

トランスジェニックマウスを用いた伸長ポリグルタミン鎖による CREB 依存性の転写活性の検討

高野 政彦

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)

Nuclear Accumulation of Expanded Polyglutamine Stretches activates CREB Mediated Transcriptional Activation in DRPLA Transgenic Mice

Masahiko TAKANO

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

Course for Molecular and Cellular Medicine

Molecular Neuroscience and Brain Diseases Neurology

(Director: Prof. Masatoyo NISIZAWA)

Abstract

Dentatorubral - pallidoluyasian atrophy (DRPLA) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder. Previous studies have shown that DRPLA protein with expanded polyglutamine stretch - es interact with transcription factors in DRPLA patient's neuron or cultured cell. Furthermore, it suppresses CREB - dependent transcriptional activation in cultured cells. The interference of CREB - dependent transcription by expanded polyglutamine stretches might cause DRPLA. To study the effect of expanded polyglutamine stretches on the CREB - dependent transcriptional activation *in vivo*, we made transgenic mice harboring a CRE - *LacZ* reporter gene and a full - length mutant human DRPLA gene with expanded CAG repeats (Q76). We analyzed a cor - relation between the nuclear accumulation of expanded polyglutamine stretches and CREB - dependent transcriptional activation in each cortical neuron. We found the strong linear correla - tion between the CREB - dependent transcriptional activation and the amount of DRPLA protein with expanded polyglutamine stretch in nucleus. This activation of CREB - dependent transcrip - tion might be a compensatory response to the accumulation of expanded polyglutamine stretches in nucleus.

Key words: DRPLA, polyglutamine, CREB - dependent transcription, transgenic mice

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

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

緒 言

現在までに9つの遺伝性の神経変性疾患(球脊髄性筋萎縮症(SBMA)¹⁾,ハンチントン病(HD)²⁾, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)³⁾, 脊髄小脳失調症1型(SCA1)⁴⁾, 2型(SCA2)⁵⁾, マシヤドジョセフ病/3型(MJD/SCA3)⁶⁾, 6型(SCA6)⁷⁾, 7型(SCA7)⁸⁾, 17型(SCA17)⁹⁾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リピートの異常伸長が見出されることが,明らかにされている。

SBMAではアンドロゲン受容体¹⁾, SCA6では電位依存性Ca α 1Aサブユニット⁷⁾, SCA17ではTATA結合タンパク⁹⁾が病因タンパクとして明らかとなっているが,これらを除くポリグルタミン病では病因タンパクの機能は分かっていない。しかしCAGリピート長は健常者と患者との間に明らかな境界値を認め, SCA6を除いてその境界値は35~40リピートであること,発症年齢と伸長CAGリピート長には負の相関関係を認めること,など共通点多く普遍的な病態機序が推察される。

ポリグルタミン病の病態機序として転写障害の関与が推察されてきた。本疾患では特徴的な病理学的所見として核内封入体(NI)が剖検脳およびモデルマウスで認められるが²¹⁾²²⁾,このNIに伸長ポリグルタミン鎖と共にCBP¹¹⁾¹³⁾²³⁾, TBP²⁴⁾, TAF II 130²⁵⁾, Sp1²⁵⁾などの転写因子が含まれることが報告されてきた。特にDRPLAではCREB依存性の転写活性に必要な転写補助因子であるTAF II 130²⁵⁾ないしはCBP¹³⁾と核内移行した伸長ポリグルタミン鎖の結合が示され,神経変性と転写障害との関連性が疑われてきた。また培養細胞を用いた研究でも,凝集体形成に先行してCREB依存性の転写活性が低下していることが示唆されてきた¹⁵⁾¹⁶⁾。現在ではNIはむしろ防御的に働いており,それ以前の伸長ポリグルタミン鎖を含む変異タンパクが核内に蓄積し,CREB依存性の転写活性に障害を引き起こすと考えられている^{26)~29)}。しかし*in vivo*の実験系においてCREB依存性の転写活性の低下を直接示

した報告はない。

我々のグループは伸長したポリグルタミン鎖による神経変性機構を個体レベルで解析することを目的に,プロモーター領域を含むDRPLA患者のゲノムDNA(76CAGリピート)全長を単一コピーで導入したDRPLAモデルマウス(Q76マウス)を作製した¹⁷⁾。このモデルマウスは神経症状を呈さないが,世代間でCAGリピート数の変化を認めること,世代間の不安定性にparental biasを認めること,体細胞モザイクを認めることなど,DRPLA症例と様々な点で類似していることを確認している。また病理学的には,加齢と共に核内に増大ポリグルタミン鎖の蓄積を認め,12週齢でほぼ全ての神経細胞に核内蓄積を認め,ヒトDRPLA剖検脳とその病変分布,核内蓄積像も類似している。

このDRPLAモデルマウスを用いてCREB依存性の転写活性をレポーター解析できるモデルマウスを作製し,CREB依存性の転写活性が伸長ポリグルタミン鎖の神経細胞核内蓄積により変化を受けるのか否かを*in vivo*で検証した。その結果,マウス脳皮質の神経細胞で,伸長ポリグルタミン鎖の核内蓄積度とnicotine刺激によるCREB依存性転写活性との間に正の相関関係を見出したので報告する。

