer 5'-AAAAAGCTTCGCCACCATGGTCTCAACACATCA, 5'-AAAAAGCTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGを

用い PCR 法にて増幅, HindIII で切断後 pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) の HindIII 切断部位に挿入した. このプラスミドを DRPLA-Qn (Qn は異なる長さのポリグルタミン鎖長を示す) とした. DRPLA-Qn の C 末 AgeI 切断部位に myc 配列 EQKLISEEDL を挿入し, pT-DRPLA-Qn-myc-HcRed を作成した.

CRE を介する転写機能のレポーターとして, pCRE-d2EGFP (Clontech) を鋳型に CRE-TATA-d2EGFP 領域を primer 5'-AAAGATATCGCACCAGACAGTGACGTCAGCTGCCAGAT, 5'-AAACTCGAGCTACACATTGATCCTAGCAGAAGCAC を用い PCR 法により増幅し, pT-DRPLA-Qn-HcRed の HcRed 領域の下流, EcoRV/XhoI 切断部位に挿入した (pT-DRPLA-Qn-HcRed/CRE-d2EGFP). 作成したプラスミドは ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて塩基配列の確認を行った.

安定細胞株の作成および細胞培養

作成した pT-DRPLA-Qn-HcRed/CREd2EGFP を pOG (Invitrogen) とともに Flp-In-T-REx-293 細胞 (Invitrogen) の Flp リコンビナーゼ標的部位に Effecten Transfection Reagent (キアゲン) を用い導入した. Hygromycin 200 μ g/ml 存在下にて培養し安定細胞株を得た (DRPLA-Q12, 32, 56, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293). 細胞培養は Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) に 10% Fetal Bovine Serum, Hygromycin 100 μ g/ml, Blasticidin 5 μ g/ml を添加した培養液を用い 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ の環境下で継代, 維持を行った.

蛍光強度測定法およびウエスタンブロット法によるポリグルタミン鎖発現の解析

ポリグルタミン鎖-HcRed の蛍光測定は 35mm 径 poly-D-lysine 処理, ガラスボトムディッシュ (MatTek) で各細胞株を培養した後, 細胞培養液に doxycycline を 1 μ g/ml 濃度で添加し, 蛍光顕微鏡 (ニコン TE-300NT) および ORCA-ERII, AQUACOSMOS 蛍光解析ソフトウェア (浜松ホトニクス) を用い, 励起 540-580nm/吸

光 600-660nm の条件下で観察した.

ウエスタンブロット法は doxycycline で発現誘導後 0, 6, 12, 48, 72 時間ごとに細胞を回収し, 溶解バッファー (25mM HEPES pH7.5, 50mM NaCl, 1% NP40, 10% glycerol, 1mM PMSF, 1x complete mini; Roche) で細胞溶解, BCA 法で蛋白濃度を測定後, 各 8 μ g を用い行った. ポリグルタミン鎖は抗 c-myc 抗体 (マウスモノクローナル: cat No.1667149; Roche) を用い ECL+ plus Western Blotting Detection System (Amersham Bioscience) にて検出した. さらに Scion Image for Windows (Scion Corporation) を用いてデンストメトリー解析を行った.

パルスチェイス解析

DRPLA-Q12, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 に doxycycline (1 μ g/ml) を添加, 2 時間後, 15 分間メチオニン非含有培養液に変更し培養したのち, ³⁵S-メチオニン/³⁵S-シスチン 0.1 mCi/ml (redivue Pro-mix L- [³⁵S] in vitro cell labeling mix: AGQ0080; Amersham Bioscience) 存在下で 30 分間培養, 1 回 phosphate buffered saline で洗浄後 doxycycline とアイソトープを除いた通常の細胞培養液に換え, 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間毎に細胞を回収し, 細胞ライセートを一次抗体抗 c-myc 抗体, 二次抗体 Dynabeads M-450 (抗マウス抗体; DYNAL) にて免疫沈降を行い SDS-PAGE にて泳動後, 固定液 (50% メタノール + 10% 酢酸) で処理し, 乾燥, BAS2000 (Fuji) にて定量解析した.

細胞系を用いた UPS 機能評価法

DRPLA-Q12, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 を doxycycline (1 μ g/ml) で 50 時間発現を誘導したのち, プロテアソーム阻害薬である N-acetyl-leu-leu-norleucinal (以下 ALLN) を 10 μ g/ml の濃度で細胞培養液に添加した. 引き続き 50 時間 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ の条件下で培養し, 蛍光顕微鏡による HcRed 蛍光観察 (励起 540-580 nm/吸光 600-660nm) をおこない ALLN を添加してない細胞群と添加した群との蛍光強度を

