

ポリグルタミン病における L-plastin の増加

長谷川 有 香

新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：西澤正豊教授)

Increased L-plastin in Polyglutamine Diseases

Arika HASEGAWA

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science/

Course for Molecular and Cellular Medicine/

Molecular Neuroscience and Brain Diseases/ Neurology

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要 旨

ポリグルタミン病は、疾患原因遺伝子の翻訳領域内に位置するポリグルタミン鎖の伸長により、神経細胞機能障害を来す疾患である。機能障害の機序として転写障害、ユビキチン・プロテアソーム系の障害、軸索輸送障害などが提唱されているが、その本態は不明である。本症において引き起こされる事象を明らかにするために、伸長ポリグルタミン鎖の発現に伴う蛋白質発現量の変化を網羅的に検討した。その結果、伸長ポリグルタミン鎖を発現する細胞において、L-plastinが増加していることを見出した。ポリグルタミン病患者の一部の剖検脳でもL-plastinの増加を認めた。L-plastinはアクチン結合蛋白であり、アクチンの調節を介してシナプス機能やエンドサイトーシスにも関与する。今回の結果より、ポリグルタミン病の病態機序における初期変化として、L-plastin増加に伴うアクチン機能異常の存在が推察された。

キーワード：ポリグルタミン病，蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動（2D-DIGE），L-plastin，アクチン結合蛋白，エンドサイトーシス，シナプス

はじめに

現在、9疾患（球脊髄性筋萎縮症；SBMA¹⁾，ハンチントン病；HD²⁾，歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症；DRPLA³⁾，脊髄小脳失調症1型；SCA1⁴⁾，2型；SCA2⁵⁾，Machado-Joseph病（3型）；MJD/SCA3⁶⁾，脊髄小脳失調症6型；SCA6⁷⁾，7型；SCA7⁸⁾，17型；SCA17⁹⁾）において、疾患原因遺伝子の翻訳領域内のポリグルタミン鎖の異常

伸長が原因として知られている。これらの疾患はポリグルタミン病と総称されている。臨床的には、1. 35～40リピートを閾値として発症する（例外として、脊髄小脳失調症6型のみ、20リピート前後を閾値とする）、2. リピート数の伸長と発症年齢に負の相関が認められる（表現促進現象）、3. 神経系が選択的に障害される、4. 病理学的に、神経細胞にポリグルタミン鎖陽性の核内封入体が認められる、という特徴を有する¹⁰⁾¹¹⁾。このことか

Reprint requests to: Arika HASEGAWA
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 長谷川有香

ら、伸長ポリグルタミン鎖そのものが神経細胞障害性を有している (gain of toxic function) と考えられる。伸長ポリグルタミン鎖による神経細胞障害機序として、ユビキチン・プロテアソーム系の障害、CREB (cAMP-response element binding protein) 依存性転写障害に代表される転写の障害、ミトコンドリア障害、軸索輸送障害、シナプス機能障害などが提唱されてきた¹²⁾¹³⁾。しかし、何が最初に引き起こされる本質的な変化であるかは明確になっていない。

ポリグルタミン病の最も初期の変化を明らかにするためには、伸長ポリグルタミン鎖の発現によって引き起こされる変化を、網羅的に捉える手法が重要である。mRNA レベルではこのような網羅的な解析が様々な対象に対して行われてきた^{14)–16)}。しかし、病態機序に関わる変化として、mRNA レベルでの発現調節のみではなく、最終産物である蛋白質レベルでの分解や翻訳後修飾などの質的な変化が起きている可能性がある。このため、蛋白質レベルでの、量的および質的な変化を解析する手法が有用であると考えられるが、このような網羅的解析を行った研究はこれまでにない。

近年、異なる試料間の蛋白質を網羅的に比較検討できる手法として、蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動法 (2D Differential Gel Electrophoresis; 2D-DIGE 法; Amersham Biosciences Corp. 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08855 USA) が開発された¹⁷⁾¹⁸⁾。今回、本法を用い、染色体上の同一の部位に異なる長さのポリグルタミン鎖を導入し、ポリグルタミン鎖を安定に発現する細胞系を用いて、ポリグルタミン鎖の伸長に伴う、細胞内の蛋白質発現の量的な変化を検討し、さらに、ポリグルタミン病の剖検脳での検討を加えた。

材料と方法

1. ポリグルタミン鎖を安定に発現誘導できる細胞系

当研究室の高橋らが Flp-In TREX system

(Invitrogen) を用いて作製した、異なる鎖長 (Q12, Q79) のポリグルタミン鎖を HEK293 細胞の染色体上の同一部位に導入し、doxycycline にて発現誘導できる細胞 (部分 DRPLA-Q12, および Q79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293) を用いた¹⁹⁾。これは遺伝背景を全く同一にし、ポリグルタミン鎖長のみが異なり、Q79 細胞では凝集体形成が見られる特徴も有し、ポリグルタミン病のモデルとなる安定発現培養細胞系である。

2. 蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) 法 (図1)

異なる鎖長の部分 DRPLA-Q12 および Q79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293 (以下 Q12, Q79 細胞) を doxycycline (1 μ g/ml) で刺激し、ポリグルタミンを発現誘導した 48 時間後に細胞を回収し、細胞溶解バッファー (7M Urea, 2M thiourea, 40mM Tris-HCl (pH8.5), 4% CHAPS) に溶解後、2D-clean up Kit (Amersham Biosciences) で脱塩処理した。蛋白定量後、Q12 細胞サンプルと Q79 細胞サンプルを等量ずつ混合したものを内部標準サンプルとし、各サンプル 50 μ g を CyDye DIGE Fluor minimal dyes (Cy2, Cy3, Cy5) (Amersham Biosciences) 400pmol で標識した。全てのサンプルを混合し、4枚のゲルで蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) を行った。一次元目の等電点電気泳動は、Immobiline DryStrips (Amersham Biosciences) pH3-10NL 24cm で 16 時間膨潤後、計 90,000Vhr で行った。次に、Ettan Dart six Electrophoresis system (Amersham Biosciences) を用いた二次元目泳動の後、Typhoon9400 (Amersham Biosciences) により、各々 Cy2, Cy3, Cy5 の各最適励起波長を用いて、ゲルをスキャンした。得られたゲルのイメージを、DeCyder 2D Software (Amersham Biosciences) の Difference In-gel Analysis (DIA) および Batch Processor モジュールを用いてスポット検出と定量解析を行った。最後に、Biological Variation Analysis (BVA) を用いて、内部標準サンプルを介したゲル間のスポットマッチング、定量値の標準化、Student's T-test による有意差検定を行った。

