

部分 DRPLA 蛋白一過性発現系における CREB 依存性転写障害の研究

下 畑 光 輝

新潟大学大学院医学研究科神経内科学専攻

(主任：辻 省次教授)

Suppression of CREB - dependent Transcriptional Activation in the Transient Expression System of Truncated DRPLA Proteins

Mitsuteru SHIMOHATA

Neurology, Graduate Student,

School of Medicine, Niigata University

(Director: Prof. Shoji Tsuji)

Abstract

Dentatorubral - pallidoluysian atrophy (DRPLA) is an autosomal dominant progressive neurodegenerative disorder caused by unstable expansion of a CAG trinucleotide repeat in exon 5 of the DRPLA gene on chromosome 12p13.31, which codes for a polyglutamine stretch. To elucidate the mechanisms of neurodegeneration in DRPLA, suppression of CRE - binding protein (CREB) - dependent transcriptional activation by expanded polyglutamine (polyQ) stretches was analyzed. Phosphorylation of CREB and induction of c - Fos in response to CPT - cAMP were strongly suppressed in Neuro2a cells expressing expanded polyQ in a polyQ - length - dependent manner. The suppression of CREB - dependent transcriptional activation was reversibly restored by increasing the concentration of CPT - cAMP. Expanded polyQ - induced cytotoxicity determined by quantitation of nuclear fragmentation was also substantially suppressed by enhancing CREB - dependent transcriptional activation. FR901228, a histone deacetylase inhibitor, was also demonstrated to restore expanded polyQ - induced suppression of CREB phosphorylation and c - Fos expression. Furthermore, nuclear fragmentation was significantly suppressed by FR901228. Coexpression of dominant - negative CREB vectors considerably abrogated the suppressive effect of CPT - cAMP as well as FR901228 on the expanded polyQ - induced cytotoxicity. These findings suggest that the interference of CREB - dependent transcriptional activation by expanded polyQ stretches is involved in the pathogenetic mechanisms underlying neurodegeneration, and that enhancement of CREB - dependent transcriptional activation is a target of treatment of polyglutamine diseases.

Key words: CAG repeat, polyglutamine, CREB, transcription, HDAC inhibitor

Reprint requests to: Mitsuteru SHIMOHATA
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 下畑光輝

緒 言

現在までに9つの遺伝性神経変性疾患(球脊髄性筋萎縮症: SBMA, ハンチントン病: HD, 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症: DRPLA, 脊髄小脳失調症1型: SCA1, 2型: SCA2, マシャドジョセフ病/3型: MJD/SCA3, 6型: SCA6, 7型: SCA7, 17型: SCA17)において病因遺伝子の翻訳領域内にポリグルタミン鎖をコードするCAGリピートの伸長が見出されている^{1)–12)}. これらのポリグルタミン病の病因蛋白の機能は, SBMA, SCA6, およびSCA17の病因蛋白であるアンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR)¹⁾, 電位依存性Ca α 1Aサブユニット⁹⁾ およびTATA結合蛋白 (TATA-binding protein, TBP)¹¹⁾¹²⁾を除き明らかでないが, ①35~40リピートを閾値として発症すること, ②伸長したCAGリピートと発症年齢に負の相関(表現促進現象)を認めること, ③神経系が選択的に障害され, その病変分布は疾患毎に多様性があること, など共通点が多く, 何らかの普遍的な神経細胞の変性過程の存在が考えられる. 一方, 変異遺伝子の遺伝子産物はmRNA, および蛋白レベルで, 野生型遺伝子の遺伝子産物と大きな変化がないことも明らかにされており, 伸長ポリグルタミン鎖を含む変異蛋白自体が何らかの神経細胞毒性を獲得するものと推測されている (gain-of-toxic function)¹³⁾. 我々のグループはこれまでに, 伸長ポリグルタミン鎖を含む部分DRPLA蛋白(Q82)をbaitにした yeast two-hybrid assay を行い, TATA結合蛋白随伴因子 (TBP-associated factor 130; TAF II 130)が伸長ポリグルタミン鎖に結合することを見いだした¹⁴⁾. TAF II 130は転写因子CREB (cAMP-responsive element-binding protein) やSp1に直接結合し, 転写コアクチベーターとしてこれらの転写因子を介する転写を活性化する機能を有することから¹⁵⁾, 伸長ポリグルタミン鎖とTAF II 130の結合はCREB依存性の転写活性化, すなわち遺伝子発現を阻害する可能性が予測される. 実際, レポーター遺伝子を用いた培養細胞モデルの解析では, 部分DRPLA蛋白(Q82)はCREB転写を

抑制し, かつこの抑制はTAF II 130を共発現することで回復した¹⁴⁾. 同様に, ハンチントン病においても *in vitro* やモデルマウスを用いた検討で, 伸長ポリグルタミン鎖を有する huntingtin がTAF II 130およびSp1に, ポリグルタミン鎖の長さ依存性に結合し, ドパミンD2受容体の発現を抑制することが報告されている¹⁶⁾.

今回, Neuro2a細胞を用いた部分DRPLA蛋白(Q0, 19, 57)一過性発現系において, 膜透過型cAMP (0.1または2mM)投与後のcAMP応答性遺伝子群の蛋白レベルでの発現をウエスタンブロット法で経時的に検討し, 内在性のCREB依存性転写においても伸長ポリグルタミン鎖の長さ依存性に抑制されること, またCREB依存性転写を直接促進する膜透過型cAMPの高濃度での投与, およびクロマチンのリモデリングを介し, 非特異的にCREB依存性転写を促進すると考えられるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与により, 伸長ポリグルタミン鎖によるCREB依存性転写の抑制および細胞毒性が緩和されることを確認したので報告する.

材料と方法

1. プラスミドの構築

伸長ポリグルタミン鎖を含む部分DRPLA蛋白が核移行することで, 細胞障害および凝集体形成が促進されることから¹⁷⁾, 核移行シグナル (nuclear localization signal; NLS), およびGreen Fluorescent Protein (GFP)をC末端に発現し, 異なるポリグルタミン鎖長(Q0, 19, 57)を含む部分DRPLA蛋白(N末側5アミノ酸, C末側5アミノ酸)をコードする, pT-DRPLAQ (0, 19, 57)-NLS-GFPはShimohata, T14)らが作成したものを使用した. 変異型CREBをコードするドミナントネガティブCREBベクターはClontech (#K6014-1)を使用した.

