

## 脊髄小脳変性症の分子病態機序の解明

小野寺 理\*

要旨：神経細胞の機能を維持するために、神経細胞の内部環境を維持する品質管理機構の重要性が明らかとなってきた。とくに蛋白質と核酸の品質管理機構と神経変性疾患との関係が注目されている。優性遺伝性脊髄小脳変性症の代表的な疾患であるポリグルタミン病では、蛋白質の品質管理機構の異常が推察されている。本症では、増大したポリグルタミン鎖が原因となるが、増大ポリグルタミン鎖の細胞傷害性を持つ構造体は明らかではなかった。われわれは、近接した蛍光物質間でおこる蛍光共鳴エネルギー移動現象を利用し、増大ポリグルタミン鎖のオリゴマー状態を可視化する方法を開発した。本法により、増大ポリグルタミン鎖が、平行βシート構造、もしくは順方向性のシリンダー構造のオリゴマーを形成することを示した。また、オリゴマーが、もっとも細胞傷害性が高い構造体であることを示した。一方、劣性遺伝性脊髄小脳変性症の病態機序として、核酸品質管理機構の破綻が注目を集めている。神経細胞のDNAは活性酸素や化学物質により常に障害をうけDNA損傷が生じている。損傷部の3'末端はリン酸基、ホスホグリコール酸基または不飽和アルデヒド基となっており、修復のためには水酸基にエンド・プロセッシングされる必要がある。われわれは劣性遺伝性脊髄小脳失調症の原因遺伝子アブラタキシンの生理機能を検討し、この蛋白質が、*in vitro*において、3'末端のリン酸基およびホスホグリコール酸基を除去し水酸基とする活性を持ち、これにより損傷部のエンド・プロセッシングに関与していることを示した。このことから、本症の病態機序としてDNA損傷の蓄積があることを示し、脊髄小脳変性症での核酸品質管理機構の重要性を明らかにした。

(臨床神経, 49:1-8, 2009)

Key words: ポリグルタミン病, アブラタキシン, オリゴマー, 一本鎖DNA切断, 品質管理機構

## はじめに

20世紀の遺伝性神経変性疾患の神経学には、疾患概念の確立とその原因遺伝子の単離という明快なテーマがあった。このテーマは大きな成功をおさめ、1993年にハンチントン病の原因遺伝子が同定されたのを始めとし、遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子はほぼ同定された。しかし、その後、遺伝性神経変性疾患の病態解明は混沌とし、未だ患者さんの治療に還元できる成果に乏しい。今、私達は、神経変成を止める、もしくは癒す成果につなげるために、何を解決すればいいのか、遺伝子同定に変わる、実現可能な、明確な目標を設定する必要がある。ポストゲノム時代の変性疾患研究に対する明確な目標の設定という命題は、難しい、しかしきわめて創造的な仕事である。これは、多くの若い神経内科医の英知を集め、研ぎ澄まされていく必要がある。本稿では、ポストゲノム時代の変性疾患研究の現状と、その問題の一端を、脊髄小脳変性症の分野から提起し、若い医師が、神経変性疾患の治療という未踏の領域に向かうささやかな道標となることを希望する。

## 1 分子病態機序からの脊髄小脳変性症の再考

脊髄小脳変性症、欧米では脊髄小脳失調症という名称がよく使われる。しかし、この名称は、臨床面からも、病態面からも正確性に欠け、本症の治療研究の一部をミスリーディングしている。歴史的に遺伝性小脳変性疾患は、小脳症状を主体とするHolmes型と、変性領域に広がりをもせるMenzel型に大別されてきた。しかし、分子生物学的研究の結果、原因遺伝子毎に分類されるにいたっている。一方、分子病態機序からは、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症等が一部の遺伝性脊髄小脳変性症と同様の分子病態機序、つまり増大したポリグルタミン鎖によりひきおこされることが示された。疾病における分類は、疾患の理解と治療を目標とした物である。疾患のなりわいを分子病態からみられるようになった今、その病態や病理、臨床所見から新たに再構築する視点も必要ではないだろうか。そのような分類が、本症の治療戦略を明確化し、研究の集中、さらに企業参入による治療方法開発への加速化につながると考える。

\*Corresponding author: 新潟大学脳研究所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分子神経疾患資源解析学分野  
〔〒951-8122 新潟市旭町通1-757〕  
新潟大学脳研究所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分子神経疾患資源解析学分野  
(受付日: 2008年10月3日)

