

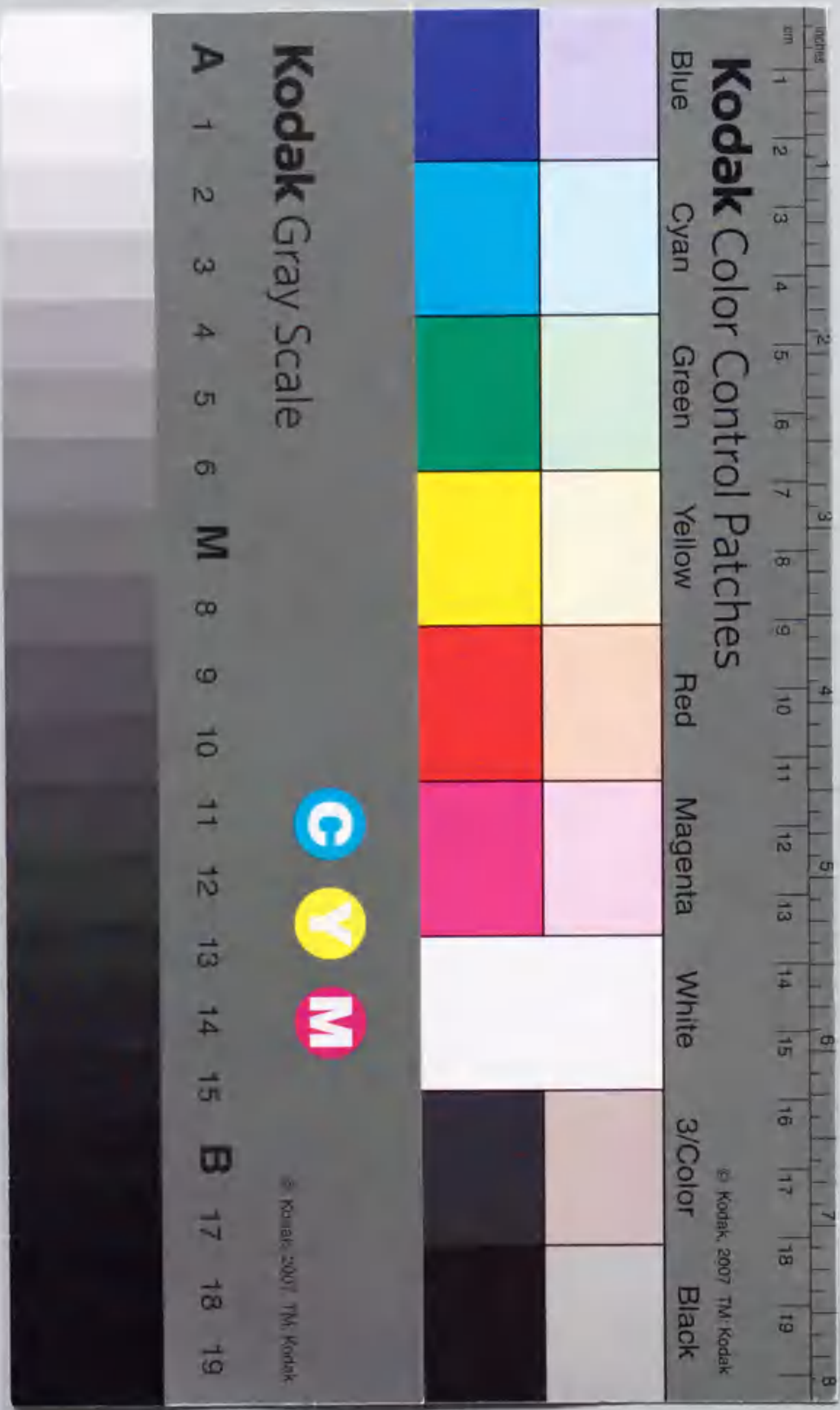
博士論文

遺伝性神経疾患(血中-amyloidosis) のラットを用いた
ミオシリンV1の遺伝子変異とその発現と関する研究

二本柳 子

名古屋大学大学院人間情報学研究所

2001 年度



報告番号 甲第 4826 号

①

博士論文

遺伝性神経疾患(*dilute-opisthotonus, dop*)ラットを用いた
ミオシンVaの遺伝子変異とその発現に関する研究

名古屋大学大学院人間情報学研究科

二木杉子

目次

1章 序論 -----	3
2章 <i>dilute-opisthotonus(dop)</i> ラットにおけるミオシンVa遺伝子解析--	8
2-1 目的	9
2-2 材料と方法	10
2-3 結果	16
2-4 考察	25
3章 ラット脳でのミオシンVaの発現 -----	31
3-1 目的	32
3-2 材料と方法	33
3-3 結果	35
3-4 考察	38
4章 結論と展望 -----	40
謝辞 -----	45
参考文献 -----	46
図表	
論文目録	

Faint, illegible text on the left page, possibly bleed-through from the reverse side.

Faint, illegible text on the right page, possibly bleed-through from the reverse side.

1章 序論

ミオシンは筋フィラメントの主要な構成成分の一つとして同定され、研究されてきたが、近年になって筋細胞以外にも多様なミオシン分子が存在することが明らかにされてきた。これらのミオシン分子はアミノ酸配列の相同性によって現在までに17のサブクラスに分類されており (Hodge and Cope, 2000; Mermall et al., 1998)、本研究で注目したミオシンVaはそのクラスVに属する。ミオシンVaはヒト (Engle and Kennett, 1994)、マウス (Mercer et al., 1991)、ラット (Futaki et al., 2000)、ニワトリ (Espreafico et al., 1992) でホモログが存在することが知られており、そのcDNA塩基配列の解析から、ミオシンVaタンパク質はN末端側のアクチン結合能を持つモータードメイン (headドメイン)、それに続くneckドメイン、およびC末端側のtailドメインからなることが示された (図 1A; Mermall et al., 1998; Reck-Peterson et al., 2000)。Cheneyらはニワトリ脳からミオシンVaタンパク質を抽出し、ミオシンVa分子は双頭型の2量体であることを明らかにした (図 2; Cheney et al., 1993)。またこの2量体のミオシンVa分子は、headドメインを介してアクチンフィラメント上を移動する歩行型モータータンパク質であることが *in vitro* で示された (Mehta et al., 1999; Walker et al., 2000)。一方、ミオシンVa分子のtailドメインは様々なタンパク質と結合することが示唆されており (Costa et al., 1999; Huang et al., 1999; Prekeris and Terrian, 1997)、ミオシンVaタンパク質は細胞内でアクチンフィラメントに沿ってオルガネラや小胞などの輸送を行うと考えられている (Langford and Molyneaux, 1998; Reck-Peterson et al., 2000)。

