

「脳を知る」

平成7年度採択研究代表者

金澤 一郎

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

「ヒト脳の単一神経細胞の発現遺伝子」

1. 研究実施の概要

目的：ヒト脳の単一神経細胞で発現している遺伝子は、細胞毎に異なっており、それが細胞の個性を決めている。そこで、脳で発現している機能分子のファミリーメンバーをまず確定すること、レーザーにより単一神経細胞の切り出しを可能にすること、統計解析を考慮に入れながら超高感度のアッセイ系を開発すること、を同時平行で進める。さらにこの方法を用いて、極く初期に亡くなった神経変性疾患患者のやがて死ぬ運命にある神経細胞の発現遺伝子における特異的变化を確定することによって細胞の運命を知る。

方法：機能分子としてイオンチャンネルを集中的に扱うことにし、共通塩基配列のプライマーを用いてクローニングを行う。細胞の切り出しのためにはエキシマレーザーによるダイセクターを作成する。統計解析により最も適切なプライマーを設定しそれを用いた超微量RT-PCR法を確立する。

結果： ヒト脳に発現する新規のNa⁺チャンネルを発見、SCN12Aと命名し、全シーケンスを決定した。in situ hybridizationにより、脳の神経細胞とグリア細胞の両者に発現していることを証明した。現在その生理学的機能を検討中である。

既知ではあるが、従来ヒト脳での存在が知られていなかったNa⁺、Ca⁺⁺チャンネルの存在を確認し、定量的カタログを作成している。

エキシマレーザーを用いた単一神経細胞を切り出すためのレーザーダイセクターが完成し、約10μm程度の大きさの神経細胞を切り出せるようになった。

脳で発現している既知の遺伝子を例に用いて、ディファレンシャルディスプレイ(DD)での電気泳動パターンを予測する新しいコンピュータソフト群を開発した。

単一神経細胞が発現する遺伝子を検索するための、超微量RT-PCR法およびそれに続くDD法がほぼ完成した。

その方法を用いて、CAGリピート病の1つであるDRPLA小脳において、

細胞毎にCAGリピート数に明らかなモザイシズムがあることを証明した。

2. 研究実施内容

1) クローニング・チーム

単一神経細胞の発現する遺伝子を探索して神経細胞の個性を知る上で、どのような分子に注目するかがまず重要である。我々は神経細胞のもつ最も重要な機能は興奮作用であることに鑑み、その機能の最も基本的な素子であるイオンチャンネルについて系統的に探索することにした。

C a⁺⁺およびN a⁺ イオンチャンネルのクローニング

C a⁺⁺およびN a⁺ イオンチャンネルは、神経・筋などの興奮性細胞の細胞膜に存在する膜蛋白である。これらのチャンネルは複数のサブユニットから構成されるがその主要な機能はそれぞれ サブユニットに備わっているとされている。これまでに哺乳類において複数のC a⁺⁺チャンネルおよびN a⁺チャンネルの遺伝子が同定されてきており、これらのチャンネルにはアミノ酸配列にある程度のホモロジーが認められスーパーファミリーを形成していることが分かっている。しかしながら、これまでヒトの脳に発現しているこれらのチャンネル遺伝子を系統的に探索した研究はなく、また定量的に検索した研究もない。

そこで我々はヒト脳に発現するC a⁺⁺チャンネルおよびN a⁺チャンネルのカタログを作成するとともに、その定量解析を行い、続いてそれらの細胞局在、さらには単一神経細胞における定量的発現状態を捕らえることを目的として、ヒト脳に発現するこれらのチャンネルのクローニングに着手した。その結果、C a⁺⁺チャンネルについては既に脳に発現していることが判明している 1 A、 1 B、 1 C、 1 D、 1 Eの各タイプに加えて、筋肉にのみ発現すると考えられてきた 1 Sタイプも間違いなくヒト脳に発現していることを確認した。

一方、N a⁺チャンネルについては、これまでに哺乳類の脳に発現することが知られていたS C N 1 A、2A、3A、8A、9Aの各タイプを同定したが、その他に従来脳には存在しないとされてきたS C N 4 A、5Aも実際に存在することを確認した。

さらに、E S T (Expressed Sequence Tag) データベースを基にして、従来まったく知られていなかった新奇のN a⁺チャンネル サブユニットをクローニングし、S C N 12 Aと命名した。このS C N 12 Aは、少なくともカルボキシル末端の異なる2種類の転写産物があり(アミノ酸は1792個と1445個)いずれも既知のN a⁺チャンネル サブユニットに共通する4か所の膜貫通ドメインを有している。S C N 12 AのmRNAのサイズは約7 k bで、脾臓、小腸、胎盤および脊髄に主として発現を示した。脳よりも圧倒的に脊髄に強い発現がある