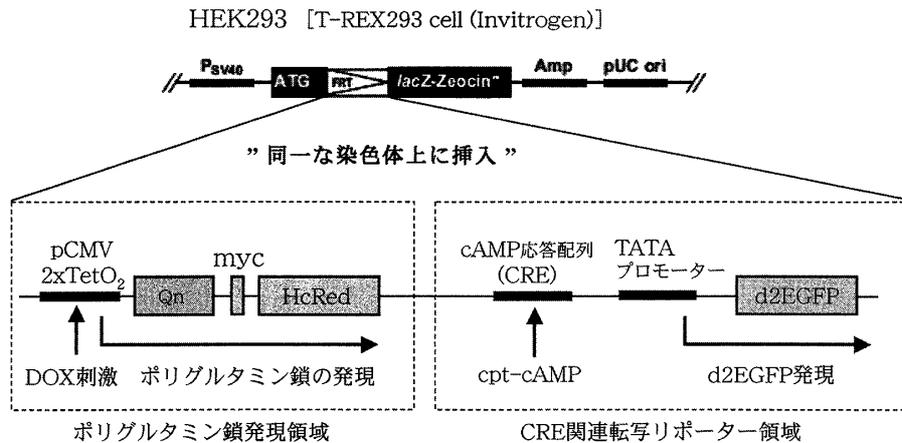


図1 ポリグルタミン誘導安定細胞株の作成

Flp-In-T-REx-293細胞(Invitrogen)のFlpリコンビナーゼ標的的部位(FRT)に、ポリグルタミン鎖-HcRed融合蛋白発現領域、CRE配列下にd2EGFPを有するプラスミドをFRTに組み換え導入した。作成した細胞株はdoxycyclineでポリグルタミン鎖を発現誘導し、cAMP刺激でCREを介した転写活性のレポーターとなるd2EGFPを発現する。

AQUACOSMOS 蛍光解析ソフトウェア(浜松ホトニクス)を用い解析した。

DRPLA-Q12, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293に、Effecten Transfection Reagent(キアゲン)を用いpd2EGFP-N1(Clontech)を遺伝子導入後、doxycycline(1 μ g/ml)を添加しDRPLA-Qn-HcRedの誘導を行った。48時間後、蛋白合成阻害薬Cycloheximide(CHX; 100 μ g/ml)を培養液に添加。その後、0, 1, 2, 3, 4時間ごとに細胞を回収し、そのライセートをSDS-PAGE, ウェスタンブロッティング法(1次抗体: Living Colors A.v. Peptide Antibody-HRP conjugate; Clontech)により残存d2EGFPを評価した。定量解析にはTyphoon 9400(Amersham Bioscience), ImageQuant(Amersham Bioscience)を用いた。d2EGFPはそのC末にUPSによる分解ターゲットとなるPESTアミノ酸配列を有しUPSによる易分解性を呈する(半減期約2時間)ため、d2EGFPの減衰(分解)の程度はUPS機能を反映している。

CREを介した転写機能のレポーター解析

DRPLA-Q12, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293を35mmガラスボトムデッシュで培養後、

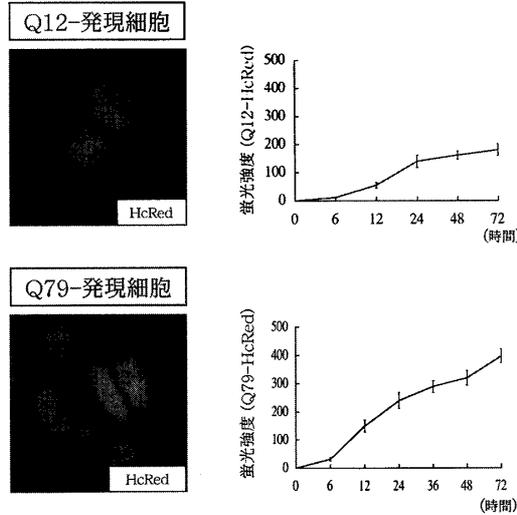
doxycycline(1 μ g/ml)を細胞培養液に添加、72時間後、cpt-cAMP(SIGMA)0.2mMおよび1.0mMを細胞培養液に添加。48時間後、蛍光顕微鏡(ニコンTE-300NT)およびORCA-ERII, AQUACOSMOS 蛍光解析ソフトウェア(浜松ホトニクス)を用い、励起465-495nm/吸光515-555nmにて蛍光強度を測定した。測定は細胞毎に関心領域(ROI)を設定し、各々120細胞においてROI内の蛍光強度の平均を求めた。核内凝集体形成の有無における転写活性の比較は、doxycycline(1 μ g/ml)を細胞培養液に添加、120時間後、cAMP(0.2mM, 1.0mM)の刺激を48時間行い、核内凝集体の有無別に、各々70細胞において蛍光強度を測定した。

結 果

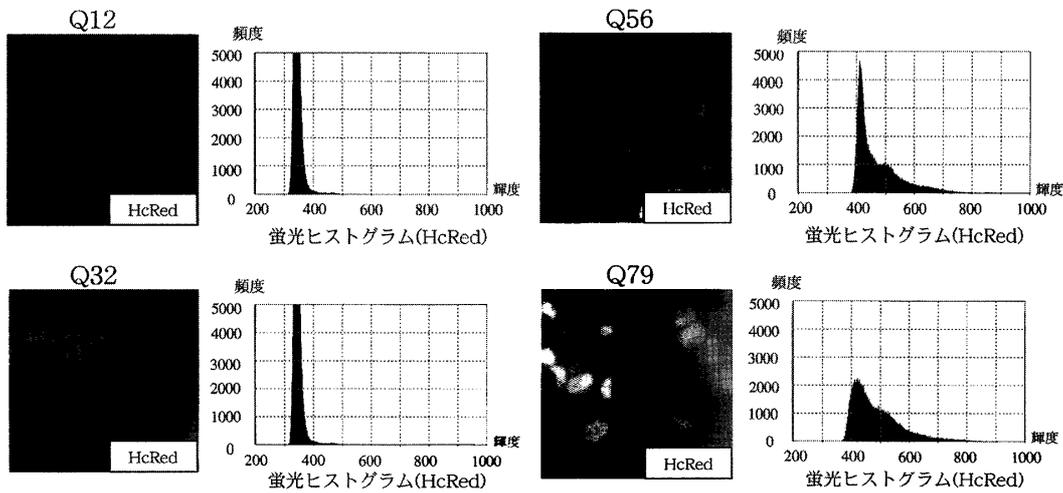
樹立した細胞におけるdoxycyclineによるポリグルタミン鎖発現誘導

樹立したDRPLA-Q12, 32, 56, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293(図1)をdoxycycline(1 μ g/ml)で刺激しポリグルタミン鎖発現を誘導した(図2)。細胞内HcRed蛍光強度はポリグル