マウスにおけるミオシンVa欠損変異である *dilute-lethal* (*d^l*) マウスは、被毛の淡色化と運動失調や後弓反張などの神経症状をあらわし、離乳期には死亡する (Evans et

al., 1997; Searle, 1952)。この d^l マウスの表現型から、ミオシンVaはマウスにおいて毛色決定および中枢神経系の機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。Provanceらは、 d^l マウスの毛色異常の原因を細胞レベルで検討した結果、正常な色素細胞では色素顆粒が細胞質全体に分布し、その分布に一致してミオシンVaタンパク質の局在が認められるのに対し、 d^l マウスの色素細胞では色素顆粒が核の周辺に凝集し、正常な分布が見られないことを明らかにした (Provance et al., 1996; Wei et al., 1997)。このことからミオシンVaが色素顆粒の細胞辺縁への輸送に不可欠であることが示唆された。また、高岸らは d^l マウスの中枢神経系の形態異常を検索し、電子顕微鏡観察によって、小脳プルキンエ細胞の樹状突起棘 (スパイン) 中にある滑面小胞体 (SER) が d^l マウスでは欠損していることをはじめ明らかにした (Takagishi et al., 1996)。同様の所見は、ミオシンVa遺伝子の異なる部位に変異をもつ他の変異系統マウスでも認められた (Huang et al., 1998a; Huang et al., 1998b)。これらの結果から、マウスのミオシンVaはプルキンエ細胞の樹状突起の末端におけるSER輸送に重要な役割を果たすことが示唆された。

ヒトにおいてもミオシンVa遺伝子変異は遺伝性疾患、Griscelli syndrome (GS) として報告されており、皮膚や髪の毛の淡色化、および若年期からの神経症状を示す (Menasche et al., 2000; Pastural et al., 1997; Pastural et al., 2000)。このことから、ミオシンVaはヒトでも表皮の色素細胞、および中枢神経系で重要な役割を果たしていると考えられた。

一方、大野らによって見いだされた自然発生の遺伝性神経疾患ラットである

dilute-opisthotonus (*dop*) ラットは、劣性ホモ個体 (*dop*ラット) において淡毛色と致死性の神経症状を示すなど、 d^l マウスに酷似した表現型を示す (Dekker-Ohno et al., 1993)。さらに、*dop*ラットのプルキンエ細胞のスパインにおいても d^l マウスと同様にSERが欠損していることが明らかにされた (Dekker-Ohno et al., 1996)。また、DNAマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝子マッピングの結果、*dop*ラットの遺伝子変異部位がラット第8染色体上の、マウスのミオシンVa遺伝子座に相当する領域にあることが示された (Ohno et al., 1996)。これらの結果は*dop*ラットの遺伝子変異がミオシンVa遺伝子上にあることを強く示唆した。しかしながら、*dop*ラットが実際にミオシンVa遺伝子に変異を有するか否かについては明らかにされておらず、近傍の遺伝子座における変異が同様の表現型をもたらす可能性も考えられた。そこで本研究では、*dop*ラットの原因遺伝子変異がミオシンVa遺伝子にあるか否かを明らかにすることを目的として、ラットのミオシンVa遺伝子の解析を行い、正常ラットと*dop*ラットの比較、検討を行った。その結果、*dop*ラットはミオシンVa遺伝子に変異が存在し、脳においてミオシンVaタンパク質が認められない欠損変異であることが明らかになった。

ミオシンVaの欠損は中枢神経系の機能に重大な障害を及ぼし、*dop*ラットや d^l マウスにおいては運動失調や四肢の硬直、後弓反張などの症状を、ヒトにおいてはGS患者に認められる運動失調や精神遅滞を引き起こすと考えられる。その詳細なメカニズムは殆ど明らかにされていないが、*dop*ラットでは、プルキンエ細胞のスパインにおいて、SERの欠損に加え、シナプス伝達における長期抑圧 (LTD) が欠如していることが報告された (Miyata et al., 1997)。プルキンエ細胞におけるLTD (小脳性LTD)

は運動学習や協調運動を行う上で重要な神経可塑性の一つであることが示唆されており (Ito, 1989)、小脳性LTDの欠如が運動失調などの要因であることが考えられる。一方で、ミオシンVaは神経伝達物質の放出 (Prekeris and Terrian, 1997)、神経突起での小胞輸送 (Bridgman, 1999)、神経成長円錐の糸状仮足の伸展 (Wang et al., 1996) など、様々な神経機能に関わることが培養神経細胞等を用いた研究から示唆されており、ミオシンVa欠損が*in vivo*においてもこれらの機能に影響を及ぼすことが考えられる。しかし、*dop*ラットもしくは*d^l*マウスの神経伝達の異常についてはいまだ十分に検討されておらず、脳におけるプルキンエ細胞以外の異常の有無については明らかにされていない。

ミオシンVa欠損による脳機能への影響を検討する上では、まず脳におけるミオシンVaの発現分布を明らかにすることが重要だと考えられた。マウスの脳におけるミオシンVa mRNAの分布はすでに報告されているが (Mercer et al., 1991)、ミオシンVaタンパク質についてはその詳細な分布はいまだ明らかにされていない。そこで本研究で、野生型ラットの脳におけるミオシンVaタンパク質の分布を明らかにするため、抗ミオシンVa抗体を用いた蛍光抗体法による免疫組織化学的研究を行った。その結果、ミオシンVaタンパク質がこれまで報告されていない特徴的な分布を示すことを明らかにした。これらの結果は、ミオシンVaの神経機能における役割を解析する上での重要な示唆を与えるものと考えられる。