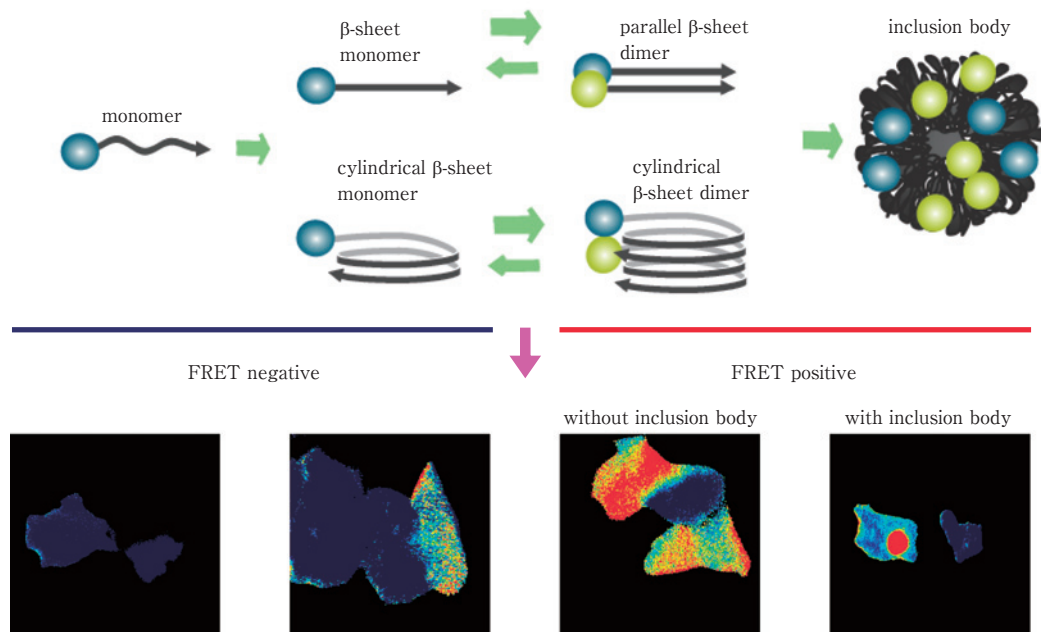


Fig. 1 Imaging for polyglutamine oligomers using fluorescence resonance energy transfer confocal microscopy

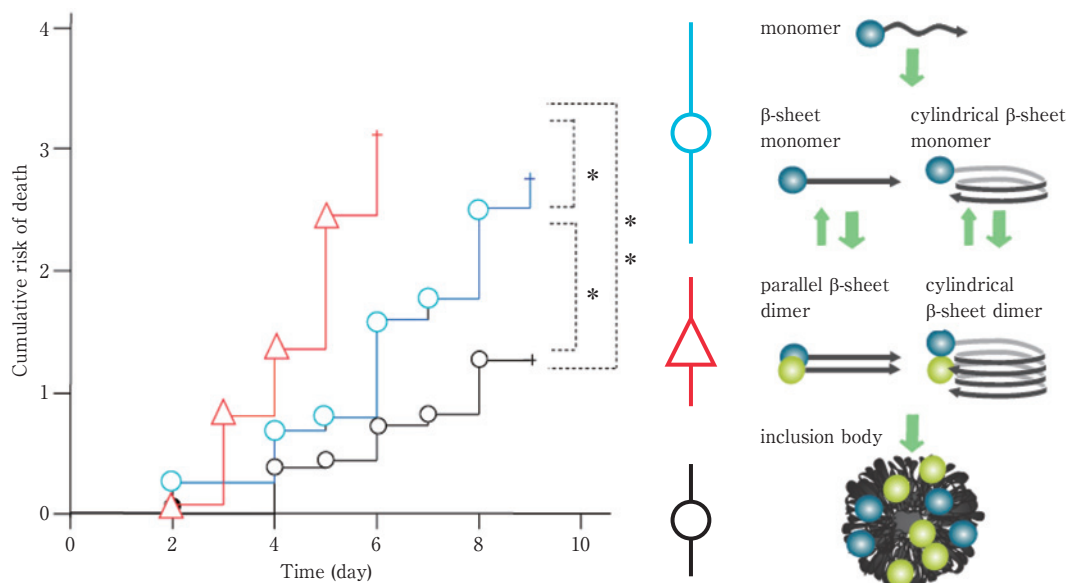
Upper panel; Model for soluble polyglutamine (polyQ) oligomer formation and fluorescence resonance energy transfer (FRET) signals. Nontoxic polyQ monomers transform into toxic  $\beta$ -sheet polyQ monomers and/or toxic cylindrical  $\beta$ -sheet monomers. The toxic  $\beta$ -sheet polyQ monomers assemble into oligomers in a parallel orientation. The cylindrical  $\beta$ -sheet monomers assemble into oligomers in a head-to-tail orientation. PolyQ proteins may shift between these two structures. Blue balls, mCFP; yellow balls, mYFP; gray arrows, polyQ. Lower panel; FRET microscopy shows polyQ oligomers in living cells. FRET signals were observed in COS7 cells transfected with polyglutamine repeats- CFP/YFP. Corrected FRET signal intensity (cFRET) and the FRET-to-donor fluorescence ratio (cFRET/ICFP: FRET signal intensity) were calculated. The pseudocolor scale corresponds to the cFRET/ICFP values, i.e., FRET signal intensity, from 0.20 (blue) to 0.50 (red). Blue cells indicate FRET-negative cells and red cells indicate FRET-positive cells. Cell with red circle (right panel) indicate cell with aggregate. (modified from Takahashi T, et al: Hum Mol Genet 2008; 17: 345-356.)