ことは極めて興味深い。FISH法によってSCN12Aは染色体3番短腕(3p21.3-p23)にマップされた。また、SCN12Aは既知のNa⁺チャンネルと約50%程度のホモロジーしか示さず特異的な機能をもつNa⁺チャンネルの可能性もある。in situ hybridizationにより、このチャンネルは、脳の神経細胞とグリアの両者に発現していることが推定された。現在この遺伝子産物の生理機能を検索中である。また従来ESTでしか知られていなかったSCN8A及びSCN3Aの全シーケンスを決定した。

K⁺およびCl⁻チャンネルのクローニング

上記1.の場合と同様に、ヒト脳で発現し機能を持つもうひとつのチャンネルグループであるK⁺およびCl⁻チャンネルについて、カタログ作成、定量的検索などを目的として上記1.とほぼ同様な方法によって研究を進めた。既知のK⁺チャンネルおよびCl⁻チャンネルとホモロジーをもつクローンをESTデータベースから得て、プライマーを作成しRACE法(Rapid Amplification of cDNA Ends)によって全長をクローニングする方法と既知のK⁺チャンネルあるいはCl⁻チャンネルのサブファミリーの共通塩基配列に合わせてプライマーをデザインし、これを用いたnested PCRを行う方法によって検索した。その結果、K⁺チャンネルについてはラットのK⁺チャンネルであるergファミリーに属するerg3とアミノ酸レベルで約94.5%のホモロジーをもつ新奇のヒトcDNA断片を得た。さらに、約95.2%のホモロジーを持つ別のcDNA断片も得られた。現在、この2つのクローンについて全長をクローニングしその全シーケンスを決定することに集中している。なおCl⁻チャンネルについてはクローンを4種類見いだしたがいずれも既知のものであった。

多系統萎縮症(オリブ橋小脳萎縮症)脳で発現が増加している新奇遺伝子(ZNF231)のクローニング

オリブ橋小脳萎縮症患者の病変部位である小脳にその発現が明らかに増加している遺伝子を目標としてディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法によって8300個のクローンの中から見いだして同定したものである。この遺伝子の転写産物は約16kbのサイズをもち、全シーケンスを決定したところ3926アミノ酸よりなるORF(Open Reading Frame)をもち、2か所にGPリピート、double zinc finger motifのペア、1か所のleucine zipper motif、2か所のグルタミン・リッチ・ドメインおよび1か所のヒスチジン・リッチ・ドメインなど極めてユニークなモチーフを有することが分かった。我々はこれをZNF231と命名した。ノザン解析により、この遺伝子は脳に特異的に発現しており、他の臓器ではほとんど発現していないことを見いだしたが、脳の中でも恐らくニューロンに特異的に発現していると考えている。特異抗体を作成したので、

それを用いた光学および電子顕微鏡的レベルでの免疫組織化学的検討をしている。

ハンチントン病の培養細胞モデルにおける細胞内封入体生成の動態

ハンチントン病は金澤が長年にわたって手がけてきた優性遺伝病である。1993年にその責任遺伝子が決定され、そこに存在するCAGリピートの異常な伸長によって発病することが判明した。CAGリピート病にはハンチントン病以外には歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、マシャド・ジョセフ病(MJD)など多くの疾患があり、我々の研究室では最先端の研究を続けてきたし、現在でも続けている。一方、1996年には異常に伸長したCAGリピートを有するハンチントン病遺伝子のエクソン1のみを強制発現させたトランスジェニックマウスにおいて、核内封入体の存在が見いだされ、その封入体がハンチントン病における神経細胞死を招来するとされた。従って、CAGリピート病全体の病態を理解する上でこの封入体の動態を知ることは極めて重要であると考えられている。現在までに世界的に10チーム以上がこの問題にアプローチしている。我々は異常に伸長したCAGリピートを有するハンチントン病遺伝子のエクソン1 GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子をつなぎ、これをCOS細胞にトランスフェクトし蛍光顕微鏡下に「定点観測」することにより、封入体の動態を調べることにした。その結果、驚くべきことに、細胞内封入体はほとんど5分以内に瞬間的に出現し、40分以内にほぼ完成することを発見した。ハンチントン病の線条体細胞死に、この細胞内封入体の形成が直接かかわっているか否かを検討することを目的として、培養細胞内で形成された封入体を大量に集め、蛋白解析を行なっている。

