

齒状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (Dentatorubral-  
Pallidolusian Atrophy : DRPLA)  
遺伝子周辺のゲノム構造及び発現遺伝子の同定

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 (主任:辻 省次教授)

石 田 義 則

Genomic Structure and Identification of Expression Genes Flanking  
the Gene for Dentatorubral-Pallidolusian Atrophy (DRPLA)

Yoshinori ISHIDA

*Department of Neurology,  
Brain Research Institute, Niigata University  
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

Expansion of CAG repeat has been established as a new disease mechanism for hereditary neurodegenerative diseases. The mechanism of neurodegeneration caused by the expanded CAG repeat, however, remains unknown. An intriguing possibility is a positional effect caused by the expanded CAG repeat affecting the expression of the adjacent genes. To elucidate whether such positional effect is involved in the mechanisms of neurodegeneration, we performed detailed structural analysis of the genomic region flanking the gene for dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA), an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by unstable expansion of CAG repeat on 12p13.31.

We constructed a cosmid genomic library using genomic DNA of a DRPLA patient containing the largely expanded CAG repeat (79 repeat units), and cloned the genomic DNA containing the mutant DRPLA gene (DRPLA 18E). By screening a human brain frontal cortex cDNA library using the fragments of the genomic clone as the probes, we isolated 18 independent cDNA clones. By detailed nucleotide sequence analysis of these cDNA clones, we identified 3 genes in addition to the DRPLA gene. Of the 3 genes, one gene codes for neuron-specific enolase (NSE) and the others are a novel gene and a novel mRNA for DRPLA. The NSE gene was found to be located approximately 5 kb

Reprint requests to: Yoshinori ISHIDA,  
Department of Neurology,  
Brain Research Institute,  
Niigata University, Niigata  
City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野  
石田義則

upstream of the DRPLA gene, and the novel gene was located upstream of the NSE gene.

Key words: Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), Neuron-specific enolase (NSE), physical map, Northern hybridization

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症, エノラーゼ, 物理地図

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (Dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA) は、常染色体優性の神経変性疾患であり、小脳歯状核遠心系、淡蒼球遠心系の病変を特徴とする (内藤、伊沢ら 1972, Takahata *et al.* 1978, Naito and Oyanagi, 1982, Takahashi *et al.* 1988)。臨床症状は、発症年齢により異なり、若年発症例では精神発達遅滞、ミオクローヌス、てんかん発作などを示し、進行性ミオクローヌスてんかんの臨床型を呈する。一方、成人発症例では、小脳失調、舞踏アテトーシス、痴呆などを呈する (内藤ら 1972, Takahata *et al.* 1978, Naito and Oyanagi, 1982, Takahashi *et al.* 1988, Ikeuchi *et al.* 1995)。DRPLA の遺伝子異常は、1994年に我々のグループ (Koide *et al.* 1994) および Nagafuchi ら (Nagafuchi *et al.* 1994a) により報告され、その遺伝子内翻訳領域の CAG リピートが正常人では、7—35リピートであるのに対し、患者では54—79リピートと著明に伸長していることが判明した (Koide *et al.* 1994, Nagafuchi *et al.* 1994a, Ikeuchi *et al.* 1995, Komure *et al.* 1995)。

このような CAG リピートの伸長は、近年、遺伝性神経変性疾患の遺伝子異常として見いだされ、この中には、spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) (La Spada *et al.* 1991)、ハンチントン病 (Huntington's disease collaborative research group 1994)、spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) (Orr *et al.* 1993)、Machado-Joseph 病 (MJD) (Kawaguchi *et al.* 1994) が含まれ、いくつかの共通する臨床的性質を持っている。すなわち、同一家系内で、臨床症状や重症度に多様性があること、世代を経るに従って発症年齢が若年化する表現促進現象などである。また、分子遺伝学的には CAG リピートが遺伝子翻訳領域内にあり polyglutamine として翻訳される点 (Servadio *et al.* 1995, Yazawa *et al.* 1995, Trottier *et al.* 1995)、リピート数が正常人でも多型性を示すが、35リピート以内であるのに対し、患者では2—3倍に伸長し、減数分裂、体細胞分裂に際し不安定性を示す点、更にリピート数と発症年齢との間に、明瞭な負の相関関係があることなどの点で共通し (Huntington's disease collaborative research group 1994,

