

機関番号：32613

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500329

研究課題名（和文）ハンチントン病モデルマウスにおけるナトリウムチャンネルベータ4の発現抑制

研究課題名（英文）Downregulation of sodium channel $\beta 4$ subunit in Huntington Disease transgenic mice

研究代表者 小山 文隆 (OYAMA FUMITAKA)

工学院大学・工学部・教授

研究者番号：40194641

研究成果の概要（和文）：

ナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット ($\beta 4$) は主として線条体で発現し、ハンチントン病 (HD) トランスジェニックマウス (TG) では神経症状、病理所見がみられる前に発現が顕著に抑制される。 $\beta 4$ 発現抑制の分子メカニズムを明らかにするため、 $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus (蛍光タンパク質) を発現する TG 6 系統作成できた。その中で、線条体に Venus を高いレベルで発現する TG をハンチントン病 TG と交配し、ダブル TG を作製した。ダブル TG の線条体では $\beta 4$ プロモーターでドライブされ、 $\beta 4$ のエクソン/イントロン構造と 3' -UTR を欠損したトランスジーンから転写された Venus の発現が低下した。HD の原因である伸長ポリグルタミンの核内蓄積 (NA) が認められる神経細胞では Venus の転写は抑制されていた他方、NA のない神経細胞では発現低下は認められなかった。これらの結果は、HD モデルマウスにおける $\beta 4$ の発現抑制がそのプロモーターおよび核内伸長ポリグルタミン凝集物に依存する可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

Sodium channel $\beta 4$ ($\beta 4$) is a recently identified auxiliary subunit of the voltage gated-sodium channels. We identified $\beta 4$ as an EST that was significantly downregulated in the striatum of Huntington Disease (HD) model mice and patients. To define the molecular mechanism underlying the reduction of $\beta 4$ expression, we generated transgenic mouse line expressing Venus under the control of mouse $\beta 4$ promoter in brain. We established six mice lines exhibiting Venus expression primarily in striatum, cortex or both striatum and cortex. The mouse line exhibiting predominant Venus expression in striatum was crossed with HD model mice to generated double transgenic mice. The expression of Venus transcribed from $\beta 4$ promoter-Venus transgene lacking exon-intron structure and 3'-UTR as well as endogenous $\beta 4$ was downregulated in the striatum of double transgenic mice. Venus expression was reduced in nuclear accumulation (NA) of the expanded polyglutamine bearing cells, whereas it was preserved in non-NA bearing cells. These results indicate that downregulation of $\beta 4$ in HD model mice is dependent on its promoter and nuclear accumulation (NA) of the expanded polyglutamine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学・ 神経解剖学・神経病理学

キーワード：(1) ナトリウムチャンネルベータ4 (2) ハンチントン病 (3) モデルマウス
(4) 蛍光タンパク質 (5) ベータ4プロモーター (6) 遺伝子発現抑制

1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病 (Huntington disease; HD) は舞踏運動、精神および知能障害を特徴とする常染色体優性遺伝の神経変性疾患で、ハンチンチン遺伝子に存在する CAG トリプレットリピートの伸長 [翻訳産物は伸長ポリグルタミン (poly Q)] が原因で発症する。その神経病理学的特徴は線条体での神経細胞死である。

伸長ポリグルタミンを発現する HD トランスジェニックマウス (TG) では HD 様の症状が出現し、線条体の神経細胞にはユビキチン化された伸長ポリグルタミンからなる核内凝集体が形成される。核内凝集体には伸長ポリグルタミンと結合した転写因子が認められることから、伸長ポリグルタミンが直接転写を攪乱している可能性が考えられる。

我々は HD に関係する遺伝子を明らかにするため、HD TG を DNA マイクロアレイで解析し、HD TG および HD 患者の線条体 (HD で最も激しく障害される) で発現が顕著に低下する分子としてナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット ($\beta 4$) を同定した。

$\beta 4$ は HD TG に神経症状が現れる前から線条体で発現が低下し、ユビキチン化された伸長ポリグルタミン核内凝集体が認められる時期にはほとんど発現していなかった。他方、 $\beta 4$ の脊髄運動ニューロンでの発現は症状が現れた時期でも低下せず、核内凝集体もほとんど認められなかった。このことから、伸長ポリグルタミン凝集体と $\beta 4$ の発現低下には相関性がある。

2. 研究の目的

$\beta 4$ 発現抑制の分子メカニズムを明らかにするため、 $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus (蛍光タンパク質で、GFP の変異体) を発現する TG を作成する。次に、HD TG と交配した場合にその遺伝子発現が抑制するかどうか、さらに伸長ポリグルタミン核内凝集体と遺伝子発現抑制との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TG の作製

$\beta 4$ プロモーターでドライブされ、 $\beta 4$ のエクソン/イントロン構造と 3' -UTR を欠損したトランスジーンを作製した。このト

ランスジーンをマウス受精卵に注入し TG を得た。その中で、Venus の遺伝子を有し、実際に脳で、Venus を発現するマウスを選別した。次に HD TG と交配することで、ダブル TG を作製した。

(2) Venus のダブル TG での Venus の遺伝子発現抑制

ダブル TG の脳内で $\beta 4$ プロモーター制御下で転写された Venus の発現に抑制がかかるかどうかを Real-time PCR 法およびウエスタンブロット法で調べた。また、HD の原因である伸長ポリグルタミンの核内蓄積 (NA) のある神経細胞では Venus の転写が抑制されているかどうかを Venus の蛍光と特異抗体を用いた免疫組織化学方法で調べた。