たとえば脊髄小脳変性症の治療を考えると、小脳症状を主体とするものでは、Purkinje細胞をターゲットとして、チャンネル機能の調節によるカルシウムホメオスタシスの調整を治療戦略とし、同一の疾患群として再構築しうる<sup>1)</sup>。一方、ポリグルタミン病に関しては、機能よりは、その変性の基盤となる機序を対象とした戦略が重要であり、ハンチントン舞踏病など同一の疾患群として再構築しうる<sup>2)3)</sup>。さらに劣性遺伝性脊髄小脳変性症では、酸化ストレスによる、ミトコンドリアや核の核酸傷害が病態機序として注目され、これが治療のターゲットとなる疾患群となる可能性を秘めている<sup>4)~8)</sup>。稀少疾患に対し、企業の参入が難しい現状で、できるだけ汎用性のある、広い視点に立った疾患単位の再構築と治療戦略が必要と考える。本稿では脊髄小脳変性症に関するわれわれの最新の研究成果を、“蛋白質品質管理機構異常症としてのポリグルタミン病”、“核酸品質管理機構異常症としての劣性遺伝性脊髄小脳変性症”の2つの分子病態を軸として紹介する。

## 2 ポリグルタミン病のどのような構造が何をひきおこすか：治療ターゲットに向かって

### 1) ポリグルタミン病における凝集体仮説

SCA1, 2, 3, 6に加え、HD, DRPLA, SCA17, SBMAが遺伝子内のポリグルタミン鎖の増大によりひきおこされる疾患群であり、ポリグルタミン病と称される。この15年、脊髄小脳変性症の研究は、ポリグルタミン病が中心となり進められてきた。ポリグルタミン病には、増大ポリグルタミン鎖の長さに応じた次の二つの特徴がある。一つは疾患重症度の長さ依存性であり、もう一つは閾値の存在である。ポリグルタミン病の病態機序を説明する理論は、この二つの特徴を説明することが求められる。これらの特徴が重要である理由は、この特徴が本症の治療の可能性を示唆する点にある。たった一アミノ酸が疾患の重症度を大きく変化させる事実は、この長さ依存性



**Fig. 2** Cytotoxicity of soluble polyQ oligomers in neuronally differentiated cells and model for soluble polyQ oligomer formation and FRET signal intensity. Hazard analysis demonstrates that soluble polyQ oligomers are significantly associated with an increased risk of death among neuronally differentiated cells transfected with expanded polyQ. Open red triangles, FRET-positive cells without IBs; open blue circles, cells without FRET signals; open black circles, cells with IBs. Asterisk indicates  $P < 0.002$ . Double asterisk indicates  $P < 0.00001$ . (modified from Takahashi T, et al: Hum Mol Genet 2008; 17: 345-356.)

の細胞傷害機序を制御することにより、本症の重症度が変わることが期待される。また閾値の存在は、ポリグルタミン鎖長が閾値を超えたときに獲得する性質の存在を示唆し、それをターゲットとする治療方法の可能性を示す。

われわれは、本症の治療ターゲットを決定するため、この長さ依存性、閾値依存性の増大ポリグルタミン鎖の細胞傷害性の解明をテーマとして研究を進めてきた。とくに、増大ポリグルタミン鎖が、いつ、どのように、その細胞傷害性を獲得するかという点に関心をもっている。そのためには第一に長さが何をひきおこすかを明らかにする必要がある。長さがおこす変化に関する仮説として、大きく構造変化と分解抵抗性が挙げられる。分解抵抗性に関しては、構造変化をひきおこすことによる結果である可能性もある。

ポリグルタミン鎖が長さ依存性に閾値をもって構造変化、とくに $\beta$ シート構造をとるという仮説は、精製ペプチド、もしくは精製融合蛋白をもちいた *in vitro* の構造解析研究で支持されている<sup>9)~12)</sup>。一方、ポリグルタミン鎖は長さ依存性に閾値をもって凝集体を形成する。このためポリグルタミン鎖の細胞傷害性を凝集体にもとめる仮説が提唱されてきた。凝集体が直接的に細胞を傷害するという考え方。もしくは他の蛋白質を巻き込んで間接的に細胞を傷害するという考え方である<sup>13)</sup>。しかしモデルマウスでの検討により神経症状が凝集体形成に先行することが示され、凝集体形成は必ずしも発症に必須ではないことが示されてきた<sup>14)</sup>。さらに Finkbeiner らは、培養神経細胞を経時的に観察し、凝集体形成がポリグルタ

ミンによる神経細胞死に対してむしろ防御的に働くことを示した<sup>15)</sup>。このことから凝集体に変わる細胞傷害性構造体が探されていた。

## 2) ポリグルタミン鎖による多量体

それでは、細胞傷害性を示すのはどのような構造体なのであろうか？以前より、ポリグルタミン鎖はランダムに凝集体を形成するのではなく、一定の方向性をもった多量体もしくは二量体を形成したのちに凝集すると考えられてきた<sup>13)16)</sup>。本稿では、これを凝集体と区別する意味合いで可溶性多量体と称する。このような構造物の存在は精製ペプチドや精製蛋白をもちいた研究でも示唆されていた<sup>17)~19)</sup>。しかし、生細胞内での存在の有無、また細胞障害性との関連については明らかになっていなかった。われわれはまず可溶性多量体の存在を生細胞で確認することを目標に設定し、その手法として、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) をもちいた。

