

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

新潟大学大学院医学研究科神経内科学専攻

(主任：辻 省次教授)

木 村 哲 也

Targeted Disruption of Mouse *DRPLA* Gene to Understand the Physiological Roles

Tetsuya KIMURA

Neurology, Graduate Student,

School of Medicine, Niigata University

(Director: Prof. Shoji TSUJI)

Abstract

DRPLA is an autosomal, dominantly inherited neurodegenerative disorder that is characterized by various combinations of symptoms including ataxia, choreoathetosis, myoclonus, epilepsy, dementia and psychiatric symptoms and selective neuronal loss including dentate nucleus, red nucleus, globus pallidus and subthalamic nucleus. In patients with DRPLA, the CAG trinucleotide repeat in exon 5 of *DRPLA* gene coding for polyglutamine stretches is expanded to a length exceeding 49 repeat units. It has been demonstrated that there is an inverse correlation between the size of expanded CAG repeats and the age at onset. The physiological functions of the gene products of the causative genes for polyglutamine diseases, however, remain to be determined, except for the androgen receptor (SBMA) and the $\alpha 1A$ voltage-dependent calcium channel (SCA6). To gain insight into the physiological roles of the wild-type DRPLA protein, a widely expressed protein with no known homologies to any of the proteins, we generated mice with a targeted disruption of the *DRPLA* gene. The mutant mice grow into adulthood although mice heterozygous and homozygous for this mutation displayed neurological phenotypes including involuntary movements. These results suggest that DRPLA protein has physiological functions essential for the central nervous system, and, furthermore, that even half dose of wild-type of *DRPLA* gene results in phenotypic expression. The present mice should be highly useful for investigating physiological functions of DRPLA protein.

Key words: CAG repeat, polyglutamine, physiological role, knockout mice

Reprint requests to: Tetsuya KIMURA
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 木村 哲也

はじめに

現在までに9種類の遺伝性神経変性疾患において（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⁾⁴⁾、脊髄小脳変性症1型 SCA1⁵⁾、SCA2^{6)–8)}、SCA6⁹⁾、SCA7¹⁰⁾、SCA17¹¹⁾¹²⁾、マシャドージョセフ病 MJD/SCA3¹³⁾）、各病因遺伝子の蛋白翻訳領域に、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。これらの疾患は、SBMA を除き全て常染色体優性遺伝性形式であること、SCA6 を除き発症はおおむね40リピート以上であること、通常成人発症であること、発症年齢はリピート数に反比例すること、緩徐進行性の経過をとること、神経変性または機能不全を生じること、など共通した特徴を有しており、そのため CAG リピートの伸長によって引き起こされる共通の発症機序があるものと考えられている。一方、疾患ごとに臨床症状が異なること、あるリピート数での各疾患の発症年齢は異なること、障害される神経細胞の分布にも相違があること、など特定の遺伝子の生理的機能を無視しては、治療法の確立を含めた包括的な病態機序を理解することはできない。しかし、現在までに原因遺伝子の生理的機能が明らかとなっているものは SBMA と SCA6 の2疾患のみである。SBMA はアンドロゲン受容体の変異で発病し¹⁾、SCA6 は P/Q タイプ Ca チャネル (CACNA1A) の変異で発病する⁹⁾。SCA6 の allelic disease として家族性片麻痺性片頭痛と発作性失調症2型の存在も知られている¹⁴⁾。

DRPLA はてんかん、ミオクローヌス、小脳失調、舞踏アテトーゼ、性格変化、痴呆などの臨床症状を呈し、病理組織学的に小脳歯状核遠心系（歯状核赤核路）と淡蒼球遠心系（淡蒼球ルイ体路）の病変を特徴とする遺伝性神経変性疾患である。DRPLA は若年発症ではミオクローヌス、てんかんを主症状とする進行性ミオクローヌステんかん型（progressive myoclonus epilepsy ; PME）を呈し、成人以降の発症では小脳失調、不随意運動を主徴候とする非 PME 型を示す臨床症状の多様

性が特徴的である。PME 型は非 PME 型に比べ、CAG リピート数が62以上と大きく増大しており、発症年齢と CAG リピート数が反比例することも明らかとなっている¹⁵⁾。神経細胞脱落については、PME 型で淡蒼球の方が歯状核より強い脱落傾向にあり、逆に非 PME 型では歯状核の方が淡蒼球より強い傾向が認められる¹⁶⁾。また、非 PME 型の遅発成人型では脳幹・脊髄の萎縮が著しく、小脳症状や舞踏病アテトーゼ運動と関与している可能性が示唆されている。

本研究は、DRPLA 蛋白の生理的機能の解明を目的として、マウス DRPLA 遺伝子のターゲティングを行った。さらに、発生・発達段階から成熟期を通して、DRPLA 蛋白の時間的・空間的発現分布および発現量と病変選択性（vulnerability）との関係を詳細に検討するため、DRPLA プロモーター下にレポーター遺伝子を融合蛋白として発現させた。また、このベクターデザインにより、DRPLA 遺伝子の発現調節を解析することも可能であり、治療法の確立に有用と考えられる。