2) 統計解析チーム

単一神経細胞が発現している遺伝子を系統的に探索し、神経細胞の個性や運命を明らかにするためには、神経細胞の遺伝子を細胞内に存在するままの状態 PCRで増幅することが求められる。既知の遺伝子ファミリーについてプライマーセットで増幅しようとする場合はもとより、ディファレンシアル・ディスプレイ法(DD法)によって各細胞の発現遺伝子を比較する場合にも、その成否を決める重要な因子は、DNA増幅のためのPCRを行う際に用いるプライマーの設計である。従来、脳における最適なPCR設計についての系統立った研究はほとんどなされておらず経験的に行われてきたのが現状である。

そこで我がチームでは、脳に発現している8043個の既知の遺伝子をデータベースから取り出し、PCRに用いる6merの組み合わせの出現頻度を検索した。その結果、CTGCTGあるいはCAGCAGのように50%以上の頻度で出現する6merがある一方、CGTACGあるいはCGCGTAのように2%にも満たない頻度でしか

出現しない6merもあることが分かった。こうした事実を基に、ランダムな発現遺伝子検索において邪魔になるミトコンドリア遺伝子の増幅を極力抑制するプライマーを見いだそうとしたが、残念ながら6merを用いる限り、ミトコンドリア遺伝子の増幅を完全に抑制することは不可能であることが分かった。そこで、現在10merのプライマーによるPCRを行なっている。

次に、細胞の運命を探索するためのDD用プライマー作成を目指したプロジェクトとして以下のことを行った。特殊な高速ホモロジーサーチによって加工し、DD用新データベースを作成し、それを基にして人工知能により最適なPCRプライマーの塩基配列を選定するという一連のプロセスを遂行するプログラム群を作成した。

3) ダイセクション・チーム

高エネルギーを出すエキシマレーザーを用いたレーザーダイセクター本体が完成し、実際に神経細胞を切り出す様々な条件を検討した。その結果、凍結脳切片はドライアイスではなく必ず液体窒素で凍結して氷の結晶が入らないようにした組織から作成する必要があること、凍結乾燥後にも細胞の輪郭を顕微鏡下で見えるような状態にするためには凍結乾燥のプロセスは-80度ではなく-15度付近で行う必要があること、などが確認できた。また、レーザーダイセクターにより切り出された細胞片をPCR用試験管に回収するための細胞切片回収条件の検討も終了し、ダイセクション技術は完成した。

4) 超微量RT-PCR・チーム

1. 単一神経細胞がもつ既知の遺伝子の超微量PCRによる増幅

(単一神経細胞のゲノムDNAを増幅する)

CAGリピート病においては体細胞モザイクの存在が興味深い問題の一つである。そこで、単一神経細胞の切り出しの方法が確立したので、CAGリピート病の一つであるDRPLAの遺伝子の3'領域に対するプライマーを作成して実際に単一神経細胞からPCRで増幅できるかどうかを検討した。それが可能であることがわかったので、DRPLAモデルマウス(新潟大のグループにより作成されたマウス)を用いて、CAGリピートのモザイクの有無を検索している。

2. 単一神経細胞に発現する既知の遺伝子の超微量RT-PCRによる増幅

(単一神経細胞のmRNAのうち既知のものを増幅する)

ラット・プルキンエ細胞をレーザーダイセクターにて切り出し、既知の蛋白遺伝子であり神経細胞に多量に発現しているニューロフィラメントL鎖遺伝子を用いたモデル実験を行った。すなわち、ニューロフィラメントL鎖遺伝子のmRNAに対するプライマーを作成し単一プルキンエ細胞から得た

mRNAを用いてRT - PCRを行ったものである。このように方法としてほぼ完成したので、これを上記DRPLA患者脳に応用したところ プルキンエ細胞やグリア細胞など、小脳を形成する個々の細胞毎に、CAGリピー数に明らかな違いがあり、体細胞モザイクがあることを初めて証明した。

3 . 単一神経細胞に発現する未知の遺伝子の超微量 R T - P C R による増幅 (単一神経細胞のm R N Aの全てをそのままの比率で増幅する)