FRET は二つの蛍光分子 (ドナーとアクセプターという) が十分に近接し、ドナーの蛍光スペクトルと、アクセプターの励起スペクトルの間に重なりがあるばあい、ドナーを励起することによりドナーの発光がおこる前に、そのエネルギーがアクセプターを励起し、ドナーの発光の代りにアクセプターの発光をみとめる現象である。この手法によりオンゲストローム単位で二つの蛍光分子が近接しているかどうかを判定することができる。注意点として、二量体を形成していても、立体構造によっては蛍光分子が近接せず FRET 値がえられない

可能性があり、陰性のばあいの評価は慎重である必要がある。

ポリグルタミン鎖による二量体の立体構造に関しては4種類のモデルが提唱されている。直線モデルとシリンダーモデルがあり、直線モデルにはPerutzが初期に提唱したanti-parallelモデル(polar zipperモデル)と順方向(parallel)が、さらにPerutzが最後に提唱したシリンダーモデルとしてhead to tailとhead to headのモデルがある<sup>10)20)21)</sup>。われわれはFRETによりこれらの構造を区別することができるよう、ポリグルタミン鎖の同じ側(N末側もしくはC末側)に蛍光蛋白をつけた融合蛋白と、反対側に蛍光蛋白をつけた融合蛋白を用意し、複数の組合せでFRET値を観察した。直線モデルのばあいparallelであれば同側の組合せで陽性シグナルがえられanti-parallelであれば反対側の組合せでシグナルがえられる。またシリンダーモデルのばあい、head to headのばあいは、同側の組合せでは蛍光蛋白が障害となりFRET陽性の二量体が形成できない。またhead to tailのばあいは、同側の組合せでは陽性のFRET値がえられるが、反対側の組合せでは蛍光蛋白間の距離が遠くなりFRET値が小さくなると想定した。

実際、凝集体では、いずれの組合せでもFRET値は強陽性を示しFRET観察により構造を想定することが可能なことが示された<sup>22)</sup>。一方、凝集体を形成していない領域では、蛍光蛋白を同側に付加した組合せでのみ、陽性のFRET値が観察された。この結果から、直線モデルであればparallel構造、シリンダーモデルであればhead to tailのシリンダー構造を取っていると推定した(Fig.1)。本手法により、生細胞内でポリグルタミン鎖がある一定の方向性をもって多量体を形成することを示し、ポリグルタミン鎖の、単体、多量体、凝集体を区別して可視化した。

本手法をもちいて、神経系細胞にてポリグルタミン鎖の構造毎の細胞死に対する影響を検討した。その結果、FRET陽性でかつ凝集体を持たない状態のポリグルタミン構造がもっとも細胞死を惹起しやすいこと、また凝集体を形成した細胞はもっとも長命であることを示した(Fig.2)<sup>22)</sup>。これにより、一細胞レベルで多量体のポリグルタミン鎖が細胞傷害性を持つことを示した。われわれの結果やペプチドや精製蛋白の結果から、この多量体は、単量体、二量体を頻回に行き来していると想定している。この状態のポリグルタミン鎖が細胞にとって障害性を持つと考える<sup>17)19)22)</sup>。

### 3) 多量体仮説の証明に向けて

近年、蛋白凝集体をみとめる神経変性疾患では、多量体が細胞傷害性を持つという考えが主流になってきている<sup>23)24)</sup>。しかし、われわれは、この凝集体か、多量体かという論争は必ずしも排他的である必要はないと考えている。一疾患一メカニズムに限る必要はなく、大きな凝集体はそれだけで物理的な障害をおこす可能性がある。増大ポリグルタミンにともなう様々な特性が、本症の初期、晩期に、それぞれ特有の細胞傷害性をひきおこしていく可能性を否定しない。しかし、重要なことは、モデル動物の結果から、症状が凝集体形成に先行するという事実であり、その原因として、多量体の細胞傷害性が考え

られるということである。この多量体がひきおこす神経機能障害の本質が今後の大きなテーマとなると考えている。

ポリグルタミン病は、蛋白質の構造異常が疾患をひきおこすというテーゼにおいて、研究を進めやすいモデルである。今後、多量体のひきおこす細胞傷害機序の解明、モデル動物、患者組織での多量体の単離、が次の命題と考えている。最大のテーマは、この構造がひきおこす細胞傷害の本質である。傷害性構造物を可視化しえたことで、今後、これにひき続きおこる細胞傷害性の時間軸を明らかにすることができる。また、ヒトおよびモデル動物から、実際に構造変化をともなったポリグルタミン断片、多量体を抽出し示す必要がある<sup>25)</sup>。また、構造変化に当たっては断片化を必要とすると考えられるが、その証明。さらに、ポリグルタミン鎖が病理像で蓄積している事実は、明確に、それが分解抵抗性を持つことを示すが、その機序、細胞が防御的に凝集体の形成を開始する機序につき検討が必要である。一つ一つのステップは小さく、治療までの道のりを考えるとくじけそうになる。しかし手順をおった地道な努力が、現場に還元されるその日に、必ずつながると信じている。