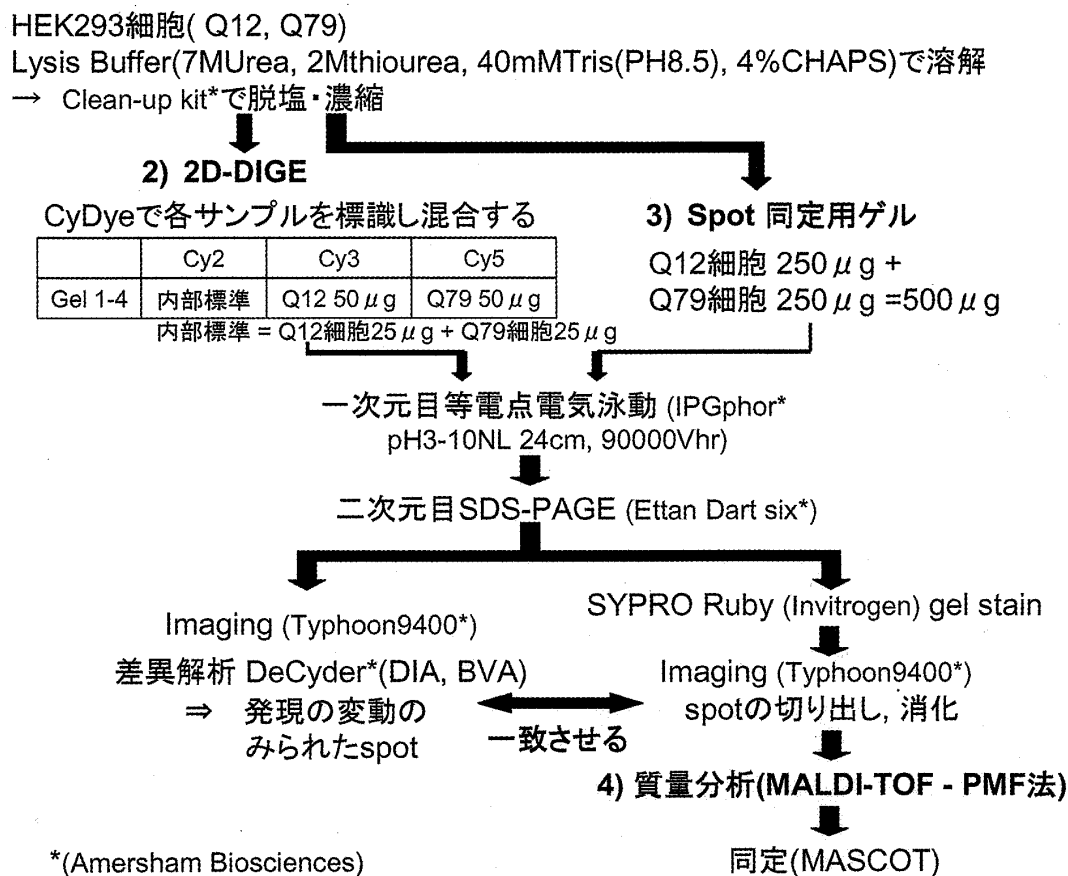


図1 蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) 法

2D-DIGE に用いたのと同じ, doxycycline 刺激 48 時間後の Q12 細胞, Q79 細胞サンプルを, 各々 二次元電気泳動を行った後, 抗 myc 抗体 (46-0603; Invitrogen) を用いて Western-blotting (WB) を行い, myc 配列を付加した各発現誘導蛋白 (Q12-HcRED, Q79-HcRED) を確認した.

3. 質量分析

Q12 細胞サンプルと Q79 細胞サンプルを等量 ずつ混合し, 合計 500 μ g を用いて 2D-DIGE と 同時に二次元電気泳動を行った. 泳動後, SYPRO Ruby (Invitrogen) ゲル染色し, Typhoon 9400 で 検出し, 2D-DIGE の解析から得られた目的の スポットと一致させ, Ettan Spot Picker (Amersham Biosciences) を用いてスポットを切り出した. これをトリプシンによりゲル内消化し, 得られた ペプチド混合物を MALDI-TOF 型質量分析計 (島津/KRATOS 飛行時間型質量分析装置 AXIMA

(S/W version2.3)) にて, ペプチド・マス・フィン ガープリント法 (Peptide-mass fingerprint; PMF) を用いて解析した. 得られたスペクトルを Mascot (<http://www.matrixscience.com>) の Swiss-Prot (<http://kr.expasy.org/sprot>) および NCBI nr sequence database (<http://www.ncbi.nih.gov/>) で検索し, 同定した.

4. Western blotting と免疫沈降

1) 培養細胞系

2D-DIGE に用いたのと同じ細胞系の発現誘導 前と doxycycline で発現誘導 48 時間後の細胞を 回収し, 前述の溶解バッファーで溶解した. 蛋白 濃度測定後, SDS-PAGE をし (各 13 μ g), 抗 L-plastin 抗体 (Clone LPL4A.1; LAB VISION, USA), 抗 c-myc 抗体 (sc-789 A-14; Santa Cruz, California, USA), 抗 Actin 抗体 (sc-1616 I-19; Santa Cruz), 抗 β -tubulin 抗体 (sc-5274 D-10;

Santa Cruz) を用いて, WB を行い, ECL plus Detection System (Amersham Bioscience) にて検出した. また, NE-PER (PIERCE) を用いて, 核と細胞質画分に分画し, WB を行った.

Doxycycline 発現誘導 48 時間後の Q79 細胞を, 一次抗体に抗 L-plastin 抗体, 二次抗体に DynabeadsM-450 (抗マウス抗体; DYNAL) を用いて免疫沈降を行った. SDS-PAGE 後, myc 配列を付加した伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白 (Q79-HcRED) を, 抗 c-myc 抗体 (sc-789 A-14; 抗ラビットポリクローナル抗体 Santa Cruz) で検出した.

2) ポリグルタミン病剖検脳

新潟大学脳研究所病理学分野にて病理診断され, 保管されているポリグルタミン病患者および対照患者剖検脳を用いて, WB を行った. 前頭葉皮質は DRPLA10 例, HD3 例, MJD2 例, 対照 6 例, 小脳は DRPLA5 例, HD3 例, 多系統萎縮症 (MSA) 4 例, 対照 2 例, 後頭葉皮質は DRPLA4 例, HD3 例, 対照 3 例, 大脳白質は DRPLA5 例, HD3 例, 対照 3 例の, 各々約 5-7mg を用いた. DRPLA は 18 歳から 79 歳, 59 から 68 リピートの検体である. 対照は年齢を 30 歳から 76 歳とほぼ合致させ, ポリグルタミン病を除く中枢神経疾患とした (Alzheimer 病 72 歳, 突然死 71 歳, 統合失調症 59 歳, パーキンソン病 53 歳, 筋緊張性ジストロフィー 30 歳, 小脳失調症 76 歳). いずれも, 死後 4-5 時間以内に剖検された検体である. これを組織重量の約 10 倍量の溶解 buffer (8M Urea, 30mM Tris-HCl (PH8.5), 4% CHAPS, 1mMPMSF) に溶解し, 蛋白定量後, SDS-PAGE (各 15 μ g) を行った. WB は上記と同様に行い, Typhoon 9400 でスキャンし, Image Quant TL v.2003. (Amersham Biosciences) を用いて得られたバンドを定量化し, L-plastin の発現量は β -tubulin で補正した.