A



B



C

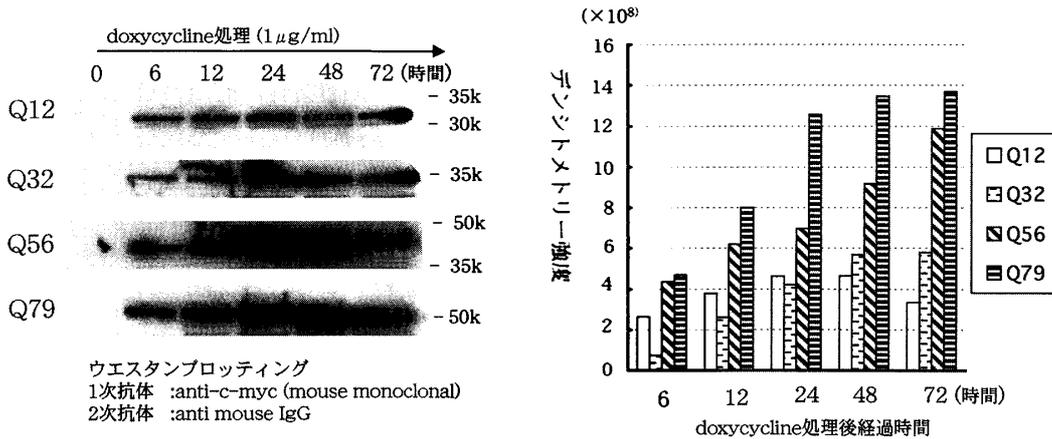


図2 ポリグルタミン鎖の発現量および発現分布の相違 (Q12, 32, 56, 79)

- A : Q79-HcRed は Q12-HcRed に比較して、より高い蛍光強度を認めた。右グラフは各々 20 細胞を測定した平均の蛍光値の経時的推移を示す。(グラフ中のエラーバーは標準誤差を表す。)
- B : 伸長数の増大にともない HcRed 蛍光強度が上昇する傾向を認めた。この結果から伸長数依存性の細胞内のポリグルタミン鎖の蓄積が疑われた。左図は HcRed 蛍光撮影, 右図はその蛍光強度のヒストグラム解析を示した。
- C : ウェスタンブロット法による検出 (左) および、そのデンシトメトリー解析 (右) を行い、増大ポリグルタミン鎖の伸長数に依存した経時的蓄積を認めた。

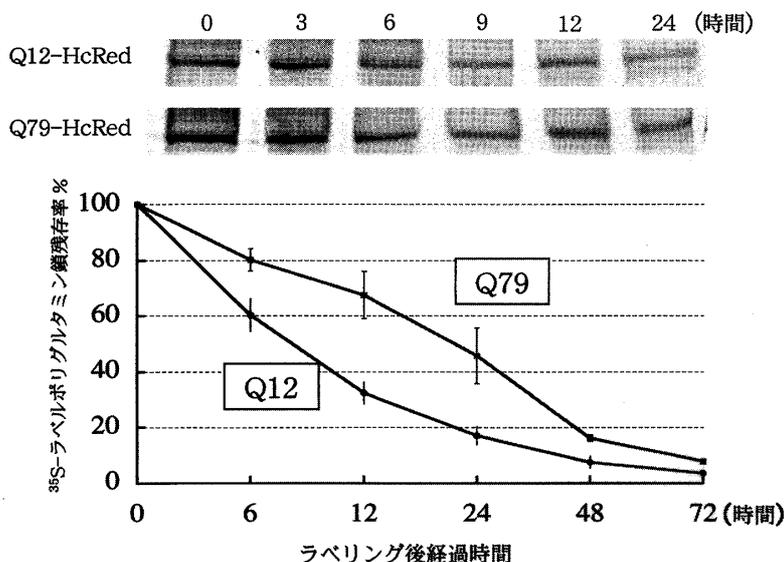


図3 ポリグルタミン鎖 (Q12, Q79) のパルスチェイス解析
DRPLA-Q12, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 を doxycycline で2時間誘導後, ^{35}S -メチオニンによりアイソトープラベルを行い, ポリグルタミン鎖の分解を検討した. 増大ポリグルタミン鎖は正常ポリグルタミン鎖にくらべ, 分解の遅延をみとめる. 右グラフはチェイス開始時の蛋白量を100%とした減衰 (4回の実験の平均±標準誤差) を示す.

タミン伸長数に相関して高くなる傾向を示した (図2A, B). 異なるポリグルタミン鎖長毎の細胞内発現量の経時的増加をウエスタンブロット法にて検出し, デンシトメトリー解析によって評価した (図2C). 発現誘導開始時から72時間の観察で, Q12鎖は12時間以降ほぼ一定の蛋白量が維持されたのに対し, Q32, Q56, Q79鎖は経時的に蛋白量の上昇がみられ, 特に増大ポリグルタミン鎖であるQ56, Q79において顕著であった.