2. 部分DRPLA蛋白の一過性発現と部分DRPLA蛋白発現細胞の回収

Neuro2a細胞はトランスフェクション前日, 60mmディッシュ型プレートに 8×10^5 ずつ培養

した。翌日、pT-DRPLAQ (0, 19, または 57)-NLS-GFP のいずれかを各 $1\mu\text{g}$ ずつ Effectene transfection reagent (Qiagen) を用いてリポフェクション法にて導入したところ、発現効率は $38.2 \pm 2.6\%$ であった。このため、MACSelection system (Miltenyi Biotec) を用いて、部分 DRPLA 蛋白を発現した細胞のみを選択的に回収した。具体的には、上記のプラスミド DNA $1\mu\text{g}$ および培養細胞の細胞膜表面上に CD4 抗原を発現するプラスミド DNA である pMACS4.1 $0.2\mu\text{g}$ を導入し、24 時間後にマグネットビーズを付加した抗 CD4 抗体を加え、部分 DRPLA 蛋白および CD4 抗原を発現した細胞をラベルした。これらの細胞をマグネットカラムにより、部分 DRPLA 蛋白を発現した細胞のみを選択的に回収し、(3)、(4) の蛋白発現解析に用いた。

3. 膜透過型 cAMP 投与時のウエスタンブロット法による蛋白発現解析

上記 (2) により回収した部分 DRPLA (Q0, 19, または 57) を発現した Neuro2a 細胞に、0.1 または 2mM の膜透過型 cAMP (Sigma) 投与し、0, 1, 2, 3, 6 時間後に細胞溶解バッファを用いて細胞抽出液を作成した。蛋白濃度の測定後、Sato らの方法¹⁸⁾ に従い、SDS-PAGE (各検体とも $25\mu\text{g}$) 後、anti-phosphorylated CREB anti-body (Up State; 希釈倍率 1:500), anti-CREB1C21 antibody (Santa Cruz; 1:500), anti-c-Fos (K25) antibody (Santa Cruz; 1:1000), anti- β -Actin antibody (Santa Cruz; 1:2000) を用いてウエスタンブロットを行った。免疫反応を生じた蛋白は、ECL plus (Amersham) を用いて化学発光させた。

4. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤投与時のウエスタンブロット法による蛋白発現解析

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、FR901228 (藤沢薬品) は DMSO (0.02%) にて溶解した。上記 (2) により回収した部分 DRPLA (Q57) を発現した Neuro2a 細胞を、0.5nM の FR901228 投与下に 15 時間培養した後、0.5mM の膜透過型 cAMP を投与した。0, 1, 2, 3, 6 時間後に細胞溶解バッファを用いて細胞抽出液を作成した。蛋白濃度の測定後、SDS-PAGE (各検体とも $25\mu\text{g}$)

し、(3) で用いた anti-phosphorylated CREB antibody, anti-CREB1C21 antibody, anti-c-Fos (K25) antibody, anti- β -Actin antibody および、anti-acetylated histone H3 antibody (Up State; 1:1000) を用いてウエスタンブロットを行った。免疫反応を生じた蛋白は、ECL plus (Amersham) を用いて化学発光させた。ウエスタンブロットの結果はデンストメーターを用いて解析した。

5. 核断片化率および凝集体形成率の検討

Neuro2a 細胞および COS7 細胞を 8 ウェルチャンバースライド (Lab Tek) に各 1×10^4 個ずつ培養後、pT-DRPLAQ (19, または 57)-NLS-GFP を各 $0.1\mu\text{g}$ ずつ Effectene transfection reagent を用いてリポフェクション法にて導入した。導入後、膜透過型 cAMP, forskolin または FR901228 投与下に、Neuro2a 細胞は 72 時間後、COS7 細胞は 48 時間培養した後、GFP 発現細胞における凝集体形成率と核断片化率を蛍光顕微鏡下に観察した。核断片化率は Hoechst33342 ($5\mu\text{M}$) による核染色を用いて計測した。また WST-8 assay は Cell Counting Kit-8 (Wako) を用いて、cAMP 投与 72 時間後に行った。統計学的解析は ANOVA 解析後、Bonferroni 法による補正を行った。

結 果

1. 伸長ポリグルタミン鎖はリン酸化 CREB および c-Fos 蛋白発現を抑制する

コントロールの Neuro2a 細胞におけるリン酸化 CREB および即時応答遺伝子 c-Fos の発現形式を確認するため、膜透過型 cAMP 0.1mM 投与後、0, 1, 2, 3, 6 時間後に細胞抽出液を作成し、抗リン酸化 CREB 抗体、抗 c-Fos 抗体を用いてウエスタンブロットを行った (図 1A)。リン酸化 CREB は投与から 1-2 時間後に発現のピークに達し、3 時間後まで持続した。また即時応答遺伝子 c-Fos は投与 2-3 時間後にピークに達し、6 時間後まで持続した。高濃度 (2mM) の膜透過型 cAMP を投与したところ、リン酸化 CREB および c-Fos の発現は、ともに濃度依存性に発現の