材料と方法

(1) マウス DRPLA ゲノム遺伝子のクローン化

マウス 129 / SvJ のゲノムライブラリー（STRATAGENE Lambda FIX II Library）から約 1.1×10^6 pfu のラムダファージを NZCYM 培地にプレーティングした。ニトロセルロースフィルター BA-S85（Schleicher & Schuell, Dassel, Germany）に2分間トランスファーしてそのレプリカをとり、1.5M NaCl/0.5M NaOH 溶液中でアルカリ変性させ、80度2時間のベーキングにてファージを固定した。ハイブリダイゼーションプローブは既報のマウス奇形癌由来の cDNA ライブラリーより得た full length DRPLA cDNA¹⁷⁾ を Eco RI で消化し、エクソン2からエクソン5の CAG リピートを含む約1.3kbを使用した。ニックトランスレーション法（Amarsham, Megaprime™ DNA labelling system）により標識した。50%ホルムアミド/5×SSC（3M NaCl, 0.3M sodium citrate, pH 7.0）/1×デンハルト/20mM

リン酸ナトリウム/10%デキストランの溶液条件で、42度16時間のハイブリダイゼーションを行った。フィルターは最終的に1% SSC/0.1% SDSで60度30分間洗い、-80度16時間のオートラジオグラフィにより検出した。検出されたクローンをNZCYMプレートより単離した。

次に、エクソン2の翻訳開始点より上流約50bpからエクソン5の約300bpの計628bpをプローブとして、同様にサザン解析を行いDRPLAゲノム遺伝子の全長を含むクローン(ファージクローンNo.8)を得た。さらに、このクローンをEcoRIとNot Iで消化し、pBluescript II KS(-)(TOYOBO)にサブクローン化した。サブクローン化したプラスミドをp4.5, p4.3, p8.3とし、それぞれについて制限酵素地図を作成し、さらに一部についてはABI 310により塩基配列を確認した。

(2) ターゲティングベクターの作成

DRPLA遺伝子の蛋白翻訳開始点から6アミノ酸を残し、以下 β -galactosidase遺伝子で置換し、その融合蛋白が発現するようにデザインした。

まず、p8.3をEcoRIとBgl IIで消化し、Sea Plaque アガロースゲル1% (FMC, Rockland, USA) にて電気泳動し、1.3kbの断片を切り出した(A-1)。別に、pBluescript II KS(-)をEcoRIとSpe Iで消化し(A-2)、EcoRI-Bgl II-Spe I リンカーを挿入した(A-3)。このA-3をEcoRIとBgl IIで消化し、得られた2.9kbの断片(A-4)にA-1を挿入した(A-5)。次に、このA-5をBsa Iで消化して2.0kbの断片を切り出した(B-1)。また別にpBluescript II KS(-)をEcoRIとSpe Iで消化してEcoRI-Bsa I-Bgl II-Spe I リンカーを挿入した(B-2)。このB-2をBsa Iで消化・CIP処理した後1.4kbの断片を切り出した(B-3)。このB-3にB-1を挿入した(B-4)。次に、B-4をBbs IとBgl IIで消化して得られた0.5kbの断片に(C-1-1)、フレームを合わせたBbs I-BamHI-As I-Bgl II リンカーを挿入した(C-1-2)。

一方、pMC1871 (Stratagene) をSma IとAat IIで消化して得られた0.6kbの断片(C-2-1-1)を、beta-gal Basic (CLONTECH) をSma IとAat IIで消化して得た6.7kbの断片(C-2-1-2)

に挿入し、 β -galactosidase 遺伝子を作成した(C-2-1-3)。

このC-2-1-3(β -galactosidase 遺伝子)はBam HIで消化し、4.4kbの断片(C-2-1-4)を切り出した。C-1-2をBam HIで消化してCIP処理をし(C-2-2-1)、ここにC-2-1-4を挿入(C-2-2-2)した。得られたベクターはABI 310により塩基配列を確認した(C-2-2-3)。これにより、DRPLA 遺伝子の翻訳開始点から6アミノ酸(18塩基)と β -galactosidase 遺伝子との融合が完了した。

pGK neo polyA (LEXICON GENETICS) はAsc Iで消化し、1.6kbの断片を切り出した(C-3-1)。次に、C-2-2-3をAsc Iで消化しCIP処理した後(C-3-2)、ここにC-3-1を挿入した(C-3-3)。その構造については塩基配列を確認した(C-3-4)。この結果、 β -galactosidase 遺伝子に続きneo 遺伝子が組込まれた。

次に、C-3-4をBsa Iで消化した7.6kbの断片(D-1-1)に、p8.3をBsa Iで消化して得られた2.2kbの断片(D-1-2)を挿入した(D-1-3)。D-1-3はEcoRIとBgl IIで消化し、得られた6.9kbの断片(D-2-1)を、EcoRIとBgl IIでp8.3を消化して得られた9.9kbの断片に(D-2-2)挿入した(D-2-3)。この段階で、DRPLA 遺伝子の翻訳開始点から、レポーター遺伝子・ポジティブ選択遺伝子を含んだ3'側が完成した。

次に5'側の相同領域を確保するために、p4.3をHind IIIとNhe Iで消化し4.5kbの断片を切り出し(E-1-1)、ここにHind III-Rsr II-Nhe I リンカーを挿入した(E-1-2)。pGK DT (LEXICON GENETICS) はRsr IIで消化し、得られた1.2kbの断片(E-2-1)をE-1-2に挿入し、塩基配列を確認した(E-3-1)。

DTAを含む5'側のE-3-1をHind III・EcoRI・Pvu Iで消化し、2.8kbの断片を切り出した(F-1-1)。3'側のD-2-3はHind IIIとEcoRIで消化し、16.8kbのフラグメントとして切り出した(F-1-2)。最終的に5'側のF-1-1を3'側のF-1-2に挿入し(F-1-3)、ターゲティングベクターを完成させた。

(3) ES 細胞へのターゲティングベクターの導入

2.3×10^7 (cells/ml) 個の ES 細胞 (CCE) に, Not I で線状化した $50 \mu\text{g}$ のターゲティングベクターを, PBS (–) で計 1 ml に溶解し, $270\text{V} \cdot 50 \mu\text{F} \cdot 720$ オームの条件で電気穿孔した. この細胞は ES 細胞培養液 (ESM) に懸濁しフィーダー細胞上にまき, 第 3 日に $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G 418 を加え, 第 9 日にコロニーを収穫した.