ポリグルタミン鎖の細胞内代謝

増大ポリグルタミン鎖が蓄積していくことから, ポリグルタミン鎖 (Q12およびQ79) の細胞内代謝をパルスチェイス法により解析した (図3). 先行して2時間ポリグルタミン鎖 (Q12, Q79) の発現誘導後, ^{35}S -メチオニンラベリングを行い解析した結果, Q12鎖は半減にいたるまで約8時間を要したのに対し, Q79鎖では約22時間を要し, 増大ポリグルタミン鎖では細胞内蛋白分解が遅延していると考えられた.

ポリグルタミン鎖のUPSに対する影響

次に, 本蛋白分解に対するUPS系の関与を見るために, プロテアソーム阻害薬を用い, ポリグルタミン鎖代謝の検討を行った. 50時間, ポリグルタミン鎖 (Q12およびQ79) を発現誘導後, プロテアソーム阻害薬 ALLN ($10\mu\text{g/ml}$) を添加し, さらに50時間培養した後, ポリグルタミン鎖 (Q12およびQ79) の発現量を蛍光強度ヒストグラムで検討した (図4A). 正常ポリグルタミン鎖 (Q12) は ALLN 添加後, 増大ポリグルタミン鎖 (Q79) とほぼ同等まで細胞内蛍光強度 (HcRed) の著明な上昇が認められた (図4A上段). 一方, 増大ポリグルタミン鎖 (Q79) では ALLN 添加前後で細胞内蛍光値に明らかな変化はなかった (図4A下段).

次に d2EGFP をマーカーとして用いた UPS 機能評価をおこなった²⁰⁾ (図4B). d2EGFP を一過性に導入し, ポリグルタミン鎖 (Q12およびQ79) を48時間発現誘導したのち, 蛋白合成阻害薬 Cycloheximide (CHX; $100\mu\text{g/ml}$) を添加し,