2章

dilute-opisthotonus (dop) ラットにおける ミオシンVa遺伝子解析

2-1 目的

遺伝性神経疾患ラットである *dilute-opisthotonus* (*dop*) ラットは、大野らにより見いだされた自然発生の突然変異系統で、ラット近交系 DOP 系統として確立され (Dekker-Ohno et al., 1993)、現在は名古屋大学環境医学研究所において維持されている。この異常は常染色体劣性様式で遺伝し、ヘテロ個体の表現型にはなんら異常が認められない。DOP 系統の劣性ホモ個体 (*dop* ラット) は、正常な同腹仔に比べ淡色の被毛を示す。また、生後 11 日頃から後肢に運動失調が観察され、次第に姿勢を保つことが困難となり、横転したまま四肢を掻くような間代性の痙攣が頻発する。さらに、頭尾を反らせ、数秒間にわたって硬直する後弓反張様の発作が自律的にあらわれるようになる。これらの神経症状は成長に伴って重篤さを増し、生後 3 週間程度で衰弱し死亡する (Dekker-Ohno et al., 1993)。

dop ラットで認められた表現型は、マウスのみオシン Va 欠損変異である *dilute-lethal* (*d^l*) のものに酷似しており、ラット染色体上の遺伝子変異部位のマッピングの結果も、*dop* ラットがみオシン Va 遺伝子に変異をもつことを強く示唆するものであった。しかし *dop* ラットが実際にどのような遺伝子変異をもつかはこれまでに明らかにされていない。そこで本研究では、*dop* ラットのみオシン Va 遺伝子における変異の有無を明らかにすることを目的として解析を行った。

2-2 材料と方法

dilute-opisthotonus (*dop*) ラット

実験には、環境医学研究所で維持されている *dop* 変異を持つ近交系ラット(系統名 DOP/Nem)を用いた。DOP/Nem系統の劣性ホモ個体 (DOP- *dop/dop*; *dop*ラット) は離乳期に死亡するため、DOP系統はヘテロ型 (DOP- *+/dop*) 個体の交配によって維持されている。ヘテロ型の雌雄を一週間同居により交配し、得られた同腹仔を生後2週間目で実験に用いた。*dop*ラットは淡色の被毛により同定し、外見上正常な個体 (DOP- *+/+*もしくはDOP- *+/dop*) をコントロールとして用いた。

サザンブロット

正常および *dop*ラットの肝臓からゲノムDNAをSambrookらの方法にしたがって抽出した(Sambrook et al., 1989)。得られたDNAを制限酵素EcoRI、BamHI、PstIで消化し、それぞれ10 μ gを0.8%アガロースゲル電気泳動によって分画した。泳動後のゲルをアルカリ溶液 (0.4 N NaOH, 0.6 M NaCl)、中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl) にそれぞれ30分ずつ浸して変性、中和処理を行った後、GeneScreen Plus (GSP) メンブレン (New England Nuclear Life Science Products, Boston, USA)にDNAを転写した。メンブレンは[α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol; New England Nuclear Life Science Products)で標識したマウスのミオシンVa cDNA (クローンD46、National Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center, USA, Dr. N. A. Jenkinsより贈与) をプローブとしてハ

イブリダイズした後、洗浄し、X線フィルム (Eastman Kodak, Rochester, USA) でオートラジオグラフィーを行った (Kambe et al., 1988; Murata et al., 1990)。

ノザンブロット

2週齢の正常および *dop*ラットの大脳皮質を摘出し、全RNAをグアニジン塩酸法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) により抽出した。この全RNAからさらに、PolyA Tract mRNA Isolation System (Promega, Madison, USA) を用いてポリ(A)+ RNAを精製した。15 μ gのポリ(A)+ RNAを0.8%アガロースゲル電気泳動によって分画し、GSPメンブレンに転写してハイブリダイゼーションを行った。プローブにはマウスのミオシンVa cDNA (クローンC23、Dr. N. A. Jenkinsより贈与) を放射性標識して用いた。オートラジオグラフィー後、同一のメンブレンを用いてglycerol-3-aldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNAをプローブとしたハイブリダイゼーションを行い、RNA量の指標とした。ハイブリダイゼーション、洗浄、オートラジオグラフィーはサザンブロットと同様に行った。

ウェスタンブロット

2週齢の正常および *dop*ラットの大脳皮質を氷冷0.1 Mリン酸塩緩衝液 (PBS; pH 7.4) 中でホモジナイズし、BCA assay (Pierce, Rockford, USA) によりタンパク質濃度を決定した。ホモジナイズ溶液を等量の2x SDS dissociation buffer (125 mM Tris-HCl, 10% 2-mercaptoethanol, 4.5% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, pH 6.7) と混合し、95°Cで5

分間加熱した (SDSサンプル溶液)。100 μ g のタンパク質を含むSDSサンプル溶液を SDS-7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し (Laemmli, 1970)、Trans-Blot SD (Bio-Rad, Hercules, USA) を用いてニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを5%スキムミルク、0.1% Tween-20を含むPBSでブロッキングし、1次抗体溶液で室温にて1時間反応させた。1次抗体にはニワトリのミオシンVa headドメイン (アミノ酸 5-752; 図2) を抗原とするポリクローナル抗体 (head抗体; San Paulo University, San Paulo, Brazil, Dr. R. E. Larsonより贈与)、およびラットのミオシンVa tailドメイン (アミノ酸 1005-1830; 図2) を抗原とするポリクローナル抗体 (tail抗体; Washington University, St. Louis, MO, USA, Dr. P. C. Bridgmanより贈与) を用いた。0.1% Tween-20を含むPBS (PBS-Tw) 中で15分間ずつ3回、振とうしながら洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体を含むPBS-Tw中で室温にて1時間反応させた。1次抗体の場合と同様に洗浄し、APバッファー(100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5)中に5分間浸した後、0.45% NBT (50 mg/ml nitroblue tetrazolium in 70% dimethylformamide) および0.35% BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate in dimethylformamide) を含むAPバッファー中で発色反応を行った。

蛍光抗体法による免疫組織化学

2週齢の正常および*dop*ラットの腹腔内にpentobarbital sodium (50 mg/kg body) を注入して麻酔した後、心臓から固定液 (4% paraformaldehyde, 0.1 Mリン酸緩衝液, pH 7.4) を灌流し、小脳を摘出して4°Cで1時間、同様の固定液に浸した。さらに10%、

20% sucroseを含むPBSを浸透させた後、OCTコンパウンド (サクラ精機、東京) に凍結包埋し、12 μ m厚の矢状断切片を作成した。切片をPBSで5分間3回洗浄した後、0.1% Triton X-100で10分間、0.1 M L-lysineで10分間処理し、5% ウシ血清アルブミン (BSA)、3%正常ヤギ血清、0.02% sodium azideを含むPBSで1時間ブロッキングを行った。一次抗体としてウェスタンブロットと同様のtail抗体を1% BSA、0.02% sodium azideを含むPBSで希釈し、4°Cで一晩、組織切片に反応させた。PBSで5分間3回洗浄した後、ビオチン化抗ウサギIgG抗体を室温にて1時間反応させ、一次抗体と同様の洗浄を行った。さらにFITC標識ストレプトアビジンを室温にて1時間反応させ、洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss, Jena, Germany) により観察を行った。

