

[別紙 1]

論文内容の要旨

Molecular Biological Studies of Ataxin-3, the MJD1 Gene Product

MJD1 遺伝子産物 ataxin-3 の分子生物学的研究

指導教官 金澤 一郎 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成9年4月入学
医学博士課程
脳神経医学専攻
氏名 王 光輝

1991年に初めてトリヌクレオチドの不安定なくり返し配列の伸長によって生じる2種類のトリプレットリピート病が発見されて以来、トリプレットリピート病の研究は急速に発展した。現在に至るまでにトリヌクレオチドのくり返し配列の伸長によって生じる15種類の神経疾患が同定されている。そのうち8種類の疾患は、それぞれのタンパク質に存在するポリグルタミン領域をコードしているCAGの不安定なくり返し配列の伸長に起因しており、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)、ハンチントン病(HD)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、脊髄小脳失調症1型,同2型,同3型,同6型,同7型(SCA1,SCA2,SCA3,SCA6,SCA7)がある。

Machado-Joseph病(MJD)(別名:脊髄小脳失調症3型(SCA3))はその遺伝子の翻訳領域に存在するCAGの伸長により生じる常染色体優性神経変性疾患である。現在までにMJDや他のCAGリピート病の研究からCAGリピートの翻訳されたポリグルタミンの伸長がこれらの疾患の神経変性に関与していることが広く受け入れられるようになった。しかしMJDの神経変性の詳細な病態やataxin-3の正常の機能は未だ不明である。

MJD 遺伝子産物の同定:我々は ataxin-3 を特異的に認識するモノクローナ

ル抗体を作成した。これらの抗体を用い、イムノブロットにより ataxin-3 は正常なリンパ芽球細胞において約 50kDa のタンパク質であることを同定した。正常なアレルの産物間での電気泳動の移動性の違いは、C 末端における多型性とポリグルタミン鎖長による分子量の違いに一致する。さらに MJD サンプルでは約 60KDa の移動度の遅いバンドが同定された。このバンドは伸長したアレルの産物である。

伸長したポリグルタミンによる細胞死：MJD における細胞死の機序を解明するために、我々は全長の ataxin-3, ataxin-3 変異体,正常なポリグルタミンと伸長したポリグルタミンをそれぞれを含んだ ataxin-3 の C 末端側断片を遺伝子導入により発現した。ataxin-3 変異体と伸長したポリグルタミンを含む ataxin-3 変異体の C 末端断片は核内封入体を形成し、細胞死を引き起こした。このことから伸長したポリグルタミンを含む ataxin-3 変異体の C 末端側断片は病理変化を生じるのに十分であることが示唆された。

ataxin-3 の機能探索：ataxin-3 の正常機能を同定するために、我々は two-hybrid system を用いて ataxin-3 と結合するタンパク質のスクリーニングを行い、酵母 DNA 修復タンパク質 RAD23 の 2 つのヒトホモログである HHR23A,HHR23B と ataxin-3 が結合することを発見した。さらに我々は ataxin-3 は HHR23 タンパク質の N 末端にある DNA 修復に重要な ubiquitin-like(UBL)ドメインと結合することを確認した。しかし ataxin-3 は ubiquitin と結合しないため、この特異的な結合を通じて ataxin-3 は HHR23 タンパク質と機能面で関連していることが示唆される。ataxin-3 タンパク質の正常体と変異体では HHR23 タンパク質との結合能に差は見られない。しかし 293 細胞において、HHR23A はこの結合によって ataxin-3 変異体の核内封入体に集積する。また HHR23B もこの結合によって MJD の剖検脳において核内封入体に集積することを確認した。これらの結果からこの結合は ataxin-3 の正常な機能と関連していること、MJD において HHR23 タンパク質の機能異常が存在する可能性が示唆された。

以上本研究において、私は MJD の遺伝子産物 (ataxin-3) の同定とその機能に関連する結合タンパク (HHR23) の同定、及び細胞死に対する影響の検討を行った。