



These results demonstrate that the lack of the DRPLA/atrophin-1 directly or indirectly changes expression level of a specific group of genes, and that we may harmlessly treat DRPLA by RNAi knockdown technique.

**Key words:** CAG repeat, polyglutamine, knockout mice, GeneChip, expression profile

## はじめに

DRPLA (歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症) は、進行性ミオクロノステんかん、小脳失調、舞踏アテトーゼ、性格変化、痴呆などの多彩な神経症状を示し、病理学的には歯状核赤核路と淡蒼球ルイ体路の変性を特徴とする常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症であり、伸長ポリグルタミン病の一つである。現在までに9種類の遺伝性神経変性疾患 (ハンチントン病 HD<sup>1)</sup>、球脊髄性筋萎縮症 SBMA<sup>2)</sup>、脊髄小脳変性症 1型 SCA1<sup>3)</sup>、2型 SCA2<sup>4)</sup>、マシャドージョセフ病 MJD/SCA3<sup>5)</sup>、6型 SCA6<sup>6)</sup>、7型 SCA7<sup>7)</sup>、17型 SCA17<sup>8)9)</sup> および DRPLA<sup>10)11)</sup>) において、各病因遺伝子の翻訳領域に、ポリグルタミンをコードする CAG リピートの伸長を認めている。これらの疾患では伸長ポリグルタミン鎖そのものが細胞障害性を有すると考えられている。

一方、DRPLA 蛋白の生理的機能については、不明な点が多い。ショウジョウバエにおける DRPLA 蛋白の相同遺伝子 *Atro* の欠失モデルの研究では、co-repressor として転写を抑制する機能が示唆されている<sup>12)</sup>。また、ポリグルタミン鎖が複数の転写関連因子に認められることから、転写制御との関連が注目されている。

近年 RNAi 法により目的とする遺伝子の発現を効率よく抑制する技術が開発され、神経変性疾患の新たな治療法として注目されている。この治療法の安全性を確立するためには、本遺伝子の生理的役割を明らかにすることが重要である。本研究は、DRPLA 蛋白が種々の転写制御に関わっている可能性を想定し、その生理的機能を解析するため、DRPLA ノックアウトマウスにおいて、網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行い、本遺伝子欠損の影響を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### マウスの作成

DRPLA ノックアウトマウスは、当研究室の木村らにより、以下の方法で作成されたものを使用した。129SvJ ゲノムライブラリーより、約 100 万クローンをスクリーニングし、全長 DRPLA ゲノム遺伝子を単離した。DRPLA 遺伝子プロモーターの組織による発現分布を明確化するために、翻訳開始点から 6 アミノ酸を残し、それ以下を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子で置換し、融合蛋白が作られるようにデザインした。完成したターゲティングベクターを ES 細胞へ導入し、キメラマウスを作成後、得られたキメラマウスと C57BL/6J とを交配し N1 マウスを得た。N1 マウスと C57BL/6J とをさらに 2 回交配して N3 マウスを得た。N3 世代のマウスを交配して N3 コロニーを作成し、各 genotype のマウスを得た<sup>13)</sup>。

ノックアウトおよび野生型、胎生 14 日齢 (E14)、生後 1 日齢 (P1)、生後 42 日齢 (P42) の雄を 3 匹ずつ使用した。P42 のマウス、P1 のマウスは N3 コロニーのマウス同士を交配して得られたものを、E14 のマウスは N3 コロニーのマウス同士を体外受精・核移植 (IVF-ET) をして得られたものをそれぞれ使用した。P1 と E14 のマウスの性別は、ゲノム DNA より SRY 遺伝子の PCR を行って決定した。脳を氷上で摘出し、ドライアイスで速やかに凍結した後、RNA 抽出まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### Total RNA の抽出

凍結保存したマウスの全脳に ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan) を加え、ポリトロンにてホモジネートした。ホモジネート液にクロロホルムを加えてよく混和し遠心し、遠心後上層を回収し、イソプロパノールを等量加えて、全 RNA 沈殿を遠

心にて回収した。回収した全 RNA から, ISOGEN Poly (A)<sup>+</sup> Isolation Pack (NipponGene) を用いて, mRNA を精製した。精製されたすべての mRNA は, A260/A280 比が 1.7-1.9 であることを確認した。