(4) 組換え体 ES 細胞の選別

回収した 120 クローンの ES 細胞を培地上で増やし DNA を抽出した. 約 $5 \mu\text{g}$ のゲノム DNA を EcoRI で消化し, 0.8% アガロースゲルに 40V の電圧で 20 時間の電気泳動を行いゲノム断片を分離した. 電気泳動の後, アガロースゲル内のゲノム断片を $1.5\text{M NaCl}/0.5\text{M NaOH}$ 溶液中でアルカリ変性させ, ニトロセルロースフィルター BA-S85 (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) にブロッティングし, UV 固定 (UV stratalinker) の後 2 時間 80 度のベーキングにてゲノム断片を固定した.

5' 側のプローブは p4.5 を Sac I で消化した 1.1 kb 断片を使用した. 3' 側については 3'-1-1 (Ag CgCggAgCAggCCAAgggT) と 3'-1-2 (TgAC TgCCgCCCTgTggCgAg) をプライマーに設定し, 初回 DNA 変性を 94 度 2 分間, 30 サイクルの条件で PCR を行った (DNA 変性 94 度 1 分間, アニール 63 度 1 分間, 伸長反応 72 度 5 分間). これにより得られた約 500 塩基の PCR 産物を 3' 側のプローブとして使用した. Internal probe は C-2-1-3 を Bam HI と Mlu I で消化してできる約 1.3 kb の断片を使用した. プローブの標識はニックトランスレーション法により (Amarsham, MegaprimeTM DNA labelling system) 行った. フィルターは 50% ホルムアミド / $5 \times \text{SSC}$ (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) / $1 \times \text{デンハルト}/20\text{mM}$ ナトリウムリン酸ナトリウム / 10% デキストランの溶液条件で 42 度 18 時間のハイブリダイゼーションを行った.

フィルターの洗いは 3' 側では, $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS を室温で 30 分 2 回, $1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS を室温で 60 分 2 回, $1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS を 60 度 30 分 1

回とした. 5' 側では最終洗いの温度を 50 度に設定した. -80 度で 2 日間のオートラジオグラフィーを行った.

(5) キメラマウス・ノックアウトマウスの作成

12 個の組換え陽性 ES 細胞のうち, No.93, No.99, No.30 について, 通常の方法により胚盤胞に注入しキメラマウスを作成した. ES-No.93 より得られたキメラマウスと C57BL/6J とを交配し, さらに F1 同士の交配により F2 マウスを作成した. genotype の解析は competitive PCR 法により行った. PCR 条件は, DRP-F (gTgCCTACAAC TgCTgCCAgC), DRP-R.wild (CTCTgAgATCTC CTCgCTCCg), DRP-R.mnt (gACgACAgTATC ggCCTCAgg) をプライマーに設定し, 初回 DNA 変性を 94 度 2 分間, 最終伸長反応 72 度 15 分間, 30 サイクルとした (DNA 変性 94 度 1 分間, アニール 60 度 1 分間, 伸長反応 72 度 1 分間).

結 果

(1) マウス DRPLA ゲノム遺伝子のクローン化

ファージクローン No. 8 はマウス DRPLA ゲノム遺伝子全長を含んでおり, p8.3 は DRPLA 遺伝子の翻訳開始点の存在するエクソン 2 から終始コドンの存在するエクソン 10 までの全てを含んでいることが明らかとなった. また, p4.5 にはエクソン 1 が存在し, かつ DRPLA 遺伝子上流の ENO2 遺伝子の一部も存在した (図 1).

(2) ターゲティングベクターの作成と

β -galactosidase 遺伝子の発現

pBluescript II KS (–) ベクターに挿入した DRPLA 置換型ターゲティングベクターは, 5' 側の相同領域が 2.4 kb, 3' 側の相同領域が 7.1 kb, 全長は 16.7 kb であり, 翻訳開始点から 6 アミノ酸に続いてレポーター遺伝子の β -galactosidase 遺伝子が融合蛋白として発現した. このターゲティングベクターは, ユニークサイトである Not I で消化することで線状化することができる (図 2).