死ぬ運命にある神経細胞と正常細胞との発現遺伝子の差を見だし、神経細胞死の原因分子を探索することを目指して、超微量ディファレンシアル・ディスプレイ法を確立する。このことを目的としてm R N Aからのc D N A作成条件、c D M Aの相対比を保ったままの増幅条件、F D D (Fluorescent Differential Display)のためのP C R反応の条件、などを検討した。その結果、これらの条件を一応確立できた。さらにプライマーデザインがもう一つの重要な因子となるので、統計解析チームの助けを得てより適切なプライマーのデザインを行い、ヒト脳に多く出現することが統計的にも証明された6 m e rを含む10m e rのプライマーを用いるとよいことが判明した。現在までにヒト大脳皮質細胞、ヒトプルキンエ細胞、ヒト黒質細胞に応用し、うまく作動することが確認できたところである。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Ishikawa K, Watanabe M, Yoshizaki K, Fujita T, Iwamoto H, Yoshizawa T, Harada K, Nakamagoe K, Komatsuzaki Y, Satoh A, Doi M, Ogata T, Kanazawa I, Shoji S, Mizusawa H: Clinical, neuropathological, and molecular study in two families with spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 67, 86-89 (1999)

Waragai M, Lammers CH, Takeuchi S, Imafuku I, Udagawa Y, Kanazawa I, Kawabata M, Mouradian MM, Okazawa H: PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Human Molecular Genetics*, 8, 977-987 (1999)

Kanazawa I: Molecular pathology of dentatorubral-pallidolusian atrophy : *Philosophical Transactions of the Royal Society, series B, Biological Sciences*, 354, 1069-1074 (1999)

Song J, Geltinger C, Sun K, Kanazawa I, Yokoyama KK: Direct lysis method for the rapid preparation of plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*, 271, 89-91 (1999)

Song J, Kanazawa I, Sun K, Murata T, Yokoyama KK: Removal of ethidium bromide and cesium chloride from plasmid DNA by Ethanol precipitation. *Bio Techniques*, 26, 1056-1060 (1999)

Ishikawa K, Fujigasaki H, Saegusa H, Ohwada K, Fujita T, Iwamoto H, Komatsuzaki Y,

Toriyama H, Watanabe M, Ohkoshi N, Shoji S, Kanazawa I, Tanabe T, Mizusawa H: Abundant expression and cytoplasmic aggregations of α 1A voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Human Molecular Genetics*, 8,1185-1193(1999)

Song J, Murakami H, Tsutsui H, Ugai H, Geltinger C, Murata T, Matsumura M, Itakura K, Kanazawa I, Sun K, Yokoyama KK: Structural organization and expression of the mouse gene for Pur-1, a highly conserved homolog of the human MAZ gene. *European Journal of Biochemistry*, 259,676-683(1999)

Sato T, Oyake M, Nakamura K, Nakao K, Fukushima 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, Komre O, Takahashi M, Sano A, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Katsuki M, 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. *Human Molecular Genetics*, 8,99-106 (1999)

Imafuku I, Masaki T, Waragai M, Takeuchi S, Kawabata M, Hirai S, Ohno S, Nee LE, Lippa CF, Kanazawa I, Iwagawa M, Okazawa H: Presenilin 1 suppresses the function of c-Jun homodimers via interaction with QM/Jif1. *Journal of Cell Biology*, 147,121-133(1999)

Takeuchi S, Imafuku I, Waragai M, Roth C, Kanazawa I, Buettner R, Mouradian MM, Okazawa H: AP-2 represses D1A dopamine receptor gene transcription in Neuro2a cells. *Molecular Brain Research*, 74,208-216(1999)

Wang G, Mitsui K, Kotliarova S, Yamashita A, Nagao Y, Tokuhiro S, Iwatsubo T, I, Nukina N: Caspase activation during apoptotic cell death induced by expanded polyglutamine in N2a cells. *NeuroReport*, 10, 2435-2438(1999)

Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, Kanazawa I: Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 46,806-815(1999)

Yoshizawa T, Yamagishi Y, Koseki N, Goto J, Yoshida H, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I: Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Human Molecular Genetics*, 9,69-78(2000)

Jeong SY, Goto J, Hashida H, Suzuki T, Ogata K, Masuda N, Hirai M, Ishigara K, Uchiyama Y, Kanazawa I: Identification of a novel human voltage-gated sodium channel

subunit gene, SCN12A. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 267,262-270 (2000)

Ogata K, Jeong SY, Murakami H, Hashida H, Suzuki T, Masuda N, Hirai M, Ishihara K, Uchiyama Y, Goto J, Kanazawa I: Cloning and expression study of the mouse tetrodotoxin-resistance voltage-gated sodium channel subunit NaT/Scn11a. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 267,271-277(2000)