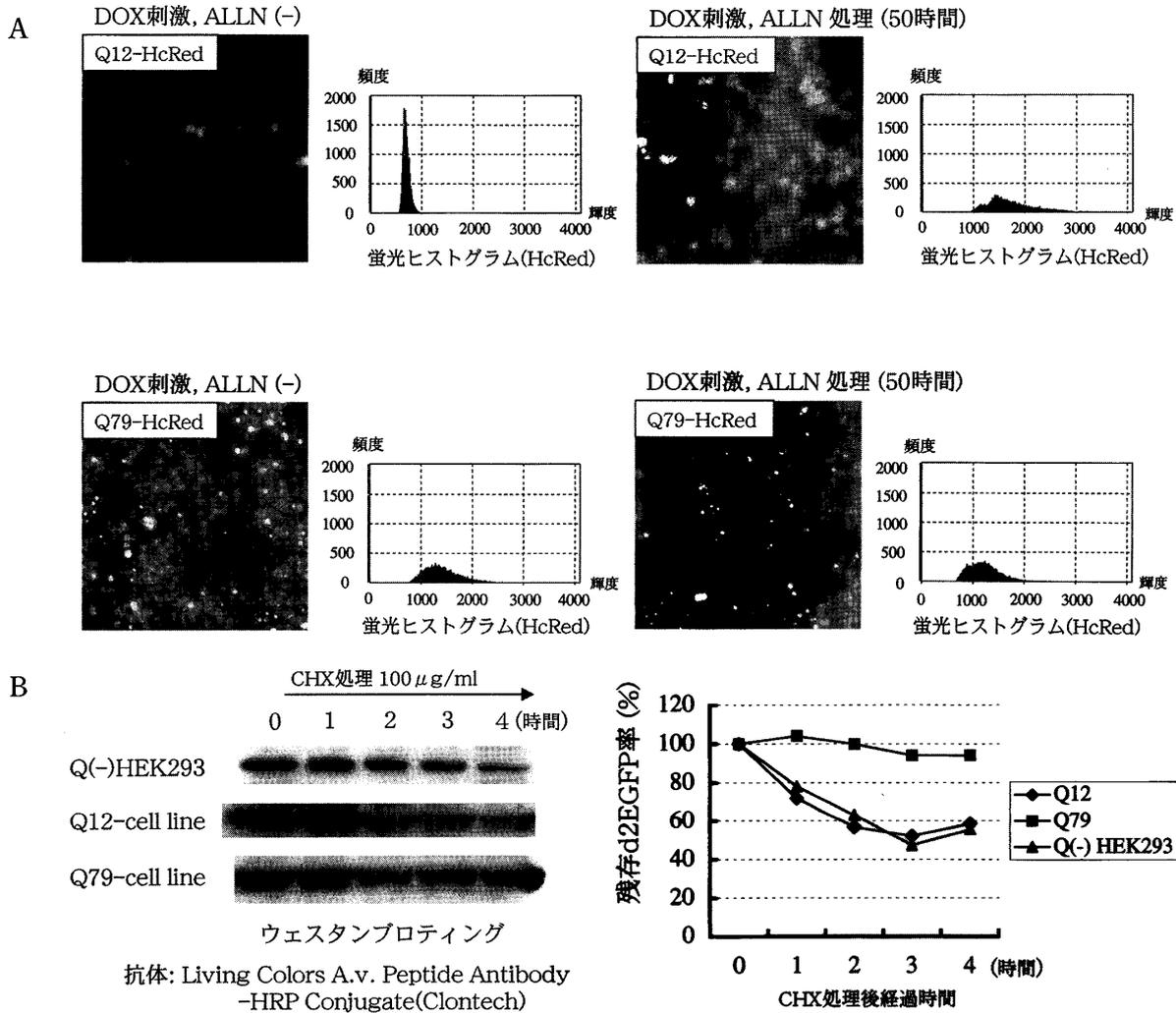


図4 増大ポリグルタミン鎖発現はユビキチン・プロテアソーム機能を障害する。

A : ポリグルタミン鎖誘導下 (50 時間) の細胞 (DRPLA-Q12, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293) に対しプロテアソーム阻害薬である ALLN (10 μ g/ml) を添加し, さらに 50 時間後の HcRed 蛍光強度を観察した. DRPLA-Q12-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 では著明な蛍光強度の上昇がみられるが (上段), DRPLA-Q79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 ではプロテアソーム阻害前後で差異は認めない (下段).

B : ポリグルタミン鎖誘導下 (48 時間) の細胞 (DRPLA-Q12-HcRed/CREd2EGFP/HEK293, DRPLA-Q79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293, HEK293) で, d2EGFP を一過性に発現後, CHX にて新たな蛋白合成を止め, d2EGFP の分解をウェスタンプロテイング法にて経時的測定した. 右はその定量解析で CHX 添加直後を 100 % とした d2EGFP の減衰率を示した. DRPLA-Q79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 では d2EGFP はほとんど分解を受けず, UPS の強い障害が示される. DRPLA-Q12-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 では HEK293 と同様の分解を受ける.

d2EGFPの減衰率をウエスタンブロッティング法にて観察しUPS機能を評価した。増大ポリグルタミン鎖(Q79)を発現した細胞群では4時間後も94%のd2EGFPの残存を認め、d2EGFPの分解は著明に抑制されていた。一方、正常ポリグルタミン鎖(Q12)は4時間後で開始時の59%残存し、ポリグルタミン鎖非発現細胞(56%)と同程度の分解を認めた。

生細胞におけるCREを介した転写発現に対するポリグルタミン鎖の影響

doxycyclineによるポリグルタミン鎖発現誘導後72時間の細胞株においてcAMP細胞外刺激(0.2mMおよび1.0mM)をおこないCREを介した転写活性をd2EGFP蛍光強度にて評価した(図5A)。ポリグルタミン鎖を同時に蛍光顕微鏡観察(HcRed; 励起540-580nm, 吸光600-660nm)し、凝集体形成細胞は2%以下であり、まず凝集体形成のない細胞を選択し解析した。d2EGFP蛍光値によるCREを介した転写活性は0.2mM cAMP刺激では正常ポリグルタミン鎖(Q12)は発現誘導(-)群が平均 65.7 ± 3.00 (標準誤差)に対し、発現誘導(+)群は 28.8 ± 2.16 と発現誘導(-)群の転写活性(100%)に対し44%まで低下した。一方、増大ポリグルタミン鎖(Q79)は発現誘導(-)群が 55.7 ± 3.23 、発現誘導(+)群は 22.3 ± 1.93 と発現誘導(-)群の転写活性に対し40%まで低下を認めた。ANOVA(Analysis of variance)にて非誘導群と誘導群間に有意差が認められた。1.0mM cAMP刺激では正常ポリグルタミン鎖(Q12)は発現誘導(-)群がd2EGFP蛍光強度平均 64.3 ± 2.63 (標準誤差)に対し、発現誘導(+)群は平均 29.9 ± 1.51 と低下(発現誘導(-)群の活性の47%まで低下)、増大ポリグルタミン鎖(Q79)は発現誘導(-)群が平均 91.5 ± 3.23 に対し、発現誘導(+)群は平均 16.2 ± 2.19 と低下を認めた(発現誘導(-)群の活性の18%まで低下)。ANOVAにて群間に有意差を認め、Student-Newman-Keuls検定にて増大ポリグルタミン鎖(Q79)誘導群はQ12誘導群に比して優位な低下を認めた

(図5A)。

次に、この抑制効果に対する凝集体形成の影響を確認するために、ポリグルタミン鎖発現誘導を120時間に延長し、その後同様に48時間のcAMP刺激を行い核内凝集体形成細胞群と非形成細胞群とでCREを介した転写抑制に変化が生ずるかを検証した。CREを介した転写活性(d2EGFP蛍光)は0.2mM cAMP刺激下で非形成細胞群は 35.5 ± 2.36 であったのに対し凝集体形成細胞群は 31.3 ± 2.72 。1.0mM cAMP刺激下で非形成細胞群は 34.6 ± 2.42 であったのに対し凝集体形成細胞群は 32.6 ± 2.59 と有意な違いを認めなかった(図5B)。

考 察

ポリグルタミン病の細胞機能障害機序として転写と分解の機能異常が唱えられてきた。一方、ポリグルタミン病の長さ依存性、閾値の存在、時間依存性を説明しうる病態機序として、凝集体形成が注目されてきた。しかし、これら細胞機能障害と凝集体形成との関係については、必ずしも明確ではなかった。本研究では、この両者の関係を明かすために、ポリグルタミン鎖を発現誘導可能で、その遺伝子導入部位が染色体上で同一(遺伝的背景が均一)、かつその細胞内挙動、機能障害を単一細胞毎に可視化可能な安定細胞株を作成した。従来報告された安定細胞系では、凝集体形成細胞と非形成細胞を区別して細胞機能を解析することが出来なかったが、今回我々の樹立した細胞は、ポリグルタミン鎖の長さ以外の遺伝的背景は、使用した細胞間で全く同一であり、ポリグルタミン鎖の細胞内凝集体の有無が、細胞機能に及ぼす影響を検討することができた。この細胞系により、いずれの細胞機能障害も凝集体形成に先行して起こることを明らかとした。