材料と方法

1. 増大ポリグルタミン鎖を含むDRPLA遺伝子のCREB依存性転写活性に対する影響を解析するダブルトランスジェニックマウスの確立

CREB依存性の転写活性の変化をレポーター解析し得るマウスとして, β -galactosidaseの発現を解析することによりCREB依存性の転写活性を検証できるCRE-LacZ transgenic miceをImpeyらから供与された¹⁸⁾。このマウスはRSVプロモーターの下流に6個の連続したCRE配列をもち,更にその下流に β -galactosidaseの発現領域をもつ導入遺伝子を持ったマウスである。自然交配によりCRE-LacZ transgenicマウスとQ76マウス

とを交配させた CRE-*LacZ*^{+/-} DRPLA^{+/-} transgenic mice (以下 double transgenic マウス) を作成した。遺伝子型は切尾試料を PCR 法により検定した。PCR 条件は, Lac-Z3 (ACCAgAAg CggTgCCgAAAA), Lac-Z4 (CCCgTAggTAgTC ACgCAAC), および RT1-F (CCTCCTCCCTATgg CCgCCTCTT), RT3-R (ggAggAgggggCCCgAg TTTT) をそれぞれ CRE-*LacZ* transgenic マウスと DRPLA マウスのプライマーに設定し, 初回 DNA 変性を 96 °C 1 分間, 最終伸長反応 72 °C 10 分間, 25 サイクルとした (DNA 変性 96 °C 1 分間, アニール 61 °C 1 分間, 伸長反応 72 °C 1 分間)。

2. nicotine 刺激による CREB 依存性転写活性の賦活化

double transgenic マウスおよび CRE-*LacZ* transgenic マウスは 12 週齢の雄個体を対象とした。CREB 依存性の転写活性を増強させる目的で, (一) -nicotine (SIGMA) 2.4 ~ 3.2mg/kg を生理食塩水に溶解し, 腹腔内に投与した。薬剤の投与 2 時間後に isoflurane (日産化学工業) 麻酔下でマウスを屠殺後に開頭し, 全脳を半切して OCT 包埋後にドライアイス冷却下, 2-メチルブタンで凍結した。OCT 包埋された脳試料を Cryostat で冠状断に薄切 (10 μm 厚) し, 冷風により乾燥固定した。hippocampus レベルの組織切片を対象として染色を行った¹⁹⁾。0.2 % glutaraldehyde で 1 次固定をし, 0.01 % NaDOC, 0.02 % Triton X-100/PBS で洗浄後に 1.0mg/ml X-Gal にて 37 °C 48 時間反応させた。その後に PBS で洗浄し, 0.2 % glutaraldehyde で 2 次固定後に PBS で洗浄した。Nuclear Fast Red で対比染色し, エタノール脱水およびキシレン脱脂を行なった後にマウントし, 光学顕微鏡で観察した。

3. マウス脳皮質神経細胞での anti-β-galactosidase 陽性細胞の検討

OCT 包埋された脳試料を Cryostat で冠状断に薄切 (10 μm 厚) し, 冷風により乾燥固定した。hippocampus レベルの組織切片を対象とした。

4 % paraformaldehyde で固定し, PBS で洗浄後に, Blocking buffer (5 % BSA, 0.05 % Triton-X, 4 % normal goat serum) で室温 1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体として anti-β-galactosidase (1: 500) および anti-NeuN antibody (Chemicon; 1: 2000) にて 4 °C 24 時間反応させた後に, 2 次抗体として Alexa Flour488 goat anti-rabbit IgG および Alexa Flour594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probe; 1:200) を室温で 2 時間反応させ蛍光顕微鏡 (ニコン TE-300NT) にて観察した。同一スライスの皮質 II ~ VI 層における 5 視野を無作為に選んで 400 倍で観察し, 各視野内で anti-NeuN antibody による染色陽性の細胞数を計測した。その中で同時に anti-β-galactosidase antibody で染色される細胞を確認し, 計測した。統計処理は one way ANOVA にて行い, posthoc 解析は Dunnett 法にて行った。

4. マウス脳皮質神経細胞における CREB 依存性転写活性と増大ポリグルタミン鎖の発現量の検討

同一個体の同一スライス内における個々の神経細胞での 1C2 antibody と anti-β-galactosidase antibody による二重蛍光免疫染色法による蛍光強度を測定し, 比較した。OCT 包埋された脳試料を Cryostat で冠状断に薄切 (10 μm 厚) し, 冷風により乾燥固定した。hippocampus レベルの組織切片を対象とした。4 % paraformaldehyde で固定し, PBS で洗浄後に, HCOOH 処理を 10 分間室温で行った。PBS で洗浄し, Blocking buffer で室温 1 時間ブロッキングを行った後に, 1 次抗体として anti-β-galactosidase antibody (Chemicon; 1: 500) および 1C2 antibody (Chemicon; 1: 3000) にて 4 °C 48 時間反応させた。2 次抗体として Alexa Flour488 goat anti-rabbit IgG および Alexa Flour594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probe; 1: 200) を室温で 2 時間反応させ, 検鏡した。同一スライスの皮質 II ~ VI 層において無作為に選んだ明瞭な 7 視野を 400 倍で観察し, 各視野内の全ての神経細胞に ROI を設定して, 免疫染色陽性の同一細胞内における ROI 内の平均蛍光強度を各 2

