



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

**札幌医科大学学術機関リポジトリ *ikor***

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title	Aprataxin 遺伝子変異 (689insT) が培養ラット後根神経節の髄鞘形成に及ぼす影響について
Author(s)	堀本, 佳誉; 菊池, 真; 館, 延忠; 小塚, 直樹
Citation	札幌医科大学保健医療学部紀要, 第 13 号: 21-27
Issue Date	2011 年
DOI	10.15114/bshs.13.21
Doc URL	<a href="http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6362">http://ir.cc.sapmed.ac.jp/dspace/handle/123456789/6362</a>
Type	Journal Article
Additional Information	
File Information	

- ・コンテンツの著作権は、執筆者、出版社等有します。
- ・利用については、著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲内で行ってください。
- ・著作権法に規定されている私的使用や引用等の範囲を越える利用を行う場合には、著作権者の許諾を得てください。

## Aprataxin遺伝子変異(689insT)が培養ラット後根神経節の 髄鞘形成に及ぼす影響について

堀本佳誉<sup>1)</sup>、菊池 真<sup>2)</sup>、館 延忠<sup>3)</sup>、小塚直樹<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 千葉県立保健医療大学健康科学部リハビリテーション学科理学療法学専攻

<sup>2)</sup> 札幌医科大学医学部第一解剖学講座

<sup>3)</sup> 札幌医科大学保健医療学部作業療学科

<sup>4)</sup> 札幌医科大学保健医療学部理学療学科

眼球運動失行を伴う失調症(AOA1)はaprataxin遺伝子の変異により起こる疾患である。

本研究では、アデノウイルスを用いて野生型 aprataxin cDNA、689insT変異型aprataxin cDNA、LacZを発現するcDNAのそれぞれを培養ラット末梢髄鞘に導入したもの(Wild, Mt, LacZ)と導入しない培養ラット末梢髄鞘(NC)を作製・培養し、絞輪間距離の計測を行った。遺伝子導入後、Wild、Mt、LacZ、NCの4群間における絞輪間距離の比較ではNCとWildの間( $P < 0.01$ )、LacZとWildの間( $P < 0.001$ )に有意差を認め、Mtは他の3群と有意差を認めなかった。この結果から、末梢神経細胞に対してMtの機能は優性阻害の影響はなく機能の喪失であり、Wildで起こるaprataxinの過剰な発現は、Schwann細胞の配列後に起こる伸長や、髄鞘化の開始、軸索の伸長に何らかの影響を及ぼす可能性が推測された。

キーワード: アブラタキシン、末梢神経、培養神経、絞輪間距離

## Studies of the length of myelin internodes of cultured rat dorsal root ganglia cells infected by adenovirus with wild type and mutated (689 ins T) aprataxin cDNA

Yoshitaka Horimoto<sup>1)</sup>, Shin Kikuchi<sup>2)</sup>, Nobutada Tachi<sup>3)</sup>, Naoki Kozuka<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Physical Therapy, Department of Rehabilitation Sciences, Faculty of Health Care Sciences, Chiba Prefectural University of Health Sciences, Chiba, Japan

<sup>2)</sup> Department of Anatomy I, School of Medicine, Sapporo Medical University

<sup>3)</sup> Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University

<sup>4)</sup> Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University

Ataxia-oculomotor apraxia type 1 (AOA1) is responsible for the mutation of the aprataxin gene.

In this study, mutated aprataxin cDNA and cultured peripheral nerves from rat dorsal root ganglia were created to investigate expression of aprataxin protein. Internode length was calculated among wild type long form aprataxin cDNA (Wild), mutated (689insT) long form aprataxin cDNA (Mt), cDNA expressed LacZ (LacZ) and Normal Control (NC). Internode length of Wild was significantly shorter than NC ( $P=0.021$ ) and LacZ ( $P=0.001$ ). There were not significant differences between Mt and others. Those observations were suspected to have loss of function in Mt.

Other studies suggest that the tissue distribution of aprataxin transcripts may be related to tissue-specific phenotypes. Further observations are necessary in order to disclose the function of aprataxin in peripheral nervous system.

Key words : aprataxin, peripheral nerve, dorsal foot ganglia, internode

Bull. Sch.Hlth.Sci.Sapporo Med. Univ 13:21-27(2011)

## 1. はじめに

脊髄小脳変性症 (Spino-cerebellar degeneration; SCD) は、小脳性または脊髄性の運動失調を主症候とし、小脳や脊髄の神経核や伝導路に病変の主座を持つ変性疾患の総称である<sup>1)</sup>。SCDは従来、臨床症状や神経病理的所見から分類されてきたが、神経細胞の変性機構が不明であったため<sup>2)</sup>、原因不明の疾患群とされてきた<sup>3)</sup>。しかし近年の分子遺伝学的研究の発展により、いくつかの遺伝性SCDの病因遺伝子が発見され、その病態機序の解明が進んでいる<sup>2)</sup>。遺伝性の病型において、本邦では脊髄小脳失調症、Machado-Joseph病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症などの常染色体優性遺伝形式をとるSCDが多く、そのほとんどがCAGリピート病 (トリプレットリピート病) であり、リピート数が多くなると、発症は若年化し、症状も多彩となることが報告されている<sup>4)</sup>。