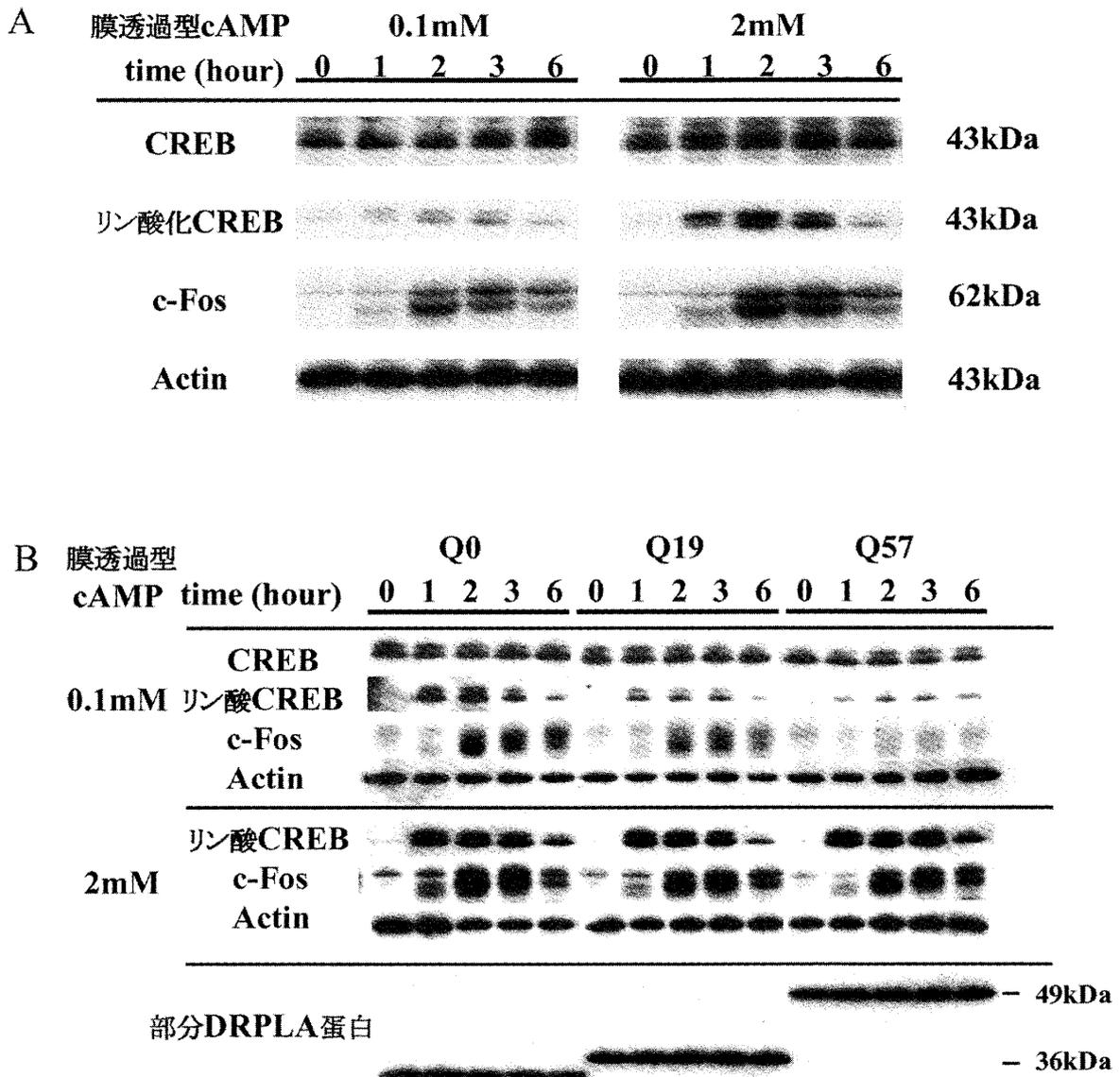


図1 膜透過型 cAMP 投与後の cAMP 応答遺伝子産物の発現

- (A) コントロールの Neuro2a 細胞に膜透過型 cAMP 0.1mM を投与した後、経時的に細胞抽出液を作成し、リン酸化 CREB、c-Fos の発現をウエスタンブロットにて検討した。リン酸化 CREB、c-Fos とも膜透過型 cAMP 投与後 2-3 時間をピークとする発現を認める。膜透過型 cAMP 2mM の投与時には、濃度依存性にリン酸化 CREB、c-Fos の発現増加を認めた。
- (B) 部分 DRPLA 蛋白 (Q0, 19, または 57) を発現した Neuro2a 細胞に、膜透過型 cAMP 0.1mM を投与したところ、リン酸化 CREB および c-Fos の発現は伸長ポリグルタミン鎖の長さ依存性に抑制されたが、膜透過型 cAMP 2mM の投与時には、伸長ポリグルタミン鎖による発現抑制は認められない。

増強が認められた。次に、伸長ポリグルタミン鎖によるリン酸化 CREB および c-Fos 発現への影響を検討するため、部分 DRPLA 蛋白 (Q0, 19, または 57) を発現した Neuro2a 細胞に膜透過型

cAMP 0.1 または 2mM を投与した後、経時的にリン酸化 CREB および c-Fos の発現を検討した。なお、Effectene transfection reagent のプロトコールに従ったトランスフェクション効率は 38.2 ±

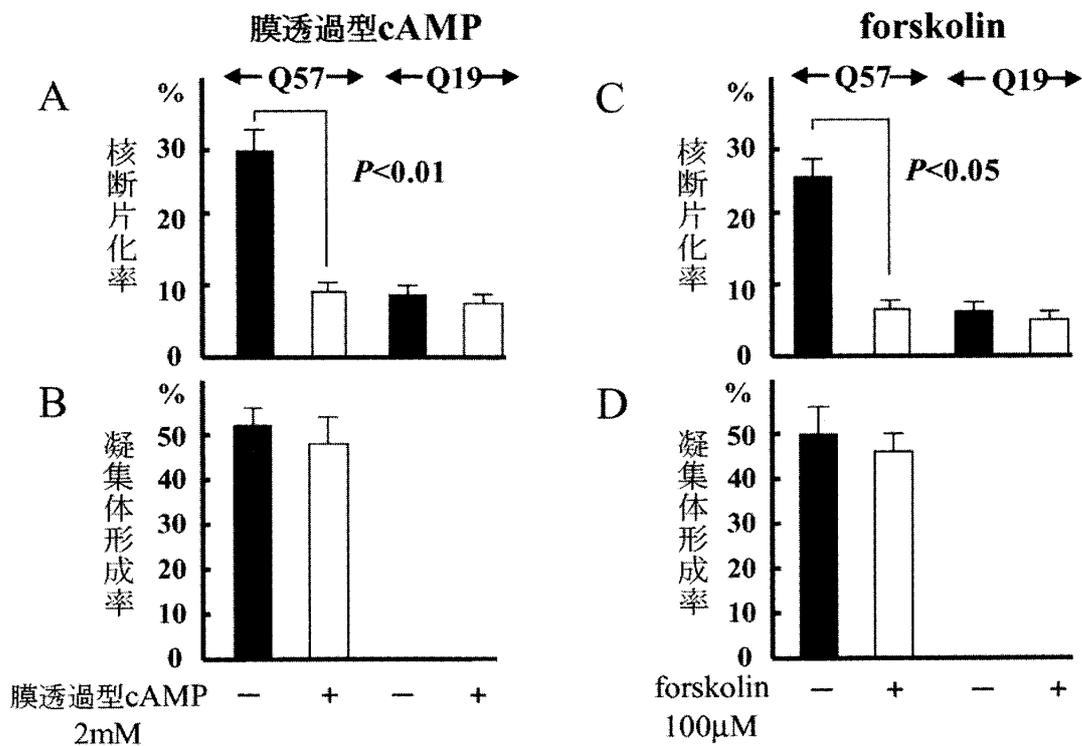


図2 膜透過型 cAMP, forskolin による核断片化抑制効果

部分 DRPLA 蛋白 (Q19 または 57) を発現した Neuro2a 細胞を, 膜透過型 cAMP 2mM または forskolin 100 μ M 投与下に 72 時間培養した後, 核断片化率 (A, C) および凝集体形成率 (B, D) を測定した. 膜透過型 cAMP および forskolin の投与により, 有意な核断片化率の抑制を認めた. 部分 DRPLA 蛋白 (Q19) 発現群では凝集体の形成は見られなかった. グラフは 3 回の平均 \pm 標準偏差を示す.

2.6%であったため, MACS を用いて部分 DRPLA 蛋白を発現した細胞のみを回収した. 回収後, 部分 DRPLA 蛋白を発現した細胞の割合は $80.6 \pm 3.4\%$ であった. 0.1mM の低濃度膜透過型 cAMP 投与後のリン酸化 CREB および c-Fos の発現は, 伸長ポリグルタミン鎖の長さ依存性に優位に抑制されたものの, 2mM の膜透過型 cAMP 投与後のリン酸化 CREB および c-Fos の発現は, Q0, 19, 57 群間で有意な差異を認めなかった (図 1B).