#### オリゴヌクレオチドマイクロアレイ

今回の研究では, 約 12,000 個の遺伝子の発現を確認できる GeneChip MG-U74Av2 (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて発現解析を行なった。ビオチン化 cRNA の調整は GeneChip のプロトコールに従い, 以下のように行なった。mRNA 1 $\mu$ g から, T7-oligo (dT) 24-primer と Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 1 時間反応させ, 一本鎖 cDNA を合成した。その後, E.coli RNase H, E.coli DNA polymerase I, E.coli DNA ligase を加えて 16 $^{\circ}$ C, 2 時間反応させ, 最後に T4 DNA polymerase を加えて二本鎖 cDNA を作成した。GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) を使用して精製した後, この cDNA を鋳型として, BioArray high yield RNA transcript labeling kit (ENZO Diagnostic, New York, NY) を用いて, 37 $^{\circ}$ C, 6 時間 in vitro transcription を行い, ビオチン標識 cRNA を合成した。cRNA は GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) で精製し, 吸光度計によって濃度を測定した。次に cRNA 20 $\mu$ g (最終濃度 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) を断片化溶液 (40mM Tris 酢酸溶液, 30mM 酢酸マグネシウム, 100mM 酢酸カリウム) 中, 94 $^{\circ}$ C, 35 分で反応させ 35-200 塩基に断片化した。この cRNA を MES buffer 中で 45 $^{\circ}$ C, 16 時間 GeneChip とハイブリダイゼーション行なった。その後, ハイブリダイゼーション溶液を除き, GeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix) を用いて, Non-Stringent Wash Buffer (0.9M 塩化ナトリウム, 51.9mM 燐酸ナトリウム, 7.5mM EDTA, 0.01% Tween20), Stringent Wash Buffer (100mM MES, 0.01M [Na<sup>+</sup>], 0.01% Tween20) で洗浄後, streptavidin phycoerythrin とビオチン化抗 streptavidin にて染色を行なった。蛍光シグナルは GeneChip system confocal scanner (Hewlett-Packard, Houston, TX) を用いて読み取った。

#### 統計解析

読み取った蛍光シグナルを, Microarray Suite MAS 5.0 (Affymetrix) にて CEL ファイルに変換し, Rosetta Resolver (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) にインポートして, データの解析を行なった。2way-ANOVA および 1way-ANOVA を用いて各群間で検定を行い, ANOVA における P-value が 0.01 未満のものを有意なものとして抽出した。また, 各 sequence で, Intensity データにおける P-value ((Intensity (sequence) - Average intensity (negative controls)) / error) が 0.01 以上のものは発現量の低い遺伝子 (absent) として除外した。Affymetrix のホームページ (<http://www.affymetrix.com/index.affx>) より, NetAffx Analysis Center のサイトを利用し, 抽出された遺伝子の Annotation Number から, annotation table を Download し, 遺伝子の機能を検討した。また, Mouse Genome Informatics (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>) や National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) などのバイオインフォマティクスを利用した。

## 結 果

### GeneChip<sup>®</sup>を用いた遺伝子発現プロファイリング

Rosetta Resolver を用いて解析を行なった (図 1)。2-way ANOVA を行い, 各週齢において比較 (time-slice) した。DRPLA ノックアウトマウス脳では野生型マウス脳に比べて, E14 において 192 遺伝子で発現低下, 242 遺伝子で発現上昇がみられた。P1 では 21 遺伝子で低下, 21 遺伝子で上昇, P42 では 26 遺伝子で低下, 101 遺伝子で上昇していた。

この中で intensity の平均で 2.0 倍以上の変化の見られたものは, E14 の発現低下において 9 遺伝子, 発現上昇で 57 遺伝子であった。P1 では 2 遺伝子が発現低下, 3 遺伝子が発現上昇していた。P42 では発現上昇が 3 遺伝子のみであった (表 1)。