常染色体優性遺伝性SCDを対象とした理学療法を展開する場合、DNA上の異常 (genotype) と臨床症状発現 (phenotype) との対応関係の解析が進めば、症状発現機序も考慮した運動療法の実施の可能性があることが指摘されている<sup>5)</sup>。一方、常染色体劣性遺伝性SCDではFriedreich失調症が有名であり、欧米では最も頻度の高い遺伝性SCDである<sup>6)</sup>。本邦では臨床的にFriedreich失調症が疑われるものの、原因遺伝子とされるfrataxin異常の確認された症例は報告されていない<sup>7)</sup>。本邦ではFriedreich失調症類似疾患が報告され<sup>7)</sup>、その臨床的特徴は、①常染色体劣性遺伝、②幼小児期に発症し、緩徐進行性、③歩行障害・軽度の知的発達障害・眼振・眼球運動失行・協調運動障害・深部腱反射消失・四肢の筋萎縮・深部感覚障害などを呈する、④低アルブミン血症・高脂血症を呈する、⑤高度の小脳萎縮、である。

この疾患の原因遺伝子は、9番染色体短腕13領域 (9p13) に同定され<sup>8, 9)</sup>、翻訳されるタンパクはapratatinと命名され、眼球運動失行を伴う失調症 (Ataxia-oculomotor apraxia; AOA1) または低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳変性症 (early onset ataxia associated with hypoalbuminemia; EAOH) と呼ばれている (以下AOA1)<sup>10)</sup>。apratatin遺伝子は7つのエクソンより構成され、342個のアミノ酸からなるlong form apratatin (以下アブラタキシン) と、エクソン3がalternative splicingを受け168個のアミノ酸からなるshort form apratatinがある<sup>8, 9)</sup>。アブラタキシンは39kDaのタンパクであり<sup>8, 9)</sup>、核に存在し<sup>11)</sup>、一様に核小体や核細胞質で小さく分散して認められ<sup>12, 13)</sup>、成人脳、胎児脳、気管、腎臓、心臓、肺などで発現していることが確認されている<sup>10)</sup>。アブラタキシンの機能はDNA単鎖切断損傷修復 (single-strand break repair; SSBR) であると考えられているが不明な点が多い<sup>10-12)</sup>。AOA1では14の変異<sup>14)</sup>が報告されており、これら変異のほとんどが、エクソン5、6、7に位置

する。ヨーロッパにおいて最も頻度が高い変異はW279Xであり<sup>8, 15)</sup>、本邦においては、689insTが最も多く、次いでP206L<sup>9)</sup>である。

発症は10歳以前であり<sup>15)</sup>、100%の患者に失調症状が見られ、80%に中等度から重度の舞踏病様症状が認められ、早期に進行、重症化し、進行初期に重症度が決定される<sup>14)</sup>。疾患の進行とともに著明となる末梢神経障害は、軸索変性による感覚運動神経障害であり、感覚神経障害が先行し、その後運動神経障害がみられるようになる<sup>16)</sup>。感覚障害、筋力低下を主因とする運動機能障害により、発症後約10年で車椅子生活となる<sup>16)</sup>が、発症時期には小脳失調症状が優位なために、末梢神経障害の発症時期は不明である。AOA1の患者の理学療法を行う上で、小脳失調や舞踏病様症状の重症度は進行初期に決定されるが、末梢神経障害は進行とともに経年的に悪化することを考慮すると、末梢神経障害の発症時期を知り、その変性状態を分子生物学的レベルから知ることは、末梢神経の変性が著明になる以前の時期に、末梢神経障害を考慮した身体局所の選択的筋力強化、関節変形・拘縮の予防的運動療法などの理学療法を行うために重要である。

本研究ではアブラタキシン遺伝子変異が髄鞘形成過程でどのように関与しているかを知るために、培養系を用いて発現実験を行った。アブラタキシン組換えcDNAを作製し、アデノウイルスベクターに構築した。これをラット後根神経節より培養した末梢神経細胞に導入し、アブラタキシン組換えcDNAが髄鞘発現に与える影響を、免疫組織化学的に解析する事を目的とした。

## 2. 方法

### 2-1. 研究対象

胎生20日目のSprague-Dawleyラット (以下SDラット) 胎児5-7匹のDRGを用いた。また、689insT変異を有するアブラタキシンcDNAを作製し、アデノウイルスに構築し、実験に用いた。