また, このターゲティングベクターを pCMV-Script vector (Stratagene) に入れ換え, リポフェクション法によって COS 細胞にトランスフェ

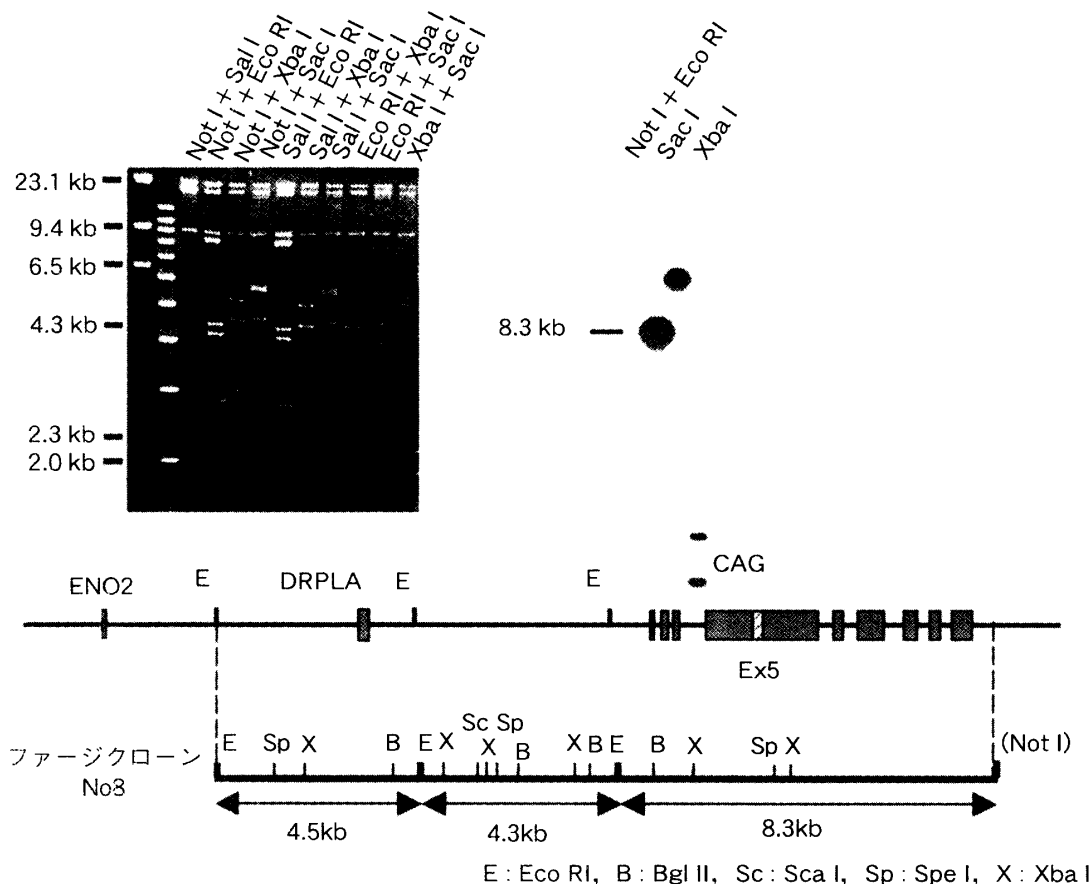


図1 ファージクローン No. 8 の制限酵素地図

マウス129ゲノムライブラリーより単離したファージクローン No. 8 は、*DRPLA* 遺伝子の全長を含んでいた。P8.3は翻訳開始点を含むエクソン2を含んでいる。

クションすることにより、*DRPLA* 遺伝子と β -galactosidase 遺伝子の融合蛋白が発現されることを確認した (図3)。

(3) ES細胞へのターゲティングベクター導入、組換え体ES細胞の選別、キメラマウス・ノックアウトマウスの作成

電気穿孔後のES細胞の生存率は約85%であった。培養後、約10,000コロニーから120コロニーを選び解析した結果、12コロニーで組換え陽性であった (図4)。ES-No. 93より得られたキメラマウスとC57BL/6Jとの交配で80匹の仔が生まれ、そのうち35匹でgerminal transmissionがおこった。そのうち15匹がヘテロ接合体で、性比は雄5匹・雌10匹であった。また、ホモ接合体が胎生致死とはならず誕生することを確認した (図5)。ヘテ

ロ接合体においても、離乳頃より比較的ゆっくりと四肢関節を屈曲・伸展させる運動や体幹を捻転させる動きと姿勢が観察された。こうした運動に混入して、持続時間が数秒間程度の細かいからだのふるえが観察され、クラスピングも認められた (図6)。

考 察

本研究で作成した*DRPLA* ノックアウトマウスは、ヘテロ接合体においても、前述のように離乳頃より比較的ゆっくりとした四肢関節を屈曲・伸展させる運動や体幹を捻転させる動きと姿勢などが観察されることから、*DRPLA* 蛋白の量的な減少が関与している可能性があり、ハプロ不全を