2. 高濃度の膜透過型 cAMP は伸長ポリグルタミン鎖による細胞毒性を緩和する

膜透過型 cAMP の投与により, 伸長ポリグルタミン鎖を含む部分 DRPLA 蛋白の細胞毒性が緩和されるかを検討するため, pT-DRPLA Q57-

NLS-GFP を導入した Neuro2a 細胞を 2mM の膜透過型 cAMP 投与下に培養した. 72 時間後 Hoechst33342 (5 μ M) を用いて核染色し, 核断片化率および凝集体形成率を検討した. GFP 発現細胞における核断片化率は, 膜透過型 cAMP 非投与群において GFP 発現細胞の $29.7 \pm 4.0\%$ に認めたが, 投与群では $9.3 \pm 1.2\%$ と有意な減少を認めた ($p < 0.01$) (図 2A). 一方, 凝集体形成率は投与群においても有意な減少を認めなかった (図 2B). この膜透過型 cAMP の核断片化抑制効果は, 濃度依存性に認められた (図 3A). またアデニル酸シクラーゼの活性化を介し細胞内 cAMP 濃度の上昇を来す forskolin の投与によっても, 濃度依存性の核断片化抑制効果を認めた (forskolin 非投与群; $22.6 \pm 4.9\%$, 100 μ m 投与群; $7.3 \pm$

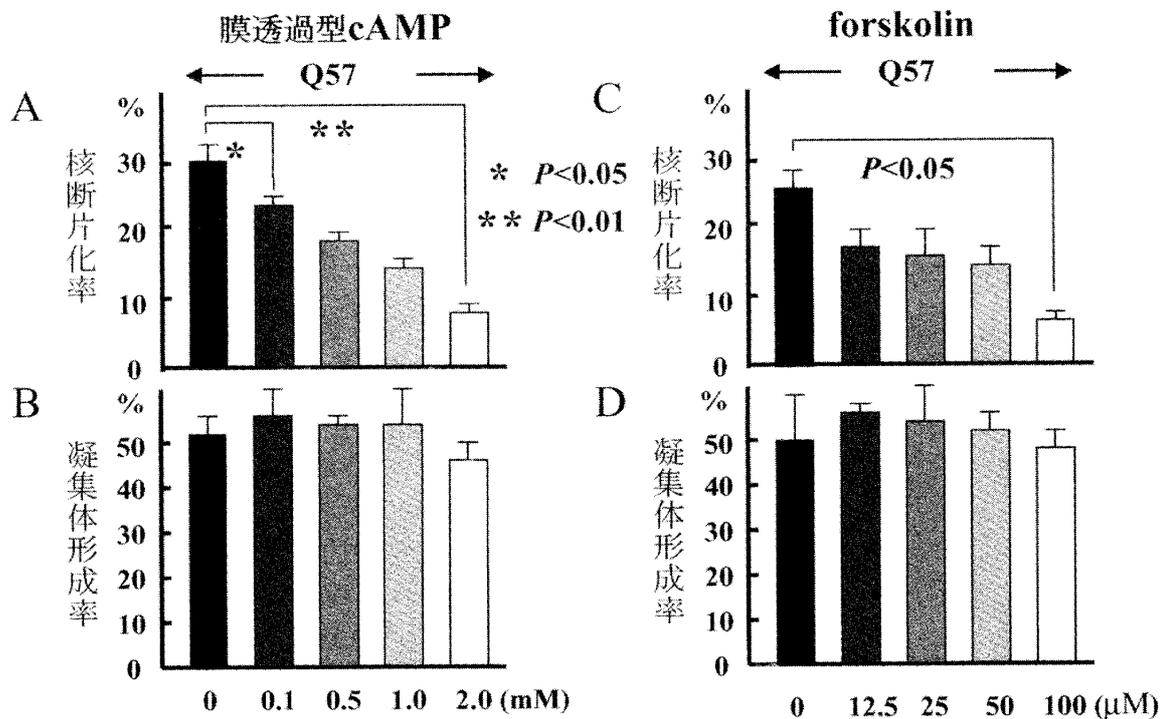


図3 膜透過型 cAMP, forskolin の濃度効果

膜透過型 cAMP および forskolin の核断片化抑制効果 (A, C) は、それぞれ濃度依存性に認められた。

凝集体形成率 (B, D) には有意な減少は認めなかった。グラフは3回の平均±標準偏差を示す。

2.1%, $p < 0.05$) (図 2C, 3C)。さらに COS7 細胞を用いた検討でも、膜透過型 cAMP による有意な核断片化抑制効果が認められた (データ省略)。この膜透過型 cAMP による核断片化抑制効果が CREB 依存性転写を介したものであることを確認するため、Neuro2a 細胞に pT-DRPLA Q57-NLS-GFP に加え、CMV ベクター (コントロール)、野生型 CREB ベクター、変異型 CREB をコードするドミナントネガティブ CREB ベクターのいずれか 1 つ (図 4A) を共発現させたのち、膜透過型 cAMP 0.5mM 投与下に 72 時間培養し、核断片化率を検討した (図 4B)。変異型 CREB 発現群における膜透過型 cAMP の核断片化抑制効果は、CMV ベクターおよび野生型 CREB 発現群に比較し有意に減少していた ($p < 0.05$)。また WST-8 を用いた検討でも、変異型 CREB 発現群では有意に WST-8 値の低下、すなわち生存細胞の減少を認めた ($p < 0.05$) (図 4C)。CMV ベクター、野生

型 CREB、または変異型 CREB のいずれか 1 つのみを Neuro2a 細胞に発現させた際には、核断片化率に有意差を認めなかったことから、部分 DRPLA (Q57) 発現群における膜透過型 cAMP の核断片化抑制効果は、主に CREB 依存性転写の活性化を介したものと考えられた。

3. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は CREB 依存性転写活性化を間接的に促進する

CREB 依存性転写を活性化する高濃度の膜透過型 cAMP の投与により、伸長ポリグルタミン鎖により抑制された CREB 依存性転写が回復したこと、この転写活性化が伸長ポリグルタミン鎖による細胞毒性をも緩和したこと、次に、クロマチン構造のリモデリングを介して CREB 依存性転写を間接的に促進すると考えられる、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による CREB 依存性転写活性化への影響を検討した。まず FR901228 による細胞毒性を来さない至適濃度を決定するた

