

論文要旨

Chorein deficiency leads to upregulation of gephyrin and GABA_A receptor

chorein 機能喪失は、gephyrin と GABA_A 受容体の upregulation をもたらす。

倉野 裕

【序論および目的】

有棘赤血球舞踏病(ChAc)はハンチントン病様の神経精神症状と有棘赤血球症を呈する遺伝性神経変性疾患である。我々はポジショナルクローニング法を用いて病因遺伝子 *VPS13A* を同定し、予想遺伝子産物を chorein と命名した。さらに、ヒト疾患と同じ変異をもつ ChAc モデルマウスを作成し、ChAc 類似の症状を持ち、また線条体の神経細胞死の存在を明らかにした。今回我々は、マイクロアレイ解析にて、ChAc モデルマウスと野生型マウスの線条体における遺伝子発現の差異を検討したところ、gephyrin 遺伝子の発現が ChAc モデルマウスで有意に高かった。そこで ChAc モデルマウスを用いて、gephyrin およびそれに関連する GABA_A 受容体のタンパク質レベルでの発現解析を行った。

【材料および方法】

1. マウス線条体におけるマイクロアレイ解析を行い、ChAc モデルマウスと野生型マウスでの遺伝子発現の差異を検討した。
2. gephrin、GABA_A receptor $\alpha 1$ および $\gamma 2$ subunits の、タンパク質レベルでの発現の差異をウエスタンブロット法、および免疫組織化学法を用いて確認した。

【結果】

マイクロアレイ解析にて、ChAc モデルマウスの線条体において、gephyrin の発現が有意に高いことがわかった。gephyrin と関連のある GABA_A 受容体と合わせて、ChAc モデルマウスの線条体・海馬・淡蒼球等にて、gephyrin と GABA_A receptor $\gamma 2$ の発現が有意に高いことを、ウエスタンブロット法や免疫組織化学法を用いて確認した。

【結論及び考察】

ChAc モデルマウスの線条体・海馬にて、gephyrin や GABA_A receptor $\gamma 2$ の発現が有意に増加していたことは、GABA に神経保護作用があるということからも考えて、線条体変性を防ぐために介在ニューロンや、自己受容体の神経保護作用が働いた可能性が考えられる。淡蒼球における反応は、90%以上が GABA 作動性ニューロンで占められる線条体の変性に伴う upregulation と考えられる。

ChAc と同様に舞踏運動を呈し、線条体に変性を持つ疾患であるハンチントン病(HD)の、ヒト死後脳を用いた実験では、GABA_A 受容体の発現は増加していたが、gephyrin の発現は増加していなかった。このことから、ChAc と HD との間には、線条体変性のメカニズムや gephrin との関連において、分子病態に違いがあることが推察できる。今回の結果は、ChAc の病態を考える上で有用な所見と思われる。

(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Volume.351, Issue 2, Pages 438-442, 2006年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 6 号	学位申請者	倉野 裕
審査委員	主査	丸山 征郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	納 光弘	副査 熊本 一朝
	副査	有村 公良	副査 後藤 正道

Chorein deficiency leads to upregulation of gephyrin and GABA_A receptor

chorein 機能喪失は、gephyrin と GABA_A 受容体の upregulation をもたらす

(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Volume. 351, Issue 2, Pages 438-442, 2006 年 掲載)

有棘赤血球舞踏病 (ChAc) は、ハンチントン病様の神経精神症状と有棘赤血球症を呈する遺伝性神経変性疾患である。最近、病因遺伝子 *VPS13A* が同定され、予想遺伝子産物は chorein と命名された。また、遺伝子改変技術により作成した、ヒト ChAc 患者と同じ *VPS13A* 変異をもつ ChAc モデルマウスでは、ChAc 類似の症状を呈し、線条体特異的な神経変性を持つことが明らかになった。そこで学位申請者らは、RNA マイクロアレイ解析を行い、ChAc モデルマウスと野生型マウスの線条体における遺伝子発現の差異を検討した。その結果、発現に有意差のあった遺伝子の産物に対して、タンパク質レベルでの発現を解析した。

その結果、以下の知見が明らかにされた。

1. RNA マイクロアレイ解析結果

Gephyrin 遺伝子の発現が、ChAc モデルマウスで有意に上昇していた。Gephyrin は GABA_A 受容体のアンカーリングタンパク質である。線条体の神経細胞は 95% が GABA 作動性の有棘中型細胞である。そこで、gephyrin に加え、それと関連のある GABA_A 受容体についてもタンパク質レベルでの解析を行った。