ミオシンVa cDNAクローニングと塩基配列解析

ミオシンVa cDNAのクローニングは、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) により行った。2週齢の正常および*dop*ラットの大脳皮質から抽出した全RNA 1 μ gを鋳型とし、反応液20 μ l中で、逆転写酵素 (MMLV-reverse transcriptase; Life Technologies, Rockville, USA) およびOligo dTプライマーもしくはミオシンVa特異的プライマー (L2282; 図1B) を用いて一本鎖cDNAを合成した (RT産物)。L2282によるRT産物はミオシンVa cDNAの5'側 (断片Iおよび5'; 図1C) の増幅の際の鋳型として用いた。RT産物の1 μ lを鋳型とし、反応液50 μ l中でAmpliTaqGold (Perkin Elmer, Norwalk, USA) を用いてPCRによる増幅を行った。PCRプライマーはマウスの

ミオシンVa cDNA塩基配列(Mercer et al., 1991)をもとに作成し、ミオシンVa cDNAのタンパク質コード領域を、互いに重複した5つのcDNA断片として増幅した。PCRプライマー、およびcDNA断片の模式図を図1に示す。非翻訳領域を含む5'末端および3'末端はRapid Amplification of cDNA Ends (Life Technologies)キットを用いたRACE法により増幅した。PCRおよびRACE法により得られたcDNA断片はpGEM-Teasy Vector System I (Promega)キットを用いてクローニングした。RT-PCRに用いたプライマーの名称および塩基配列を以下に示した；

U0063, 5'-CCAAGTTTGCCAGGGTTTGG-3'; U1201 5'-CATCAAGCCCATCTCCAAGC-3';
U1983, 5'-AAACCTTAA TGCCACTACT-3'; U3876, 5'-CCATCCA ACCCAA GGATGAC-3';
U4515, 5'-ATGCCGACTACCTGGACGAT-3'; U5475, 5'-CTCCA CAGCTGCTCATGGATGC-3';
L0151, 5'-CCTCAAGGTGAAGCAGGAGC-3'; L1304, 5'-TTGACAGCAGAA TGGAGAGC-3';
L2282, 5'-TGACCAGCACGGAAAAGAT-3'; L3954, 5'-TGCTTGTGCTATTTCACCTT-3';
L4771, 5'-TCTGGCGAGACGTGTTGTGC-3'; L5508, 5'-TCAGACCCGTGCGATGAAGC-3'.

cDNAクローンの塩基配列はABI 373A DNAシーケンサーを用いてdye-terminator法により解析した。PCR産物から得た複数のクローンの塩基配列を、AutoAssembler (Perkin Elmer)およびCLUSTAL W プログラム(Thompson et al., 1994)を用いて解析し、3クローン以上の塩基配列を比較して決定した。アミノ酸配列の相同性の比較にはPHYLP 3.573cプログラムを用い(Felsenstein, 1993)、progressive pairwise methodにより分子間系統図を作成した。

ミオシンVaゲノムDNAクローニング

ミオシンVa遺伝子の変異領域を増幅するためのゲノムPCRに用いたプライマーおよびミオシンVa遺伝子の模式図を図9に示す。プライマーは本研究でクローニングしたラットのミオシンVa cDNAの塩基配列をもとに作成した。肝臓から抽出したゲノムDNA約600 ngを鋳型とし、ExTaq (Takara, 東京)を用いたPCRにより増幅を行った。得られたDNA断片はcDNAと同様にクローニングし、塩基配列を決定した。用いたプライマーの名称および塩基配列は以下の通りである；

U1419, 5'-AGCTACAGCAA CAATTCAAC-3'; U1563, 5'-TGCTGGATGAGGAA TGTAAG-3';
L1445, 5'-TCCTGTTCCAGTTTGAAGAC-3'; L1585, 5'-TGTCATCGGTACCTCTAGGC-3'.

サザンブロット解析

*dop*ラットのミオシンVa遺伝子に、広範囲にわたる欠失などの変異が生じているか否かをサザンブロット法により検討した。*dop*ラットと比較するコントロールには、外見上正常な同腹仔を用いた。外見上正常な個体の遺伝子型は野生型もしくはヘテロ型の可能性が考えられるが、*dop*変異がサザンブロット解析で検出可能であれば、いずれも劣性ホモ型の*dop*ラットに対して異なった結果を示すことが期待された。しかしながら、3種類の制限酵素 (EcoRI, BamHI, PstI) を用い、マウスのミオシンVa cDNA (D46; Mercer et al., 1991) をプローブとした比較では、コントロールと*dop*ラットのDNA制限断片のサイズに大きな差異は検出されなかった (図 3A)。このことから*dop*ラットにおけるミオシンVa遺伝子変異は、サザンブロット解析では制限断片の大きさの差異として検出されない程度の、範囲の狭い変異である可能性が考えられた。

ラットの脳におけるミオシンVaの発現

*dop*ラットの脳でのミオシンVa mRNAの発現を検討するため、ノザンブロット法により解析を行った。サザンブロットと同様に外見上正常な同腹仔をコントロールとした。その結果、コントロール、*dop*ラットともに約7、8、11 kbの3種類の転写産物が検出された (図 3B)。マウスにおいてもほぼサイズの等しい3種類の転写産物が報

告されていることから (Mercer et al., 1991)、これらのバンドがラットのミオシンVa mRNAを示していると考えられた。コントロールと*dop*ラットの間では、転写産物の大きさに差異はなく、また、発現レベルについても*dop*ラットでの顕著な変化は認められなかった。すなわち、*dop*ラットの脳で発現しているミオシンVa mRNAの大きさ、発現量はともにほぼ正常であることが示された。

ウェスタンブロット解析によるミオシンVaタンパク質の発現の検討

*dop*ラットの脳におけるミオシンVaタンパク質の発現を検討するため、ウェスタンブロット解析を行った。ミオシンVaタンパク質のheadおよびtailドメインをそれぞれ抗原とする2種類のポリクローナル抗体を用い、*dop*ラットと外見上正常な同腹仔とを比較した。