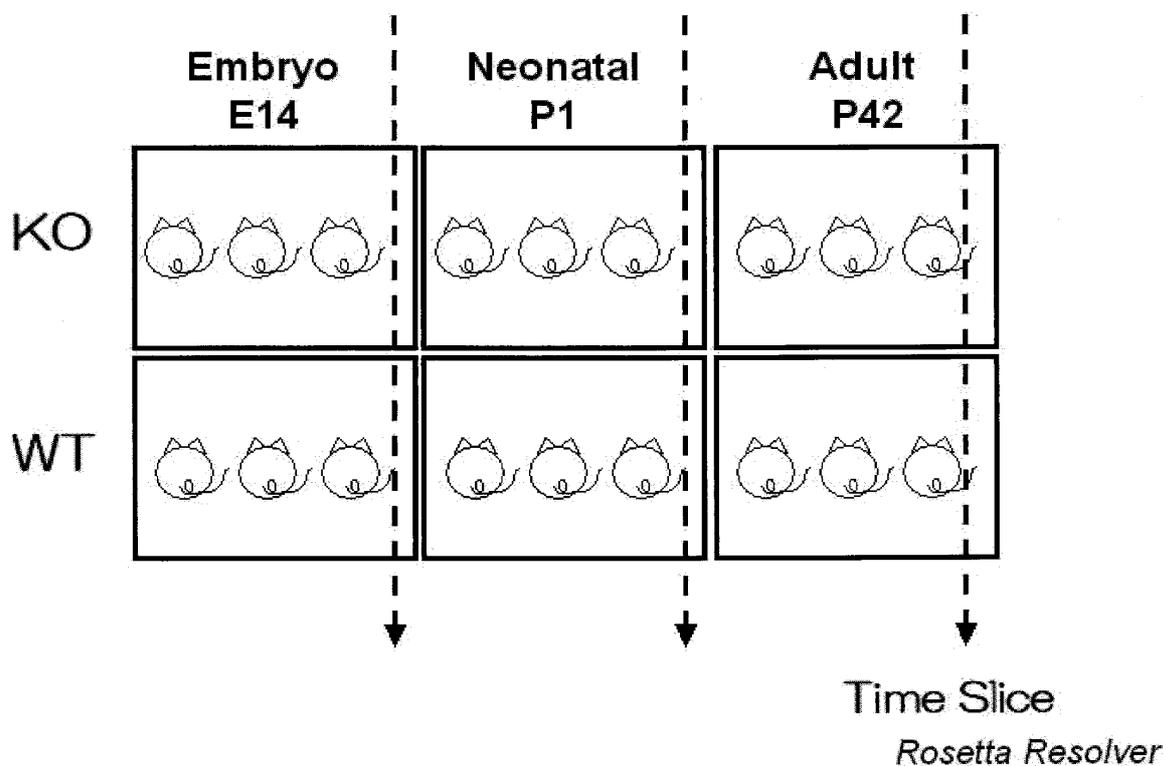


図1 統計解析のシェーマ

胎生14日齢 (E14), 生後1日齢 (P1), 生後42日齢 (P42) の雄のノックアウトマウス (KO) および野生型マウス (WT) をそれぞれ3匹ずつ使用した. 統計解析には Rosetta Resolver を使用し, 2-way ANOVAにおける Time Slice で各週齢の遺伝子の発現の違いを検定した. ANOVAで  $P < 0.01$  を有意とし, Intensity P value が 0.01 以上のものは, 発現量の低い遺伝子として除外した.

どの週齢においても共通して変化が認められる遺伝子群が重要と想定し, その有無を Venn-Diagram で検討した (図2). 3群のうち2つ以上で共通して変化のあった遺伝子は, 表2に示す通りである. E14とP42で発現低下の認められた遺伝子は neuropeptide Y (Npy) であり, E14とP1で発現低下していた遺伝子は transthyretin (Ttr), polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K (Polr2k), OCIA domain containing 1 (Ociad1), splicing factor, arginine/serine-rich 2 (Sfrs2), RIKEN cDNA 1110008H02 gene (1110008H02Rik) であった. また, E14とP42で発現の上昇していた遺伝子は ephrin B2 (Efnb2) であり, P1とP42で発現の上昇していた遺伝子は RIKEN cDNA 4930577M16 gene (4930577M16Rik) であった.

全ての週齢で発現が上昇していた遺伝子は RIKEN cDNA 2610042L04 gene (2610042L04Rik) であった.