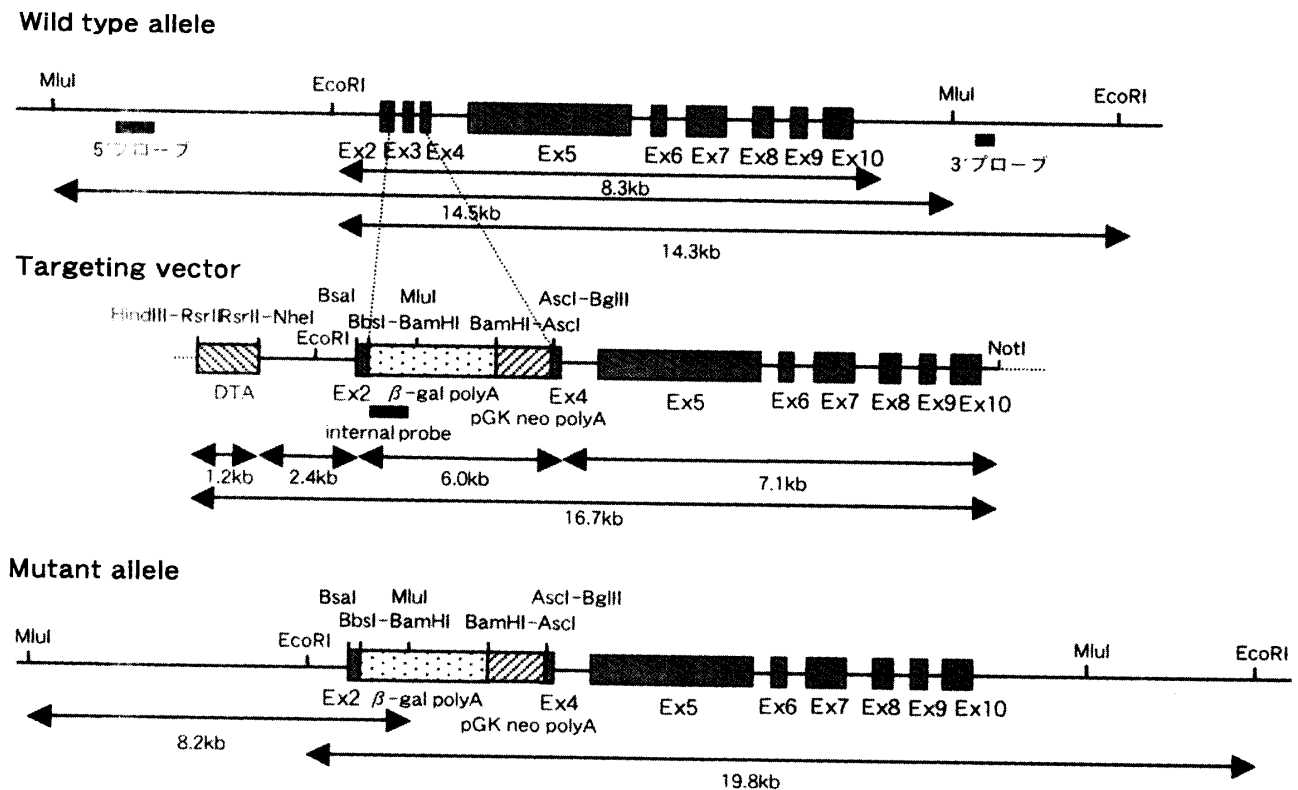


図2 Targeted disruption of the *DRPLA* gene

エクソン2の翻訳開始点より6アミノ酸を残し、 β -galactosidase と pGK *neo* 遺伝子を置換挿入した。5'側に DTA を置いた。相同領域は 5'側で2.4kb、3'側で7.1kbとした。なお mutant allele のサザン解析は 5'側は Mlu I で消化し8.2kb の、3'側は EcoRI で消化し19.8kb の断片が検出できる。

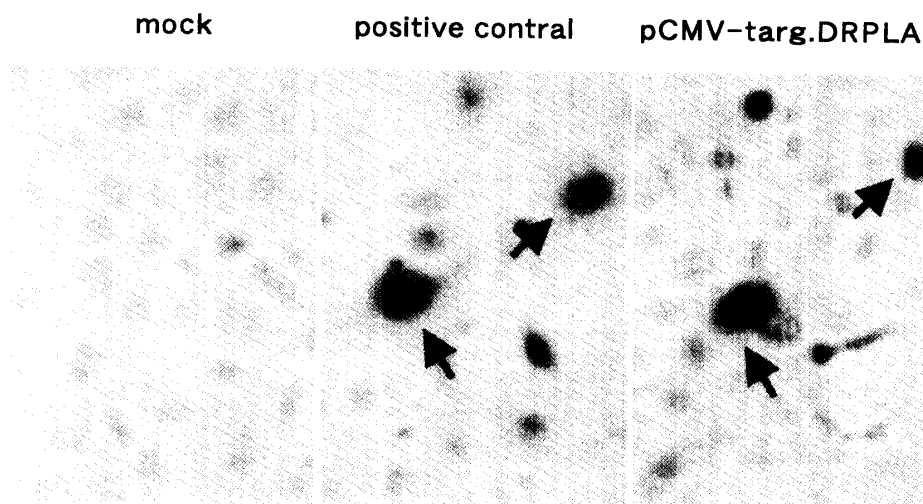
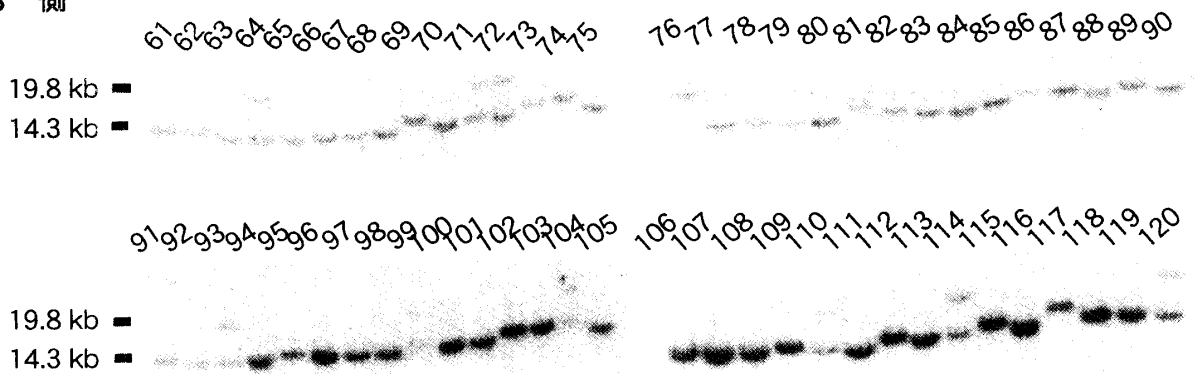