### 2-2. 研究対象および組み換えDNA使用に関する倫理および規定

組換えDNAの使用に関しては、札幌医科大学における組換えDNA実験指針<sup>17)</sup> および、文部科学省の組換えDNA実験指針<sup>18, 19)</sup> を遵守し実施した。また、動物の使用に関しては札幌医科大学動物実験指針<sup>20)</sup> を遵守し実験を行った。

### 2-3. 野生型、変異型APTIX cDNAライブラリーの作製

野生型ヒトアブラタキシン cDNAは、東京大学医科学研究所新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻ゲノム制御医科学分野より供与されたものを使用した。ベクターはpUC19を用い、遺伝子導入部位はHindIIIとした。供与された野生型アブラタキシンcDNAはこの制限酵素認識部位を持たないため、HindIII認識部位を有するprimer1 (5'-GCC AAG CTT GTG ATG ATG CGG GTG-3') と、primer2

(5'-GGC AAG CTT GAA TCA CTG TGT CCA GTG-3')を用いてPCRを行い、5'側と3'側にHindIII認識部位を有する野生型アプラタキシンcDNAを得た。PCRの条件は、①98℃にて10秒間、②64℃にて5秒間、③72℃にて1分間という3段階の過程を30サイクル繰り返し、4℃にて保存した。このcDNAとpUC19を、制限酵素HindIIIで消化し、Low-melt agaroseゲルを用いて精製し、DNA Ligation Kit Ver.1を用いてライゲーションを行った。その後E. coli JM109 Competent Cellsを用いて形質転換を行った。寒天培地上に形成されたコロニーを液体LB培地に植菌した。この培養液をGFX Micro Plasmid Prep Kitを用いて精製し、プラスミドDNAを得た。

689insTの変異を有する変異型アプラタキシンcDNAの作製は、大腸菌で増やしたプラスミドはメチル化されておりDnp Iにより多くの断片に切断されるが、プラスミドのPCR産物は切れないという性質を利用した変異導入法<sup>21)</sup>を利用した。まず、変異を導入する部位を中央におき、前後に12bpつけた完全に相補的な2本のprimer3 (5'-ATA TGC ACA CTG T TGG GGG AAA AGG-3')とprimer4 (5'-CTT TTT CCC CCA A CAG TGT GCA TAT-3')を作製した。pUC19にライゲーションされた野生型アプラタキシンcDNAをtemplate DNAとし、PCRを行った。PCRの条件は、①98℃にて10秒間、②64℃にて5秒間、③72℃にて1分間という3段階の過程を30サイクル繰り返し、4℃にて保存した。Dnp Iによる制限酵素処理を行った反応液40  $\mu$ lをE. coli JM109 Competent Cellsを用いて形質転換を行った。形質転換した反応液10  $\mu$ lをLB寒天培地にまき、形成されたコロニーを液体LB培地に植菌した。この培養液をGFX Micro Plasmid Prep Kitを用いて精製し、プラスミドDNAを得た。

#### 2-4. 塩基配列の確認

実際にpUC19に組み込まれたcDNAの塩基配列は、直接塩基配列決定法にて確認した。直接塩基配列決定法は、Big Dyeを用いた。1本鎖にしたDNAをABI PRISM™ 310 Genetic Analyzerを用いて、塩基配列を解析した。

#### 2-5. 組換えアデノウイルスの作製

最終分化したアデノウイルスベクターを用い、組換えアデノウイルスの作製はGrahamらの系を用いた。まず、野生型アプラタキシンcDNAと変異型アプラタキシンcDNAを組換えアデノウイルスの作製の為のベクター (pAd-Bgl II) のLacZ発現部位の中のHindIII切断部位へサブクローニングした。このプラスミドとE1を欠如したアデノウイルスゲノム (pJM17) を、リポフェクタミンを用いて293細胞へコトランスフェクションし、組換えアデノウイルスを得た。野生型アプラタキシンcDNAと変異型アプラタキシンcDNAを含む組換えアデノウイルスにトランスフェクションされた293細胞はx-gal染色にて確認した後に、破壊、遠沈し、その培養上清をラットDRG細胞に感染させた。また、同時にアプラタキシンcDNAをサブクローニングしな

いベクターを用いてLacZを発現する組換えアデノウイルスを作製した。

#### 2-6. 細胞の分離と培養

培養液はpowder  $\alpha$  minimum essential medium (GIBCO)、超純水、炭酸水素ナトリウム、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperadyl] ethansulfonic acid (HEPES)、 $\beta$  グルコース、nerve growth factor、ペニシリン、ストレプトマイシンを組成したもの (以下 $\alpha$  MEM) を使用した。

実体顕微鏡下でDRGを摘出し、周囲の結合組織をできるだけ除去した後、0.25%トリプシンで37℃にて30分間保温し、トリプシン溶液を破棄した後、10% fetal calf serum (FCS) を含む $\alpha$  MEMを加え、滅菌した濾過用布を用いて、DRG細胞を分離した。その後、コーティングガラス上に静置しインキュベーター (36.5℃, 5%CO<sub>2</sub>+95%air) にて培養した。24時間後に5%FCSを含む $\alpha$  MEMを2ml添加し、その後2-3日おきに、新しい5%FCSを含む $\alpha$  MEMと入れ替えた。