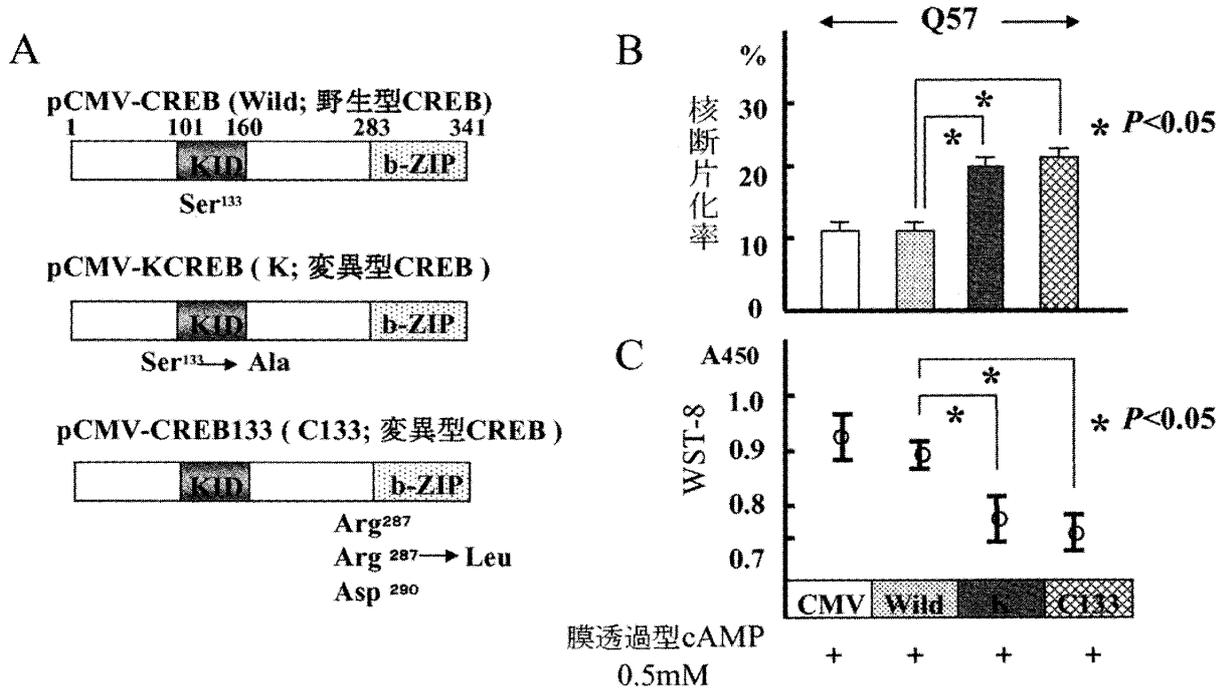


図4 変異型 CREB による、膜透過型 cAMP 核断片化抑制効果の減弱

Neuro2a 細胞に pT-DRPLA Q57-NLS-GFP および、pCMV ベクター、野生型 CREB を発現する pCMV-CREB、変異型 CREB を発現する pCMV-KCREB、pCMV-CREB133 のいずれか (A) を共発現させ、膜透過型 cAMP 0.5mM 投与下に 72 時間培養した後、核断片化率 (B) を検討し、また WST-8 assay (C) を施行した。変異型 CREB の発現により、膜透過型 cAMP の核断片化抑制効果は有意に減弱した。グラフは 3 回の平均±標準偏差を示す。

め、Neuro2a 細胞を 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50nM の濃度下に 48 時間培養後、WST-8 assay による細胞増殖抑制 (図 5A; 棒グラフ)、および核断片化率 (図 5A; 実線) を検討した。濃度依存性に細胞増殖抑制および核断片化率の上昇を認めたが、特に 5nM 以上で顕著であった。また FR901228 は低濃度から濃度依存性にヒストン H3 をアセチル化し、ヒストンアセチル化活性を有していた (図 5B)。以上より FR901228 の濃度を、有意な細胞毒性を来さない 0.5nM とし、CREB 依存性転写への影響を検討した。部分 DRPLA 蛋白 (Q19, または 57) を発現させた Neuro2a 細胞に 0.5nM の FR901228 を投与後、経時的にリン酸化 CREB, c-Fos およびアセチル化ヒストン H3 の発現をウエスタンブロット法にて検討したところ、両群ともアセチル化ヒストン H3 の発現を経時的に認められたものの、リン酸化 CREB, c-Fos の発現は認められなかつ

た (データ省略)。このため、部分 DRPLA 蛋白 (Q57) を発現させた Neuro2a 細胞に、0.5mM の膜透過型 cAMP を単独投与した群、および 0.5mM の膜透過型 cAMP に加え 0.5nM の FR901228 を併用した群間において、リン酸化 CREB および c-Fos の発現を検討した (なお、FR901228 は膜透過型 cAMP の投与 15 時間前から前投与した) (図 6A)。ウエスタンブロットの結果をデンストメーターを用いて計測したところ、併用群においてリン酸化 CREB は投与 2 時間後に単独群の 1.8 倍、c-Fos は投与 3 時間後に 1.9 倍に増強し、かつ発現の延長が認められた (図 6B, C)。

4. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は伸長ポリグルタミン鎖による細胞毒性を緩和する

FR901228 による間接的な CREB 依存性転写の促進作用により、伸長ポリグルタミン鎖を含む部

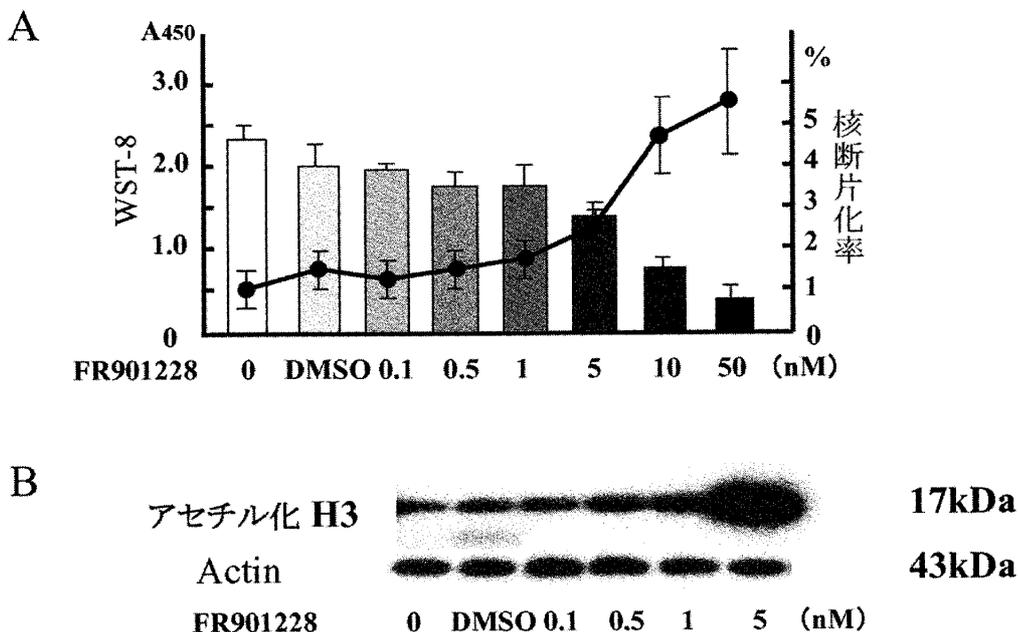


図5 FR901228による細胞毒性およびヒストンアセチル化効果

- (A) FR901228の至適濃度を決定するため、コントロールのNeuro2a細胞を、0-50nMのFR901228の投与下に48時間培養した。5nM以上で顕著な細胞増殖抑制(WST-8 assay; 棒グラフ)および核断片化率(実線)の上昇が見られた。DMSOの濃度は0.02%。グラフは3回の平均±標準偏差を示す。
- (B) コントロールのNeuro2a細胞を、0-5nMのFR901228投与下に48時間培養した後、ウエスタンブロットにてアセチル化ヒストンH3の発現を検討した。濃度依存性にアセチル化ヒストンH3の発現が見られた。