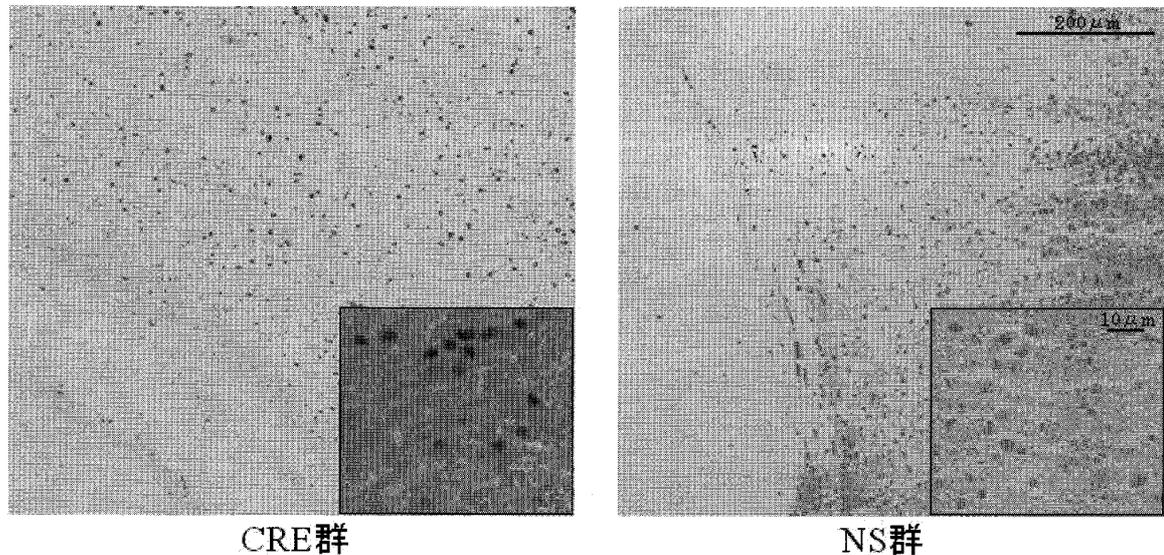


図1 (一) - nicotine 投与による CREB 依存性の転写活性の増強
 マウス脳皮質の X-Gal 染色, 濃染された細胞が X-Gal 染色で陽性の細胞. CRE 群: (一) - nicotine 投与後の CRE-*LacZ* transgenic マウス NS 群: 生理食塩水投与後の CRE-*LacZ* transgenic マウス (倍率 40 倍, 右下枠 200 倍).

次抗体に対応する励起波長 (495nm と 590nm) で各個体に測定した. 蛍光強度の測定は蛍光顕微鏡 (ニコン TE-300NT) および ORCA-ERII, AQUACOSMOS 蛍光解析ソフトウェア (浜松トニクス) を用いた.

結 果

1. nicotine の投与により CREB 依存性の転写活性は増強される

Impey らから供与された CRE-*LacZ* transgenic マウスは定常では僅かな β -galactosidase 活性しか示さないことから, CREB 依存性の転写活性を nicotine 投与により誘発することを試みた. 雄 12 週齢の CRE-*LacZ* transgenic マウスに nicotine を投与した群 (CRE 群) とコントロールとして同量の生理食塩水を投与した群 (NS 群) を X-Gal 染色し, 比較した. 図 1 に認められるように nicotine 投与により明らかに β -galactosidase の発現は増強されており, nicotine の腹腔内投与によりマウス脳での CREB 依存性の転写活性を増強できることを示した. 一方, 非刺激下では β -

galactosidase の発現は僅かに認めるのみであった.

本マウスは, *LacZ* 遺伝子型を認める個体でも *LacZ* が誘導されない個体があることが知られている (表 1)¹⁸⁾²⁰⁾. X-Gal 染色にて陽性細胞を認める個体は, 生理食塩水投与後 CRE-*LacZ* transgenic マウスおよび nicotine 刺激後 CRE-*LacZ* transgenic マウス, double transgenic マウス, 各々 50, 56, 72% であった. よって X-Gal 染色により陽性細胞の有無を確認し陽性細胞を認めた個体のみ以下の実験に使用した.