5. 統計解析

WB で得られた L-plastin/ β -tubulin の値を, DRPLA 群の前頭葉皮質 (n = 10) と対照群の前頭葉皮質 (n = 6) 間で, t 検定を用いて比較した.

DRPLA 前頭葉皮質の L-plastin/ β -tubulin 比

と CAG リピート数との相関については, 線型回帰分析を用いて検討した.

結 果

1. 2D-DIGE 法によるモデル細胞系での蛋白発現量の比較

まずポリグルタミン鎖の伸長による初期変化を同定する目的で, 発現誘導後 48 時間の細胞を用いて, 2D-DIGE 法を行った (図 2-1)). あらかじめ, 発現誘導 48 時間後の Q12, Q79 細胞を, 各々二次元電気泳動し, その後抗 myc 抗体を用いた WB にて発現誘導蛋白を確認した. 約 33kD, pH7-8 に Q12-HcRED を (図 2-2)A), 約 50kD, pH7-8 に Q79-HcRED を確認した (図 2-2)B). 2D-DIGE 法にて, これと同じ位置に発現量の異なるスポットを確認でき, 本法により Q12-HcRED および Q79-HcRED を良好に検出できることを示した.

4 枚のゲルにて BVA を用いて, 各スポット (検出できた発現蛋白) における Q12 と Q79 細胞間での発現量の比を比較した. Q79/Q12 細胞発現量比は, 検出した全 2521 スポットのうち 96% が ± 1.3 以内であった. 各発現誘導蛋白のスポットを除き, Q79 細胞で発現量比 1.5 以上の増加を有意 ($p < 0.05$) に示したものは 12 個, 1/1.5 以下の減少は 8 個であった. 最大の変化を示したスポットは No.1234 で, 発現量比 2.91 ($p < 0.001$) であった.

2. 質量分析法による量差のある蛋白質の同定 (図 3)

変化が最大であった No.1234 (発現量比 2.91, $p < 0.001$) を, MALDI-TOF MS-PMF 法を用いて, L-plastin と同定した.

3. 培養細胞系, および患者剖検脳での L-plastin 発現量の検討

L-plastin の増加について WB にて検証した. 今回用いた細胞では doxycycline 刺激前にも少量のポリグルタミン鎖の発現を認め, doxycycline 刺激後, ポリグルタミン蛋白は著明に誘導された (図 4-1 下). doxycycline 刺激前, 48 時間後, と

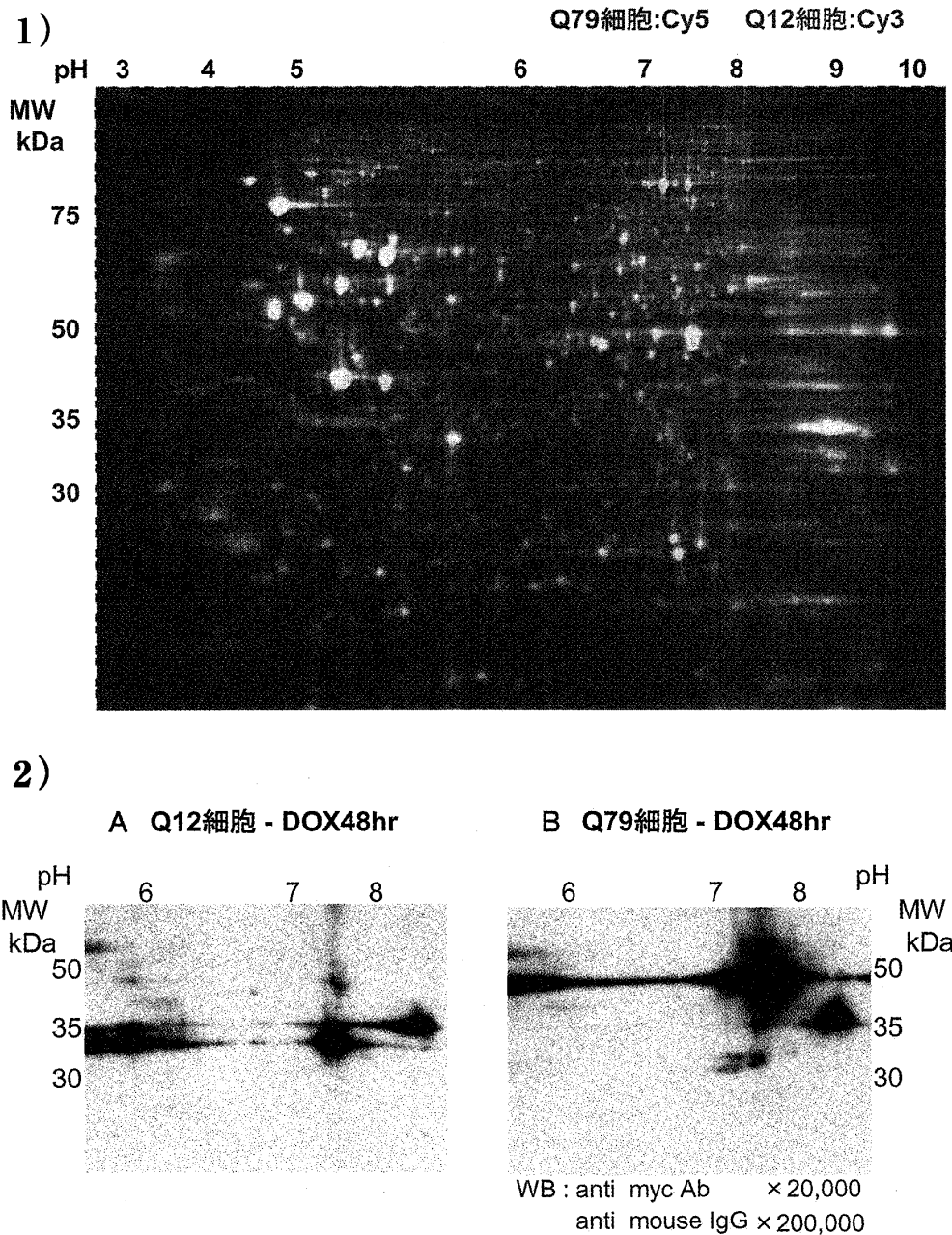


図 2

1) Q12 および Q79 細胞全分画の 2D-DIGE の重ねあわせ画像

Cy3 = Q12 (緑), Cy5 = Q79 (赤)