分DRPLA蛋白の細胞毒性が緩和されるかを検討するため、pT-DRPLA Q57-NLS-GFPを導入したNeuro2a細胞を0, 0.1, 0.5, 1nMのFR901228投与下に72時間培養後、核断片化率および凝集体形成率を検討した。核断片化率は、コントロール群においてGFP発現細胞の $28.0 \pm 5.5\%$ に認められたが、FR901228投与群では0.5nMにおいて $14.2 \pm 1.2\%$ と最も有意な減少を認めた(図7A)。一方、凝集体形成率はFR901228投与群においても有意な減少を認めなかった(図7B)。FR901228による核断片化抑制効果におけるCREB依存性転写の関与を検討するため、Neuro2a細胞にpT-DRPLA Q57-NLS-GFPおよびCMVベクター、または変異型CREBベクターをトランスフェクションしたのち、FR901228 0.5nM投与下に72時間培養し、核断片化率(図7C)および凝

集体形成率(図7D)を検討した。変異型CREBの発現により、FR901228の核断片化抑制効果は完全には消失しなかったものの、CMVベクター発現群に比較し著明に減少しており($p < 0.05$)、FR901228の核断片化抑制効果は主にCREB依存性転写を介したものと考えられた。

考 察

今回、培養細胞を用いた部分DRPLA蛋白一過性発現系において、膜透過型cAMPにより誘導されるリン酸化CREBおよびこれに伴う即時応答遺伝子c-Fosの発現は、伸長ポリグルタミン鎖の長さ依存性に抑制されることを確認した。cAMP応答性遺伝子群発現の初期段階において、CREBはprotein kinase A (PKA)によりserine

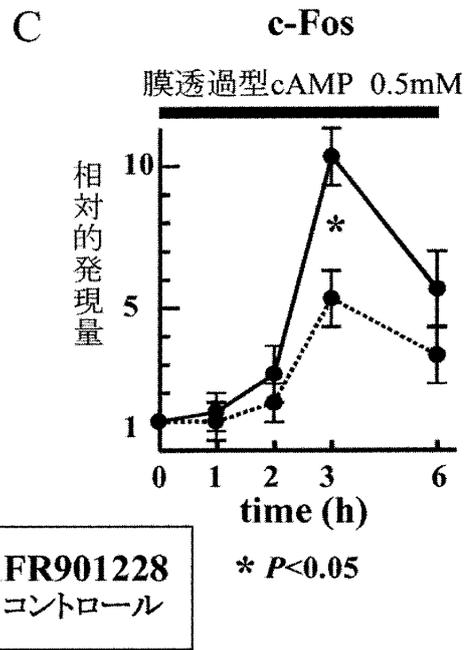
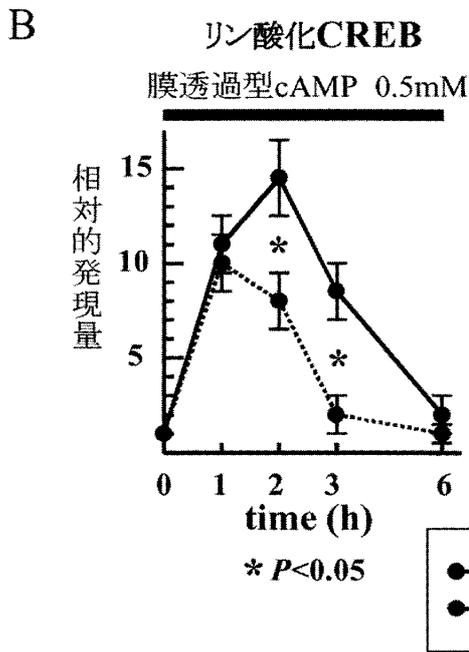
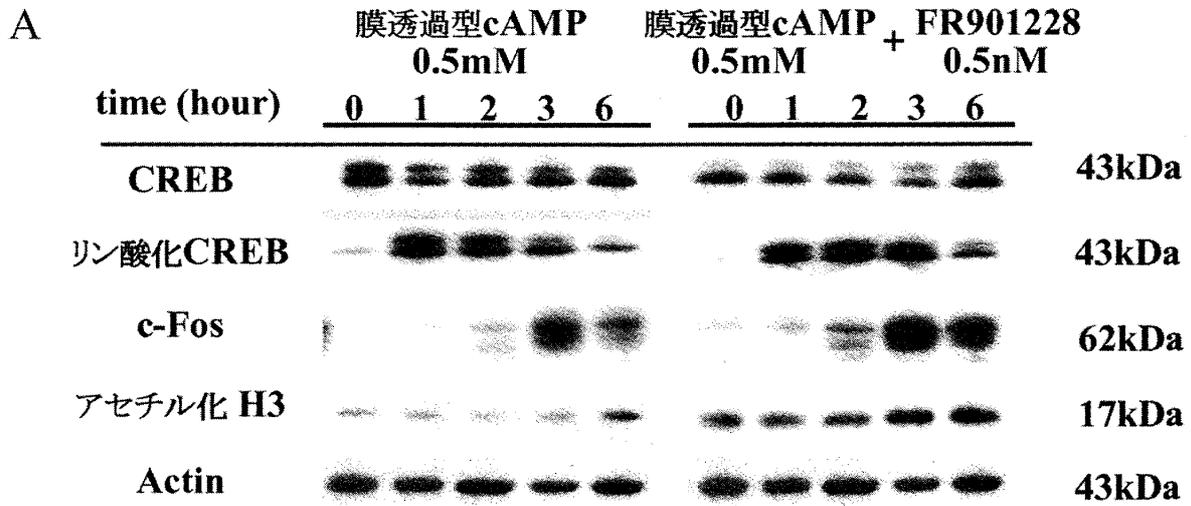


図6 FR901228 による CREB 依存性転写の増強効果

(A) 部分 DRPLA 蛋白 (Q57) を発現した Neuro2a 細胞に、膜透過型 cAMP 0.5mM を単独、または FR901228 0.5nM を併用し投与した。FR901228 は膜透過型 cAMP の投与 15 時間前に前投与した。併用群ではアセチル化ヒストン H3 の発現に加え、リン酸化 CREB および c-Fos の発現増加を認めた。

(B, C) ウェスタンブロットによるリン酸化 CREB, c-Fos の発現を、デンストメーターで解析した。それぞれ基礎発現量に対する相対的発現量を示す。グラフは 3 回の平均±標準偏差。