#### 2-7. 培養細胞への遺伝子導入

培養2週間を経過した培養細胞に、アデノウイルスを用いて野生型アプラタキシンcDNAを導入したもの (以下、Wild) と、689insT アプラタキシンcDNAを導入したもの (以下、Mt) を作製した。アデノウイルスは、先行研究<sup>22)</sup>に従い200,000 cellに対して $2.5 \times 10^7$  pfu/mlとなるように感染させた。その後2週間、5%FCSを含む $\alpha$  MEMを交換しながら培養を続けた。また、アデノウイルスの影響を調べるためにLacZを発現するcDNAを同様の手順で導入したもの (以下、LacZ) を作製し、同様に培養した。対照群として、アデノウイルスを感染させない群 (以下、NC) を作り同様の条件下で培養した。

#### 2-8. 導入遺伝子の確認および直接塩基配列決定法

感染の有無は、感染した培養細胞の一部をトリプシン処理 (0.25%トリプシン+ $\alpha$  MEM) にて細胞を培養皿から遊離、採集し、DNAを抽出した。抽出したDNAをPCRにより目的部位を増幅し、導入遺伝子の塩基配列を決定した。その後、直接塩基配列法を用いて感染の有無を観察した。

#### 2-9. 培養細胞の染色

培養細胞に対して免疫組織化学染色を行い、髄鞘形成を確認した。一次抗体は抗myelin basic protein (MBP) 抗体、二次抗体にはヒストファイニンシンプレステイン-ラットMAX-P0 (MULTI) 抗体を用いた。

以上の染色法により得られた培養末梢神経組織を、光学顕微鏡下にて4群 (Wild、Mt、LacZ、NC) の髄鞘を選択して写真撮影を行った。撮影した写真をコンピューターに取り込み、画像解析システムImage JのFreehand linesの機能を用いて、染色された髄鞘の長さ (以下、絞輪間距離) を計測した。

#### 2-10. 解析

統計処理には、統計処理ソフトSPSS 11.0.1 J for Windows (SPSS Japan社製) を用いた。

4群 (Wild、Mt、LacZ、NC) のそれぞれにおける250箇所  
の絞輪間距離を計測し、それぞれの平均値を求め、一元  
配置分散分析を行った。その後の検定にはscheffe法を用い  
た。危険率は0.05とした。

### 3. 結 果

#### 3-1. 導入遺伝子の確認と直接塩基配列決定法

回収した培養細胞からDNAを抽出し、PCRを行った結果、  
NCとLac Zは、PCRによる目的部位の増幅はされなかった。  
WildとMtは約1kb付近に目的部位の増幅が認められた (図  
1)。直接塩基配列決定法により、Mtには689番目にチミ  
ン (T) の挿入が確認されたが、Wildには認めなかった  
(図2)。

#### 3-2. 免疫組織化学染色および絞輪間距離

免疫組織化学染色では髄鞘のみが染色された (図3)。  
NC、LacZ、Wild、Mtそれぞれの絞輪間距離の平均値±標  
準偏差 (N=計測数) は $71.7 \pm 30.4 \mu\text{m}$  (N=250)、 $74.2 \pm 30.6 \mu\text{m}$   
(N=250)、 $63.4 \pm 28.9 \mu\text{m}$  (N=250)、 $70.6 \pm 28.9 \mu\text{m}$   
(N=55) であった。一元配置分散分析により有意差を認め  
た (F (3, 801) =6.1, P=0.0004)。その後の検定によりN  
CとWildの間 (P=0.021)、LacZとWildの間 (P =0.001) に  
有意差を認めた (図4)。MtはNC、LacZ、Wildとの間に有  
意差を認めなかった。

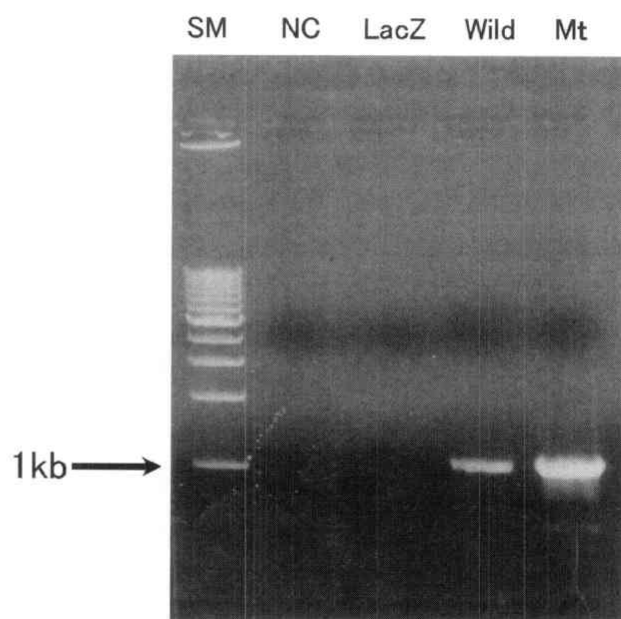


図1 PCR後の電気泳動による導入遺伝子の確認  
NCとLac Zは、DNAの抽出を行ったがPCRによる目的部位  
の増幅は出来なかった。WildとMtは約1kb付近に目的部位  
の増幅が認められた。