## 3 神経細胞特異的損傷核酸修復システムはあるか： アラタキシン研究が広げた世界

### 1) アラタキシンの同定とDNA切断修復機構

神経変性疾患の臨床研究の難しいところは、臨床経過が長期にわたり、時としてその全経過が一臨床医の時間をこえる点にある。本邦で長年、フリードライヒ失調症との異同が論じられていた“眼球運動失行と低アルブミン血症をともなう早発型失調症(AOA1/EAOH)”は、幼少期では眼球運動失行、成人期では低アルブミン血症とことなる臨床症状を示し、小児科領域と神経内科領域で別々の疾患として報告されていた。本症の疾患概念は、新潟大学神経内科の歴史の上に確立された。さらに2001年辻らのグループは、本症の原因遺伝子を単離し、アラタキシン(APTX)と名付けた<sup>26)</sup>。

アラタキシンはポリヌクレオチドキナーゼ3'ホスファターゼ(PNKP)との相同性からDNA修復における生理機能の存在が推察され、さらに佐野らにより一本鎖DNA切断修復(single-strand break repair : SSB)に関与する蛋白質の足場蛋白となるXRCC1と結合することが示された<sup>27)28)</sup>。一方、高嶋らのグループにより、同様に一本鎖DNA切断修復に関与するTDP1の遺伝子異常でAOA1/EAOHと類似の神経疾患spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy(SCAN1)をひきおこすことが報告された<sup>29)</sup>。これらの疾患は、従来の二本鎖DNA切断修復機構の異常による疾患とことなり、神経系に局限した変性を示し、神経細胞特異的なDNA切断修復機構の存在を示唆した。もともと、神経細胞では、大量に産生される活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)由来のDNA損傷を修復するために特別な修復機構の存在が想定されていた。それは細胞分裂非依存性のSSBRに関連すると考えられていた。そのため、これらの疾病は多くの研究者の興味を引き、主要ジャーナルで、脊髄小脳変性症とSSBRについ

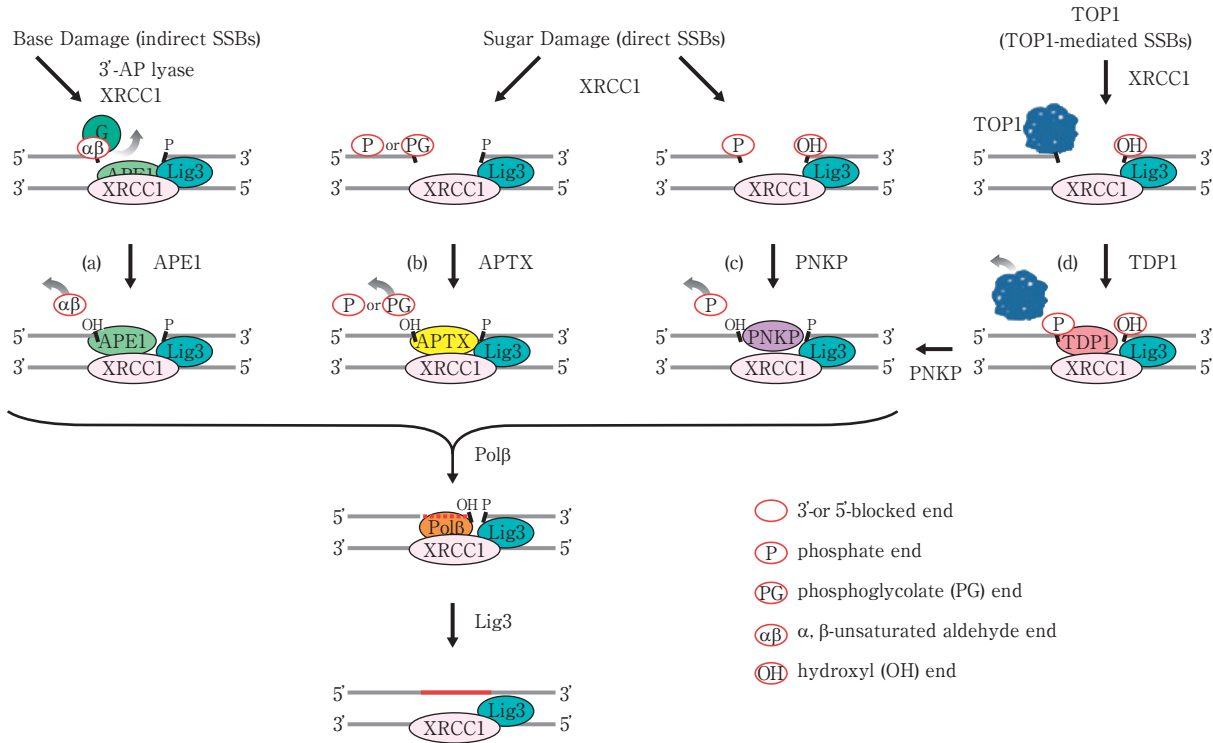


Fig. 3 Model of aprataxin-dependent SSB repair pathway.