Kawaguchi *et al.* 1994, Nagafuchi *et al.* 1994a, Onodera *et al.* 1995, Ikeuchi *et al.* 1995, Takano *et al.* 1996)、その発症に何らかの共通の機序が関与しているものと考えられている。しかし、CAG リピートの伸長が直接、神経変性とどう関連し、なぜそれぞれの疾患に特異的な神経細胞が変性するのかについては現在も未解決のままである。またこれまでの報告によれば、変異 DRPLA 遺伝子 mRNA、変異タンパクの発現量には変化はなく、変異 DRPLA 遺伝子の転写、翻訳に障害は認められていない (Nagafuchi *et al.* 1994b, Yazawa *et al.* 1995)。現時点で考えられる可能性としては、1) 増大した polyglutamine tract を有する変異タンパク自体が細胞障害性に働く、2) 変異タンパクが他のタンパクに結合しその働きを阻害する (Stott *et al.* 1995)、3) 変異がゲノム上で変異遺伝子のみならず周辺の遺伝子の発現に影響を与える、いわゆる positional effect、4) 増大した polyglutamine tract がある種の転写因子としての機能を変化させる (Gerber *et al.* 1994)、5) polyglutamine tract が polar zipper として働き、タンパクの凝集を引き起こすなどが挙げられる (Perutz *et al.* 1994)。また、最近では Ikeda らが MJD において、伸長した polyglutamine の部分のみを発現させた場合のみ細胞障害性が見られ、変異遺伝子の全長を発現させた場合は細胞障害性が見られないことを示し、変異タンパクに翻訳された後、polyglutamine の部分が修飾され高分子の不溶性タンパクを形成し、これが細胞障害性に働く可能性などが示唆されている (Ikeda *et al.* 1996)。

本研究では、DRPLA において3)の CAG リピートの増大が DRPLA 遺伝子のみでなく、ゲノム上でその周辺の遺伝子発現に影響を与える positional effect の可能性について検討するため、DRPLA 遺伝子を含む 40 kbp の領域のクローン化を行い、その詳細なゲノム構造を解析し、さらに DRPLA 遺伝子の周辺に存在する発現遺伝子の同定を試み、これらの遺伝子の発現量について検討した。さらに、これまで明らかにされていなかった DRPLA 遺伝子の exon 1 のゲノム上の位置を明らかにした。

## 方 法

1) cosmid library の作成と DRPLA 遺伝子を含む clone の単離: CAG リピート数78リピートをもつ DRPLA 患者の lymphoblastoid cell line より genomic DNA を抽出し, 180  $\mu$ g を Sau3AI (9 units) で, 37  $^{\circ}$ C, 8分間の条件で消化した後, pulsed field gel electrophoresis (0.5 $\times$ TBE, 14 $^{\circ}$ C, 1.0% LE agarose, gradient: 6.0 V/cm, run time: 10 hr., included angle: 120 $^{\circ}$ , int. sw. tm.: 0.47 sec, fin. sw. tm.: 3.92 sec) を行い, 30~45 kb の領域を size fractionation し, electroelution により回収した. vector として, Xba I で消化した cosmid vector (super Cos 1) (Stratagene) をアルカリフォスファターゼ処理した後, BamHI で消化し, 上記の genomic DNA を ligation した. その product を Gigapack III (Stratagene) を用いて packaging し, library を作成した. DRPLA cDNA (Onodera *et al.* 1995) をプローブとして 4 $\times$ 10<sup>5</sup> の cosmid clone について colony hybridization 法を用いて, スクリーニングを行った.

2) cosmid clone の制限酵素地図の作成: 1) により得られた DRPLA 遺伝子を含む cosmid クローンについて Hind III および Bgl II で部分消化した後, *cos* site を  $\lambda$ -terminase により切断し, *cos* 末端に [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP で標識した 12 mer のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせる. アニーリングした cosmid DNA の断片を 0.4% agarose gel 電気泳動 (1 $\times$ TAE, 30V, 24時間) で分離し, autoradiogram を分析して制限酵素地図を作成した. (Cosmid mapping kit) (Takara)

3) DRPLA 遺伝子 exon 1 のゲノム上の位置決定: 2) で作成した map をもとに exon 1 が存在すると考えられる DRPLA 18E 上の 22 kb~26 kb の約 4 kb の Hind III 断片を pBluescript SK (-) に subcloning し, この部分の詳細な physical map を作成した後, exon 1 上に作成した 21 mer の oligoprobe を用いて hybridization analysis を行い, これと hybridize する断片をさらに subcloning して, 前述の方法により塩基配列を決定した.

4) 発現遺伝子の同定:

プローブの作成; 1) で作成した cosmid library より変異 DRPLA 遺伝子を含む genomic DNA を単離し (図 1), このクローンを Hind III で消化し, Bio-Rad 社の CHEF MAPPER を用いて field inversion gel electrophoresis (0.5 $\times$ TBE, 14 $^{\circ}$ C, 1.0% LE agarose, forward volt. gradient: 9.0 V/cm, reverse volt. gradient: 6.0 V/cm, int. sw. tm.: 0.3 sec, fin. sw. tm.: 0.36 sec, total run tm.: 23 hr. 17 min.) を行い 15 kbp の断片を切り出し, さらに Bgl II で消化して, DRPLA 遺伝子の 5' 側約 2.5 kbp から 17.5 kbp にわたる 15 kbp の部分に 5 kbp, 4 kbp, 3 kbp のプローブ (probe B, C, A, D) を, さらに, DRPLA 遺伝子の 3' 側に約 5 kbp のプローブ (probe E) を設定し, random priming technique (Feinberg and Vogelstein 1983) により, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP で label した.