## 考 察

DRPLAを含む伸長ポリグルタミン病は, 伸長ポリグルタミン鎖そのものが細胞障害性を有すると考えられている (gain-of-toxic function). しかし, 個々の疾患における臨床症状や障害される神経細胞の分布の違いを説明することは難しく, 各責任遺伝子に依存した要素も考慮する必要があると考えられる (loss-of-function). ポリグルタミン病の治療法確立に向けて, 包括的な病態機序を正確に理解するためには, 責任遺伝子の生理的機

表1 2.0倍以上の変化のあった遺伝子群

Gene Symbol	RefSeq Transcript ID	Intensity Average		Fold Change
		Knock-out	Wild type	
<b>Embryo14 Down</b>				
Hbb-bh1	NM_008219	52.43	274.52	0.19
1110008H02Rik	—	148.75	610.77	0.24
Ufd1l	NM_011672	49.78	195.38	0.25
Vamp3	NM_009498	17.82	63.60	0.28
Hbb-b2	NM_016956	788.42	1986.47	0.40
Tr	NM_013697	191.91	433.01	0.44
Mrpl9	NM_030116	35.70	73.93	0.48
<b>Embryo day14 Up</b>				
4921506J03Rik	—	146.20	23.98	6.10
Rnf2	NM_011277	74.06	16.29	4.55
Rab7	NM_009005	122.20	27.12	4.51
Usp22	NM_001004143	64.42	14.54	4.43
2510049I19Rik	NM_026455	123.91	28.02	4.42
LOC280487/lap	NM_010490	138.23	31.88	4.34
	/NM_183299			
G6pd2/G6pdx	NM_008062	57.82	13.72	4.22
	/NM_019468			
LOC280487/lap	NM_010490	257.43	62.33	4.13
	/NM_183299			
Txndc7	—	265.91	64.40	4.13
Syt1	NM_009306	45.19	10.98	4.12
Anp32a	NM_009672	128.77	33.31	3.87
Plagl1	NM_009538	56.51	16.38	3.45
B3galt3	NM_020026	61.10	19.75	3.09
Snx2	NM_026386	137.95	46.95	2.94
2510049I19Rik	NM_026455	278.44	95.21	2.92
Ly6h	NM_011837	471.21	171.14	2.75
Sfrs1	NM_173374	83.96	30.57	2.75
Tpm4	NM_001001491	57.42	20.92	2.74
Matr3	NM_010771	117.70	43.15	2.73
F2r	NM_010169	51.58	19.01	2.71
Gtf2i	NM_010365	104.55	38.59	2.71
Hnrpa3	NM_146130	47.97	17.80	2.70
	/NM_198090			
Lypla1	NM_008866	46.99	17.50	2.69
Rnf13	NM_011883	54.37	20.38	2.67
Rraga	NM_178376	280.28	108.15	2.59
Pkia	NM_008862	133.84	52.23	2.56
Txndc7	—	206.64	84.14	2.46
Arih1	NM_019927	75.16	30.96	2.43

Gria2	NM_013540	86.13	35.70	2.41
Pole3	NM_021498	56.75	23.65	2.40
Rnf14	NM_020012	142.86	61.17	2.34
St13	NM_133726	100.68	43.12	2.34
Tia1	NM_011585	336.40	146.20	2.30
Tbl3	NM_145396	61.28	26.85	2.28
Elavl3	NM_010487	216.41	95.94	2.26
Grina	NM_023168	231.42	103.42	2.24
1700037H04Rik	NM_026091	124.57	55.75	2.23
Myo7a	NM_008663	63.42	28.43	2.23
E130013N09Rik	—	92.39	41.45	2.23
Dlst	NM_030225	96.10	43.62	2.20
Ppm1b	NM_011151	92.10	41.87	2.20
Smc6l1	NM_025695	50.05	22.77	2.20
	/NM_026052			
Faf1	NM_007983	62.79	28.81	2.18
Ccar1	NM_026201	62.31	28.68	2.17
Syt11	NM_018804	85.86	39.79	2.16
Arl6ip1	NM_019419	766.35	356.64	2.15
Calm3	NM_007590	398.14	186.49	2.13
Rohn	NM_009708	225.57	105.68	2.13
D10Erttd516e	—	95.05	44.73	2.13
Fin14	—	108.96	51.37	2.12
Pnck	NM_012040	116.11	56.06	2.07
D9Wsu20e	NM_133718	246.55	119.47	2.06
Arfrp1	NM_029702	70.53	34.23	2.06
Clns1a	NM_023671	82.97	41.52	2.00