はじめに、ポリグルタミン鎖の代謝分解に関して考察する。ポリグルタミン鎖はその長さに応じて蓄積していく傾向(図2A, B, C)を認めた。この機序としては、ポリグルタミン鎖の発現が増大している可能性、蛋白分解に関する機能障害が引き起こされている可能性、ポリグルタミン鎖そ

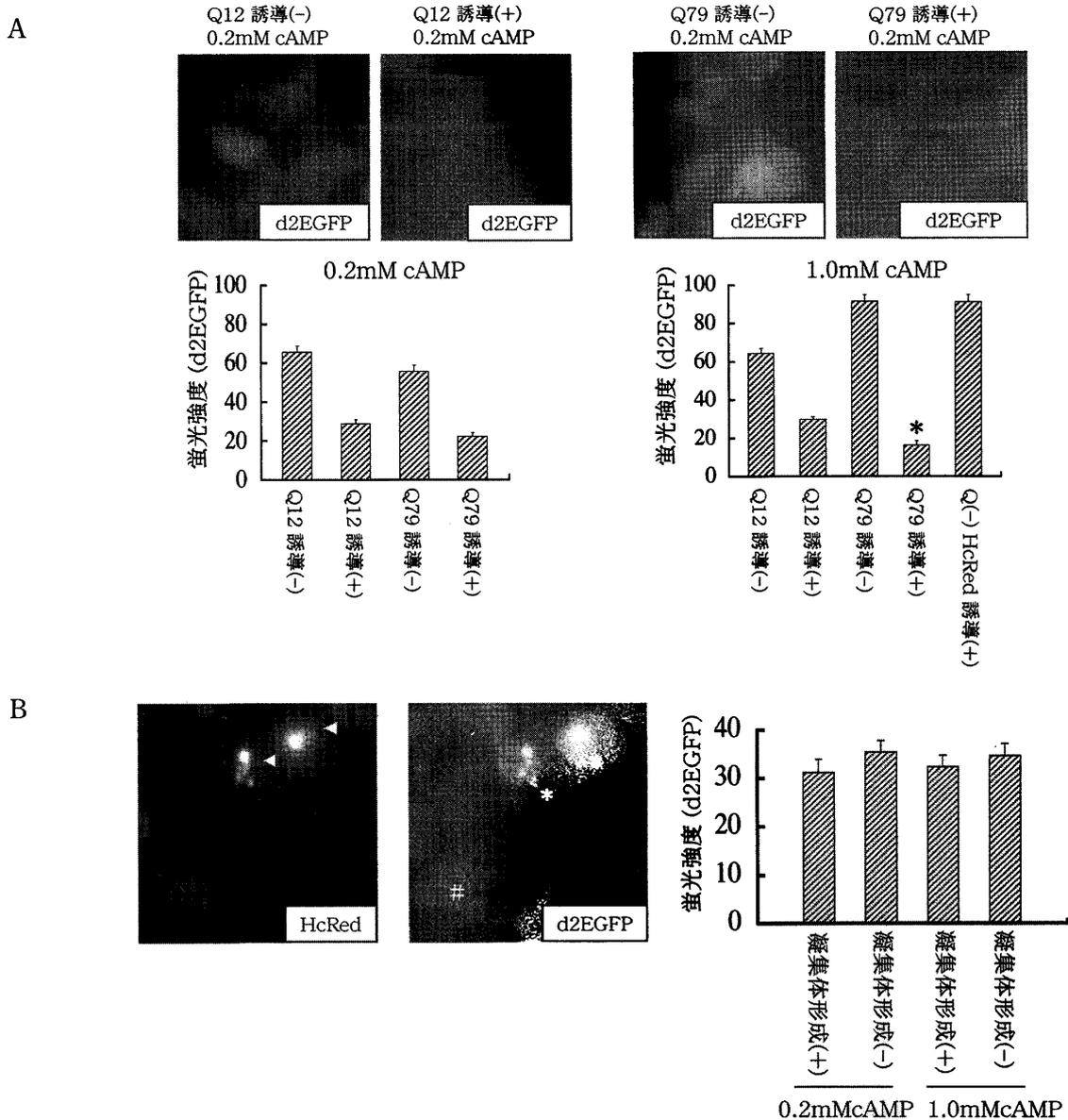


図5 ポリグルタミン鎖の早期の CRE 関連転写抑制効果

- A : DRPLA-Q12, 79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 にてポリグルタミン鎖 (Q12, Q79) 発現後 72 時間における CRE を介する転写活性について凝集体未形成細胞を用い d2EGFP をレポーターとして解析した。上段はポリグルタミン鎖 (Q12, Q79) 非発現および発現後の 0.2mM cAMP 刺激時の d2EGFP 蛍光撮影。下段グラフは cAMP 0.2mM (左) および 1.0mM (右) の CRE 応答 (d2EGFP 蛍光強度) を表し、ともにポリグルタミン発現細胞では明らかな転写抑制効果を認めた ($P < 0.05$ ANOVA)。(グラフ中の各データは 120 細胞測定の前平均値で、エラーバーは標準誤差を示す。*:Student-Newman-Keuls 群間検定で Q12 誘導 (+) 群に比して有意な低下を認めた。)
- B : 核内凝集体形成の転写に対する影響を調べるため、DRPLA-Q79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 にて、誘導時間を 120 時間に延長し、Q79-HcRed の凝集体形成を有する細胞群と有さない群とで CRE を介する転写活性を d2EGFP の蛍光値で比較した。d2EGFP の蛍光値に二群間で差は認めなかった。
- ▲: 核内凝集体, *: 核内凝集体を有する細胞, #: 核内凝集体を有さない細胞 (グラフ中の各データは 70 細胞測定の前平均値でエラーバーは標準誤差を示す。)