cDNA のスクリーニング; 上記の方法で得られたプローブを用いて human frontal cortex cDNA library (Stratagene) を約 10 $\times$ 10<sup>6</sup> phage clone についてス

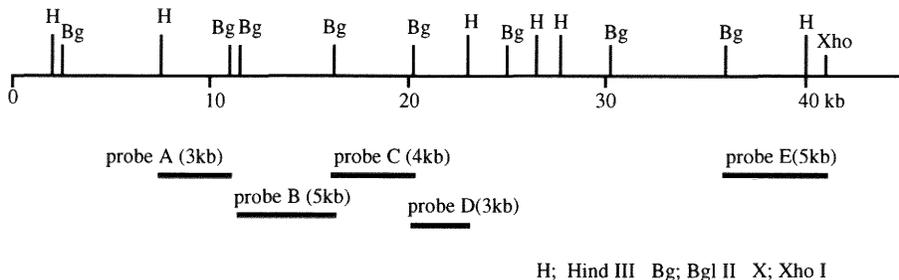


図 1 cosmid clone (DRPLA 18E) の制限酵素地図と設定したプローブの位置を示す. probe A, probe B, probe C, probe D は地図上の約 7.5 kb の Hind III と 22.5 kb の Hind III の間の 15 kb の断片を切り出した後, Bgl II で消化して作成した. probe E は, Bgl II で約 7 kb の断片を切り出し, vector の配列を含まないようにするため, さらにそれを Xho I で消化し, 作成した.

クリーニングした. hybridization は, 50% formamide, 5×SSC (1×SSC=0.5 M NaCl, 15 mM sodium citrate), 1×Denhardt 液 (50×Denhardt 液=1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% bovine serum albumin), 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10% dextran sulfate, 200 μg/ml human placental DNA で42°C, 18時間行った (Wahl *et al.* 1979). 洗浄の最終条件は, 0.1×SSC, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液で60°Cで30分間行った.

5) 塩基配列決定: 単離した cDNA (λ-Zap clone) を self-excision により, pBluescript SK (-) plasmid に変換 (Short *et al.* 1988) した後, 自動蛍光シークエ

ンサー (Pharmacia P-L Biochemicals) を用いて塩基配列を決定した (Sanger 1977, Chen and Seeberg 1985, Murray *et al.* 1989). 決定した塩基配列は, BLAST プログラムを用いて Gen Bank (release 94), EMBL (release 45), DDBJ (release 25), について既知の塩基配列との相同性について検索を行った.

6) Northern blot 解析:

Northern blot; 正常コントロール3例, DRPLA 5例の大脳凍結標本より総 RNA を抽出 (Chirgwin *et al.* 1979) した後, さらに Oligotex-dT30 (Takara) を用いて poly A (+) RNA を抽出した. 2 μg の poly A (+) RNA を, 0.66 M formaldehyde を含む 1.5%