緑色のスポットは Q12 細胞で、赤色のスポットは Q79 細胞で発現量が増加していることを示す。黄色のスポットは両者間で発現量比がほぼ変わらないことを示す。

約 33kD, pH7-8 の緑色のスポットは Q12 発現誘導蛋白 (Q12-HcRED), 約 50kD, pH7-8 の赤色のスポットは Q79 発現誘導蛋白 (Q79-HcRED) である。

2)

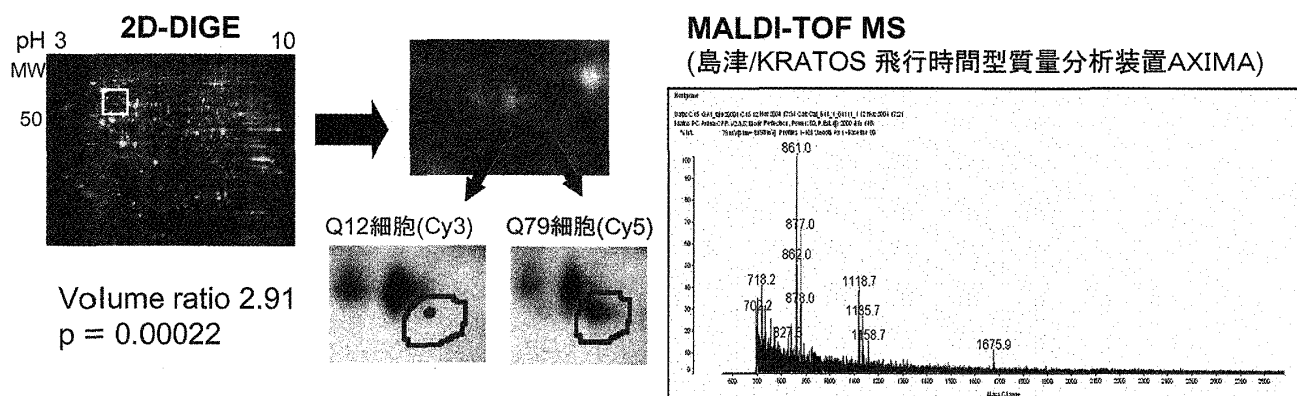
A: 2D-DIGE に用いた, doxycycline 刺激 48hr 後の Q12 細胞の 2次元電気泳動

抗 myc 抗体により, 約 33kD, pH7-8 に発現誘導蛋白 (Q12-HcRED) を検出した。

B: 2D-DIGE に用いた, doxycycline 刺激 48hr 後の Q79 細胞の 2次元電気泳動

抗 myc 抗体により, 約 50kD, pH7-8 に発現誘導蛋白 (Q79-HcRED) を検出した。

Protein No.1234



同定の結果

Accession Number	SWISS-PROT ID	Protein Description	Mr	PI	score
P13796-00-00-00	PLSL-HUMAN	Splice isoform Displayed;from P13796 L-plastin (Lymphocyte cytosolic protein 1)(LCP-1)(LC64P)	70815	5.20	74
P13796-00-01-00	PLSL-HUMAN	Splice isoform Displayed;from P13796 L-plastin (Lymphocyte cytosolic protein 1)(LCP-1)(LC64P)	70829	5.21	74

図3 Protein No.1234の質量分析の結果

pH 5, 約70kDaに、赤色の単独スポットを認める(上段左)。

このスポットを切り出し、トリプシンによるゲル内消化後、MALDI-TOF PMF法で得られたスペクトル(上段右)を Mascot (<http://www.matrixscience.com>) の Swiss-Prot (<http://kr.expasy.org/sprot>) で検索した結果、L-plastinと同一した(下段)。

もに、Q12細胞に比しQ79細胞でL-plastinの発現量の増加を認め、その増加量には誘導前後で著明な違いを認めなかった(図4-1上)。細胞内分画での発現量の増加をみる目的で、核と細胞質分画に分けて検討した。Q79細胞ではいずれの経過時間でも、核および細胞質分画でL-plastinの増加を認めた。また、doxycycline刺激後の時間経過に伴って、Q79細胞の細胞質分画に、約50kDaのバンドの出現を認めた(図4-2)。このバンドは、別の抗L-plastin抗体(sc-16657 D-16;Santa Cruz)を用いても検出され、L-plastin由来と考えた。

L-plastinと伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白の相互作用を検討する目的で、抗L-plastin抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、伸長ポリグ

ルタミン鎖発現蛋白(Q79-HcRED)は、L-plastinと共沈され、L-plastinが伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白と細胞内で結合していることが示唆された(図4-3)。

次に、L-plastinが増加する生理的意義を検討するために、ポリグルタミン病患者組織での検討を行った。対照として、ポリグルタミン病以外の種々の神経疾患の剖検脳を用いた。図5に示すように、一部の患者において明らかにL-plastinの増加を認めた。前頭葉皮質では、対照群においてL-plastin発現量(L-plastin/ β -tubulin)は平均0.44(0.20-0.57)(n=6)であったのに対して、DRPLA群では、平均0.74(0.21-2.96)(n=10)と有意(p<0.05)に増加を認めた。HD群は平均1.1(0.37-4.96)(n=3)で、1検体では著