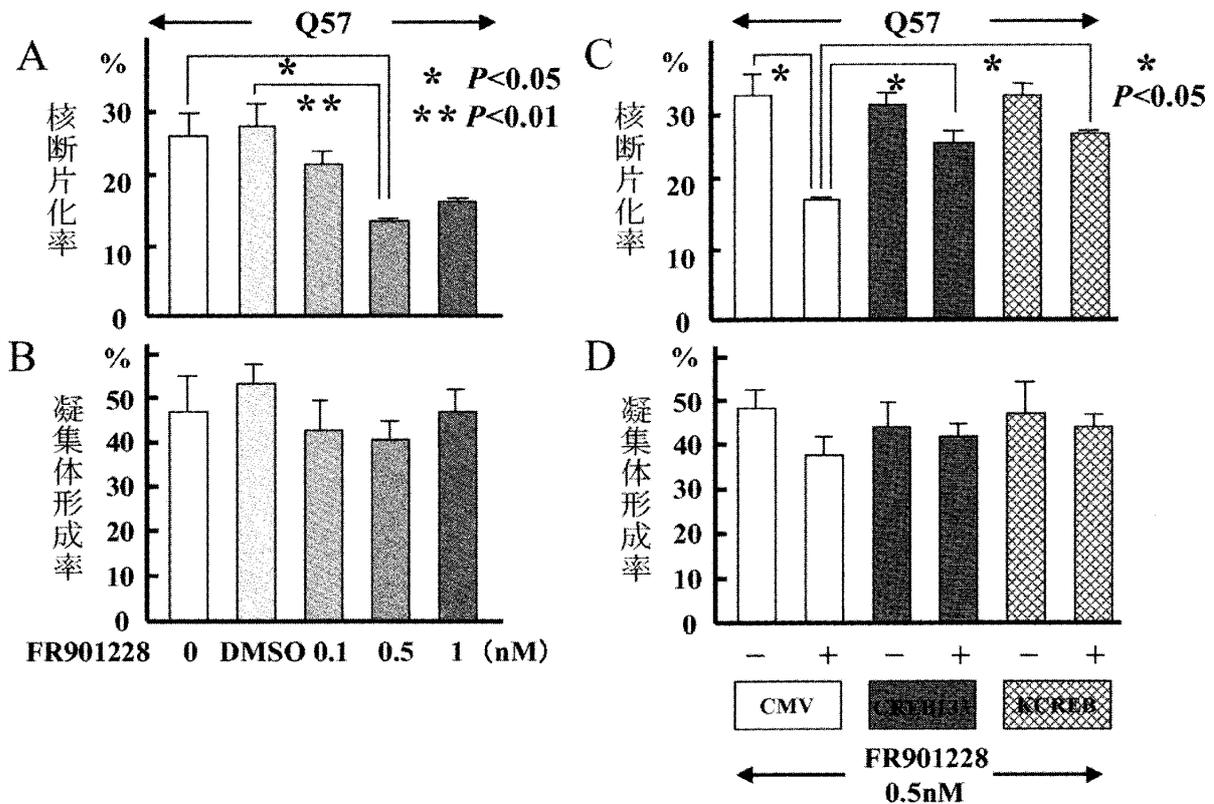


図7 FR901228による核断片化抑制効果と変異型 CREB による核断片化抑制効果の減弱

(A, B) 部分 DRPLA (Q57) を発現した Neuro2a 細胞を, FR901228 非投与, または投与 (0-1nM) 下に 72 時間培養した後, 核断片化率 (A) および凝集体形成率 (B) を検討した. 0.5nM において最も有意な核断片化率の減少を認めたが, 凝集体形成率に有意な減少は認めなかった. グラフは 3 回の平均±標準偏差.

(C, D) Neuro2a 細胞に pT-DRPLA Q57-NLS-GFP および, 野生型 CREB を発現する pCMV-CREB, 変異型 CREB を発現する pCMV-KCREB, pCMV-CREB133 のいずれか (図 4A) を共発現させ, FR901228 0.5nM 投与下に 72 時間培養した後, 核断片化率 (C) および凝集体形成率 (D) を検討した. 変異型 CREB の発現により, FR901228 の核断片化抑制効果は有意に減弱した. グラフは 3 回の平均±標準偏差.

133 においてリン酸化された後, 転写活性化に関与することから¹⁹⁾, これらの結果は, これまでのレポーター遺伝子を用いた検討と同様に, 伸長ポリグルタミン鎖が内在性の CREB 依存性転写をも障害することを意味する. また, これまでに様々な細胞および *in vivo* モデルにおいて, CREB が細胞の機能維持, 生存に重要な機能を担っていること²⁰⁾⁻²⁴⁾, さらに *c-fos* を始めとする即時反応遺伝子群も, 遅延反応遺伝子群の発現に影響し,

かつ神経細胞の生存に不可欠であることから²⁵⁾²⁶⁾, 伸長ポリグルタミン鎖による CREB 依存性転写の抑制は, 神経細胞の機能不全, ひいては神経細胞死を生じうるものと考えられる. また今回 19 リピートという正常長のポリグルタミン鎖発現群においても 0 リピート発現群に比べ, 有意なリン酸化 CREB および *c-Fos* の発現抑制を認めたことから, DRPLA 蛋白そのものが何らかの転写調節機能を有している可能性も考えられる.

さらに本研究において特筆すべきは、伸長ポリグルタミン鎖によって生じたリン酸化 CREB, c-Fos の発現抑制が、CREB 依存性転写を強力に活性化する高濃度の膜透過型 cAMP の投与によって著明に回復したことである。さらにこの CREB 依存性転写の活性化は、核断片化率の有意な減少を伴っており、CREB 転写の活性化により伸長ポリグルタミン鎖の細胞毒性が緩和されたことを意味する。また変異型 CREB を発現するドミナントネガティブ CREB ベクターを共発現することにより、膜透過型 cAMP の核断片化抑制効果はほぼ消失したことから、この細胞死抑制効果の主要経路は CREB 依存性転写活性化を介したものと考えられる。最近、ハンチントン病のエクソン 1 を発現した PC12 細胞を用いた検討でも cAMP や forskolin の細胞死抑制効果が報告されており²⁷⁾、これらの結果は DRPLA を含めたポリグルタミン病の病態に、伸長ポリグルタミン鎖による CREB 依存性転写障害が深く関与し、かつこれらの転写障害が可逆性である可能性を示しているものと思われた。

一方、ポリグルタミン病において、クロマチン構造の調節機能が障害されている可能性が指摘されている。その根拠として、CREB 依存性転写の転写因子の 1 つである CREB 結合蛋白 (CBP) がヒストンアセチル化酵素活性を有すること²⁸⁾、また伸長ポリグルタミン鎖を伴うハンチンチンが CBP に結合すること²⁹⁾、が挙げられる。実際にハンチントン病や球脊髄性筋萎縮症の培養細胞モデルを用いた検討で、アセチル化ヒストン H3, H4 の基礎発現量の低下が指摘されている³⁰⁾³¹⁾。そこで今回、クロマチン構造を修飾し、間接的に転写を活性化すると考えられるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による CREB 依存性転写への影響も併せて検討した。膜透過型 cAMP および低濃度の FR901228 を併用した場合、膜透過型 cAMP 単独投与に比べ、アセチル化ヒストン H3 の誘導と共に、有意にリン酸化 CREB や c-Fos の発現を増強し、かつ伸長ポリグルタミン鎖による核断片化を抑制した。また FR901228 の細胞死抑制効果は、ドミナントネガティブ CREB ベクターを共発