SM : サイズマーカー

NC : アデノウイルスを感染させなかった細胞より抽出し  
たDNAのPCR産物

LacZ : LacZを発現するcDNAを導入した細胞より抽出した  
DNAのPCR産物

Wild : 野生型long form aprataxin cDNAを導入した細胞より  
抽出したDNAのPCR産物

Mt : 変異型long form aprataxin cDNA (689insT) を導入し  
た細胞より抽出したDNAのPCR産物

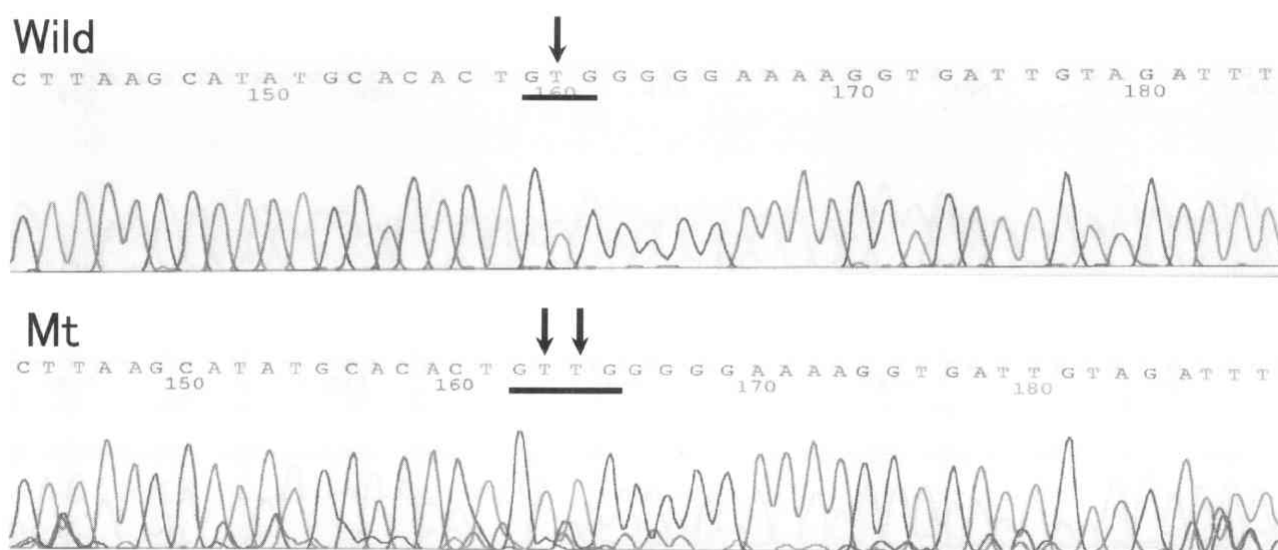


図2 シーケンス

矢印はlong form aprataxin cDNAの689番目の塩基を示す。Mtではチミン (T) が挿入されている。

Wild : 野生型long form aprataxin cDNA

Mt : 変異型long form aprataxin cDNA (689insT)



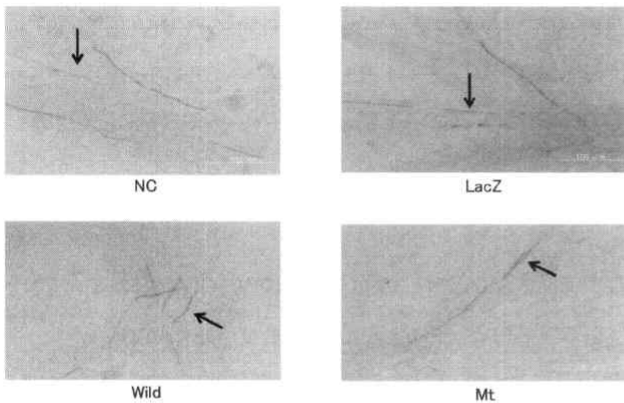


図3 髄鞘

スケールは100  $\mu$ m。図の通り、髄鞘部分を濃染している。  
 NC : アデノウイルスを感染させなかった細胞の髄鞘  
 LacZ : LacZを発現するcDNAを導入した細胞の髄鞘  
 Wild : 野生型long form aprataxin cDNAを導入した細胞の髄鞘  
 Mt : 変異型long form aprataxin cDNA (689insT) を導入した細胞の髄鞘  
 矢印で示した髄鞘の絞輪間距離はNC ; 77.9  $\mu$ m、LacZ ; 72.2  $\mu$ m、Wild ; 66.4  $\mu$ m、76.4  $\mu$ m