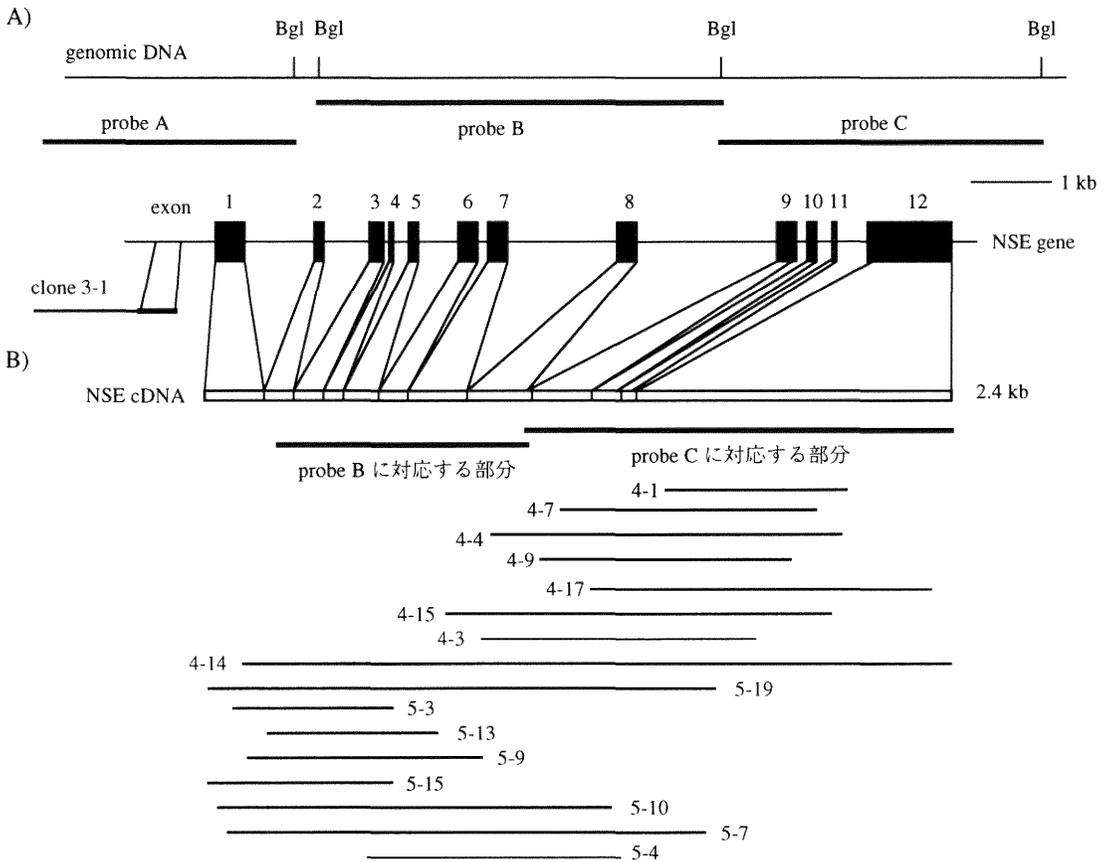


図 2 A) genomic DNA と probe A, probe B, probe C の位置関係, 及び NSE gene との対応を示す. また, clone 3-1 が NSE gene の exon 1 の上流のゲノムの配列に一致している様子を示す.  
B) NSE cDNA と probe B, probe C との対応を示し, それぞれの probe で得られた cDNA clone の位置を示す. また, A) のゲノム上の NSE exon の位置と cDNA を対応させた.

agarose gel で 85 V, 3 時間, 電気泳動した後, ニトロセルロース膜に転写した. 上記1) で得られた cDNA をプローブ (プローブの labelling は上記の方法に従った) に用いて, hybridization を行った. また, 各臓器の RNA (multiple tissue northern blot, Clonetech) を用いて hybridization を行った. オートグラフィーは強化スクリーンを用いて行い, その後プローブを除去し, human  $\beta$ -actin の 2.0 kb をプローブとして用い, hybridization を行った. hybridization は, 50% formamide,  $5 \times \text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC} = 0.5 \text{ M NaCl}$ , 15 mM sodium citrate),  $1 \times \text{Denhardt}$  液 ( $50 \times \text{Denhardt}$  液 = 1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% bovine serum albumin), 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10% dextran sulfate で  $42^\circ\text{C}$ , 18 時間行い, 洗浄の最終条件は,  $0.1 \times \text{SSC} - 0.1\%$  SDS 溶液で  $60^\circ\text{C}$  で 30 分間で行った.

## 結 果

1) 変異 DRPLA 遺伝子を含む cosmid クローンの単離および制限酵素地図の作成: 独立した 10 個の overlapping clone が得られ, DRPLA 遺伝子を含む約 40 kbp をクローン化することができた (DRPLA 18E). このクローンを既存の primer (Koide *et al.* 1994) を用いて PCR し CAG リピート数を確認した後, *Bgl* II,

*Hind* III で消化して, 制限酵素地図を作成した. (図 1)

2) DRPLA 遺伝子 exon 1 のゲノム上の位置 (図 3): DRPLA 18E (図 1) 上, 22 kb~26 kb の約 4 kb の *Hind* III 断片内, 約 25 kb の点にある *Bgl* II site から上流約 1.1 kb, exon 2 の約 4 kb 上流の点で exon 1 の 3' 側の塩基配列を確認した.

3) 発現遺伝子の同定

a) Neuron-specific enolase (NSE) 遺伝子の同定 (図 1, 2)

probe B, probe C (図 1) を用いて各々 8 個の cDNA クローンを単離し, それぞれについて部分塩基配列を決定した. データバンクを用いた相同性の検索の結果, 全ての cDNA クローンが NSE cDNA に一致した. Northern blot 解析では, NSE 翻訳領域は non-neuronal enolase と muscle-specific enolase に高い相同性を示すため, NSE の 3' 側の非翻訳領域に約 500 bp のプローブを作成し行った. 各臓器の RNA を用いた Northern 解析では, 脳のみ約 2.4 kb の band が認められた (図 4). 正常コントロール 3 例, DRPLA 5 例について抽出した poly A (+) RNA についての Northern 解析では, DRPLA 症例群と control 群との間には明らかな変化を認めなかった.

b) probe A, D により単離された clone: 約 3 kbp の *Bgl* II-*Hind* III 断片 (図 1) は physical map 上