図3 β -galactosidase の発現

作成した *DRPLA* ターゲッティングベクター内のレポーター遺伝子が、培養細胞内で正確に融合蛋白として発現することを確認した。CMV プロモーター下に組込んだ *DRPLA* ターゲッティングベクターは、ポジティブコントロール同様、X-gal 染色により青色に染まる（矢印）。

3' 側



5' 側

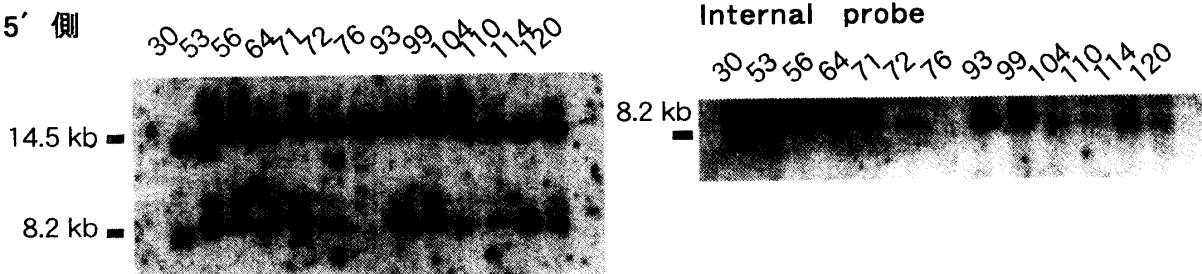


図4 ES細胞の選別

ターゲティングベクターをES細胞に導入し、サザン解析により、組換え陽性細胞を選別した。組換え体では、3'側で14.3kbのバンドの他に19.8kbのバンドが認められ、同様に5'側では14.5kbのバンドの他に8.2kbのバンドが認められる。さらに、ターゲティングベクター内に設定したインターナルプローブでは、組換え体で8.2kbのバンドがただ一本認められる。

H H h H W

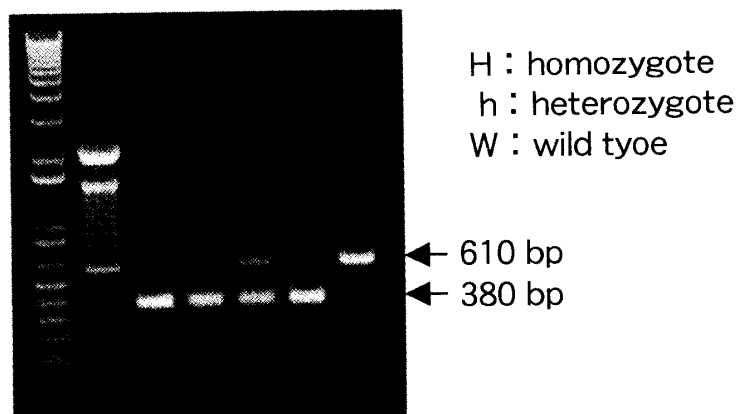


図5 F2マウスの genotype

PCRの産物として、野生型アリルをもつ個体では610bpのバンドが認められ、変異型アリルをもつ個体は380bpのバンドが認められる。competitive PCR法により、18匹のF2マウスを解析した結果では、ホモ接合体6匹、ヘテロ接合体6匹、野生型6匹であった。

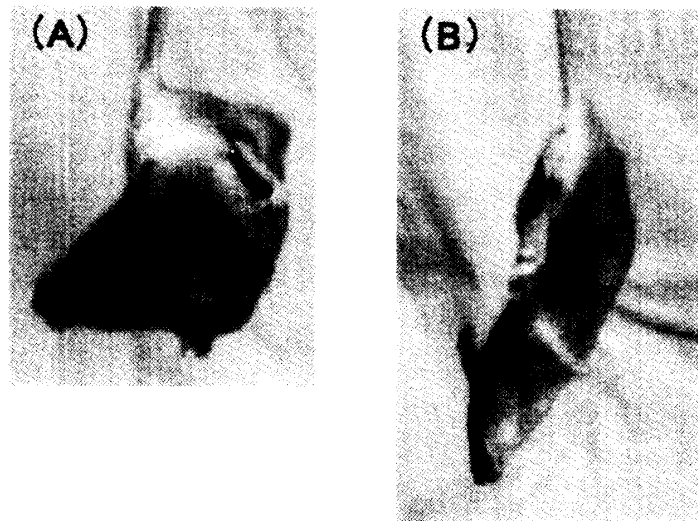


図6 3ヶ月齢のF1ヘテロの表現型

キメラマウスと C57BL/6J との交配により生まれた F1 ヘテロマウスは、四肢を屈曲させる運動や、体幹を捻転させる姿勢を示す (A)。また、後脚のクラスピングも認められる (B)。