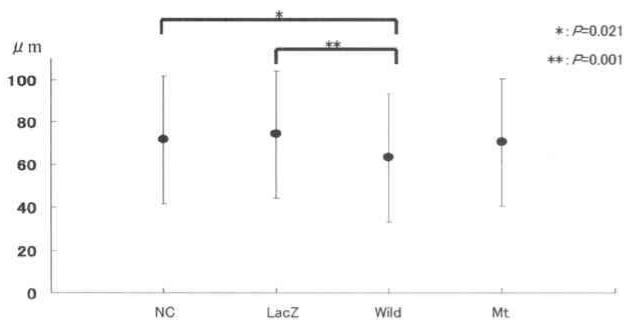


図4 絞輪間距離

NC : アデノウイルスを感染させなかった細胞の絞輪間距離  
 LacZ : LacZを発現するcDNAを導入した細胞の絞輪間距離  
 Wild : 野生型long form aprataxin cDNAを導入した細胞の絞輪間距離  
 Mt : 変異型long form aprataxin cDNA (689insT) を導入した細胞の絞輪間距離  
 点は平均値、縦棒は標準偏差を示す。

## 4. 考 察

AOA1の患者の理学療法を行う上で、小脳失調や舞踏病様症状の重症度は進行初期に決定されるが、末梢神経障害は進行とともに経年的に悪化すること<sup>14)</sup>を考慮すると、アプラタキシン遺伝子変異が末梢神経に及ぼす影響を知ることとは理学療法を行う上で重要である。

本研究では、末梢神経の変性が著明になる以前の時期に、末梢神経障害を考慮した身体局所の選択的筋力強化、関節変形・拘縮の予防的運動療法などの理学療法を行うための基礎実験として、日本で最も多いとされる689insTの遺伝子変異を有する変異型アプラタキシンcDNAを培養系を用

いて、その形態を解析した。

本研究はラット培養神経細胞を用いているため、完全にはヒトのAOA1病患者の病態とは合致しない。しかし、ヒトアプラタキシン遺伝子とラットアプラタキシン遺伝子の相同性は81%と高く、変異型アプラタキシンcDNAを導入して絞輪間距離を観察することにより、AOA1病患者における病態解明につながると考えられた。また、今回変異を導入した部分のアミノ酸のバリン (Val) はヒトとラットで一致している (図5) ことより、この部分にチミンを導入することは変異の導入という点で意味があると考えられる。

回収した培養細胞からDNAを抽出し、PCRを行った結果、Wild、Mtでは増幅された断片が観察され、アデノウイルスによりヒトアプラタキシンcDNAが培養細胞に導入されたことが確認された。また、シーケンスの結果より、野生型および変異型のアプラタキシンcDNAが、髄鞘に導入されたことが確認された。現在、髄鞘にアプラタキシン遺伝子を導入した報告はない。本研究は、アプラタキシン遺伝子を実際の髄鞘に導入したことに関して、新規性のある結果と考えられた。

また、抗MBP抗体を用いた免疫組織化学染色において、髄鞘形成が確認された。本研究では、絞輪間距離の平均はNC、LacZ、Wild、Mtそれぞれ、71.7 $\pm$ 30.4  $\mu$ m、74.2 $\pm$ 30.6  $\mu$ m、63.4 $\pm$ 28.9  $\mu$ m、70.6 $\pm$ 28.9  $\mu$ mであった。Bungeら<sup>23)</sup>は89日以上DRGを培養した後の絞輪間距離の平均は128  $\mu$ mで、54-246  $\mu$ mの範囲としており、本研究で得られた結果は正常の範囲であると考えられた。

本研究においてNC、LacZとMtの絞輪間距離の間には有意差が認められなかった。今回行った、アデノウイルスによる培養細胞へのアプラタキシンcDNAの導入は、組み込み型の遺伝子導入ではなく、一過性の遺伝子導入である<sup>24)</sup>。このため、培養細胞内ではSDラットアプラタキシン遺伝子が発現するタンパクに加え、ヒトアプラタキシンcDNAが発現するタンパクが存在する状態となる。末梢神経細胞に対する変異アプラタキシンの機能は、優性阻害の影響 (dominant negative effect) はなく、一本鎖遺伝子修復能力の低下・損失 (loss of function)<sup>25)</sup>とされている。このことから、Mtの細胞内では、SDラットが発現するアプラタキシンのみが働いたと推測された。このため、細胞内のタンパクはNC、LacZと同じ状態となり、脱髄などの神経変性は起こらず、絞輪間距離の差が見られなかったのではないかと推測された。