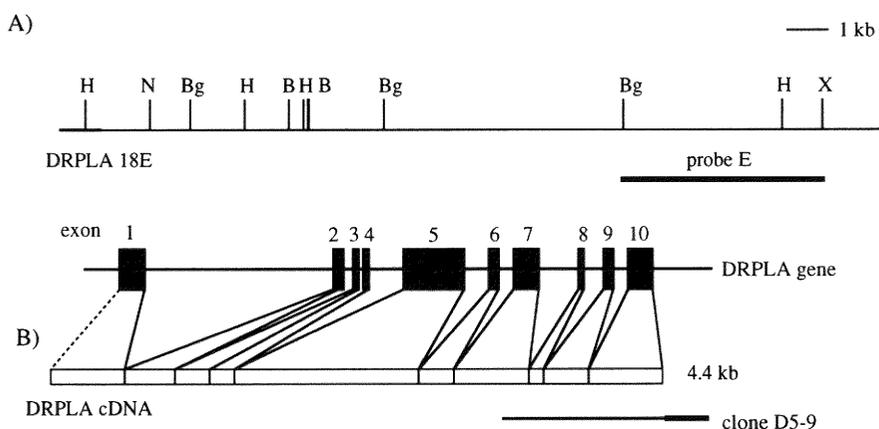


図 3 A); genomic DNA と DRPLA gene の位置関係と probe E の位置を示す. B; BamH I, Bg; *Bgl* II, H; *Hind* III, N; Not I, X; *Xho* I B); DRPLA cDNA と probe E により得られた cDNA clone D5-9 の位置関係. clone D5-9 の太線部は今回新たに見つかった配列部分. DRPLA cDNA と DRPLA gene の exon は対応している. exon 1 については今回, 位置は明らかとなったが, その長さは現在も不明である. 従って, exon 1 の 5' 側の cDNA との対応を表す線は点線とした.