アミノ酸配列から推定されたミオシンVaタンパク質の分子量は約210 kDaであるが、ウェスタンブロットでは約190 kDaの位置に検出されることがマウス、ラット、ニワトリで報告されている (Cheney et al., 1993; Evans et al., 1997)。今回の結果では、正常個体の脳において、head抗体、tail抗体でともに約180 kDaの位置にミオシンVaタンパク質と考えられるバンドが検出された。ところが、*dop*ラットの脳ではいずれの抗体を用いてもこの180 kDaのバンドは検出されず、他に特異的なバンドも全く認められなかった (図 4A)。また、tail抗体を用いた場合のみ、正常個体と*dop*ラットの両方で180 kDaのバンドの低分子量側に弱いバンドが検出された。これは正常個体と*dop*ラットで同じように検出されることから、非特異的なバンドだと考えられる。

この結果より、*dop*ラットの脳ではミオシンVaタンパク質がほとんど存在していないことが示唆された。

蛍光抗体染色によるミオシンVaの発現

ウェスタンブロット解析の結果を確認するため、ラットの小脳の組織切片を用いた蛍光抗体法によりミオシンVaタンパク質の発現を検討した。Tail抗体を用いた抗体染色では、正常個体の小脳で分子層、プルキンエ細胞に強い蛍光が観察されたのに対し、*dop*ラットの小脳では特異的な蛍光染色像は認められなかった(図4B)。この結果は、ウェスタンブロット解析の結果と同様、*dop*ラットの脳ではミオシンVaタンパク質が存在しないことを示唆するものであった。

ラットのみオシンVa cDNAのクローニング

*dop*ラットの脳においてミオシンVaタンパク質が欠損していることが示唆されたことから、発現しているミオシンVa mRNAが何らかの変異を含んでいる可能性が考えられた。そこでRT-PCR法によるcDNAクローニングを行い、正常および*dop*ラットから得られたミオシンVa cDNAの塩基配列を比較した。ラットのみオシンVa cDNAの塩基配列はこれまでに報告されていないため、第一に野生型ラットミオシンVa cDNAのクローニングを試みた。変異を含んだcDNAがヘテロ個体からクローニングされる可能性も考えられたので、塩基配列の決定の際の変異の混入をさけるため、1種類のcDNA断片について3回以上のRT-PCRを行い、各回に得られたクローンの塩基配列を

比較のうえ決定した。

報告されているマウスミオシンVa cDNAの塩基配列 (Mercer et al., 1991) をもとにPCRプライマーを設計し、全タンパク質コード領域を5断片に分けてクローニングを行った(図1)。その際、ミオシンVa cDNAのタンパク質コード領域は5 kb以上に及ぶために通常のOligo dTプライマーを用いたRT反応では、5'側領域の一本鎖cDNAの合成が十分に行われないと考えられた。そこでミオシンVa特異的プライマー (L2282) を用いたRT反応を行い、得られた一本鎖cDNAを鋳型として用いたPCRにより5'側のcDNA断片I (図1D)を増幅した。また、翻訳開始コドン上流の塩基配列にはGCの割合が高いことがマウスおよびニワトリのみオシンVa cDNAの塩基配列の比較から予想された。そこで5' RACEのためのRT反応の際には、GC結合の解離に有効だと考えられているdimethyl sulfoxide (DMSO) を反応液に添加した。この処理により、5'末端のcDNA断片が得られた。

各cDNA断片の塩基配列を決定した結果、得られたcDNAの塩基配列は5,487 bpのタンパク質コード領域を含んでいた(図5)。転写開始部位はKozakのルールに一致し(Kozak, 1987)、最も5'側の翻訳開始部位であるメチオニンのコドン(ATG)の30 bp上流には他の終止コドンが存在することから、このATGコドンが翻訳開始部位であることが確認された。

cDNAの塩基配列から推定されたアミノ酸配列は推定分子量約210 kDaのタンパク質をコードし、マウスのミオシンVa (Mercer et al., 1991)、ヒトのMYH12 (Engle and Kennett, 1994)、ニワトリのp190 (Espreafico et al., 1992) とそれぞれ97%、96%、90%

の相同性を示したのに対し、同じクラスVミオシンに属するラットのmyr6/ミオシンVb (Zhao et al., 1996) との相同性は59%であった (図6)。このことからクローニングしたcDNAはラットのみオシンVaのものであることが示された。ラットのみオシンVa cDNA塩基配列はGenBankに登録し (accession No. AB035736)、Rat Genetic Nomenclature Committeeに従い、遺伝子記号はMyo5a、タンパク質はMyoVAとした。

ラットのみオシンVaタンパク質の一次構造を種間で比較したところ (図7)、headドメインは、ミオシンファミリーに共通したATP結合領域、アクチン結合領域の配列を含み、ドメイン全体でアミノ酸配列が高度に保存されていた。またneckドメインにはミオシンVファミリーの特徴である6つのIQモチーフとよばれる配列が存在した。このことからラットのみオシンVaも他の生物種のものと同様した一次構造を有し、機能の面でも相同であることが示唆された。

dopラットの脳におけるミオシンVa転写産物の検討

次に、dopラットの脳から野生型と同様の方法を用いてミオシンVa cDNAのクローニングを試みた。その過程で、RT-PCRで得られたcDNA断片のサイズをアガロースゲル電気泳動により比較したところ、cDNA断片II (図1D) のサイズが野生型のものよりも小さいことを見出した。そこでこのcDNA断片IIの塩基配列を解析したところ、141 bp (1442-1582; 図8A) の配列が欠失していることが明らかとなった。さらに他のcDNA断片の塩基配列を決定し、全タンパク質コード領域について野生型と比較した結果、この141 bpの欠失が唯一の変異であり、ミオシンVaタンパク質のheadド

メイン中の47アミノ酸 (468-514) に相当すること、欠失によるフレームシフトは起こさないことが明らかとなった。このことは、141 bpの欠失を含んだmRNAが正常なミオシンVaタンパク質よりも約6 kDa小さいタンパク質をコードすることを示唆する。しかしながら、これまでの解析でdopラットの脳ではミオシンVaタンパク質が検出されなかったことから、何らかのメカニズムでタンパク質の発現、もしくは抗体による認識が阻害されたと考えられる。

141 bpの欠失を含むmRNAの発現とdop表現型との連鎖解析

ミオシンVa mRNAに見い出された141 bpの欠失 (変異型mRNA) がdopの表現型の原因であるか否かを明らかにするため、変異型mRNAが表現型と一致して個体間に分配されるかどうかを、RT-PCRを用いた連鎖解析により検討した。