WildはNC、LacZと比較して有意に絞輪間距離が短い結果となった。Dyckら<sup>26)</sup>は、絞輪間距離を計測することにより、脱髄や再髄鞘化、絞輪間距離の発達を知ることができるとしており、脱髄が認められる場合、絞輪間距離は短くなると報告している<sup>27)</sup>。Charcot-Marie-Tooth病モデルノックアウトマウスのDRGの培養実験においてLiuら<sup>28)</sup>は、12日間培養後の絞輪間距離をコントロールと比較すると、約1/3 (平均40  $\mu$ m以下) の長さであったとしている。本研

ヒト: (182) VYKDEQVVV IKDKYPKARY HWLVLPWTSI SSLKAVAREH LELLKHMHTV GEKVIVDF (238)  
 VYKD+QVVV IKDKYPKAR+ HWLVLPW SI SSLK V EH LELLKMH V GEKVI DF  
 ラット: (169) VYKDDQVVV IKDKYPKARH HWLVLPWASI SSLKVVTSEH LELLKHMHA V GEKVIADF (225)



ヒト 689insT: (182) VYKDEQVVV IKDKYPKARY HWLVLPWTSI SSLKAVAREH LELLKHMHT V GGKGDCRF (238)  
 VYKD+QVVV IKDKYPKAR+ HWLVLPW SI SSLK V EH LELLKMH V GEKVI DF  
 ラット 689insT: (169) VYKDDQVVV IKDKYPKARH HWLVLPWASI SSLKVVTSEH LELLKHMHA V GGKGDCRF (225)



図5 アミノ酸配列

上段にヒトアブラタキシンのアミノ酸配列 (H. S)、下段にラットアブラタキシンのアミノ酸配列 (Rat)、中段に両方に共通するアミノ酸を示した。

上図は正常なヒトアブラタキシンとラットアブラタキシンのアミノ酸配列の相同性は81%であった。689番目の塩基thymineを挿入した部分のアミノ酸のバリン (V: 矢印、下線で示す) はヒトとラットで一致している。

下図は689番目の塩基thymineを挿入した際のアミノ酸配列である。矢印で示した部分にチミンが挿入され、太字、下線で示した部分のアミノ酸配列に変化が見られる。

究のWildの絞輪間距離は正常の範囲内にあり、NCとLacZとの平均値の差は8~11  $\mu$ mと小さいことより、脱髄などの軸索の異常がなかったと考える。脱髄などの病理所見により絞輪間距離が短くなったというよりは、絞輪間距離の発達の遅れが見られたのではないかと推測された。絞輪間距離が成長していく過程は、まず軸索に沿ってSchwann細胞が配列したあと、伸長とensheathmentが起こる。その後髄鞘化が生じ、軸索や周囲の組織の伸長に伴い他動的に絞輪間距離も伸長するとされている<sup>29,30)</sup>。Wildの細胞内では、SDラットが発現するアブラタキシンと、ヒトアブラタキシンが発現しており、過剰発現の状態である。このためヒトアブラタキシンが、Schwann細胞の配列後に起こる伸長や、髄鞘化の開始、軸索の伸長に何らかの影響を及ぼし絞輪間距離の発達の遅延がみられたのではないかと推測された。今回の研究では末梢神経においてヒトアブラタキシンがこれらの段階で何らかの影響を与え、Wildにおいて絞輪間距離が有意に短くなったことが推測されるが、どの段階でどのように関与したのかは不明である。アブラタキシンの機能はDNA単鎖切断損傷修復であると考えられており<sup>10-12)</sup>、過剰な発現は逆に細胞の内部環境のホメオスタシスを壊す可能性があるが、その機能は不明な点が多く推測の域を脱しない。

本研究では、導入遺伝子の確認と、絞輪間距離の計測を行ったのみであり、アデノウイルスにより導入されたcDNAは、少なくとも45日間はタンパクが強制発現される<sup>20)</sup>という先行研究をもとに考察しているが、実際に発現しているタンパクの確認していないため、考察は推測の域を脱しない。今後、タンパク発現量を確認する研究が必要であると考え。また、ラット細胞内にヒトアブラタキシンcDN

Aを導入した際の機構の解明のためにsiRNA実験を行う必要もあると考えた。現在、ヒトアブラタキシンの機能は一本鎖遺伝子損傷修復機能とされ、その修復過程の研究が進んでいる。アブラタキシンの発現は組織特定の様式によりコントロールされ、AOA1における組織特定の臨床症状に関与している可能性が考えられており<sup>31)</sup>、臨床症状においては、中枢神経障害と末梢神経障害の発症時期が異なっている<sup>14)</sup>。今後、中枢神経系のみでなく、末梢神経系におけるアブラタキシンの機能解明のさらなる研究も必要であると考え。

SCDに対する理学療法は、小脳失調に対する運動療法が主体となっている<sup>32)</sup>が、これらの研究の成果を生かし、DNA上の異常 (genotype) と臨床症状発現 (phenotype) との対応関係を考慮した理学療法を展開していく必要があると考え。