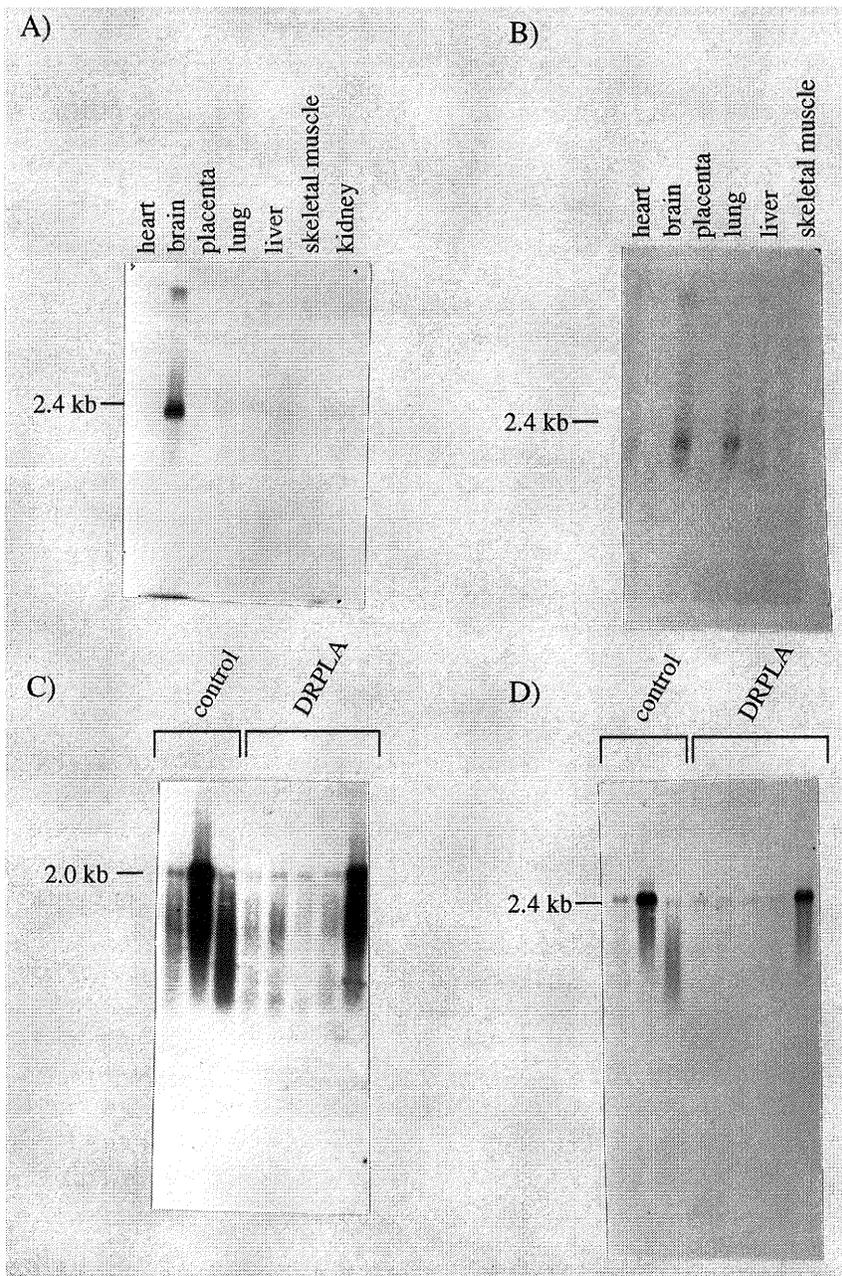


図 4 A) ; probe C により得られた cDNA clone を probe に用いて行った Northern 解析. (multiple tissue northern blot) 2.4 kb のバンドが脳のみ認められる. B) ; probe A により得られた cDNA clone 3-1 を probe に用いて行った Northern 解析. (multiple tissue northern blot) NSE に類似した約 2.4 kb のバンドが得られたが, その分布は脳と肺に見られ NSE と異なっている. C) ; human  $\beta$ -actin 2.0 kb を probe に用いて行った Northern 解析. (poly A (+) RNA northern blot) 各検体の泳動量に差を認める. D) ; C) の膜 (poly A (+) RNA northern blot) を用いて NSE 3' 側の non-coding region 300 bp を probe として行った Northern 解析. 各検体の泳動量に差を認めるが, 症例と正常コントロールの間に明らかな差を認めない.

8-11 kb, 20-23 kb と長さが約 3 kb ではほぼ同様の断片となり、分離が困難であったため、両者を含む DNA 断片をプローブとして上記の cDNA library をスクリーニングしたところ、全長約 1.8 kbp のクローン (3-1) が得られた (図 2)。このクローンをプローブとして、DRPLA 18E を *Bgl* II で消化し、Southern blot hybridization を行ったところ、上流側の 7 kbp の断片と hybridize した。以上から、probe A, D により得られたクローン (3-1) は NSE の 5' 側のものと判断した。このクローンの塩基配列を、BLAST プログラムを用いて Gen Bank (release 94), EMBL (release 45), DDBJ (release 25) について既知の遺伝子との相同性を検索したところ、3' 側の約 330 bp が、報告されている NSE の genomic DNA (NSE exon 1 の 5' 側) に一致し、ゲノム塩基配列上その直上に AG 配列を認め、splicing site であると考えられた。残りの部分では既知の遺伝子との相同性は認められなかった。各臓器の RNA について Northern 解析を行ったところ、約 2.4 kb のバンドが脳と肺で認められた (図 4)。

c) probe E により得られた clone (図 3): probe E により全長約 2.0 kbp の clone (D5-9) が得られた。既知の遺伝子との相同性を解析したところ、5' 側の一部が DRPLA 遺伝子の 3' 側 (2538-4100) に一致したが、3' 側の 280bp については既知の遺伝子と相同性を認めなかった。各臓器の RNA についての Northern hybridization では、心、脳、胎盤、肺、肝、骨格筋、脾で約 4.4 kb の band を認めた。

## 考 察

本研究において、DRPLA 遺伝子を含む 40 kbp のゲノム DNA をクローン化し、その詳細な physical map を作成し、DRPLA 遺伝子周辺の発現遺伝子の検索を行った。あわせて、これまで明らかでなかった DRPLA 遺伝子の exon 1 の位置を明らかにした。従来の報告で DRPLA 遺伝子のゲノム上の構造は、ゲノムと cDNA との restriction site の比較と、PCR でイントロンの長さを決めることによりなされ、exon 1 の位置が決定されていなかった。本研究で示したように、exon 1 の位置は、exon 2 との距離は約 4 kb にも及び、従来の方法で決定するのは困難であり、本研究で用いた方法が有効であった。

また、DRPLA 遺伝子周辺の発現遺伝子の検索の結果、DRPLA 遺伝子の上流 5 kb の部分に約 10 kb にわたり NSE 遺伝子を同定した。NSE は神経細胞と神

経分泌細胞の cytoplasm に存在し、解糖系における 2-phosphoglycerate と phosphoenolpyruvate の可逆反応を触媒している。局在の異なる 3 つの isozyme が知られ、NSE の他に、体細胞に広く存在した、神経系の glia 細胞に存在する non-neuronal enolase (NNE) と、筋に局在する muscle-specific enolase (MSE) がある。細胞局在の違いの他、発達段階で発現に違いが見られ、NNE と NSE は、神経系の発達早期の段階でその発現が切り替わると言われている (Zomzely-Neurath *et al.* 1983)。1985 年に、rat における cDNA の塩基配列が (Sakimura *et al.* 1985)、1987 年には、その遺伝子構造が報告されており、その構造上の特徴として、少なくとも 3 つの転写開始点を持つこと、その promoter 領域は明らかな TATA, GC box 構造を持たず、G, C に富み、少なくとも 7 つの反復配列単位を持つことなどが挙げられている (Sakimura *et al.* 1987)。また、これらの特徴は、ヒトでも確認されており、哺乳類に広く共通した特徴といえる (Oliva *et al.* 1991)。さらに、NSE cDNA を probe にした *in situ* hybridization で小脳の Purkinje 細胞にその mRNA が豊富に存在しているとの報告が散見される (Schmechel *et al.* 1987, Watanabe *et al.* 1990)。このような性質を持つ酵素の遺伝子が、DRPLA という小脳 Purkinje 細胞の減少を引き起こす神経変性疾患の原因遺伝子の近傍に存在していることは、DRPLA 遺伝子内の CAG リピートの伸長によるゲノム DNA の構造上の変化が、周辺遺伝子の発現に影響を及ぼす positional effect の可能性を考えた場合、その神経細胞変性の機序を考える上で、興味深いことと思われる。今回の Northern blot 解析の結果では、DRPLA 症例群でその発現量に明らかな差は認められなかったが、positional effect の可能性の厳密な評価を行うには、今回見いだされた mRNA が多型性を示している場合、変異 DRPLA 遺伝子と *cis* に存在する mRNA と *trans* に存在する mRNA を個別に定量する方法の確立が必要となる。さらに、positional effect を想定し、変異遺伝子と *cis* に存在する遺伝子の発現量に変化をきたし、一方で正常遺伝子からの転写に異常がないと考えた場合 mRNA は、50~100% の間で変動すると予測され、mRNA の精度の高い定量法が必要になり、さらなる検討を要する。また Nagafuchi らは、DRPLA 遺伝子の下流約 1.3 kb の点に sn RNA U7 を同定しており、その発現量についても今後検討していく必要がある。