呈するものと考えられる。このことは DRPLA 遺伝子が中枢神経系に必須の生理的機能を果たしていることを示している。

ポリグルタミン病について各責任遺伝子の生理的機能を明らかにすることは重要であり、その解明のため精力的にノックアウトマウスが作成され、詳細な解析がすすめられている。HD ノックアウトマウスはホモ接合体で胎生7.5日から8.5日で致死となる^{18)–20)}。ヘテロ接合体では、報告により多少異なるものの、淡蒼球の神経細胞数が減少し、活動性の増加を示すという報告がある¹⁸⁾。生後脳における huntigtin の働きを検討するため、Cre-lox P システムを用いて forebrain と小脳に発現を限定したノックアウトマウスも作成された²¹⁾。このホモ接合体はクラスピング、体幹の捻転、運動機能障害が出現し、尾状核の神経変性変化を認めた。胎生致死にはならないが、野生型に比べ寿命は短縮していた。これらの結果、IT15/Hdh 遺伝子は中枢神経系発達の前段階で発生に必須の役割があり、生後脳においてもその生存・存続に必要であり、神経細胞機能に関与していることが示された。SCA1 ノックアウトマウスのヘテロ接合体

は野生型と区別ができないが、ホモ接合体では探索行動、学習能力、運動機能の低下を認めている²²⁾。一方、SCA2 ノックアウトマウスには異常所見が認められていない。SCA6 はその生理的機能が判明している数少ないポリグルタミン病である。CACNA1A 遺伝子のノックアウトマウスではホモ接合体で生後10日より失調症状、ジストニア、筋力低下を示し、成熟前に死亡する²³⁾。tottering や leaner のように、ヌル変異ではない $\alpha_{1A}^{-/-}$ の自然発症マウスでは欠伸発作が観察されている²⁴⁾。本研究で作成した DRPLA ノックアウトマウスについても、生理的機能の解明に向けて、さらに解析を進めてゆく必要がある。

DRPLA 蛋白と他の細胞内蛋白質との相互作用を検討するため、yeast-two hybrid システムを用いた研究がある。DRPLA 蛋白は、主に細胞質で解糖系酵素であるグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) と、ポリグルタミン鎖長とは無関係に結合する²⁵⁾。GAPDH には解糖作用のほか、ウラシル DNA の N-グリコシド結合を切断する作用などがあり、DRPLA 蛋白の生理的機能との関連が推定されている。また近年では、

DRPLA 蛋白が WW ドメイン蛋白群²⁶⁾, インスリン受容体型チロシンキナーゼ基質 (IRSp53)²⁷⁾, アルギニン-グルタミン酸ジペプチド (RERE)²⁸⁾, ETO/MTG 8²⁹⁾ などシグナル伝達系や転写抑制に関与する分子と結合する点に注目が集まっている。IPSp53は細胞質で, RERE および ETO/MTG 8 とは核内で相互作用する。これらの結果は, DRPLA 蛋白がシグナル伝達に関与する可能性があることを示唆している。

冒頭で述べたように, DRPLA 遺伝子のノックアウトではハプロ不全を呈する。ポリグルタミン病において同様の報告はない。現在, ハプロ不全を示すことが知られている遺伝子は比較的少数であり, こうした遺伝子に共通した機能がすでにいくつか明らかとなっている³⁰⁾。例えば, 受容体や DNA 結合部位に対し占有度に依存して作用する量的シグナル伝達系や, 発生・代謝のスイッチに関わり互いに競合して働く遺伝子, または α - β -グロビンに代表される構造蛋白質のように定まった比率で相互作用しあう遺伝子産物などである。

本研究は DRPLA 遺伝子が中枢神経系に必須の役割を果たしていることを示した。さらに, 上述した様々な研究の解析結果を総合的に検討すると, DRPLA 蛋白に量的シグナル伝達系に関与する生理的機能が備わっている可能性も考えられる。

DRPLA 遺伝子の発現分布は Northern 解析の結果, どの組織にも広く分布しており, とくに胎児脳で高い発現がみられている³¹⁾。しかし, DRPLA 蛋白の時間的・空間的発現分布と病変選択性 (vulnerability) との関係については, 未だ不明な点が多い。遺伝子は必ずしもそれが必要とされる組織でのみ発現されるものではなく, 細胞内での役割が異なれば, 遺伝子変異により, 特定の組織でのみ強く障害が現れると考えられている。RET 遺伝子にみられるように, 発現する細胞が異なれば, 異なった効果も発揮する。本研究で作成した DRPLA ノックアウトマウスには, β -galactosidase 遺伝子が組み込まれている。これは DRPLA プロモーター作動下に発現するため, 発現分布や vulnerability の解析にはきわめて有

用と考えられる。このマウスの解析により, 発生・発達段階から成熟期を通して各組織における蛋白発現量の違いを明らかにできる。それぞれの時期において DRPLA 蛋白が果たしている役割をさらに詳細に推定できる可能性がある。

治療的側面においても, 本研究の果たす役割は大きい。DRPLA を含め, ポリグルタミン病の病態機序について, 既に変異蛋白の核移行が重要であることは明らかとなっている³²⁾。また, 核内凝集体や神経細胞死がポリグルタミン病の発病に必須ではないことも個体レベルで既に判明している¹⁸⁾ ³³⁾。さらに, 変異蛋白にも生理的機能が備わっていることが解っている³⁴⁾。こうした知見はポリグルタミン病の治療に際し, 変異蛋白の核移行を阻止することが重要であることを示唆している。しかし DRPLA においては, 本研究よりハプロ不全を示すことが明らかにされた。従って, 治療戦略上変異蛋白の発現を選択的に止めるだけでは不十分であると考えられる。変異蛋白の核移行を抑え, かつ正常蛋白の生理的活性を保つ方法論が必要となる。