**Postnatal day1 Down**

1110008H02Rik	—	295.02	707.08	0.42
Spp1	NM_009263	47.18	98.15	0.48

**Postnatal day1 Up**

Dctn5	NM_021608	155.56	58.96	2.64
2010309E21Rik	NM_025591	130.88	58.09	2.25
Nptxr	NM_028763	283.60	140.14	2.02
	/NM_030689			

**Adult 6week Up**

Col1a1	NM_007742	224.62	96.77	2.32
2610042L04Rik	NM_025940	291.29	135.96	2.14
H2afy	NM_012015	209.80	105.02	2.00

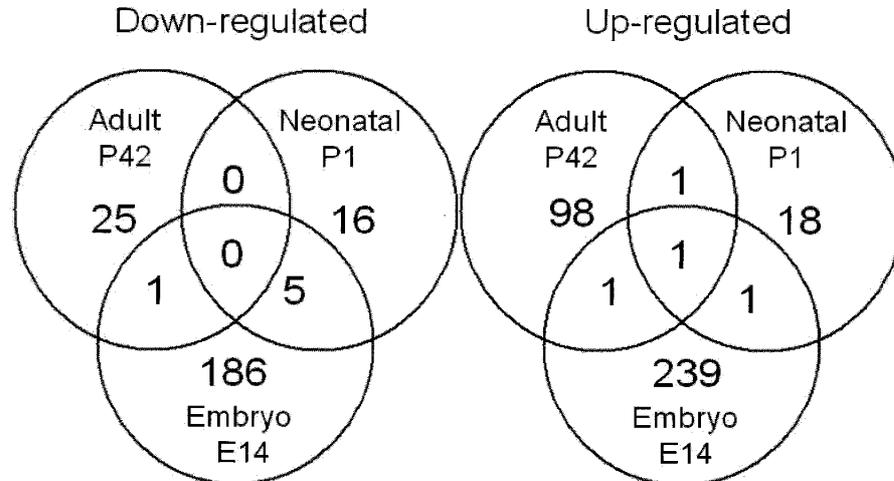


図2 各週齢における変化のあった遺伝子数

各週齢における変化のあった遺伝子数を Venn - Diagram で検討した。重なりのある部分が、各週齢で共通して変化している遺伝子数であり、胎生 14 日齢 (E14) と生後 42 日齢 (P42) で発現低下の認められた遺伝子は 1 つ (Npy) であり、胎生 14 日齢 (E14) と生後 1 日齢 (P1) で発現低下していた遺伝子は 5 つ (Ttr, Polr2k, Ociad1, Sfrs2, 1110008H02Rik) であった。また、E14 と P42 で発現の上昇していた遺伝子は 1 つ (Efnb2) であり、P1 と P42 で発現の上昇していた遺伝子も 1 つ (4930577M16Rik) であった。全ての週齢で発現が上昇していた遺伝子と、E14 と P1 で上昇していた遺伝子は、Sequence Code が異なるが同一のものであり 2610042L04Rik であった。

表2 各週齢において共通して変化のあった遺伝子群

Gene Symbol	RefSeq Transcript ID	Embryo day14			Postnaonatal day1			Adult 6week					
		KO	WT	Fold Change	KO	WT	Fold Change	KO	WT	Fold Change			
Npy	NM_023456	220.46	261.49	0.84	Dn	421.47	574.34	0.73	357.89	426.79	0.84	Dn	
Ttr	NM_013697	191.91	433.01	0.44	Dn	255.51	340.83	0.75	Dn	558.77	442.64	1.26	
Polr2k	NM_023127	194.20	307.86	0.63	Dn	125.08	168.56	0.74	Dn	182.72	160.23	1.14	
Ociad1	NM_023429	376.52	468.57	0.80	Dn	548.13	591.97	0.93	Dn	1110.82	1033.38	1.07	
Sfrs2	NM_011358	2022.28	2240.94	0.90	Dn	1041.06	1142.76	0.91	Dn	1644.76	1384.48	1.19	
1110008H02Rik	—	148.75	610.77	0.24	Dn	295.02	707.08	0.42	Dn	427.28	386.67	1.11	
Efnb2	NM_010111	253.85	234.48	1.08	Up	156.40	96.72	1.62	169.72	120.31	1.41	Up	
2610042L04Rik	NM_025940	504.16	302.24	1.67	Up	566.40	341.96	1.66	Up	291.29	135.96	2.14	Up
2610042L04Rik	NM_025940	703.10	445.47	1.58	Up	734.48	461.08	1.59	Up	470.02	209.56	2.24	
4930577M16Rik	NM_178936	20.41	22.33	0.91	Up	67.18	38.89	1.73	Up	490.35	371.34	1.32	Up