141 bpの欠失を含んだ領域を増幅するプライマーを用いたRT-PCRにより (図8B)、dopラット1匹を含む同腹仔7匹とその親の脳から得たcDNA断片のサイズをアガロースゲル電気泳動により比較した。その結果、サイズが約140 bp異なる2種類の断片が検出された。図8Cに示すように、dopラットではサイズの小さい断片のみが見られたのに対し、親および正常同腹仔3匹では2種類の断片が、他の正常同腹仔3匹ではサイズの大きい断片のみが見られた。サイズの小さいcDNA断片はmRNA上に欠失が存在することを示すと考えられる。この結果から、dopラットでは変異型mRNAしか発現しておらず、この欠失が、mRNAレベルでのdop変異の原因であることが強く示唆された。また、親の遺伝子型はdop変異に関してヘテロ型であることが交配実験から明

らかにされており、今回検出された2種類のサイズのcDNA断片は、これらの個体で正常ミオシンVa mRNAと変異型mRNAの両方が発現していることを示唆する。このことから、親と同様に2種類のcDNA断片が検出された3匹の正常同腹仔もヘテロ型であり、大きいcDNA断片のみが検出された他の正常同腹仔は野生型であることが明らかとなった。

ミオシンVa遺伝子のエクソン-イントロン構造

cDNA解析で明らかになったミオシンVa mRNAの欠失の原因を遺伝子レベルで特定するため、PCRによりミオシンVaゲノムDNAを増幅し、解析を行った。図9Aに示すように、変異型mRNAの欠失に相当する141 bpの配列に近接したゲノム領域を増幅するようにプライマーを設定し（U1419とL1445、U1563とL1585）、野生型ラットの肝臓より抽出したゲノムDNAに対してPCRを行った。その結果、141 bpの配列の5'側領域で約3 kb、3'側領域で約1.5 kbのDNA断片が得られた（図9B）。これらのDNA断片はイントロンを含んでいると考えられたため、その両端の塩基配列を解析したところ、cDNAに相当する塩基配列に接してエクソン-イントロン認識配列が見い出された（図9C）。このことから、141 bpの配列の5'側には約3 kb、3'側には約1.5 kbのイントロンが存在することが示唆された。また、プライマーU1419とL1585を用いてこのゲノム領域全体を増幅し、塩基配列を解析した結果、141 bpの領域が単一のエクソンからなることを確認した。

dopラットにおけるゲノムDNA上の変異の解析

次にdopラットから抽出したゲノムDNA（変異型ゲノムDNA）で、野生型DNAと同様に141 bpエクソンの5'側、3'側イントロンそれぞれを増幅するPCRを試みた。しかしながら反応産物が得られず、このゲノム領域に変異が存在する可能性が示唆された。そこで、プライマーU1419とL1585（図10A）を用い、両イントロンを含む領域全体を増幅するPCRを試みたところ、約5 kbのDNA断片を得た。このDNA断片の両端の塩基配列は野生型と一致しており、cDNAに相当する塩基配列に接してエクソン-イントロン認識配列が存在した。さらに制限酵素ApaIおよびNsiIによる制限断片をそれぞれサブクローニングし、141 bpエクソンの周辺の塩基配列を解析した。その結果、図10に示すように、変異型ゲノムDNAでは、306 bpの塩基配列が逆転し、その5'側の217 bpおよび3'側の17 bpの配列が欠失していることが明らかとなった。また、この再配列変異によって、141 bpのエクソンの一部が欠失し、残る部分の塩基配列が逆転していることが示された。これに伴って141 bpエクソンに隣接するエクソン-イントロン認識配列も欠失もしくは逆転しており、RNAスプライシング機構に対して機能しないと考えられた。

ゲノムPCRによる変異の検出

欠失によるDNAサイズの差を検出するために、変異領域の外側のイントロン配列にプライマーを設定し、ゲノムPCRを行った（図10A, B）。RT-PCRにより同定され

た野生型、ヘテロ型および*dop*ラットを比較したところ、図 10Cに示すように、野生型で検出された約700 bpのDNA断片に対して、約230 bp小さいDNA断片が*dop*ラットで検出された。ヘテロ型では両方のサイズの断片が検出された。このDNA断片のサイズの差は、塩基配列の解析から明らかになったゲノムDNA上の欠失の大きさ(217 bp + 17 bp) とほぼ一致した。さらに、DOP系統ラット45匹について同様のゲノムPCRによる遺伝子型解析を行い、結果を表1に示した。現在すすめている解析の例数が増えれば、野生型、ヘテロ型、変異型の分離比はおおよそ1:2:1で、理論値と一致することが期待される。

DNA組換え部位の塩基配列の検討

*dop*ラットのゲノムDNAで見い出された再配列変異が引き起こされたメカニズムについて検討するため、変異部位の塩基配列の相同性について検討した(図 10B)。DNA上の変異領域では、欠失と逆転により、2箇所DNA組換えが起こったと考えられる。5'側の組換え部位(図 10B、*印)には3つのATG繰り返し配列が存在し、組換えは2番目と3番目のATGの間で起こっていた。3'側の組換え部位(図 10B、**印)ではCCCCの4塩基連続配列の中央で組換えが起こっていた。これらの部位の前後では、相同組換えやウイルスDNAの挿入などを示唆するような、際立った塩基配列の相同領域や繰り返し配列は見い出されなかった。

2-4 考察

以上の検討により、*dop*変異の背景として、1) ミオシンVa遺伝子上に540 bpにわたるDNAの再配列変異がある、2) *dop*ラットの脳では141 bpのエクソン配列が欠失した変異型ミオシンVa mRNAが発現している、3) *dop*ラットの脳ではミオシンVaタンパク質が存在していないことを示した。これらの結果から、*dop*ラットは*d'*マウスと同様にミオシンVa欠損変異であることが明らかとなった。また、ラットのみオシンVa cDNAをクローニングし、初めて全タンパク質コード領域の塩基配列を決定した。

ラットのクラスVミオシン

Zhaoらは、ラットにおけるクラスVミオシンを検索するため、ラット脳cDNAライブラリーのスクリーニングを行って新規遺伝子である*myr6* cDNAをクローニングした。*myr6* cDNAのhead領域の塩基配列はマウスのミオシンVaと高い相同性を示したが、tail領域の塩基配列の比較からはミオシンVaとは異なることが示唆された。遺伝子マッピングの結果、マウスにおける*myr6*のホモログ遺伝子がミオシンVaとは異なる染色体に存在することが示されたことから、*myr6*は第二のクラスVミオシンであるミオシンVbとして報告された(Zhao et al., 1996)。ラットにおけるミオシンVaの存在はこれまでも示唆されていたが、本研究によって初めてそのcDNA塩基配列を決定し、*myr6*よりも他の生物種のミオシンVaとの相同性が高いことを示した。これにより、ラットにおいても少なくとも2種類のクラスVミオシンが存在することが明らかとなった。