Four DNA single strand break (SSB) repair pathways defined by the type of enzyme that removes damaged 3'-ends are shown. SSBs can arise directly from sugar damage or TOP1 cleavage or indirectly from base damage. Red circles denote the damaged ends, the specific types of which are dependent on the source of the break. The processing of damaged 3'-ends is mediated by either APE1 (a), aprataxin (APTAX) (b), PNKP (c) or TDPI (d), depending on the type of damaged 3'-end. These damaged 3'-ends should be converted to 3'-OH ends for subsequent repair processes. In the pathway for repairing indirectly induced SSBs, damaged 3'-α, β unsaturated aldehyde ends are removed by APE1 (a). In the pathway for repairing directly induced SSBs, 3'-PG ends might be removed by aprataxin (b) and 3'-phosphate ends might be removed by aprataxin or PNKP (b, c). In the pathway for repairing TOP1-mediated SSBs, TOP1 covalent complexes at the 3'-ends are restored to 3'-phosphate ends by TDPI (d). After removing damaged 3'-ends, Pol β fills the gap (red dot line). Lig3 seals the single-strand nick (red line). (modified from Takahashi T, et al: Nucleic Acids Res 2007; 35: 3797-3809)

て論じられるにいたった<sup>5)~8)</sup>。

神経細胞の DNA は活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) などの内的要因や、化学物質などの外的要因により頻回に損傷を受けている。この DNA 損傷をすみやかに修復するために、われわれは少なくとも次の 4 つの修復機構をもつ、塩基除去修復 (base excision repair : BER)、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER)、相同組み換え (homologous recombination : HR)、非同末端再結合 (nonhomologous end joining : NHEJ) による修復機構である。神経細胞は、脳脊髄関門や骨により種々の DNA 障害因子から守られている。そのため DNA 損傷の主因は内因性の ROS と考えられる<sup>30)</sup>。神経変性における APTX の役割が注目を集めたのは、この神経細胞特異的な DNA 切断修復機構の一端を、この蛋白質が担う可能性があったためである。何よりも、DNA 修復という基盤的なシステムの中に、神経特異的なシステムが存在するという説は、神経細胞死を考える上で魅力的な説

である。

## 2) アプラタキシンの機能

この仮説に基づき、APTAX が SSBR でどのような活性を持つかについて研究を進めた。ROS による SSB には、ROS が直接糖鎖を切断することによるもの (direct SSB) と、ROS による塩基損傷を BER 機構により修復する過程で生じるもの (indirect single strand breaks : indirect SSB) がある (Fig. 3)<sup>31)</sup>。SSBR は切断損傷認識と X-ray repair cross-complementing group 1 protein (XRCC1) による足場形成、切断部 3'末断端を水酸基、5'末断端をリン酸基に変換するエンド・プロセッシング、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成、DNA リガーゼによる切断部の連結のステップを経て修復される<sup>31)</sup>。DNA の連結反応は、DNA リガーゼの触媒により、切断部 5'末断端へ AMP (adenosine monophosphate) 基が付加され、その後、3'末断端の水酸基の接触により AMP 基が除去されることによりおこなわれる。しかし 3'末断端が水酸基でな



いばあい、この連結反応が阻害され、5'末断端に AMP 基が残存し、さらに修復反応を阻害する<sup>32)</sup>。実際、糖鎖損傷や塩基損傷の結果生じる SSB では3'末断端は水酸基以外の断端に修飾されている。糖鎖損傷では、リン酸基またはホスホグリコール酸 (phosphoglycolate : PG) 基となり、塩基損傷では、不飽和アルデヒド基またはリン酸基となる<sup>33)</sup>。ポリメラーゼ、リガーゼ反応のためには、3'末断端が水酸基、5'末断端がリン酸基である必要があり、これらの修飾をうけた3'末、5'末断端のエンド・プロセッシングが必要となる。

われわれは、APTX がこのエンド・プロセッシングに関与している可能性について検討し、APTX が *in vitro* において DNA 3'末断端のリン酸基および PG 基を除去し水酸基とする活性を有することを示した<sup>34)</sup>。また Ahela らは APTX が DNA 5'末断端の AMP 残基を除去しリン酸基とする活性があることを示した<sup>32)</sup>。これらの結果から、APTX は SSBR において切断端のエンド・プロセッシングに関与することを示した (Fig. 3)。本症では、本遺伝子の欠失により、SSB の蓄積が生じると考えている。

### 3) 神経細胞の核酸品質維持機構

APTX の単離とその役割の解明は、神経変性機序に、核酸の品質管理機構異常によるものがあることを示した。この事は、神経変性機序に DNA 品質管理という新たな考えを提唱した点で新しい。神経系に、特殊な DNA 修復機構が存在する可能性は興味深く、また、それが存在するとすれば SSBR に由来する物であろう。核酸の品質管理機構と神経変性の関連は、古くて新しい問題である<sup>35)36)</sup>。パーキンソン病におけるミトコンドリア DNA の障害、またアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症においても DNA 障害が唱えられ、DNA 障害による転写障害、さらにそれに励起される細胞周期リエントリーによる神経細胞死の機序が唱えられてきている。しかし、いずれも、確証にはいたっていない<sup>7)35)37)</sup>。