2. CREB 依存性の転写活性が増強されている細胞は神経細胞である

(一) - nicotine の投与による β -galactosidase 発現の増強は, マウス脳皮質で神経細胞に特異的に認められるのかを検証するため, anti-NeuN antibody と anti- β -galactosidase antibody による二重染色を行った (図 2a-f). 生理食塩水を腹腔内投与した CRE-*LacZ* transgenic マウス (NS 群), nicotine を腹腔内投与した CRE-*LacZ* transgenic マウス (CRE 群) および double transgenic

表1 各導入遺伝子型を確認し薬剤投与を行った個体のうち β -galactosidase 陽性であった個体数

	各導入遺伝子型を確認し薬剤投与した個体数: A [匹]	X-Gal染色陽性細胞を認めた個体数: B [匹]	B/A [%]
NS群	4	2	50
CRE群	16	9	56
DT群	18	13	72

PCR 法にて切尾試料から遺伝子型を確認して薬剤を投与した個体のうち, X-Gal 染色によるレポーター解析で陽性となった個体の割合. NS 群: 生理食塩水を投与した CRE-*LacZ* transgenic マウス, CRE 群: (-)-nicotine を投与した CRE-*LacZ* transgenic マウス, DT 群: (-)-nicotine を投与した double transgenic マウス

マウス (DT 群) を用いた. 各個体は薬剤投与して 2 時間後に開頭し, hippocampus を含む冠状断での凍結切片を作製した. 皮質 II ~ VI 層を無作為に 5 視野検鏡して, 約 200 個の神経細胞を検討した. 検討した組織切片の全てにおいて, anti-NeuN antibody (神経細胞核のマーカー) 陽性細胞にのみ, β -galactosidase の発現を認めた. さらに NS 群 ($n = 2$), CRE 群 ($n = 2$), DT 群 ($n = 2$) で anti-NeuN antibody 陽性の細胞数に対する anti- β -galactosidase antibody 陽性細胞の割合を検討した (図 2g). その結果, NS 群 ($36.6 \pm 4.2\%$) に比して, CRE 群 ($63.3 \pm 6.9\%$) および DT 群 ($82.4 \pm 4.8\%$) では anti- β -galactosidase antibody 陽性細胞の割合が有意に高かった ($p < 0.05$).

3. 伸長ポリグルタミン鎖の核内蓄積と nicotine 刺激後の CREB 依存性の転写活性増強は正の相関を示す

In vivo での個々の神経細胞において, 伸長ポリグルタミン鎖の蓄積が CREB 依存性の転写活性にどのように影響するのか検証するため, マウス

脳皮質において二重免疫染色を行い解析した. 1C2 antibody は TBP (TATA Box-binding protein) のポリグルタミン鎖を含む部位を抗原とした抗体であるため, 希釈率によっては TBP を染色する. そのためまず TBP を染色せず, かつ感度良く伸長ポリグルタミン鎖を同定できる 1 次抗体の希釈率を検討した. negative control として CRE-*LacZ* transgenic マウスを用い, double transgenic マウスと共に nicotine を腹腔内投与して 2 時間経った後に開頭し, 1 次抗体の希釈率を変えて染色を行った (図 3). その結果, 1C2 antibody 1:2000 ~ 1:2500 では対照とした CRE-*LacZ* transgenic マウスでも染色される細胞を認め, この条件では TBP を認識していると考えた (図 3a, b). しかし, 1C2 antibody 1:3000 では CRE-*LacZ* transgenic マウスでは陽性細胞を認めず (図 3c), かつ double transgenic マウスでポリグルタミン鎖が陽性に染まる神経細胞を確認することができた (図 3f).

この条件で double transgenic マウス脳皮質を二重免疫染色して解析した. 染色される神経細胞はいずれの抗体でも同時に染色され, 一方の抗体

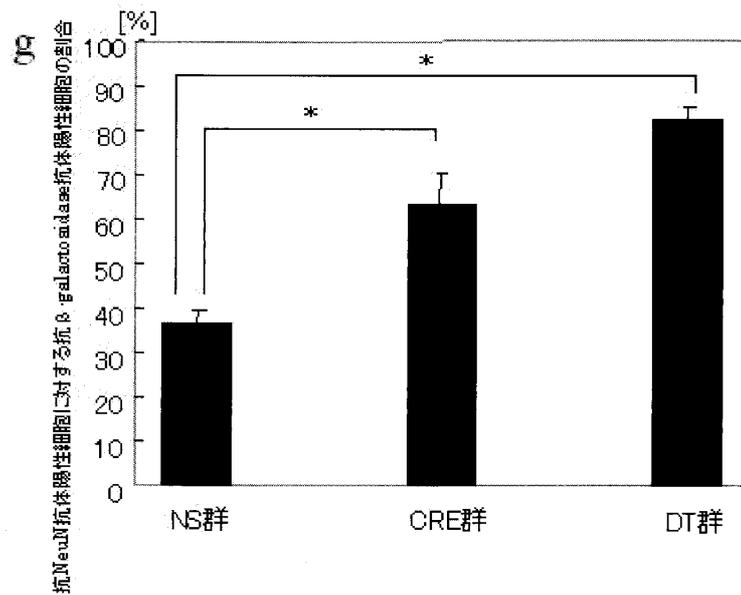
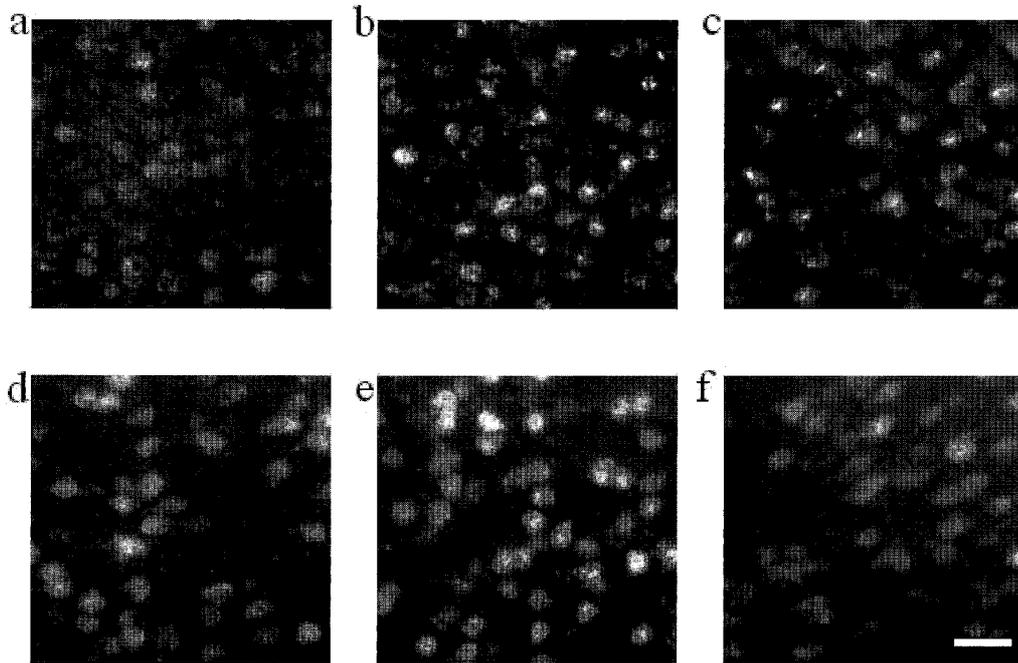