今後の包括的な DRPLA の理解には, その生理的機能と DRPLA 蛋白の核移行の機序を明らかにすることが重要である。そして, 治療法の確立には蛋白発現やその核移行を選択的にコントロールできる技術を開発することが必要であると考えられる。本研究で作成した DRPLA ノックアウトマウスは, こうした研究を遂行する上で非常に優れた系である。

謝 辞

本研究の一部は, 椿神経疾患研究財団の助成を受けた。最後に, 本稿を御高閲いただきました辻省次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新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野・佐藤俊哉先生, 同・小宅睦郎先生, 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・勝木元也所長に深謝致します。

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) 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, Furukawa T, Nihei K, Inoue T, 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) 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.
- 6) 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. *Nature Genet* 14: 277-284 1996.
- 7) Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C and Sahba S: Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet* 14: 269-276 1996.
- 8) Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Durr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y and Brice A: Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG /glutamine repeats. *Nature Genet* 14: 285-291 1996.
- 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 (SCA 6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha (1A)-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet* 15: 62-69 1997.
- 10) 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.
- 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. Molec. 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) 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.
- 14) Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SMG, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJB, Hofker MH, Ferrari MD and Frants RR: Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* 87: 543-552 1996.
 - 15) Ikeuchi T, Koide R, Tanaka H, Onodera O, Igarashi S, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Tomoda A, Miike T, Sato K, Ihara Y, Hayabara T, Isa F, Tanabe H, Tokiguchi S, Hayashi M, Shimizu N, Ikuta F, Naito H and Tsji S: Dentatorubral-pallidolusian atrophy: clinical features are closely related to unstable expansions of trinucleotide (CAG) repeat. *Ann Neurology* 37: 769-775 1995.
 - 16) Takahashi H, Ohama E, Naito H, Takeda S, Nakashima S, Makifuchi T and Ikuta F: Hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy; clinical and pathologic variants in a family. *Neurology* 38: 1065-1070 1988.
 - 17) Oyake M, Onodera O, Shiroishi T, Takano H, Takahashi Y, Kominami R, Moriwaki K, Ikeuchi T, Igarashi S, Tanaka H and Tsuji S: Molecular cloning of murine homologue dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) cDNA: strong conservation of a polymorphic CAG repeat in the murine gene. *Genomics* 40: 205-207 1997.
 - 18) Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG and Hayden MR: Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81: 811-823 1995.
 - 19) Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A; Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL and MacDonald ME: Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269: 407-410 1995.
 - 20) Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE and Efstratiadis A: Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature Genet* 11: 155-163 1995.
 - 21) Dragatsis I, Levine MS and Zeitlin S: Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature Genet* 26: 300-306 2000.
 - 22) Matilla A, Roberson ED, Banfi S, Morales J, Armstrong DL, Burright EN, Orr HT, Sweatt JD, Zoghbi HY and Matzuk MM: Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation. *J Neuroscience* 18: 5508-5516 1998.
 - 23) Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW and Shin HS: Ablation of P/Q-type Ca^{2+} channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the $\alpha(1A)$ -subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:15245-15250 1999.
 - 24) Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy JD Jr, Hawkes R, Frankel WN, Copeland NG and Jenkins NA: Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* 87: 607-617 1996.
 - 25) Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, Vance JM and Strittmatter WJ: Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nature Med* 2: 347-350 1996.
 - 26) Wood JD, Yuan J, Margolis RL, Colomer V, Duan K, Kushi J, Kaminsky Z, Kleiderlein JJ, Sharp AH and Ross CA: Atrophin-1, the DRPLA gene product, interacts with two

- families of WW domain-containing proteins. *Mol Cell Neurosci* 11:149-160 1998.
- 27) Okamura-Oho Y, Miyashita T, Ohmi K and Yamada M: Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum Mol Genet* 8: 947-957 1999.
 - 28) Yanagisawa H, Bundo M, Miyashita T, Okamura-Oho Y, Tadokoro K, Tokunaga K and Yamada M: Protein binding of a *DRPLA* family through arginine-glutamic acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9: 1433-1442 2000.
 - 29) 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 dentatorubral and pallido-luysian atrophy gene product, interacts with ETO/MTG8 in the nuclear matrix and represses transcription. *J Cell Biol* 150: 939-948 2000.
 - 30) Fisher E and Scambler P: Human haploinsufficiency – one for sorrow, two for joy. *Nature Genet* 7: 5-7 1994.
 - 31) Onodera O, Oyake M, Takano H, Ikeuchi T, Igarashi S and Tsuji S: Molecular cloning of a full-length cDNA for dentatorubral-pallidoluysian atrophy and regional expressions of the expanded alleles in the CNS. *Am J Hum Genet* 57: 1050-1060 1995.
 - 32) Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, Zoghbi HY and Orr HT: Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA 1 transgenic mice. *Cell* 95: 41-53 1998.
 - 33) Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LS 4th, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL and Detloff PJ : Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91: 753-763 1997.
 - 34) Leavitt BR, Guttman JA, Hodgson JG, Kimel GH, Singaraja R, Vogl AW and Hayden MR: Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* 68: 313-324 2001.

(平成14年1月15日受付)