本研究ではさらに、DRPLA 遺伝子周辺の発現遺伝

子として, probe A, probe E により2種のクローンを得た. 前者は NSE の exon 1 の上流の genomic DNA に一部相同性を有していた. NSE においては, 前述のように少なくとも3つの転写開始点が exon 1 の上流に確認されており, また, 5'-flanking region には G, C に富む繰り返り配列単位が見られ, これらが promoter や enhancer として働く可能性が示唆されていることから, 本研究で示した mRNA も従来報告のなかった NSE mRNA であることが考えられるが, Northern 解析において産物が脳以外に肺でも見られ, NSE と分布の上で異なっており, 今後の検討が必要である. また, probe E で得られたクローンは, Onodera らの報告した DRPLA cDNA の3'側に一部一致していたが, 3'側の 222 bp は報告のない塩基配列を有しており, やはり新たな mRNA の存在が考えられた. これら2種のクローンでの Northern 解析でも NSE 同様, DRPLA 症例群で明らかな発現量の変化は見られなかった.

本研究において, DRPLA 遺伝子に複数の mRNA が存在すること, その近傍に NSE 遺伝子が存在し, 更にその上流に従来報告のない新たな発現遺伝子の存在を見いだした. 今後, これらの遺伝子の発現が DRPLA の病態とどのように関わるかについて, より定量的な方法で解析していく必要がある.

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 大脳凍結標本提供にご尽力賜りました当研究所病態神経科学部門, 病理学分野の高橋 均教授, ご指導, 御校閲賜りました神経内科学分野辻 省次教授, また, 様々な協力をいただいた五十嵐修一先生, 小宅睦郎先生, 佐藤俊哉先生, 高野弘基先生に深謝いたします.

#### 参 考 文 献

- 1) 内藤明彦, 井沢 清, 黒崎孝則ら: 優性遺伝型ミオクローヌスてんかんの二家系, 精神誌, 74: 871~897, 1972.
- 2) Naito, N. and Oyanagi, S.: Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy, *Neurology*, 32: 799~817, 1982.
- 3) Takahata, N., Ito, K., Yoshimura, Y., Nishihori, K. and Suzuki, H.: Familial chorea and myoclonus epilepsy, *Neurology*, 28: 913~919, 1978.
- 4) Takahashi, H., Ohara, E., Naito, H., Takeda, S., Nakashima, S., Makifuchi, T. and Ikeda, F.: Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy: Clinical and pathologic variants in a family, *Neurology*, 38: 1065~1070, 1988.
- 5) Ikeuchi, T., Koide, R., Tanaka, H., Onodera, O., Igarashi, S., Takano, H. et al.: Dentatorubral-pallidoluysian atrophy: Clinical features are closely related to unstable expansion of trinucleotide (CAG) repeat, *Ann. Neurol.*, 37: 769~775, 1995.
- 6) Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H. et al.: Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), *Nat. Genet.*, 6: 9~13, 1994.
- 7) Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Budo, M. et al.: Expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p in dentatorubral and pallidoluysian atrophy, *Nat. Genet.*, 6: 14~18, 1994a.
- 8) Komure, O., Sano, A., Nishino, N., Yamauchi, N., Ueno, S., Kondoh, K. et al.: DNA analysis in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy: Correlation between CAG repeat length and phenotypic variation and the molecular basis of anticipation, *Neurology*, 45: 143~149, 1995.
- 9) La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E. and Fischbeck, K.H.: Androgen receptor gene mutation in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy, *Nature*, 352: 77~79, 1991.
- 10) 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.
- 11) Orr, H.T., Chung, M., Banfi, S., Kwiatkowski, T.J.Jr., Servadio, A. et al.: Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1, *Nat. Genet.*, 4: 221~226, 1993.
- 12) Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M. et al.: CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1, *Nat. Genet.*, 8: 221~227,