2. Gephyrin、GABA_A 受容体のタンパク質レベルの発現解析

ウェスタンブロットでは、ChAc モデルマウスにおいて、gephyrin と GABA_A 受容体 γ 2subunit の発現が有意に上昇していた。免疫組織化学染色では、ChAc モデルマウスにおいて、gephyrin と GABA_A 受容体 γ 2subunit に加え α 1subunit でも強い免疫反応を認めた。

本結果より、ChAc モデルマウスの海馬、線条体および淡蒼球における、gephyrin と GABA_A 受容体 γ 2subunit および α 1subunit のタンパク質レベルでの発現上昇が明らかとなった。神経変性の主座である線条体における GABA_A 受容体の発現増加は、介在ニューロンを介したものの、もしくは GABA 自身の神経保護作用に関連する可能性も示唆された。また、GABA 作動性ニューロンの投射先である淡蒼球においては、GABA 減少に伴う GABA_A 受容体の代償的な upregulation が生じている可能性がある。

本研究によって、ChAc 病態下で gephyrin および GABA_A 受容体の上方調節が存在し、疾患の病態と関連していることが示唆された。以上のように、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 6 号	学位申請者	倉野 裕
審査委員	主査	丸山 征郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	納 光弘	副査 熊本 一朗
	副査	有村 公良	副査 後藤 正道

主査および副査の5名は、平成18年12月25日、学位申請者 倉野 裕 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 赤血球膜画分に chorein は存在するのか？

(回答) 存在する。マウスおよびヒト赤血球膜画分に対して、抗 chorein 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。マウスでは正常 VPS13A 遺伝子量に related した反応を、ヒトでの結果は健常人でバンドは認めしたが、有棘赤血球舞踏病(ChAc)患者では反応は認めなかった。

質問2) chorein が赤血球膜に存在するという事は、小胞体輸送系のみならず細胞骨格系においても機能しているのか？

(回答) chorein は細胞骨格系においても機能していると思われる。アクチン等に結合している可能性も考えている。

質問3) 免疫組織化学染色法における一次抗体や DAB 染色の反応時間は？

(回答) 一次抗体は 4℃の冷蔵庫内で一晩(16時間以内)、DAB 染色は 10-15 分位。

質問4) マウス脳 of gephyrin 免疫染色で、歯状回が染まっているようだが海馬回の錐体細胞はどうか？

(回答) どちらの部位も染まっているが染色パターンが異なる。

質問5) chorein は脳にユビキタスに発現しているにもかかわらず、ChAc では線条体特異的に神経変性が起こるのはなぜか？

(回答) 仮説だが、線条体特異的に存在する chorein の variant の存在、線条体特異的に存在する chorein と相互作用するタンパク質の存在などが考えられる。

質問6) 筋での chorein 発現はどうか？

(回答) ヒト骨格筋に対して、抗 chorein 抗体と抗ファロイジン抗体を用いて免疫蛍光二重染色を行ったところ、アクチンに一致する部位に免疫反応を認めた。

最終試験の結果の要旨

質問 7) もし ChAc 患者脳内に GABA を投与出来るとしたら症状はどうか?

(回答) 不明である。しかし、今回の研究結果から症状が良くなる可能性がある。

質問 8) 免疫組織化学染色で 70 週齢マウスを使ったのはなぜ?

(回答) 先行研究で ChAc モデルマウス行動異常を呈したマウスが 70 週齢前後からであったため。

質問 9) Gephyrin が GABA_A 受容体 γ 2subunit にどのように作用するのか?

(回答) Gephyrin が GABA_A 受容体 γ 2subunit の両者が共に発現上昇し、共役して GABA_A 受容体機能活性を高め、神経保護的に働いているものと考えている。

質問 10) 腎臓に chorein 発現が多いが、ChAc および ChAc モデルマウスでは腎障害がみられるか?

(回答) ヒト ChAc 患者では腎障害は報告されていない。ChAc モデルマウスでの腎障害は不明である。

質問 11) 腎臓皮質で遠位尿細管と比べ、近位尿細管に chorein 発現が多いということはどういうことなのか?

(回答) 近位尿細管は遠位尿細管と比べ、電解質やペプチドの輸送体が多く存在する組織である。仮説であるが、chorein はそれら輸送体と相互作用し電解質輸送に関わる可能性も考えられる。

質問 12) ChAc モデルマウスには有棘赤血球はあるのか?

(回答) ChAc モデルマウスにおいても有棘赤血球は認められる。

質問 13) coiled-coil region をもっているが機能との関連は?

(回答) chorein は転写因子との関連がある可能性もあるが詳細は不明である。

質問 14) 脾臓でも chorein 発現が多いが、脾臓のどこに多く発現しているのか?

(回答) 免疫組織化学染色を行い、赤脾髄に免疫反応を強く認めた。これは赤血球に対する免疫反応と考えた。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。