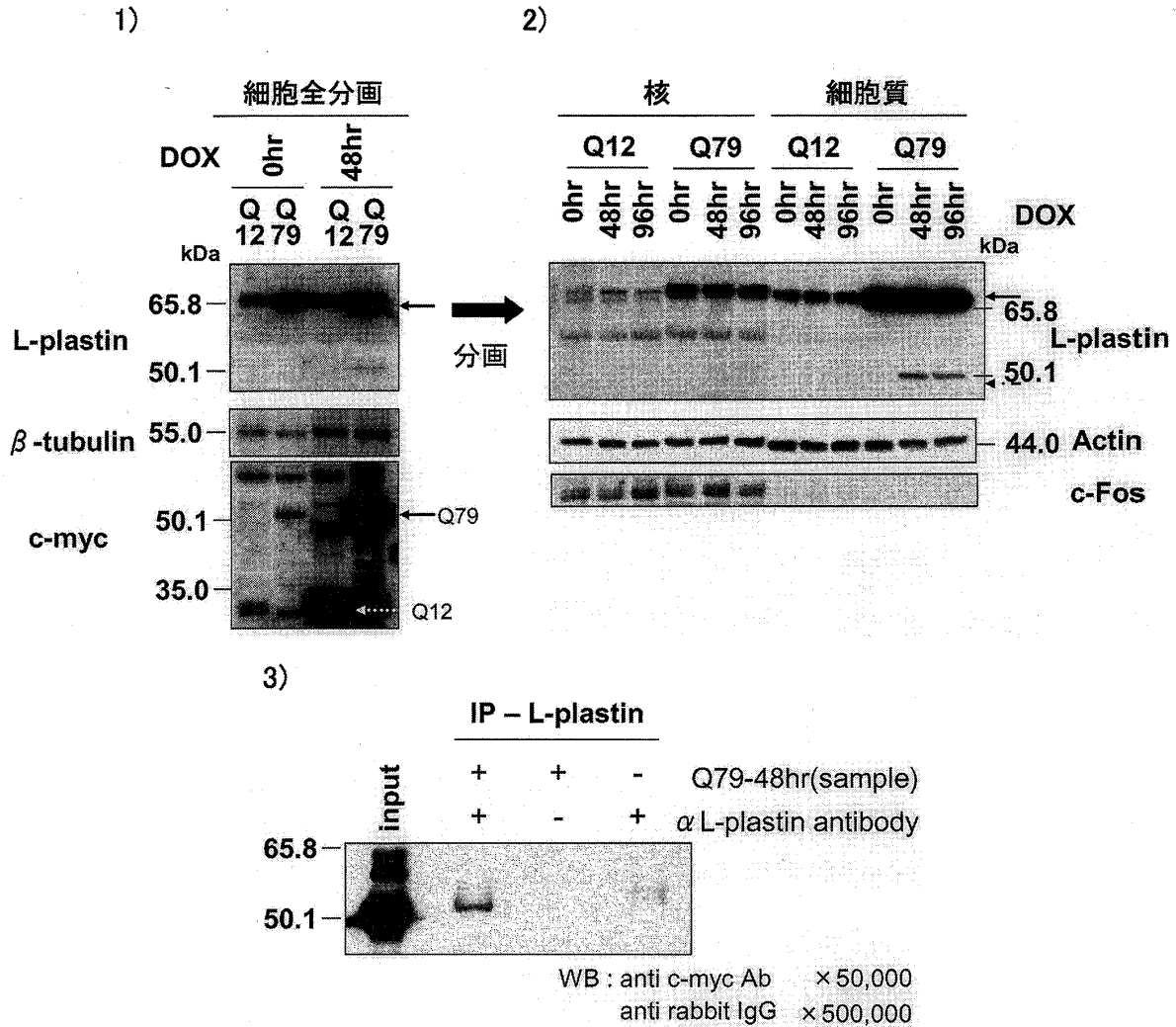


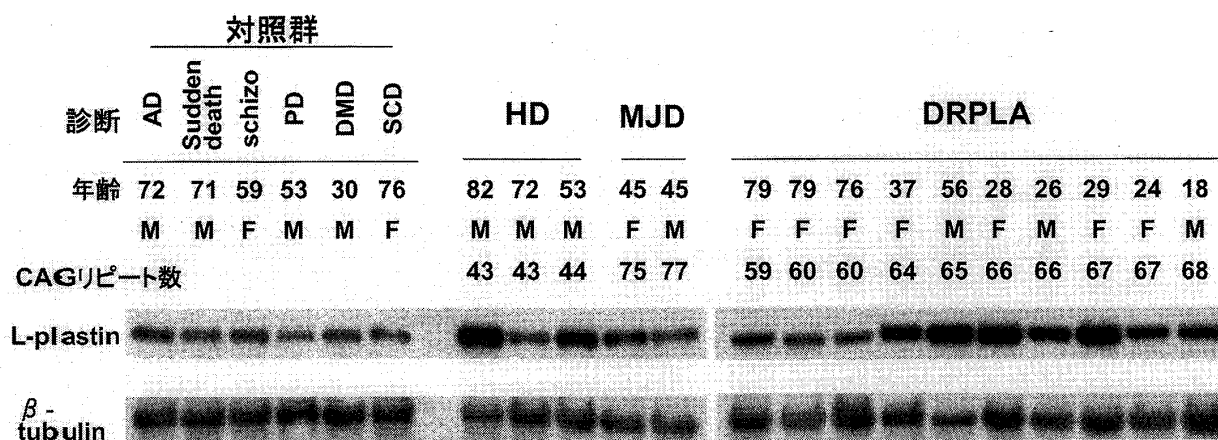
図4 培養細胞における L-plastin の Western - blotting

- 1) Doxycycline 刺激前, 48 時間後ともに, Q12 細胞に比し Q79 細胞で, 全細胞画分で L-plastin の発現量の増加をみとめる (上). また, 各誘導発現蛋白 (Q12-HcRED, Q79-HcRED) は, 抗 c-myc 抗体により, その発現が確認できる (下).
- 2) 核と細胞質画分のいずれにおいても, Q79 細胞で L-plastin が増加している. Q79 細胞で, doxycycline 刺激の時間経過とともに, 約 50kDa に新たにバンドが出現する. 抗 c-Fos 抗体 (sc-253 K-25; Santa Cruz) により, 核分画が良好に分離されていることを示す.
- 3) Doxycycline 刺激 48 時間後の Q79 細胞を抗 L-plastin 抗体で免疫沈降し, 抗 c-myc 抗体で検出した. 左のレーンのみに 50kDa に発現誘導蛋白 (Q79-HcRED) を認める.

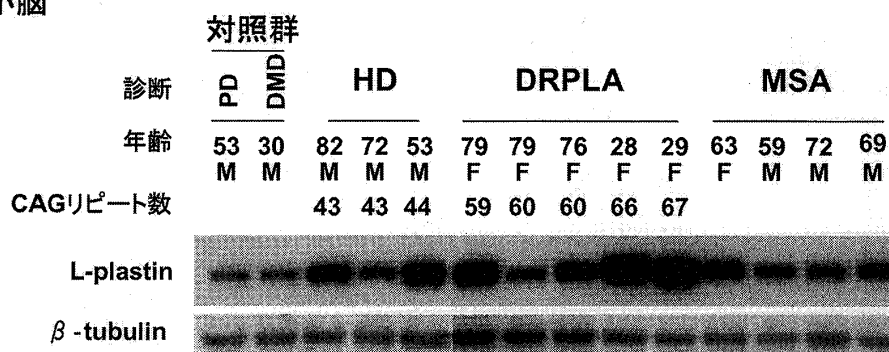
増していた. MJD 群は平均 0.49 (0.25 - 0.74) (n = 2) であった. 小脳では, 対照群 0.96 (0.78 - 1.14) (n = 2), HD 群 3.10 (1.43 - 4.23) (n = 3), DRPLA 群 4.84 (1.45 - 8.24) (n = 5), MSA 群 1.77 (0.99 - 3.27) (n = 4) であり, HD 群と DRPLA 群

で増加を示した. 後頭葉皮質では, 対照群 1.52 (0.32 - 3.89) (n = 3), HD 群 3.04 (0.43 - 5.40) (n = 3), DRPLA 群 0.96 (0.35 - 1.77) (n = 4) であった. 大脳白質では, 対照群 0.45 (0.30 - 0.67) (n = 3), HD 群 1.27 (0.85 - 1.56) (n = 3),