- 1994.
- 13) **Servadio, A., Koshy, B., Armstrong, D., Antalffy, B., Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y.:** Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals, *Nat. Genet.*, **10**: 94~98, 1995.
  - 14) **Yazawa, I., Nukina, N., Hashida, H., Goto, J., Yamada, M. and Kanazawa, I.:** Abnormal gene product identified in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) brain, *Nat. Genet.*, **10**: 99~103, 1995.
  - 15) **Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C. et al.:** Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form, *Nat. Genet.*, **10**: 104~110, 1995.
  - 16) **Onodera, O., Oyake, M., Takano, H., Ikeuchi, T., Igarashi, S. and Tsuji, S.:** Molecular cloning of full-length cDNA for dentatorubral-pallidolusian atrophy and regional expressions of the expanded alleles in the CNS, *Am. J. Hum. Genet.*, **57**: 1050~1060, 1995.
  - 17) **Takano, H., Onodera, O., Takahashi, H., Igarashi, S., Yamada, M. et al.:** Somatic mosaicism of expanded CAG repeats in brains of patients with dentatorubral-pallidolusian atrophy: cellular population-dependent dynamics of mitotic instability, *Am. J. Hum. Genet.*, **58**: 1212~1222, 1996.
  - 18) **Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Ohsaki, E., Shirayama, T. et al.:** Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA), *Nat. Genet.*, **8**: 177~182, 1994b.
  - 19) **Gerber, H.P., Seioel, K., Georgiev, O. et al.:** Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches, *Science*, **263**: 808~811, 1994.
  - 20) **Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M. and Finch, J.T.:** Glutamine repeat as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5355~5385, 1994.
  - 21) **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*, *Nat. Genet.*, **13**: 196~202, 1996.
  - 22) **Stott, K., Blackburn, J.M., Butler, J.G. and Perutz, M.:** Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: Implications for neurodegenerative diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 6509~6513, 1995.
  - 23) **Otten, A.D. and Tapscott, S.J.:** Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5465~5469, 1995.
  - 24) **Sutherland, G.R. and Richards, R.I.:** Simple tandem DNA repeats and human genetic diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3636~3641, 1995.
  - 25) **Wahl, G.M., Stern, M. and Stark, G.R.:** Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 3683~3687, 1979.
  - 26) **Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. and Huse, W.D.:** Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties, *Nucleic Acids Res.*, **16**: 7583~7600, 1988.
  - 27) **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463~5467, 1977.
  - 28) **Chen, E.Y. and Seeberg, P.H.:** Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA, *DNA*, **4**: 165~170, 1985.
  - 29) **Murray, V.:** Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Res.*, **17**: 8889, 1989.
  - 30) **Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.A.:** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal. Biochem.*, **137**: 266~267, 1984.
  - 31) **Chen, S.H. and Omenn, G.S.:** Human neuron-specific enolase: genetic and developmental

- studies, *J. Neurogenet.*, **1**: 159~164, 1984.
- 32) **Sakimura, K., Kushiya, E., Obinata, M., Odani, S. and Takahashi, Y.**: Molecular cloning and the nucleotide sequence of cDNA for neuron-specific enolase messenger RNA of rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7453~7457, 1985.
- 33) **Sakimura, K., Kushiya, E., Takahashi, Y. and Suzuki, Y.**: The structure and expression of neuron-specific enolase gene, *Gene*, **60**: 103~113, 1987.
- 34) **Sakimura, K., Kushiya, E., Ogura, A., Kudo, Y., Takahashi, K. and Takahashi, Y.**: Upstream and intron regulatory regions for expression of the rat neuron-specific enolase gene, *Molecular Brain Research*, **28**: 19~28, 1995.
- 35) **Oliva, D., Barba, G., Barbieri, G., Giallongo, A. and Feo, S.**: Cloning, expression and sequence homologies of cDNA for human gamma enolase, *Gene*, **79**: 355~360, 1989.
- 36) **Oliva, D., Cali, L., Feo, S. and Giallongo, A.**: Complete structure of the human gene encoding neuron-specific enolase, *Genomics*, **10**: 157~165, 1991.
- 37) **Forss-Petter, S., Danielson, P. and Sutcliffe, J.G.**: Neuron-specific enolase: complete structure of rat mRNA, multiple transcriptional start sites, and evidence suggesting post-transcriptional control, *J. Neurosci. Res.*, **16**: 141~156, 1986.
- 38) **Schmechel, D.E., Marangos, P.J., Martin, B.M., Winfield, S. et al.**: Localization of neuron-specific enolase (NSE) mRNA in human brain, *Neurosci. Lett.*, **76**: 233~238, 1987.
- 39) **Watanabe, M., Sakimura, K., Takahashi, Y. and Kondo, H.**: Ontogenic changes in expression of neuron-specific enolase (NSE) and its mRNA in the Purkinje cells of the rat cerebellum: immunohistochemical and *in situ* hybridization study, *Dev. Brain Res.*, **53**: 89~96, 1990.

(平成8年7月17日受付)