現することで大幅に減弱していた。FR901228 の単独投与では有意なリン酸化 CREB, c-Fos の発現が認められなかったことから、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の作用機序として、間接的に内在性の CREB 依存性転写を促進しているものと思われた。ラットのソマトスタチン遺伝子レポーターとして発現させた NIH3T3 細胞においても、forskolin に trichostatin A や butyrate, trapoxin といった HDAC 阻害剤を併用した場合、CREB のリン酸化やソマトスタチン mRNA 発現の延長が報告されており³²⁾、HDAC 阻害剤などの間接的、非特異的に CREB 依存性転写を促進する薬剤の投与によっても、クロマチン構造の調節障害を緩和し、ポリグルタミン病の病態を改善する可能性が考えられた。

おわりに

今回、部分 DRPLA 蛋白一過性発現系において、これまで報告されたレポーターを用いた検討に加え、内在性の CREB 依存性転写においても伸長ポリグルタミン鎖の長さ依存性に抑制が生じること、この抑制は直接または間接的に CREB 依存性転写を活性化することによって可逆的であることを確認した。テトラサイクリン調節機構を有するハンチントン病トランスジェニックマウスの検討でも、不随意運動、核内凝集体の形成といった表現型の出現後に変異ハンチンチンの発現をブロックすることで病的変化が可逆的に改善することも報告されている³³⁾。以上の結果からは神経変性の分子機構として、伸長ポリグルタミン鎖を有する変異タンパクの CAG リピート長依存性かつ時間依存性の核内集積と、CREB 依存性転写活性化を中心とする選択的遺伝子転写障害がその本質であると考えられ、今後の治療への方向性として、①変異タンパクの発現を直接的に抑制する、②変異タンパクのプロセッシングを阻害する、③変異タンパクの核移行を阻害する、④変異タンパクの核内集積過程とコンフォメーション変化を緩和する、⑤転写障害を緩和する(発現を抑制された特定の遺伝子群の発現を緩和する)、などが考えら

れる。さらなるポリグルタミン病の詳細な病態機序の解明とともに、より病態に即した治療法開発へのアプローチがなされていくことが強く望まれる。

謝 辞

本研究の一部は新潟県医師会学術研究助成金の助成を受けた。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御高覧を頂いた東京大学大学院医学系研究科神経医学専攻神経内科学辻 省次教授に深甚なる謝意を表すと同時に、貴重な御指導および御助言を頂いた新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野の下畑享良先生、成瀬 聡先生、同生命科学リソースセンターの五十嵐修一先生、小野寺 理助教授に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE and Fischbeck KH: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77-79 1991.
- 2) The Huntington's Disease Collaborative Research Group.: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983 1993.
- 3) Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F and Tsuji S: Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genet* 6: 9-13 1994.
- 4) Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K, Shirayama T, Ohsaki E, Bundo M, Takeda T, Tadokoro K, Kondo I, Murayama N, Tanaka Y, Kikushima H, Umino K, Kurosawa H, Fukukawa T, Hihei K, Inoue A, Sano A, Komure O, Takahashi M, Yoshizawa T, Kanazawa I and Yamada M: Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet* 6: 14-18 1994.
- 5) Takano K, Yamanouchi Y, Nagafuchi S and Yamada M: Assignment of the dentatorubral and pallidoluysian atrophy (DRPLA) gene to 12p13.31 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 32: 171-172 1996.
- 6) Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP and Zoghbi HY: Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet* 4: 221-226 1993.
- 7) Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, Wakisaka A, Tashiro K, Ishida Y, Ikeuchi T, Koide R, Saito M, Tanaka T, Hanyu S, Takiyama Y, Nishizawa M, Shimizu N, Nomura T, Segawa M, Iwabuchi K, Eguchi I, Tanaka H, Takahashi H and Tsuji S: Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique DIRECT. *Nature Genet* 14: 277-284 1996.
- 8) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S and Kakizuka A: CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 8: 221-228 1994.
- 9) Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY and Lee CC: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha1A-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet* 15: 62-69 1997.
- 10) Lindblad K, Savontaus ML, Stevanin G, Holmberg M, Digre K, Zander C, Ehrsson H, David G, Benomar A, Nikoskelainen E, Trottier Y, Holmgren G, Ptacek LJ, Anttinen A, Brice A and Schalling M: An expanded CAG repeat sequence in spinocerebellar ataxia type 7. *Genome Res* 6: 965-971 1996.
- 11) Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi

- H and Tsuji S: A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet* 8: 2047-2053 1999.
- 12) Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S and Kanazawa I: SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10: 1441-1448 2001.
- 13) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S and Kakizuka A: Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet* 13: 196-202 1996.
- 14) 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, Irwin D, Tanese N, Takahashi H and Tsuji S: Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature Genet* 26: 29-36 2000.
- 15) Tanese N, Saluja D, Vassallo MF, Chen JL and Admon A: Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 13611-13616 1996.
- 16) 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.
- 17) 下畑享良：伸長ポリグルタミン鎖の核移行による細胞障害の機序についての検討. *新潟医学会雑誌* 115: 132-147 2001.
- 18) Sato A, Shimohata T, Koide R, Takano H, Sato T, Oyake M, Igarashi S, Tanaka K, Inuzuka T, Nawa H and Tsuji S: Adenovirus-mediated expression of mutant DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches in neuronally differentiated PC12 cells. Preferential intranuclear aggregate formation and apoptosis. *Hum. Mol Genet* 8: 997-1006 1999.
- 19) Gonzalez GA and Montminy MR: Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-680 1989.
- 20) Jean D, Harbison M, McConkey DJ, Ronai Z and Bar-Eli M: CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells. *J Biol Chem* 273: 24884-24890 1998.
- 21) Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA and Ginty DD: Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286: 2358-2361 1999.
- 22) Somers JP, DeLoia JA and Zeleznik AJ: Adenovirus-directed expression of a nonphosphorylatable mutant of CREB (cAMP response element-binding protein) adversely affects the survival, but not the differentiation, of rat granular cells. *Mol. Endocrinol.*, 13: 1364-1372, 1999.
- 23) Finkbeiner S: CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25: 11-14 2000.
- 24) Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W and Schutz G: Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature Genet* 31: 47-54 2000.
- 25) Sheng M and Greenberg ME: The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477-485 1990.
- 26) Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ and Xu M: c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nature Genet* 30: 416-420 2002.
- 27) 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* 17: 1829-1845 2001.
- 28) Bannister AJ and Kouzarides T: The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384: 641-643 1996.
- 29) 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.
- 30) Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL and Thompson LM: Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413: 739-743 2001.
- 31) McCampbell A, Taye AA, Whitty L, Penney E, Steffan JS and Fischbeck KH: Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98: 15179-15184 2001.
- 32) Michael LF, Asahara H, Shulman AI, Kraus WL and Montminy M: The phosphorylation status of a cyclic AMP-responsive activator is modulated via a chromatin-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 20: 1596-1603 2000.
- 33) 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.

(平成15年1月27日受付)