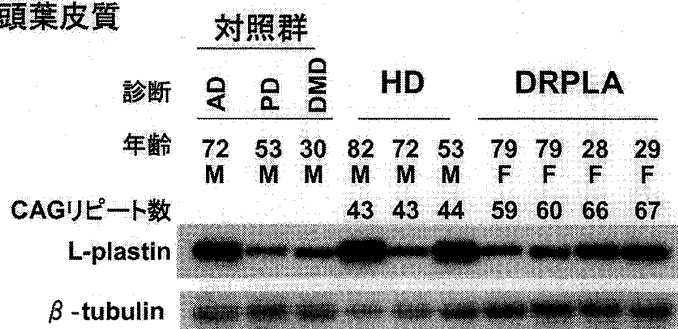
1) 前頭葉皮質



2) 小脳



3) 後頭葉皮質



4) 大脳白質

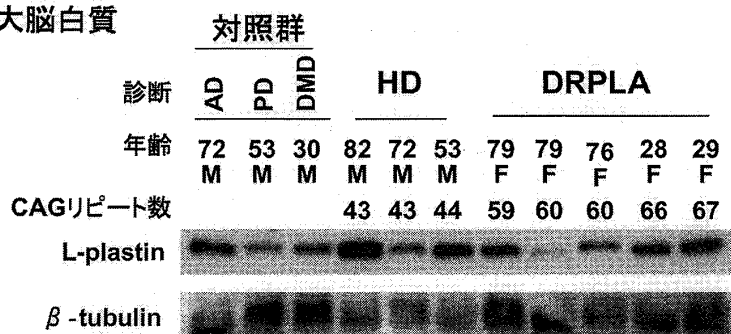


図5 ポリグルタミン病患者剖検脳での Western-blotting による L-plastin 量の検討

1) 前頭葉皮質 2) 小脳 3) 後頭葉皮質 4) 白質

(対照群: Alzheimer病; AD, 突然死; Sudden death, 統合失調症; schizo, パーキンソン病; PD, 筋緊張性ジストロフィー; DMD, 小脳失調症; SCD).

DRPLA 群 0.51 (0.18-0.71) ($n = 4$) であった (図 5, 図 6). また, 培養細胞系でみられた, 50kDa の L-plastin 由来と考えられるバンドは確認できなかった.

DRPLA 群 ($n = 10$) の前頭葉皮質の L-plastin/ β -tubulin 比と CAG リピート数との相関係数は $r = 0.133$, $p = 0.186$ であり, 有意な相関を認めなかった (図 7). また, 罹病期間, 剖検時年齢との間にも優位な相関を認めなかった.

考 察

2D-DIGE 法を用いた網羅的な蛋白発現量の解析は, 全体の変化を鳥瞰できる点で大きな意義がある. 一方で, 対象とする組織の背景の違いも反映されるため, 比較する対象の選択が重要である. 患者組織を用いた網羅的解析では, 目的とする病態以外の個人差などの要因も大きい. このため本研究では, まず, 同一染色体上に異なる鎖長のポリグルタミン鎖 (Q12, Q79) を挿入した安定発現細胞系を用い, 伸長ポリグルタミン鎖発現による蛋白量の変化を検討した.

本細胞系は, 伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白の分解抑制と核内集積, CRE 依存性転写の抑制というポリグルタミン病で認められる特徴を備えており¹⁹⁾, 従来ポリグルタミン病の病因として提唱されてきた, ユビキチン・プロテアソーム系に関わる heat shock protein や転写関連蛋白などの変化が予想された¹²⁾. しかし, 今回の結果, 全スポット 2521 個中で発現量の 1.5 倍以上の増加, もしくは 1/1.5 倍以下の減少を有意にみとめたのは, わずか 20 個のみであった. これは mRNA レベルでの網羅的解析結果とも一致する¹⁴⁾. また, 発現量が最も大きく変化したスポットとして, L-plastin を見い出した. L-plastin は, 一部のポリグルタミン病 (DRPLA, HD) 患者剖検脳においても増加していた.

L-plastin が増加する機序としては, 伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白の細胞内増加に対して反応性に増加していることが考えられる. 今回の結果では発現誘導前の状態から L-plastin 発現量に差

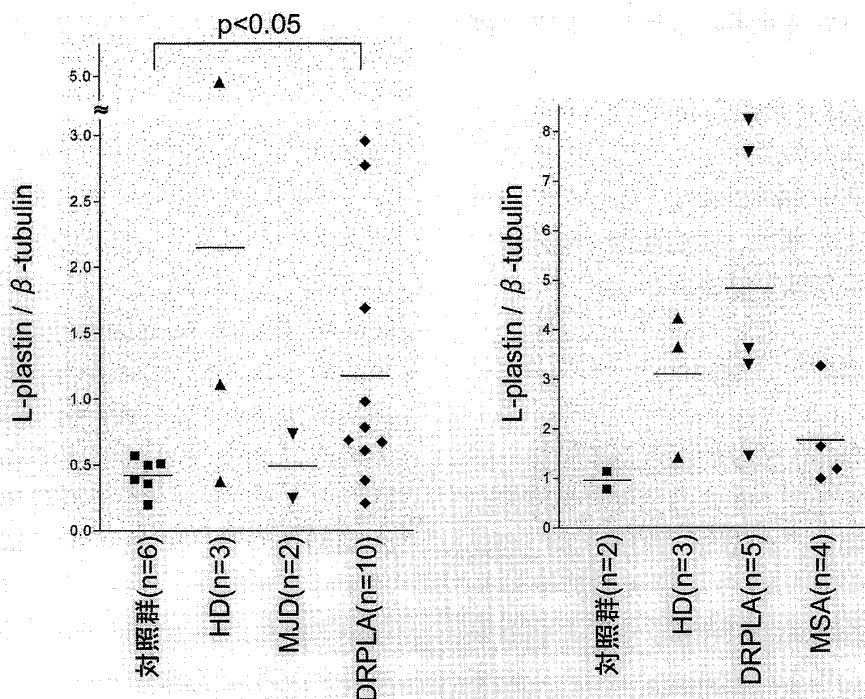
異を認める. このため, 安定細胞発現系を樹立する上での, 染色体導入部位による違い等のアーチファクトである可能性も考えられた. しかし, 今回用いたのは染色体上の同一部位に単一の遺伝子導入が行われた細胞系であり, 導入部位の差異による違いの可能性はない. そのため, doxycycline による発現誘導前にすでに発現している, 少量の伸長ポリグルタミン鎖の発現による影響を受け, L-plastin が増加していると考えた. また, 誘導後 96 時間までは, L-plastin の発現量には変化を認めなかった. このことから, L-plastin の増加が, 伸長ポリグルタミン鎖の発現の増加に対し, 緩徐な変化である, もしくはすでに飽和している可能性を考えた. 一方, 免疫沈降実験の結果から, この細胞系では, 伸長ポリグルタミン蛋白と L-plastin とが結合していることが示された. これらの結果から, L-plastin 増加の機序としては, 伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白が L-plastin と結合することにより, L-plastin の量的不足が生じ, 細胞機能を維持するために代償的に L-plastin の量が増加する可能性, もしくは, 伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白と結合することにより L-plastin の代謝・分解が妨げられて蓄積する可能性を考えた.