図2 神経細胞中での CREB 転写活性増強を認める細胞の割合

(a-f) hippocampus レベルでの冠状断切片の二重蛍光免疫染色, 上段 (a: NS 群 b: CRE 群 c: DT 群) 1次抗体 anti- β -galactosidase (1:500), 2次抗体 Alexa Flour488 goat anti-rabbit IgG (1:200), 下段 (d: NS 群 e: CRE 群 f: DT 群) 1次抗体 anti-NeuN antibody (Chemicon; 1:2000), 2次抗体 Alexa Flour594 goat anti-mouse IgG. (g) NeuN 抗体陽性細胞に対する β -galactosidase 抗体陽性細胞の割合. 各群 2 個体, 皮質 II ~ VI 層を無作為に 5 視野検鏡し各 200 個以上の細胞を観察. : NS 群: $36.6 \pm 4.2\%$ (平均 \pm 標準誤差), CRE 群: $63.3 \pm 6.9\%$, DT 群: $82.4 \pm 4.8\%$, NS 群に比較して DT 群は Dunnett 法にて有意に高い割合を示した (*: $p < 0.05$). NS 群: 生理食塩水を投与した CRE-*LacZ* transgenic マウス, CRE 群: nicotine を投与した CRE-*LacZ* transgenic マウス, DT 群: nicotine を投与した double transgenic マウス. スケールバーは 50nm.