4. 研究成果

(1) $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus を発現する TG の作製とその解析

$\beta 4$ 発現抑制の分子メカニズムを明らかにするため、 $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus を発現する TG を 6 系統作成できた。その中で、線条体に Venus を高いレベルで発現する TG をハンチントン病 TG と交配し、ダブル TG を作製した。ダブル TG の線条体では $\beta 4$ プロモーターでドライブされ、 $\beta 4$ のエクソン/イントロン構造と 3' -UTR を欠損したトランスジーンから転写された Venus の発現が低下した (図 1 A, B)。

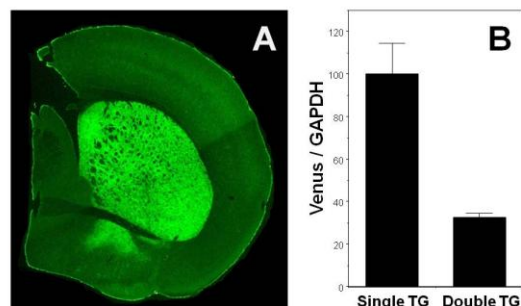


図 1. $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus を発現する TG の解析

A. Single TG より凍結切片を作製し、直接蛍光顕微鏡で観察した。Venus は線条体で強く

発現している。

B. シングル TG と HD TG を交配して作製したダブル TG の線条体では Venus mRNA の発現が抑制される。

(2) 伸長ポリグルタミンの核内蓄積 (NA) の遺伝子発現抑制との関係

HD の原因である伸長ポリグルタミンの核内蓄積 (NA) と Venus の発現の関係について検討した。NA の蓄積のある神経細胞では $\beta 4$ プロモーターでドライブされた Venus の転写は抑制されていた。また内在性の $\beta 4$ の発現も同様に抑制されていた。他方、NA の認められない神経細胞では Venus、内在性 $\beta 4$ の発現低下は認められなかった。

これらの結果は HD モデルマウスにおける $\beta 4$ の発現抑制がそのプロモーターおよび核内伸長ポリグルタミン凝集物に依存する可能性を示唆する。

現在 Venus を発現する神経細胞をフローサイトメーターで分離し、DNA マイクロアレイ法で解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Brackenbury, W. J., Calhoun, J. D., Chen, C., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., Ranscht, B., and Isom, L. L. (2010) Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and $\beta 4$ subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 2283-2288.
2. Patino, G. A., Claes, L. R., Lopez-Santiago, L. F., Slat, E. A., Dondeti, R. S., Chen, C., O'Malley, H. A., Gray, C. B., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., De Jonghe, P., Isom, L. L. (2009) A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. J. Neurosci. 29, 10764-10778.
3. Remme, C. A., Scicluna, B. S., Verkerk, A. O., Amin, A. S., Van Brunshot, S., Beekman, L., Deneer, V. H. M., Chevalier, C., Oyama, F., Miyazaki, H., Nukina, N., Wilders, R., Escande, D., Houlgatte, R., Wilde, A. A. M., Tan, H. L., Veldkamp, M. W., de Bakker, J. M. T., Bezzina, C. R. (2009) Genetically determined differences in sodium current characteristics modulate conduction

disease severity in mice with cardiac sodium channelopathy. Circulation Res. 104, 1283-1292.

4. Bauer, P. O., Wong, H. K., Oyama, F., Goswami, A., Okuno, M., Kino, Y., Miyazaki, H., and Nukina, N. (2009) Inhibition of rho-kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. J. Biol. Chem. 284, 13153-13164.
5. Kaminosono, S., Saito, T., Oyama, F., Ohshima, T., Asada, A., Nagai, Y., Nukina, N., and Hisanaga, S. (2008) Suppression of mutant huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. J. Neurosci. 28, 8747-8755.
6. Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H. and Nukina, N. (2008) Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. EMBO J. 27, 827-839.

[学会発表] (計 4 件)

1. F. Oyama, H. Miyazaki, M. Yamada, M. Kurosawa, Y. Kino and N. Nukina Correlation of nuclear accumulation of expanded polyglutamine and dysregulation of sodium channel $\beta 4$ subunit in Huntington disease transgenic mice The 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2009年10月23日、アメリカ合衆国、ハワイ州ホノルル市
2. 小山文隆、宮崎晴子、山田みず樹、黒沢大、貫名信行 ポリグルタミン病の治療ターゲット探索のためのトランスジェニックマウスの開発・解析に関する研究 厚生労働科学研究費補助金 運動失調症に関する調査研究 平成 20 年度班会議 2009年1月16日 東京
3. F. Oyama, H. Miyazaki, M. Kurosawa, M. Yamada and N. Nukina Downregulation of sodium channel $\beta 4$ subunit in Huntington Disease transgenic mice. The 58th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics 2008年11月12日 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 フィラデルフィア市
4. 小山文隆、宮崎晴子、黒沢大、山田みず樹、貫名信行 Downregulation of sodium channel $\beta 4$ in Huntington Disease transgenic mice. 第 31 回日本神経科学大会、第 31 回大会 2008年7月16日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 文隆 (OYAMA FUMITAKA)

工学院大学・工学部・教授

研究者番号：40194641