剖検脳の検討では, L-plastin の増加は全例に共通するものではなく, 各症例間で差を認めた. 最も多くの例数を解析することができた DRPLA 前頭葉皮質において, ポリグルタミン鎖の伸長数, 年齢, 罹病期間との関連を検討したが, L-plastin 増加と深く相関する要因を明らかにすることはできなかった. 今後, さらに症例数を蓄積し, 病変部位や病理学的重症度との関連についての検討を加え, 本症の病態との関連を明らかにする必要がある.

L-plastin は, T-と I-の 2 種の isoform を持ち, 酵母から哺乳類の細胞まで存在する. ヒト L-plastin は, アクチン結合ドメインと Ca 結合ドメインを有する分子量 68kDa の蛋白である. plastin は核, 細胞質のどちらにも存在し, F-アクチンフィラメントを架橋・束化し, アクチン機能の調節を行う²⁰⁾⁻²³⁾. アクチンはダイナミックに変化し, 細胞の動的な機能を担う細胞骨格蛋白である.

1) ポリグルタミン病患者剖検脳
前頭葉皮質におけるL-plastin発現量の比較

2) 小脳



3) 後頭葉皮質

4) 大脳白質

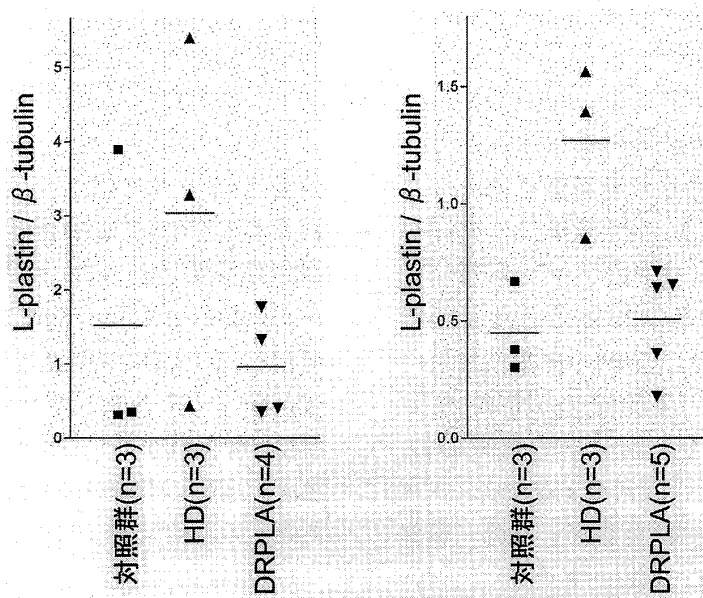


図6 ポリグルタミン病患者剖検脳でのL-plastin/β-tubulin比の検討

1) 前頭葉皮質におけるL-plastin/β-tubulin比の比較

対照群, HD群, MJD群, DRPLA群におけるL-plastin/β-tubulin比を, 平均値で示す. 対照群とDRPLA群間でのみt検定にて有意 (p < 0.05) であった.

2) 小脳におけるL-plastin/β-tubulin比の比較

3) 後頭葉皮質におけるL-plastin/β-tubulin比の比較

4) 大脳白質におけるL-plastin/β-tubulin比の比較

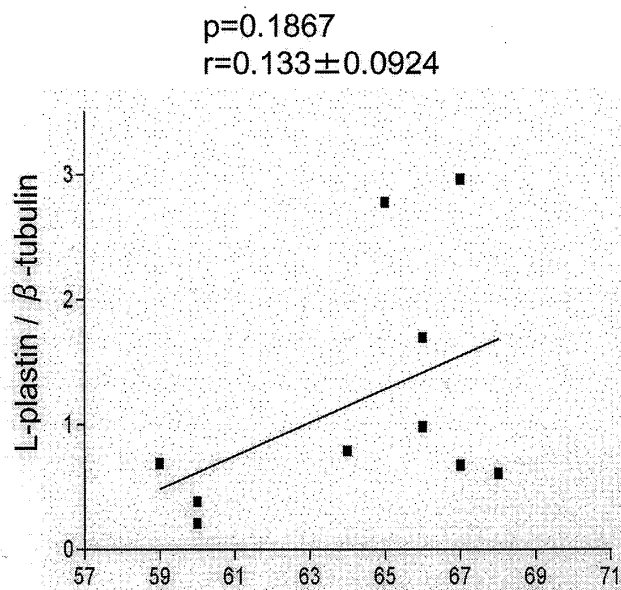


図7 DRPLA 前頭葉皮質 L-plastin/ β tubulin 比と CAG リピート数との相関

DRPLA 群の CAG リピートと L-plastin/ β -tubulin 比には有意な相関はなかった。

細胞質内では、アクチンが細胞膜を押し出し、形態を変化させ、運動させる。特に、神経細胞突起先端の糸状仮足や葉状仮足では、アクチンが重要な役割を果たしている。L-plastin は糸状仮足や葉状仮足などに多く局在し、アクチン線維を調節することで、アクチン由来の細胞形態の維持や運動性に関与している²³⁾。L-plastin の量は厳密にコントロールされており、L-plastin が過剰の場合にも、細胞の形態変化やアクチンストレス線維の再構築などの変化を引き起こすと考えられている²³⁾。

L-plastin は、クラスリン依存性エンドサイトーシスにも関与している。クラスリン依存性エンドサイトーシスは、神経細胞においては神経伝達物質の取り込み、シナプス小胞のリサイクルなどで、特に重要な役割を果たしている²⁴⁾²⁶⁾²⁸⁾。酵母ではクラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて、酵母における plastin のホモログである Sac6 と、Sac6 によって架橋された Act1 (酵母における actin のホモログ) の線維形成が必須で

ある²⁵⁾。Sac6 欠損株では、クラスリン依存性エンドサイトーシスを起すことができない²⁶⁾。一方 Sac6 の過剰発現株は致死的である²⁷⁾。この事からも、plastin が適切な量で存在することが、エンドサイトーシスやアクチン機能維持に重要であると考えられる。