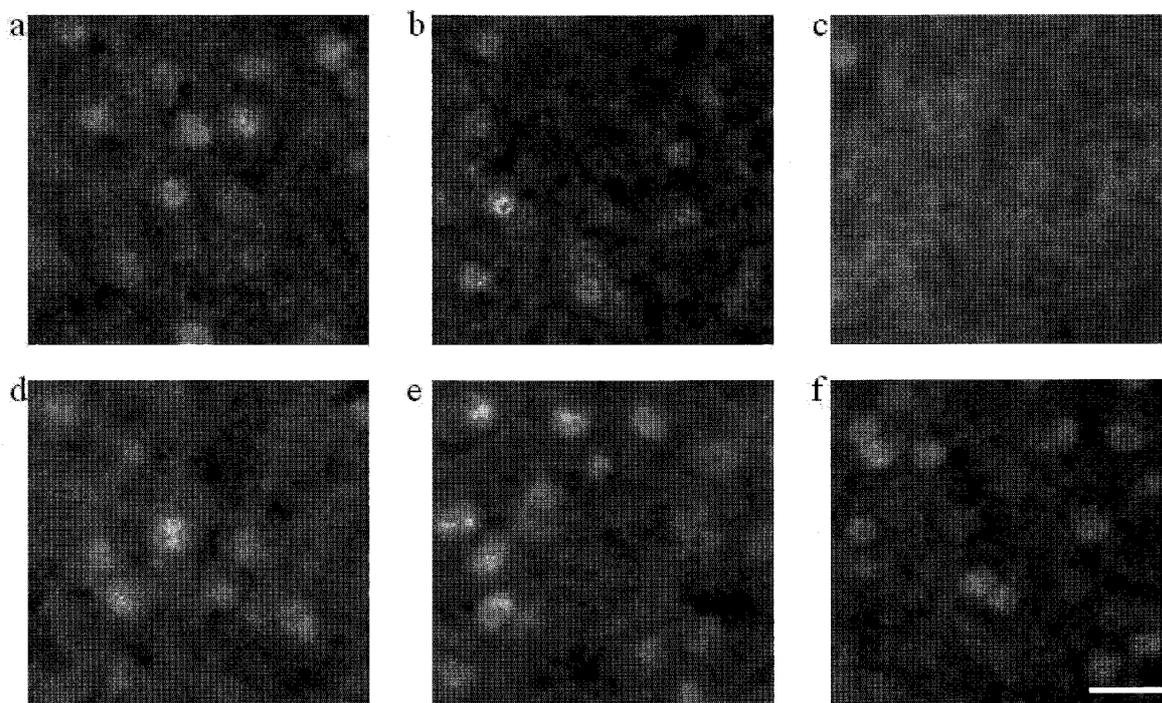


図3 1C2抗体の至適条件の検討

皮質II～VI層の1C2抗体染色を示す。上段(a, b, c); CRE-LacZ transgenic マウス。下段(d, e, f) double transgenic マウス, 1C2抗体の希釈率は左から1:2000 (a, d), 1:2500 (b, e), 1:3000 (c, f)。スケールバーは50nm。

のみで染色される細胞は見られなかった(図4)。前述のように本マウスの CREB 依存性の転写応答性は個体間で異なる可能性があり, 同一個体内での個々の細胞を用いて, 二重免疫染色による両者の蛍光強度の関係を検討した。3個体で hippocampus を含む冠状断の切片を作製し, 脳皮質II～VI層を無作為に7視野検鏡し, 250～300の神経細胞を観察した。各神経細胞における染色部位にROIを設定し, ROI内の平均蛍光強度を測定した。各神経細胞における各染色の蛍光強度を用いて, 縦軸を anti- β -galactosidase antibody の蛍光強度に, 横軸を 1C2 antibody の蛍光強度として散布図を作成した(図5)。3個体での蛍光強度の相関係数は $r = 0.76, 0.65, 0.77$ (いずれも $p < 0.0001$) となり, 2つの蛍光強度の間には正の線型相関性を認めた。

考 察

今回76個の伸長ポリグルタミン鎖を持つ DRPLA トランスジェニックマウスにおいて, 個々の神経細胞では伸長ポリグルタミン鎖の核内蓄積を強く認める細胞ほど, nicotine 刺激後の CREB 依存性の転写活性は増強されていることを示した。double transgenic マウスで CREB 依存性の転写活性の増強が観察された神経細胞の割合は生理食塩水を投与された CRE-LacZ transgenic マウスに比して有意に高く, かつ有意ではないが nicotine を投与された CRE-LacZ transgenic マウスよりも高い傾向にあった(図2g)。さらに個々の神経細胞での蛍光免疫染色での蛍光強度を比較すると, CREB 依存性の転写活性が増強している神経細胞では, 全て伸長ポリグルタミン鎖の核内蓄積を認めており(図4), かつ核内蓄積を強く認める細胞ほど nicotine 投与後の転写活性が増強さ

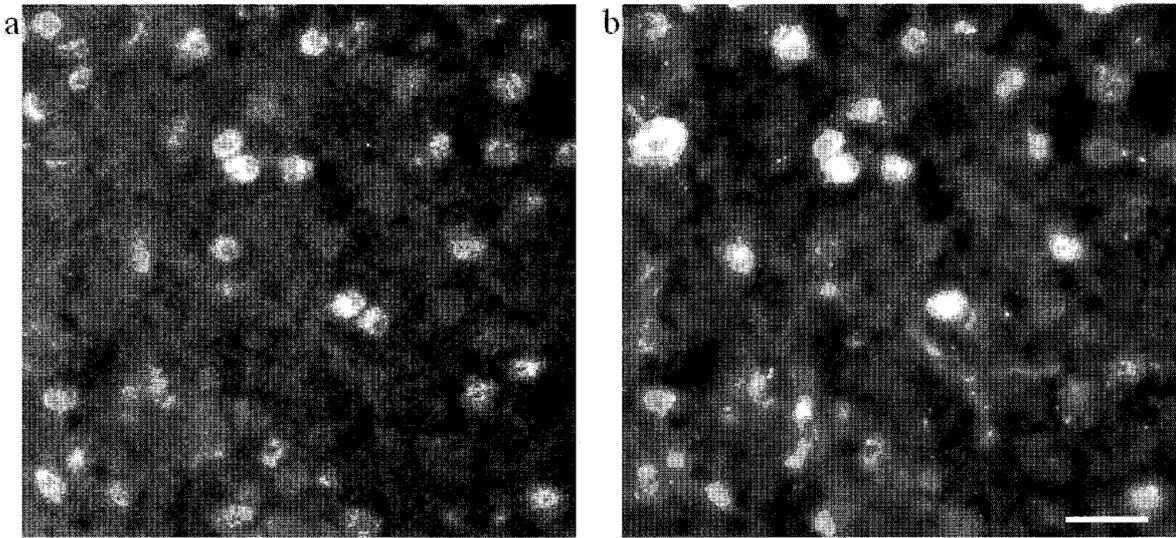


図4 double transgenic マウス皮質神経細胞での CREB 依存性転写活性と伸長ポリグルタミン鎖

double transgenic マウスの nicotine 投与 2 時間後の hippocampus レベルでの冠状断切片の二重免疫染色像で皮質 II ~ VI 層の細胞を観察した. 1C2 抗体で染色される細胞はいずれも抗 β -galactosidase 抗体で染色された. 一方, 抗 β -galactosidase 抗体あるいは 1C2 抗体のみに染色される細胞は確認できなかった. スケールバーは 50nm.