ミオシンVa mRNA tail領域の選択的スプライシング

ミオシンVa mRNAは、tail領域の選択的スプライシングによって生じる3種のアイソフォームが存在することがヒト、マウスで報告されている (Lambert et al., 1998; Seperack et al., 1995)。これらのアイソフォームは組織特異的に発現することが知られており、マウスの脳ではその中の1種が特異的に発現している (Seperack et al., 1995)。本研究で得られたラットの脳のみオシンVa cDNAのtail領域の塩基配列は、マウスのミオシンVaの脳特異的なアイソフォームと一致しており、これ以外のアイソフォームに相当するクローンは見い出されなかった。このことから、ラットの脳ではマウスと同様の脳特異的なミオシンVaのアイソフォームが発現していると考えられる。

dopラットの変異型ミオシンVa mRNAによるタンパク質欠損のメカニズム

cDNA塩基配列の解析とRT-PCRによる連鎖解析により、dopラットの脳では141 bpの欠失を伴ったミオシンVa mRNAが発現していることが示された。この欠失はフレームシフトを起こさないにもかかわらず、dopラットの脳ではミオシンVaタンパク質が検出されなかった。その原因の一つとして、タンパク質の構造変化による抗原性の消失が考えられた。しかしながら、ミオシンVa分子の高次構造においてはheadドメインとtailドメインは構造的に独立しており、headドメインにおける47アミノ酸の欠失がtailドメインに対して大きな構造変化を引き起こす可能性は小さいと考えられる。

dopラットの脳におけるウェスタンブロット解析では、headもしくはtailドメインを認

識する2種類のポリクローナル抗体を使用したにもかかわらず、特異的なシグナルが検出されなかったことから、dopラットの脳ではミオシンVaタンパク質が欠損していることが強く示唆される。ミオシンVaタンパク質欠損のメカニズムとしては、1) mRNA上の欠失に起因するタンパク質の翻訳障害、2) 47アミノ酸の欠失に起因する変異ミオシンVaタンパク質の不安定化が考えられる。47アミノ酸の欠失によるミオシンVaタンパク質のheadドメインの構造変化を検討するため、すでに結晶構造が解析されているニワトリのミオシンIIのheadドメインをモデルとして、ミオシンVa headドメインの構造を推定した (Cope et al., 1996; Huang et al., 1998a)。その結果、予想されるアミノ酸欠失部分 (468-514) は、ミオシンIIのheadドメインのアクチン結合領域の近くに位置する3つの α ヘリックス構造 (ヘリックスP-R; 図 11) にわたることが明らかとなった (University of California, Berkeley, Dr. M. J. T. V. Cope, 私信)。この領域が欠失することにより、ミオシンVaタンパク質のheadドメインには大きな立体構造変化が起こり、結果として変異タンパク質が不安定化する可能性が考えられる。

dopラットのゲノムDNA変異によるmRNAスプライシング異常

ミオシンVaゲノムDNAの塩基配列の解析から、dopラットのミオシンVa mRNA上の141 bpの欠失は、単一のエクソンの欠落によるものであることが示された。またdopラットのゲノムDNAにおける再配列変異によって、このエクソンの5'側に接するエクソン-イントロン認識配列 (スプライシングアクセプター配列) と3'側に接するエクソン-イントロン認識配列 (スプライシングドナー配列) が失われていることが明ら

かとなった。哺乳類のエクソン-イントロン認識配列は高度に保存されており、特にコア配列と呼ばれる2塩基の配列はすべてのエクソン-イントロン境界で100%保存されている (Lewin, 1994)。Nakaiらによる、スプライシング異常を伴う哺乳類の遺伝子変異のデータベースでは、90%以上の変異がコア配列に起こっており、その結果引き起こされる異常の中では、エクソンスキップがもっとも多いことが示された (Nakai and Sakamoto, 1994)。マウスのみオシンVa変異系統でも、スプライシング異常を持つものがいくつか同定されている。その中でtail領域のイントロンのスプライシングアクセプター配列に点突然変異を持つものでは、変異部位の下流でエクソンスキップが起こることが示された (Huang et al., 1998b)。*dop*ラットの再配列変異では141 bpのエクソンに接するエクソン-イントロン認識配列が失われているため、5'側イントロンのスプライシングドナー配列に対して3'側イントロンのアクセプター配列が認識され、変異を含む領域全体がスプライシングにより脱落した結果、141 bpのエクソンが欠失したmRNAが発現したと考えられる。

DNA非相同組換えによる遺伝子変異

逆転、欠失変異はDNAの組換えを伴う。これには相同組換えと非相同組換えの2種類の機構が知られており、組換え部位の周辺で20塩基以上の相同性が認められない場合は非相同組換えと定義されている。*dop*ラットのゲノムDNAにおける再配列変異では、組換え部位の周辺において数塩基の繰り返し配列が存在するものの、それ以上の特徴的な相同性は見いだされなかった。また、ウイルスDNAの挿入がゲノム

DNAの相同組換えや欠失などを引き起こす例がマウスで報告されているが (Copeland et al., 1983)、ウイルスDNAの組込みを示唆するような繰り返し配列も認められなかった。これらのことから、*dop*ラットのみオシンVa遺伝子変異は非相同組換え機構によって引き起こされたと考えられる。非相同組換えの機構としてはend-joining reactionが考えられており、これはしばしば組換え部位の周辺でDNAの欠失を伴うことが報告されている (Critchlow and Jackson, 1998; Jeggo, 1998; Smider and Chu, 1997)。

DNA欠失を伴う逆転変異

*dop*ラットにおけるみオシンVa遺伝子変異は、306 bpのDNA 2本鎖の逆転とそれに伴う217 bpおよび17 bpの欠失を含み、再配列の領域は540 bpにわたる。このようなゲノムDNA上の欠失を伴った逆転が見いだされる遺伝子変異は、マウスでいくつか報告されている。放射線照射による突然変異系統である*se^v*マウスでは、*short-ear(se)*と*Snell's waltzer(sv)*の2つの遺伝子座にわたる逆転が存在し、その両端に106 bpと818 bpの欠失を伴っていた (Avraham et al., 1995)。また、毛色異常を示す突然変異 a^{18H} マウスでは*agouti*と*itchy*を含む領域が逆転しており、その両端には18 bpと20 bpの欠失が見られた (Perry et al., 1998)。しかしながら*dop*ラットの変異と異なり、これらのマウス突然変異に見られた逆転は複数の遺伝子座にわたる広い領域(数十~数百Mb)にわたっていた。本研究で明らかにしたような、単一遺伝子内で540 bpという狭い領域内での欠失を伴う逆転変異は非常に稀な例だと考えられる。