近年、ポリグルタミン病において神経細胞死に先行する初期の機能異常として、シナプス前終末におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスの障害、シナプス機能異常が指摘され、シナプトパッチという概念が提唱されている²⁹⁾。HD では、疾患原因遺伝子である Huntingtin (Htt) のポリグルタミン鎖の伸長に伴い、Htt とシナプス小胞蛋白との結合障害が生じ、神経伝達物質の取り込みや輸送の破綻が起きるという機序も推察されている。また Htt と結合する Huntingtin-interacting protein 1 (HIP1) はアクチン結合蛋白であるが、Htt のポリグルタミン鎖の伸長により、Htt と HIP1 の結合能が低下し、遊離 HIP1 が増加し、アクチン機能異常とクラスリン依存性エンドサイトーシスの障害を引き起こされるという機序も提唱されている^{29)–31)}。さらに、同じくポリグルタミン病である SCA2 の原因遺伝子 ataxin2 が、エンドサイトーシスに関わる endophilin1,3, L-plastin, T-plastin と複合体を形成すること、さらに ataxin2 を過剰に発現させることにより T-plastin が増加することが示されている³³⁾。これらのポリグルタミン病と plastin-アクチン機能、クラスリン依存性エンドサイトーシスとの関連が注目されている。

DRPLA の疾患原因遺伝子 atrophin に関して plastin-アクチン機能やクラスリン依存性エンドサイトーシスとの関連を示唆した報告は、今回が初めてである。今後、DRPLA においても plastin-アクチン機能やクラスリン依存性エンドサイトーシスの障害について検討する必要がある。また、HD の患者剖検脳において L-plastin の増加を認めたことから、HD における L-plastin 機能異常によるシナプトパッチの可能性についても検討する必要がある。今後、L-plastin の増加が、実際にクラスリン依存性エンドサイトーシスの障害やシ

ナプス機能異常を引き起こしているかを細胞系やモデル動物で検討する必要がある。最後に、L-plastin の発現は中枢神経系以外でも広く確認されることから、ポリグルタミン鎖由来の細胞障害性を計るサロゲートマーカーの一つとして応用できる可能性も考えられる。今後、種々の組織でのポリグルタミン病の病期に応じた変化を検討していく必要もある。

謝 辞

本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただいた、新潟大学脳研究所脳疾患リソース解析部門分子神経疾患資源解析学分野 小野寺理助教授、医学部保健学科 高橋俊昭先生、脳研究所病理学分野 豊島靖子先生、高橋均教授、腎研究所構造病理学分野 吉田豊先生、脳研究所神経内科 西澤正豊教授に心より深謝申し上げます。

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* 26 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-pallidolucylian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 6: 9-13, 1994.
- 4) 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. *Nat Genet* 4: 221-226, 1993.
- 5) Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, Wakisaka A, Tashiro K, Ishida Y, Ikeuchi T, Koide R, Saito M, Sato A, Tanaka T, Hanyu S, Takiyama Y, Nishizawa M, Shimizu N, Nomura Y, 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. *Nat Genet* 14: 277-284, 1996.
- 6) 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. *Nat Genet* 8: 221-228, 1994.
- 7) 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 alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15: 62-69, 1997.
- 8) David G, Abbas N, Stevanin G, Duurr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Sandou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL and Brice A: Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 17: 65-70, 1997.
- 9) 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.
- 10) Cummings CJ and Zoghbi HY: Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.* 9: 909-916, 2000.
- 11) Yamada M, Tsuji S and Takahashi H: Pathology of CAG repeat diseases. *Neuropathology*, 20: 319-325, 2000.
- 12) Landles C and Bates PG: Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO reports* 5: 958-963, 2004.
- 13) Sugars LL and Rubinsztein CD: Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends in*

- Genet. 19: 233 - 238, 2003.
- 14) Sipione S, Rigamonti D, Valenza M, Zuccato C, Conti L, Pritchard J, Kooperberg C, Olson JM and Cattaneo E: Early transcriptional profiles in huntingtin - inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet* 11: 1953 - 1965, 2002.
 - 15) Luthi - Carter R, Strand AD, Hanson SA, Kooperberg C, Schilling G, LaSpada AR, Merry DE, Young AB, Ross CA, Borchelt DR and Olson JM: Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context independent effects. *Hum Mol Genet* 11: 1927 - 1937, 2002.
 - 16) Chan EY, Luthi - Carter R, Strand A, Solano SM, Hanson SA, DeJohn MM, Kooperberg C, Chase KO, DiFiglia M, Young AB, Leavitt BR, Cha JH, Aronin N, Hayden MR and Olson JM: Increased huntingtin protein length reduces the number of polyglutamine - induced gene expression changes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 11: 1939 - 1951, 2002.
 - 17) Unlu M, Morgan ME and Minden JS: Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071 - 2077, 1997.
 - 18) Tongue R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I and Davidson M: Validation and development of fluorescence two - dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1: 377 - 396, 2001.
 - 19) Takahashi T, Nozaki K, Tsuji S, Nishizawa M and Onodera O: Polyglutamine represses cAMP - responsive - element - mediated transcription without aggregate formation. *Neuroreport*. 28: 295 - 299, 2005.
 - 20) Bretscher A: Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F - actin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6849 - 6853, 1981.
 - 21) De Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J and Matsudaira P: Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelational proteins. *J Cell Biol* 111: 1069 - 1079, 1990.
 - 22) Arpin M, Friederich E, Algrain M, Vernel F and Louvard D: Functional Differences between L - and T - plastin Isoforms. *J Cell Biol* 127: 1995 - 2008, 1994.
 - 23) Veerle D, Joël V and Jan G: Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho) physiological cellular processes. *Acta Pharmacologia Sinica* 26: 769 - 779, 2005.
 - 24) Conner DS and Schmid LS: Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422 6: 37 - 44, 2003.
 - 25) Kubler E and Riezman H: Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *The EMBO J* 12: 2855 - 2862, 1993.
 - 26) Kaksonen M, Toret PC and Drubin GD: A Modular Design for the Clathrin - and Actin - Mediated Endocytosis machinery. *Cell* 123: 305 - 320, 2005.
 - 27) Sandrock MT, Brower MS, Toenjes AK and Adams MEA: Suppressor Analysis of Fimbrin (Sac6p) Overexpression in Yeast. *Genetics* 151: 1287 - 1297, 1995.
 - 28) Dillon C and Goda Y: The Actin Cytoskeleton: Integrating Form and Function at the Synapse. *Ann Rev Neurosci* 28: 25 - 55, 2005.
 - 29) Li JY, Plomann M and Brundin P: Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends Mol Med* 9: 414 - 420, 2003.
 - 30) Li SH and Li XJ: Huntingtin - protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends in Genetics* 20: 146 - 154, 2004.
 - 31) Smith R, Brundin P and Li JY: Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci* 62: 1 - 12, 2005.
 - 32) Doyle T and Bostein D: Movement of cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3386 - 3891, 1996.
 - 33) Ralser M, Nonhof U, Albrecht M, Lengauer Y, Wanker EE, Lehrach H and Krobitsch S: Ataxin - 2 and huntingtin interact with endophilin - A complex to function in plastin - associated pathways. *Hum Mol Genet* 14: 2893 - 2909, 2005.

(平成 17 年 12 月 27 日受付)