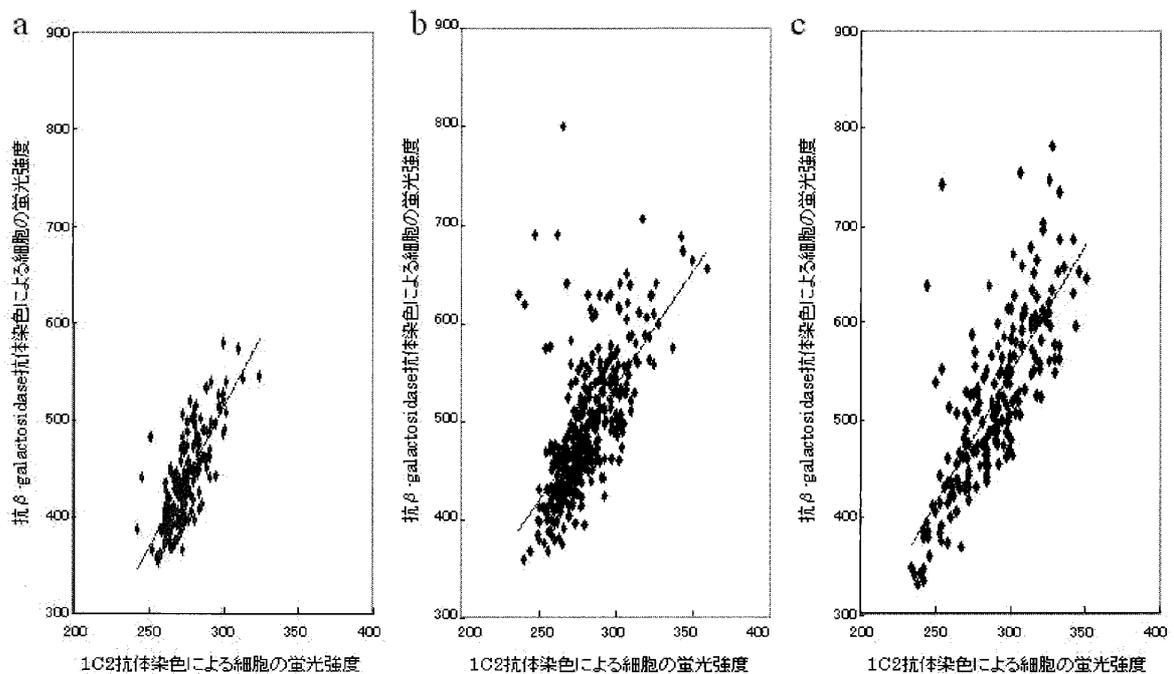


図5 二重蛍光免疫染色したマウス脳皮質の神経細胞における蛍光強度の散布図

異なる litter mate の double transgenic マウスを 3 個体を測定した (a, b, c は各個体を示す). 各個体, 皮質 II ~ VI 層から無作為に 7 視野検鏡し, 250 個以上の細胞の蛍光強度を測定. Pearson の相関係数は, a: $r = 0.76$, b: $r = 0.65$, c: $r = 0.77$ (いずれも $p < 0.0001$) であった.

れていた。これらのことから伸長ポリグルタミン鎖の核内蓄積は nicotine 投与後の転写活性を増強させると考えられる。その理由として、核内蓄積を認める神経細胞では何らかの代償機構が強く働いており、nicotine 投与という強い外部刺激に対して過剰な反応を示した可能性があると考えた。実際、今回用いた DRPLA モデルマウスは導入遺伝子の発現レベル（内在性の 80%）および CAG リピート数（76 リピート）を考慮すると、2 年というマウスの寿命を考えても十分に神経症状を発症して良いものと思われるが、Q76 マウスにおいては明らかな表現型が認められず、核内蓄積したポリグルタミンに対して何らかの代償機構が働いていることを示唆する所見と考えられる。

Obrietan らは HD モデルマウスである R6/2 マウスと本研究と同系統の CRE-LacZ transgenic マウスを用いた実験により、核内に伸長ポリグルタミン鎖の蓄積を認める神経細胞での CREB 依存性の転写活性を検証しているが³⁰⁾、同様に CREB 依存性の転写活性はむしろ増強されていると報告している。これまでの報告で示されてきた *in vitro* の実験系と異なる結果となった理由としては、個体レベルでは細胞実験のように短時間に変異タンパクを過剰発現させて急速な変異タンパクの凝集を起こす系を観察しているわけではなく、生体の代償作用が働いた結果であると述べている。