のものが分解に対して抵抗性を持つ可能性が推察される。このうちポリグルタミン鎖の発現が増大している可能性については、本細胞系は、tetra-cyclineで誘導されるCMVプロモーター下に発現が調節されており、かつ、その遺伝子導入部位が、細胞間で同一であり、可能性は低いと考えた(図1)。一方、分解に関しては、ウエスタンブロッティング法および蛍光強度分析の結果、細胞内蓄積は、発現誘導6時間後から確認された(図2C)。よって、ポリグルタミン鎖そのものが分解に対して抵抗性を有するのではないかと考えた。実際、ポリグルタミン鎖をわずか2時間のみ少量、発現させた系(まだ増大ポリグルタミン鎖の細胞機能障害が起これない想定した時期)のプルースチス解析で、正常ポリグルタミン鎖(Q12)に比して、増大ポリグルタミン鎖(Q79)では24時間までの分解が遅延していた(図3)。この事実は、増大ポリグルタミン鎖の発現により蛋白分解機序の機能不全が引き起こされたという機序より、むしろ、増大ポリグルタミン鎖が初期の蛋白分解機序に対して抵抗性をもつ可能性があると考えた。

次に、ポリグルタミン鎖を長時間発現させたことにより引き起こされる細胞機能障害を検討するため、50時間発現誘導細胞群(2%以下の細胞にのみ凝集体形成が認められる)でプロテアソーム阻害薬の影響を検討した。プロテアソーム阻害薬により、正常ポリグルタミン鎖(Q12)は著明に蓄積した(図4A上段)。これより、ポリグルタミン鎖はUPS分解代謝を受ける基質であることが示唆された。一方増大ポリグルタミン鎖(Q79)は、プロテアソーム阻害薬添加後も全く信号強度に変化を示さなかった(図4A下段)。このことから、この時点(発現50時間)で、すでにUPSが機能不全に陥っており、プロテアソーム阻害薬による分解抑制効果が認められなかったと推察した。しかし、先の実験から、増大ポリグルタミン鎖そのものも、蛋白分解に対して抵抗性を示すため、このUPS機能障害が一般的な現象であるか検討するため、d2EGFPをマーカーとして用いUPS機能を評価した²⁰⁾(図4B)。d2EGFPはそのC末にUPSによる分解ターゲットとなるPEST

アミノ酸配列を有しUPSによる易分解性を呈する(半減期約2時間)。増大ポリグルタミン鎖を48時間発現後、新たなd2EGFP産生を停止させ、経時的にウエスタンブロッティング法にて確認したところ、増大ポリグルタミン鎖発現細胞ではd2EGFPの細胞内残存を認め、強いUPS機能抑制状態であることが確認された(図4B)。これまでUPS機能障害は増大ポリグルタミン鎖由来の凝集体形成後の細胞モデルで報告されている^{20) 23)}。しかし、本研究によって、増大ポリグルタミン鎖によるUPS機能抑制は凝集体形成に先立って起こることが明らかとなった。以上の結果から、増大ポリグルタミン鎖の蓄積傾向は、まず増大ポリグルタミン鎖そのものが分解抵抗性を示し、後期にはさらにUPSを抑制させることによって生ずると考えた。

UPSは細胞内蛋白質やミスフォールディング蛋白分解の主要経路である。そのためこの機能異常により細胞障害が誘発され細胞死が惹き起こされることが推定される²⁴⁾。増大ポリグルタミン鎖によるUPS障害機序については、今後、明らかにする必要がある。

次に、CREを介した転写機能障害について考察する。本研究では、凝集体形成以前にCREを介した転写機能障害を示すこと(図5A)、凝集体形成によって、その転写機能障害は影響を受けないこと(図5B)を明らかとした。凝集体非形成細胞においても、正常ポリグルタミン鎖(Q12)、増大ポリグルタミン鎖(Q79)ともにCREを介した転写抑制効果を認めたが、1.0mM cAMP刺激下では増大鎖により強くCREを介した転写抑制効果を認めた。これより、ポリグルタミン鎖によるCREを介した転写機能障害には、ポリグルタミン鎖長さ依存性があると考えた。正常ポリグルタミン鎖においてもCREを介した転写機能抑制が認められた事については、ポリグルタミン鎖そのものの生理的な機能である可能性も考える必要がある。

ポリグルタミン病におけるCREを介した転写抑制効果はいくつかのグループより報告されてきた^{10) - 17)}。転写障害の機序としては、Sp1、TAF_{II}130、CBPといった転写因子や転写関連因子