KO: knock-out mice, WT: wild type mice, Dn: down regulated, Up: up regulated

能を把握することが重要である。

現在までにポリグルタミン病の中で責任遺伝子の生理機能が明らかとなっているのは、SBMA<sup>2)</sup>、SCA6<sup>6)</sup> および SCA17<sup>8)9)</sup> のみである。それぞれ

の責任遺伝子は SBMA ではアンドロゲン受容体、SCA6 は P/Q タイプ Ca チャネル (CACNA1A)、SCA17 は TATA - binding protein (TBP) であり、それらの翻訳領域に存在する CAG リピートの延

長により発病することが示されている。

一方、いまだ明らかになっていないもののうち、ハンチントン病の責任遺伝子である Huntingtin については、転写の調節因子である可能性が考えられている<sup>14)15)</sup>。野生型の Huntingtin を導入した細胞では、変異型を導入した細胞に比べて brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現が亢進していることが示されている。BDNF はそのプロモーター領域に転写抑制因子が結合するシスエレメントとして neuron restrictive silencer element (NRSE) を有している。Huntingtin は repressor element-1 transcription factor/neuron restrictive silencer factor (REST/NRSF) を介してその機能を抑制することで、BDNF の発現を亢進させ、さらに BDNF だけでなくプロモーターに NRSE を持つ遺伝子の発現を調節していると考えられている。

DRPLA についても、DRPLA 蛋白が転写調節因子である ETO/MTG8 に結合することから、転写制御に関与する可能性が考えられている<sup>16)</sup>。DRPLA 蛋白と ETO/MTG8 は mSin3A, ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と核内で共存し、転写抑制に働くことが示されている。ショウジョウバエを用いた研究では、ヒト DRPLA 遺伝子の相同遺伝子である Atro が転写の co-repressor として機能しているのではないかと考えられている<sup>12)</sup>。Atro はショウジョウバエの発生過程において、前後軸・背腹軸が決定された後に、pair-rule 遺伝子群の even-skipped (eve) および huckebein (hkb) と C 末において結合・相互作用し、転写抑制因子である eve とともに作用する。また、レポーター遺伝子を用いた培養細胞での一過性発現系では、全長正常 DRPLA 蛋白が CREB および p53 依存性の転写活性化を抑制することが示されている<sup>17)</sup>。

DRPLA が転写制御に関わっていると仮定すると、その欠損によって、種々の遺伝子の発現に変化をきたすことが考えられる。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングによって、それらの遺伝子の発現変化を網羅的に調べることが可能である。近年、ポリグルタミン病のモデルマ

ウスおよび細胞を用いたマイクロアレイの研究がいくつか報告されている<sup>18)–21)</sup>が、その責任遺伝子のノックアウトマウスを用いた研究は報告がない。

DRPLA ノックアウトマウスは、胎生致死にならず、寿命も野生型マウスとほぼ同じである。体重は野生型よりも少なく、その表現系は、尾を持ち上げたときに、四肢を屈曲させる運動や体幹を捻転させる運動を示す<sup>13)</sup>。明らかな失調歩行や痙攣などはみられない。脳重は野生型に比べて小さいが、病理学的に明らかな神経細胞の脱落や変性は認められない。DRPLA ノックアウトマウスが明らかな表現系を呈さないため、DRPLA の生理的機能を追及するためには包括的なプロファイリングが強力な手段となりうると思われる。本研究では、DRPLA 蛋白の個体における生理的機能を明らかにするために、DRPLA ノックアウトマウスを使用し、遺伝子発現プロファイリングを行なった。