しかし、本症の病態機序が真に SSBR の障害に由来するかについては、まだ検討を必要とする。まず第一に、二本鎖 DNA 修復機構の異常を来す疾患の多くで、同様に、小脳を中心とする神経変性が報告されている<sup>4)38)</sup>。今の知識ではこれらの蛋白質の、神経細胞での役割については混沌としており、神経系で新たな役割を担っている可能性もある。また、当初、TDPI にもなう SSBR の異常が唱えられた SCAN1 であるが、現在にいたるまで SCAN1 は 1 家系 1 変異の報告しかなく、厳密には TDPI の機能異常による疾患と断定できない。また、その後の SCAN1 関連変異 TDPI の解析から、SCAN1 は、この特別な変異体のみがもつ特性による可能性が指摘されている<sup>39)</sup>。このため、SCAN1 の存在を根拠に一本鎖 DNA 切断修復異常による神経変性疾患の存在を一般化するのには慎重である必要がある。さらに、AOA1/EAOH は ataxia with oculomotor apraxia type 2 や ataxia-telangiectasia-like disorder と臨床症状が類似している<sup>40)41)</sup>。現在の所、これらの原因遺伝子は二本鎖 DNA 修復機構との関連が唱えられており APTX との接点は見えてこない<sup>4)38)40)42)</sup>。これらの疾患の原因遺伝子と APTX が神経細胞で共通の生理機構を担っている

のであれば、神経変性過程の新たな機構の解明につながる可能性がある。それが既報の機構にふくまれるのか、まったく新しい機構であるのか神経の仕組みをふくんだ大きな命題となって行くであろう。またいずれにしても ROS による核酸障害がその背景にあるとするのならば ROS の産生を押さえる薬剤が治療薬として有力視されていくのではないだろうか<sup>43)</sup>。

## 終わりに

神経変性機序には神経細胞の特殊性が大きくかかわっていることは明白である。“分裂”を、一つの細胞の死と再生と考えれば、神経細胞は、“分裂しない”という、その一点で、きわめて特殊である。分裂は細胞の再生にきわめて重要であり、かつ必須の機構である。分裂細胞は、その機構の維持に、膨大なエネルギーをつかって、分裂という方法を選んだ。分裂細胞では細胞分裂にともなって核酸が効率よく修復され、修復できない細胞は除去される。これに対し、神経細胞は、分裂能を捨てることにより、その細胞に、獲得した能力を長期に保持する能力を持った。しかし同時に細胞内環境の維持において、多くの不利益を持つこととなった。そのため、神経細胞では、分裂細胞とはことなる特別な細胞内環境維持機構を保有するにいたったとは考えられないだろうか。神経変性疾患の多くが、加齢にともなってひきおこされることを考えると、蛋白質や核酸の品質管理の障害により、時間と共に障害が蓄積するという仮説は大変興味深い。神経変性を考えるうえで、神経細胞特異的な細胞内環境維持機構の解明が、大きなテーマとなると考える。一人でも多くの医師がこの解明に立ち向かい、ポストゲノム時代の神経変性研究が、治療という目標を制圧できることを期待する。

謝辞：本稿に紹介したわれわれの研究成果は、すべて新潟大学神経内科および脳研究所の諸先輩方、同僚、第4研究室の皆さんとの共同の研究でえられた物です。とくに五十嵐修一先生、高橋俊昭先生、ご指導いただきました宮武正教授、辻省次教授、西澤正豊教授に深謝いたします。またこのような仕事をする期会を与えていただきました多くの患者様とご家族に心から感謝いたします。今後、今までの先達のように、少しでも次の世代につなげる足場を作っていく仕事を進めていくことを誓い、本稿を終わらせていただきます。

## 文 献

- 1) Walter JT, Alvina K, Womack MD, et al: Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nat Neurosci* 2006; 9: 389—397
- 2) 高橋俊昭, 小野寺理: 脊髄小脳変性症の病態機序 ポリグルタミン病の治療戦略について. *神経研究の進歩* 2006; 50: 457—463
- 3) 永井義隆, ポピエル明子, 藤掛伸宏ら: ポリグルタミン病に対する治療戦略. *BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩* 2007; 59: 393—404