が凝集体に巻き込まれ細胞内濃度が減少するという機序が唱えられてきた^{10)–12)}。一方、近年、凝集体形成は、細胞において防御的に働き、むしろ、凝集体形成前の可溶性増大ポリグルタミン鎖、もしくは顕微鏡で確認できない凝集体 (micro aggregates) が細胞障害性を持つという説が唱えられてきている⁸⁾¹⁵⁾¹⁷⁾²⁵⁾。凝集体形成の有無は、おなじポリグルタミン鎖長であっても、細胞毎に異なるため、従来の、細胞群を一塊とした解析方法では、凝集体形成の有無による CRE を介した転写抑制効果を明確に評価出来なかった。私の方法は、各々の細胞にて、CRE を介した転写機能とポリグルタミン鎖の細胞内挙動を観察することが可能なため (図 1)、CRE を介した転写抑制効果が凝集体形成とは無関係で、かつ先行することを明らかとすることが出来た (図 5A, B)。このことから、少なくとも蛍光顕微鏡下で確認できるような凝集体を形成する以前のポリグルタミン鎖が、CRE を介した転写を抑制することが示された。今後増大ポリグルタミン鎖の細胞機能障害性獲得機序として可溶性増大ポリグルタミン、もしくは micro aggregates について、その細胞障害性の研究を進める必要がある。

本研究は、増大ポリグルタミンの分解耐性を示し、増大ポリグルタミン鎖が蛍光顕微鏡下で確認できる凝集体を形成する以前の極めて早期から、UPS 機能障害および CRE を介した転写障害を引き起こすことを明らかとした。加えて、今回開発された系はポリグルタミン鎖の細胞障害性を生細胞でモニターできる。今後このシステムを用い、薬物のスクリーニングに応用することが可能である。増大ポリグルタミン鎖の各々の因子に対する機能抑制機序を明らかとすることにより、本症の病態を解明し、有効な治療法の開発につながることを期待する。

謝 辞

本研究は、椿神経疾患研究財団により研究助成を受けた。また本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただいた新潟大学脳研究所リソースセンター 小野寺理先生、新潟大学脳研究所神経内科 西澤正豊先生、東京大学大学院医学系研究科神経内科 辻省次先生に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L and Bates GP: Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537–548, 1997.
- 2) Paulson HL, Das SS, Crino PB, Perez MK, Patel SC, Gotsdiner D, Fischbeck KH and Pittman RN: Machado–Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol* 41: 453–462, 1997.
- 3) DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP and Aronin N: Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277: 1990–1993, 1997.
- 4) Martindale D, Hackam A, Wiczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi–Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F and Hayden MR: Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 18: 150–154, 1998.
- 5) Yamada M, Tsuji S and Takahashi H: Pathology of CAG repeat diseases. *Neuropathology* 20: 319–325, 2000.
- 6) Orr HT: Beyond the Qs in the polyglutamine diseases. *Genes Dev* 15: 925–932, 2001.
- 7) Saudou F, Finkbeiner S, Devys D and Greenberg ME: Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95: 55–66, 1998.
- 8) Yu ZX, Li SH, Nguyen HP and Li XJ: Huntingtin inclusions do not deplete polyglutamine–containing transcription factors in HD mice. *Hum Mol Genet* 11: 905–914, 2002.
- 9) Taylor JP, Tanaka F, Robitschek J, Sandoval CM, Taye A, Markovic–Plese S and Fischbeck KH: Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine–containing protein. *Hum Mol Genet* 12: 749–757, 2003.

- 10) Chai Y, Wu L, Griffin JD and Paulson HL: The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem* 276: 44889 - 44897, 2001.
- 11) McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G and Fischbeck KH: CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9: 2197 - 2202, 2000.
- 12) Nucifora FC, Jr., Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM and Ross CA: Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291: 2423 - 2428, 2001.
- 13) Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson I, Tanese N, Takahashi H and Tsuji S: Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat Genet* 26: 29 - 36, 2000.
- 14) Sugars KL and Rubinsztein DC: Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19: 233 - 238, 2003.
- 15) Li SH, Cheng AL, Zhou H, Lam S, Rao M, Li H and Li XJ: Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol* 22: 1277 - 1287, 2002.
- 16) Wyttenbach A, Swartz J, Kita H, Thykjaer T, Carmichael J, Bradley J, Brown R, Maxwell M, Schapira A, Orntoft TF, Kato K and Rubinsztein DC: Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10: 1829 - 1845, 2001.
- 17) Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N and Krainc D: Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296: 2238 - 2243, 2002.
- 18) Stenoien DL, Cummings CJ, Adams HP, Mancini MG, Patel K, DeMartino GN, Marcelli M, Weigel NL and Mancini MA: Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum Mol Genet* 8: 731 - 741, 1999.
- 19) Chai Y, Koppenhafer SL, Shoesmith SJ, Perez MK and Paulson HL: Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Hum Mol Genet* 8: 673 - 682, 1999.
- 20) Bence NF, Sampat RM and Kopito RR: Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552 - 1555, 2001.
- 21) Przedborski S, Vila M and Jackson-Lewis V: Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* 111: 3 - 10, 2003.
- 22) Yamamoto A, Lucas JJ and Hen R: Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101: 57 - 66, 2000.
- 23) Jana NR, Zemskov EA, Wang G and Nukina N: Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10: 1049 - 1059, 2001.
- 24) Glickman MH and Ciechanover A: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373 - 428, 2002.
- 25) Stenoien DL, Mielke M and Mancini MA: Intranuclear ataxin1 inclusions contain both fast- and slow-exchanging components. *Nat Cell Biol* 4: 806 - 810, 2002.

(平成16年1月23日受付)