Rosetta Resolver を用いた解析で、各時期において、統計学的に有意差をもち、2.0 倍以上の変化を示している遺伝子は、表 1 の通りとなった。P1 および P42 では、変化のあった遺伝子数は少ないが、E14 ではその数が多く、とくに発現が上昇している遺伝子群が多かった。このことから、DRPLA 蛋白が発生の段階において重要な役割を担っており、生後は何らかの代償機転が働いていると考えられる。

また、各時期に共通して発現が低下していた遺伝子は、Npy, Ttr, Polr2k, Ociad1, Sfrs2, 1110008H02Rik であり、共通して発現が上昇していた遺伝子は Efnb2, 2610042L04Rik, 4930577M16Rik であった (表 2)。NPY は神経系に多量に存在する神経ペプチドであり、中枢神経系では下垂体ホルモンの分泌を亢進させ、末梢神経系では血管を収縮させ血圧を上昇させる働きがある。摂食や脂質代謝に関連しており、NPY の脳室内投与により摂食が亢進し、レプチン欠損マウス (ob/ob 肥満マウス) と NPY ノックアウトマウスを交配すると体重増加が抑制されることが知られている<sup>22)</sup>。また、NPY ノックアウトマウスではてんかん誘発

性も認められている<sup>23)</sup>。NPYの発現は普遍的転写因子(CREB, AP-1, AP-2, Sp1)結合エレメントおよび神経系に特異的なCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン反応エレメント(CaMRE)と神経反応因子(NGF)反応エレメントによって調節されておりNRSEはもっていない<sup>24)</sup>。TTRは肝臓や脈絡叢で産生され、その変異蛋白はプレアルブミンとして家族性アミロイドーシスの原因蛋白として知られているが、甲状腺ホルモンやレチノイン酸と結合して輸送する働きがある。また、 $\beta$ ペプチドと結合することから神経変性に対して保護的な作用を持つことが考えられており、うつ状態との関係も報告されている<sup>25)</sup>。Polr2Kはmetallothionein-I gene transcription activator (Mt-a)であり、metallothioneinは神経細胞内の亜鉛の濃度を調節する働きがあることなどから、神経細胞の変性に影響を及ぼす可能性も考えられる<sup>26)</sup>。Ociad1は、マウスの発生過程における血管形成に寄与している<sup>27)</sup>。Sfrs2は、SC-35としてRNAのスプライシングに関与していることが知られており、hereditary neuralgic amyotrophy (HNA)の原因遺伝子である<sup>28)</sup>。またmyelin regulatory factor-1 (MRF-1)ともいわれ、myeline basic protein (MBP)の発現調節も行なっている<sup>29)</sup>。Efnb2はEphrin受容体Ephb2を介して、NMDA受容体のリン酸化やそれによるCREBのリン酸化を行い、細胞内カルシウム濃度を調節して、シナプスの発達や可塑性に関係していることが知られている<sup>30)</sup>。

これら変化のあった遺伝子において転写調節領域にすべてに共通するエレメントは認められなかったが、これら遺伝子の発現量の変化が、DRPLAの病態に関連していることも考えられ、DRPLA蛋白が転写調節に関連した作用を持っていることが推測される。

また、DRPLAノックアウトマウスは胎生致死にならず、寿命も野生型マウスと同じであること、さらに今回の発現解析でも遺伝子の著明な発現変化を認めなかったことは、個体レベルではDRPLA遺伝子がノックアウトされたことに対して何らかの代償機構が働くことが考えられる。近年RNAiを用い神経変性疾患の治療に応用する試

みがなされているが、増大アレル特異的なプローブの開発は困難が伴う。今回の結果は、今後の治療においてDRPLA遺伝子を、アレル非特異的にノックダウンすることの安全性を示唆していると考えられた。

#### 謝 辞

本稿を御校閲いただきました西澤正豊教授に深謝申し上げます。また、本研究にご協力いただきました、東京大学大学院医学系研究科神経内科分野・辻省次教授、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター分子神経疾患資源解析学分野・小野寺理先生、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター動物資源開発支援研究分野・佐藤俊哉先生、新潟大学脳研究所神経内科分野・小宅睦郎先生、聖路加国際病院神経内科・木村哲也先生に深謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW and Zoghbi HY: Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet* 4: 221-226, 1993.
- 4) 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. *Natue Genet* 14:

- 277 - 284, 1996.
- 5) 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 Kakizaka A: CAG expansions in a novel gene for Machado - Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 8: 221 - 228, 1994.
  - 6) 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. *Nature Genet* 15: 62 - 69, 1997.
  - 7) David G, Abbas N, Stevanin G, Durr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou 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. *Nature Genet* 17: 65 - 70, 1997.
  - 8) 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.
  - 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) 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 - pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet* 6: 9 - 13, 1994.
  - 11) 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, Furukawa T, Nihei K, Inoue T, Sano A, Komure O, Takahashi M, Yoshizawa T, Kanazawa I and Yamada M: Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet* 6: 14 - 18, 1994
  - 12) Zhang S, Xu L, Lee J and Xu T: Drosophila Atrophin Homolog Functions as a Transcriptional Corepressor in Multiple Developmental Processes. *Cell* 108: 45 - 56, 2002.
  - 13) 木村哲也：DRPLA 遺伝子の生理的機能解明に向けたノックアウトマウスの作成. *新潟医学会雑誌* 116: 264 - 275, 2002.
  - 14) Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S and Cattaneo E: Loss of huntingtin - mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293: 493 - 498, 2001.
  - 15) Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D and Cattaneo E: Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE - controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35: 76 - 83, 2003.
  - 16) Wood JD, Nucifora FC Jr, Duan K, Zhang C, Wang J, Kim Y, Schilling G, Sacchi N, Liu JM and Ross CA: Atrophin - 1, the Dentato - rubral and Pallido - lousian Atrophy Gene Product, Interacts with ETO/MTG8 in the Nuclear Matrix and Represses Transcription. *The J Cell Biol* 150: 939 - 948, 2000.
  - 17) Ogura K: Transcriptional dysregulation in Polyglutamine diseases : Functional characterization of DRPLA protein. in print.
  - 18) Luthi - Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha JH and Olson JM: Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 9: 1259 - 1271, 2000.
  - 19) Luthi - Carter R, Strand AD, Hanson SA,

- Kooperberg C, Schilling G, La Spada 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 effect; *Hum Mol Genet* 11: 1927-1937, 2002.
- 20) Serra HG, Byam CE, Lande JD, Tousey SK, Zoghbi HY and Orr HT: Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice. *Hum Mol Genet* 13: 2535-2543, 2004.
- 21) Evert BO, Vogt IR, Viera-Saeker AM, Ozimek L, De Vos RAI, Brunt ERP, Klockgether T and Wullner U: Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant Ataxin-3. *J Neuropath Exp Neurol* 62: 1006-1018, 2003.
- 22) Erickson JC, Hollopeter G and Palmiter RD: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274: 1704-1707, 1996.
- 23) Erickson JC, Clegg KE and Palmiter RD: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381: 415-418, 1996.
- 24) 樋口宗史: 交感神経・中枢神経の神経ペプチド NPY の遺伝子発現と機能. *新潟医学会雑誌* 113: 77-82, 1999.
- 25) Sousa JC, Grandela C, Fernandez-Ruiz J, de Miguel R, de Sousa L, Magalhaes AI, Saraiva MJ, Sousa N and Palha JA: Transthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity. *J Neurochem* 88: 1052-1058, 2004.
- 26) Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Cerutis DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC and Pfeiffer RF: Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int* 27: 1-22, 1995.
- 27) Mukhopadhyay A, Das D and Inamdar MS: Embryonic stem cell and tissue-specific expression of a novel conserved gene, asrij. *Dev Dyn* 227: 578-586, 2003.
- 28) Kuhlenbaeumer G, Meuleman J, Schirmacher A, Stoegbauer F, Ringelstein EB, Wehnert M, Hoeltzenbein M, Broeckhoven CV and Timmerman V: Mutation analysis of a putative sialyltransferase gene, the SFRS2 splicing factor gene and the c-myb ET-locus in two families with hereditary neuralgic amyotrophy (HNA). *Ann Hum Genet* 62: 397-400, 1998.
- 29) Haque NS, Buchberg AM and Khalili K: Isolation and characterization of MRF-1, a brain-derived DNA-binding protein with a capacity to regulate expression of myelin basic protein gene. *J Biol Chem* 269: 31149-31156, 1994.
- 30) Takasu MA, Dalva MB, Zigmond RE and Greenberg ME: Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science* 295: 491-495, 2002.

(平成17年1月21日受付)