- 4) 小野寺理：感覚神経細胞と Purkinje 細胞に共通する神経変性の原因はあるのか—常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症の解明から学ぶこと. 神経研究の進歩 2004 ; 48 : 751—760
- 5) Rass U, Ahel I, West SC: Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell* 2007; 130: 991—1004
- 6) Caldecott KW: DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell* 2003; 112: 7—10
- 7) Caldecott KW: Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 619—631
- 8) McKinnon PJ, Caldecott KW: DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 37—55
- 9) Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, et al: Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 1997; 90: 549—558
- 10) Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, et al: Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 5355—5358
- 11) 小野寺理：異常蛋白処理機構とポリグルタミン病. 神経研究の進歩 2002 ; 46 : 669—679
- 12) 貫名信行, 田中元雅：ポリグルタミン含有蛋白の構造変化 マックス・ベルツ最後の挑戦. 神経研究の進歩 2002 ; 46 : 661—668
- 13) Ross CA, Poirier MA: Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 891—898
- 14) Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, et al: Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998; 95: 55—66
- 15) Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, et al: Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004; 431: 805—810
- 16) Ross CA, Poirier MA, Wanker EE, et al: Polyglutamine fibrillogenesis: the pathway unfolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1—3
- 17) Behrends C, Langer CA, Boteva R, et al: Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. *Mol Cell* 2006; 23: 887—897
- 18) Wacker JL, Zareie MH, Fong H, et al: Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 1215—1222
- 19) Schaffar G, Breuer P, Boteva R, et al: Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell* 2004; 15: 95—105
- 20) Perutz MF, Finch JT, Berriman J, et al: Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5591—5595
- 21) Lathrop RH, Casale M, Tobias DJ, et al: Modeling protein homopolymeric repeats: possible polyglutamine structural motifs for Huntington's disease. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1998; 6: 105—114
- 22) Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, et al: Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 345—356
- 23) Kaye R, Head E, Thompson JL, et al: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003; 300: 486—489
- 24) Haass C, Selkoe DJ: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 101—112
- 25) Li M, Chevalier-Larsen ES, Merry DE, et al: Soluble androgen receptor oligomers underlie pathology in a mouse model of spinobulbar muscular atrophy. *J Biol Chem* 2007; 282: 3157—3164
- 26) Date H, Onodera O, Tanaka H, et al: Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 2001; 29: 184—188
- 27) Date H, Igarashi S, Sano Y, et al: The FHA domain of aprataxin interacts with the C-terminal region of XRCC1. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1279—1285
- 28) Sano Y, Date H, Igarashi S, et al: Aprataxin, the causative protein for EAOH is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol* 2004; 55: 241—249
- 29) Takashima H, Boerkoel CF, John J, et al: Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 2002; 32: 267—272
- 30) Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR: DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutat Res* 2007; 614: 24—36
- 31) Caldecott KW: DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 875—882
- 32) Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, et al: The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* 2006; 443: 713—716
- 33) Hazra TK, Das A, Das S, et al: Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6: 470—480
- 34) Takahashi T, Tada M, Igarashi S, et al: Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with damaged 3'-phosphate and 3'-

- phosphoglycolate ends. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 3797—3809
- 35) Fukui H, Moraes CT: The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci* 2008; 31: 251—256
- 36) Martin LJ: DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 377—387
- 37) Lavin MF, Kozlov S: DNA damage-induced signalling in ataxia-telangiectasia and related syndromes. *Radiother Oncol* 2007; 83: 231—237
- 38) 他田正義, 横関明男, 小野寺理 : DNA 修復の異常と劣性遺伝性失調症. *実験医学* 2007 ; 25 : 1988—1994
- 39) Hirano R, Interthal H, Huang C, et al: Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? *EMBO J* 2007; 26: 4732—4743
- 40) Taylor AM, Groom A, Byrd PJ: Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1219—1225
- 41) Le Ber I, Bouslam N, Rivaud-Pechoux S, et al: Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients. *Brain* 2004; 127: 759—767
- 42) Suraweera A, Becherel OJ, Chen P, et al: Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. *J Cell Biol* 2007; 177: 969—979
- 43) Di Prospero NA, Baker A, Jeffries N, et al: Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2007; 6: 878—886

### Abstract

#### Molecular mechanism for spinocerebellar ataxias

Osamu Onodera, M.D., Ph.D.

Department of Molecular Neuroscience, Resource Branch for Brain Disease Research,  
Brain Research Institute, Niigata University

Recent advance of molecular biology reveals that quality control of intracellular environment takes an important role for maintaining the neuronal function. One is a quality control of protein and another is a quality control of nucleotide. Polyglutamine disease is a disease which caused by a failure of quality control of protein. Expanded polyglutamine repeats result in neurodegenerative disorders, but their cytotoxic structures remain to be elucidated. We have applied fluorescence resonance energy transfer analysis to clarify the cytotoxicity of soluble polyglutamine oligomers. By using this method we revealed that polyglutamine monomers assemble into oligomer in a parallel  $\beta$ -sheet or a head-to-tail cylindrical  $\beta$ -sheet manner. We distinguished oligomers from monomers and inclusion bodies in a single living cell. Survival assay of neuronally differentiated cells revealed that cells with soluble oligomers died faster than those with inclusion bodies or monomers. These results indicate that a formation of oligomers is an essential mechanism underlying neurodegeneration in polyglutamine-mediated disorders. About the quality control of nucleotide in neuron, DNA single-strand breaks were continually produced by endogenous reactive oxygen species or exogenous genotoxic agents. These damaged ends possess damaged 3'-ends including 3'-phosphate, 3'-phosphoglycolate, or 3'- $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehyde ends, and should be restored to 3'-hydroxyl ends for subsequent repair processes. We have demonstrated by in vitro assay that aprataxin, the causative gene product for early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia/ataxia with oculomotor apraxia type 1 (EAOH/AOA1), specifically removes 3'-phosphoglycolate and 3'-phosphate ends at DNA 3'-ends, but not 3'- $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehyde ends. The findings indicate that aprataxin removes blocking molecules from 3'-ends, and that the accumulation of unrepaired DNA single-strand breaks with damaged 3'-ends underlies the pathogenesis of EAOH/AOA1. The findings will provide new insight into the mechanism underlying degeneration and DNA repair in neurons. Taken together, these results indicate that the quality control of protein and nucleotide is crucial to understand the neurodegenerative disorder.

(Clin Neurol, 49: 1—8, 2009)

**Key words:** polyglutamine disease, aprataxin, oligomer, DNA break, quality control system