R6/2 マウスは表現型を認め、かつ転写活性の代償作用を認めている。今回用いた CAG 繰り返し配列が 76 リピートの DRPLA モデルマウスで見られたような代償作用が、CAG 繰り返し配列が更に長く表現型を認める DRPLA モデルマウスでも生じ得るか、逆に正常な CAG 繰り返し配列の DRPLA モデルマウスでは転写活性に変化が現れるのか、さらに検証を加える必要があると考えられる。病初期にこのような代償機構が存在するのであれば、この時期に治療介入すれば、神経症状も可逆性となる可能性が考えられ、本症の治療方法を考察する上で有意義な知見である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御高閣を頂きました西澤正豊教授に心から感謝申し上げます。また本研究にご協力いただきました新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科分野の五十嵐修一講師、小宅陸郎先生、赤岩靖久先生、同病理学分野の山田光則助教授、高橋均教授、同動物資源開発支援研究部門の佐藤俊哉先生、同生命科学リソース研究センター脳疾患リソース解析部門の小野寺理助教授、聖路加国際病院内科の木村哲也先生に感謝致します。

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* 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-pallidoluyisan 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) 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.
- 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) 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.
- 11) McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G and Fischbeck KH: CREB - binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9: 2197 - 2202, 2000.
- 12) Steffan JS, Kazantsev A, Spasic Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE and Thompson LM: The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB - binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6763 - 6768, 2000.
- 13) 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.
- 14) Luthi - Carter R, Hanson SA, Strand AD, Bergstrom DA, Chun W, Peters NL, Woods AM, Chan EY, Kooperberg C, Krainc D, Young AB, Tapscott SJ and Olson JM: Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet* 11: 1911 - 1926, 2002.
- 15) Wyttenbach A, Swartz J, Kita H, Thykjaer T, Carmichael J, Bradley J, Brown R, Maxwell M, Schapira A, Orntoft TF, Kato K and Rubinsztein DC: Polyglutamine expansions cause decreased CRE - mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10: 1829 - 1845, 2001.
- 16) Gines S, Seong IS, Fossale E, Ivanova E, Trettel F, Gusella JF, Wheeler VC, Persichetti F and MacDonald ME: Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock - in mice. *Hum Mol Genet* 12: 497 - 508, 2003.
- 17) Sato T, Oyake M, Nakamura K, Nakao K, Fukusima Y, Onodera O, Igarashi S, Takano H, Kikugawa K, Ishida Y, Shimohata T, Koide R, Ikeuchi T, Tanaka H, Futamura N, Matsumura R, Takayanagi T, Tanaka F, Sobue G, Komure O, Takahashi M, Sano A, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Katsuki M and Tsuji S: Transgenic mice harboring a full - length human mutant DRPLA gene exhibit age - dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients. *Hum Mol Genet* 8: 99 - 106, 1999.
- 18) Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C and Storm DR: Induction of CRE - mediated gene expression by stimuli that generate long - lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16: 973 - 982, 1996.

- 19) Lobe CG, Koop KE, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M and Nagy A: Z/AP, a double reporter for cre - mediated recombination. *Dev Biol* 208: 281 - 292, 1999.
- 20) Cancedda L, Putignano E, Impey S, Maffei L, Ratto GM and Pizzorusso T: Patterned vision causes CRE - mediated gene expression in the visual cortex through PKA and ERK. *J Neurosci* 23: 7012 - 7020, 2003.
- 21) Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH and Pittman RN: Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19: 333 - 344, 1997.
- 22) Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L and Bates GP: Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537 - 548, 1997.
- 23) Kazantsev A, Preisinger E, Dranovsky A, Goldgaber D and Housman D: Insoluble detergent - resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11404 - 11409, 1999.
- 24) Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM and Pittman RN: Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine - mediated aggregation. *J Cell Biol* 143: 1457 - 1470, 1998.
- 25) Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson I, Tanese N, Takahashi H and Tsuji S: Expanded polyglutamine stretches interact with TAFIII130, interfering with CREB - dependent transcription. *Nat Genet* 26: 29 - 36, 2000.
- 26) Nagaoka U, Uchihara T, Iwabuchi K, Konno H, Tobita M, Funata N, Yagishita S and Kato T: Attenuated nuclear shrinkage in neurones with nuclear inclusions of SCA1 brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 597 - 601, 2003.
- 27) Uchihara T, Iwabuchi K, Funata N and Yagishita S: Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates - a morphometric study on pontine neurons of Machado - Joseph disease brains. *Exp Neurol* 178: 124 - 128, 2002.
- 28) Takahashi H, Egawa S, Piao YS, Hayashi S, Yamada M, Shimohata T, Oyanagi K and Tsuji S: Neuronal nuclear alterations in dentatorubral - pallidoluyasian atrophy: ultrastructural and morphometric studies of the cerebellar granule cells. *Brain Res* 919: 12 - 19, 2001.
- 29) Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, Li XJ, Li SH, Beal MF, Hersch SM and Ferrante RJ: Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol* 46: 842 - 849, 1999.
- 30) Obrietan K and Hoyt KR: CRE - mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci* 24: 791 - 796, 2004.

(平成 17 年 1 月 21 日受付)