## 引用文献

- 1) 阿部康二: 脊髄小脳変性症の分類, Brain and nerve 53:5-13, 2001
- 2) 辻省次: 遺伝性脊髄小脳変性症の病因と病態, 日本内科学会雑誌90:264-268,2001
- 3) 星文彦: 脊髄小脳変性症の理学療法における課題と今後の展望, 理学療法17:68-70,2000
- 4) 大谷宜伸: 脊髄小脳変性症, 小児科診療 65 :580-582,2002
- 5) 望月久: 脊髄小脳変性症の運動療法 最近の考え方, PTジャーナル34:644-646,2000
- 6) Romeo G, Menozzi P, Ferlini A, et al.: Incidence of

- Friedreich ataxia in Italy estimated from consanguineous marriages. *Am J Hum Genet* 35:523-529, 1983
- 7) 五十嵐修一: 眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳変性症. *神経進歩*50:363-369,2006
  - 8) Moreira MC, Barbot C, Tachi N, et al.: The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 29:189-193, 2001
  - 9) 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* 29:184-188, 2001
  - 10) 伊達英俊、小野寺理、辻省次: 常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 (アプラタキシン欠損症). *ゲノム医学* 2:241-250,2002
  - 11) Hirano M, Furiya Y, Kariya S, et al.: Loss of function mechanism in aprataxin-related early-onset ataxia. *Biochem Biophys Res Commun* 322:380-386, 2004
  - 12) Gueven N, Becherel OJ, Kijas AW, et al.: Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet* 13:1081-1093, 2004
  - 13) Clements PM, Breslin C, Deeks ED, et al.: The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 3:1493-1502, 2004
  - 14) Le Ber I, Brice A, Durr A: New autosomal recessive cerebellar ataxias with oculomotor apraxia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5:411-417, 2005
  - 15) Le Ber I, Moreira MC, Rivaud-Pechoux S, et al.: Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. *Brain* 126:2761-2772, 2003
  - 16) 横関明男、伊達英俊、小野寺理: 眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳変性症の臨床. *神経内科*57:108-112,2002
  - 17) 大学等における組換えDNA実験指針:  
<http://web.sapmed.ac.jp/anim/dnazikkenn.PDF>.
  - 18) 組換えDNA実験指針:  
[http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/dna-a.pdf](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/dna-a.pdf).
  - 19) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針:  
[http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/genomeshishin/05062701.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/genomeshishin/05062701.htm).
  - 20) 札幌医科大学動物実験指針:  
<http://web.sapmed.ac.jp/anim/zikkennshishinn.PDF>.
  - 21) 東京大学分子生物学研究所核内情報研究部門ラボマニュアル: <http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/bnsikato/protocol/b10.html>.
  - 22) Shy ME, Tani M, Shi YJ, et al.: An adenoviral vector can transfer lacZ expression into Schwann cells in culture and in sciatic nerve. *Ann Neurol* 38:429-436, 1995
  - 23) Bunge R, Bunge M: An evaluation of some determinants of neuronal size and internode length in peripheral nerve. *Anat Record* 154: 324, 1966
  - 24) 落合孝広: これだけは知っておきたい遺伝子導入の基礎知識. 落合孝広、青木一教 編. 遺伝子導入なるほどQ&A. 羊土社, 東京, 2005, p14-36
  - 25) Hirano M, Asai H, Kiriya T et al.: Short half-lives of ataxia-associated aprataxin proteins in neuronal cells. *Neurosci Lett* 419:184-187, 2007
  - 26) Dyck P., Dyck B.: Pathologic alterations of nerves. Dyck P.J., Tomas P. ed., *Peripheral Neuropathy* 4rd. Philadelphia, WB Saunders, 2005, p752-753
  - 27) Dyck P, Ellefson R, Lais A, et al.: Histologic and lipid studies of sural nerves in inherited hypertrophic neuropathy: preliminary report of a lipid abnormality in nerve and liver in Dejerine-Sottas disease. *Mayo Clin Proc* 45: 286-327, 1970
  - 28) Liu N, Varma S, Shooter EM, et al.: Enhancement of Schwann cell myelin formation by K252a in the Trembler-J mouse dorsal root ganglion explant culture. *J Neurosci Res* 79:310-317, 2005
  - 29) Friede RL, Meier T, Diem M: How is the exact length of an internode determined. *J Neurol Sci* 50:217-228, 1981
  - 30) Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, et al.: Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14661-14668, 2001
  - 31) Hirano M, Nishiwaki T, Kariya S, et al.: Novel splice variants increase molecular diversity of aprataxin, the gene responsible for early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia. *Neurosci Lett* 366:120-125, 2004
  - 32) 米田稔彦、武富由雄: 運動失調症. 石川齋、武富由雄 編. 図解理学療法技術ガイド. 文光堂, 東京,1997, p655-661