*d'*マウスにおけるミオシンVa遺伝子変異との比較

ゲノムDNAの解析によって、*dop*ラットのゲノムDNA上の変異はミオシンVa遺伝子のhead領域にある540 bpの再配列変異であることが明らかになった。これに対し、*d'*マウスではミオシンVa遺伝子のtail領域のゲノムDNAに約3.5 kbにわたる欠失があること、*d'*マウスの脳ではミオシンVa mRNAの発現量が極端に減少しており、そのサイズも異常であることが報告されている (図 12; Moore et al., 1988; Strobel et al., 1990)。この結果およびEvansらの行ったウェスタンブロット解析の結果より (Evans et al., 1997)、*d'*マウスはミオシンVaタンパク質が存在しない欠損変異であることが示された。このように遺伝子上の変異、およびそれがmRNA発現に及ぼす影響は*dop*ラットと*d'*マウスで異なるものの、いずれもミオシンVaタンパク質を欠損しているという点で両者に共通した表現型を引き起こすものと考えられる。

3章

ラット脳でのミオシンVaタンパク質の分布

3-1 目的

ミオシンVaの欠損もしくは機能異常が、ラット、マウスおよびヒトにおいて神経症状を引き起こすことから、ミオシンVaは中枢神経系の機能に重要な役割を果たしていると考えられる。ミオシンVaタンパク質を欠損した*dop*ラットもしくは*d'*マウスの中枢神経系では、プルキンエ細胞スパインにおけるSERの欠損 (Dekker-Ohno et al., 1996; Takagishi et al., 1996) とシナプス伝達の長期抑圧 (LTD) の欠如 (Miyata et al., 1997)、および小脳の平行線維の前シナプス終末の肥大 (Bridgman, 1999) 等の異常がこれまでに報告されている。しかしながら、小脳以外の領域での異常はいまだ十分に検討されておらず、神経症状発症のメカニズムは殆ど明らかになっていない。ミオシンVa欠損による脳機能への影響を検討するためには、まず正常な脳におけるミオシンVaの発現分布を明らかにすることが重要だと考えられる。マウスの脳においては、ミオシンVa mRNAが脳の全域にわたって神経細胞で発現していることがすでに示されている (Mercer et al., 1991)。しかしながらミオシンVaタンパク質の分布については、小脳および脳幹の一部の細胞での発現しか報告されておらず (Espindola et al., 1992; Espreafico et al., 1992)、脳の他の領域における発現分布は明らかにされていない。そこで本研究では、ラットの脳におけるミオシンVaタンパク質の分布を明らかにすることを目的として、抗ミオシンVa抗体を用いた蛍光抗体法による免疫組織化学を行った。

3-2 方法

組織固定と切片

免疫組織化学には生後18日目のDOP系統ラットの野生型個体の脳を用い、ミオシンVaタンパク質を欠損した劣性ホモ個体 (*dop*ラット) の脳をコントロールとした (図4B参照)。ラットの腹腔内にpentobarbital sodium (50 mg/kg body) を注入して麻酔した後、心臓から固定液 (4% paraformaldehyde, 0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4) を灌流し、脳を摘出して大脳前半部、後半部、小脳の3ブロックに分け、4°Cで1時間、同様の固定液に浸した。さらに10%、20% sucrose (0.1 Mリン酸塩緩衝液; PBS) を浸透させた後、各ブロックをOCTコンパウンド (サクラ精機、東京) に凍結包埋した。クライオスタット (HM500-OM; MICROM, Walldorf, Germany) を用いて12 μ m厚の矢状断、前額断の凍結切片を作成した。

蛍光抗体染色

凍結切片をPBSで5分間3回洗浄した後、0.1% Triton X-100で10分間、0.1 M L-lysineで10分間処理し、5% ウシ血清アルブミン (BSA)、3%正常ヤギ血清、0.02% sodium azideを含むPBSで1時間ブロッキングを行った。一次抗体には抗ラットミオシンVa tailドメイン抗体 (Washington大学、Dr. P. Bridgmanより贈与; Evans et al., 1997) および抗ニワトリミオシンVa tailドメイン抗体 (アミノ酸1141-1830; North Carolina大学、Dr. R. E. Cheneyより贈与; Espreafico et al., 1992) を用いた。それぞれの抗体を1%

BSA、0.02% sodium azideを含むPBSで希釈し、4°Cで一晩、組織切片に反応させた。PBSで5分間3回洗浄した後、ビオチン化抗ウサギIgG抗体で室温にて1時間反応させた。さらに一次抗体と同様の洗浄を行った後、FITC標識ストレプトアビジンで室温にて1時間反応させ、洗浄した後に共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss, Jena, Germany) により観察を行った。

脳の構造の同定には "A stereotaxic atlas of the rat brain" (Pellegrino et al., 1979) を参照した。

抗体の検討

一次抗体には2種類のポリクローナル抗体、すなわちEspreaficoらが免疫組織化学に用いた抗ニワトリミオシンVa抗体 (Espreafico et al., 1992) と、Bridgmanらにより作成された抗ラットミオシンVa抗体 (Evans et al., 1997) を用いた。予備実験として行ったウェスタンブロットでは、両者ともミオシンVaタンパク質を特異的に認識し、検出感度にも大きな差は見られなかった。しかしながら、ラットの小脳の組織切片を用いた蛍光抗体染色を行ってそれぞれの染色像を観察したところ、抗ラットミオシンVa抗体を使用した方が、より細部まで明瞭な像が観察された。したがって、以下の観察はすべて抗ラットミオシンVa抗体を用いた結果を示した。

抗体染色シグナルの分布

抗ミオシンVa抗体による蛍光シグナルは、矢状断、前額断のすべての切片にわたって広く分布していた。しかしその蛍光の強さは一様ではなく、脳の領域や細胞の種類によってシグナルの強弱の差異が認められた。蛍光抗体染色の結果を模式的に図13に示した。

小脳

小脳のプルキンエ細胞では、細胞体および樹状突起全体にわたって粒状の強い蛍光が認められた。それに対し、パーグマン細胞では蛍光はまったく認められなかつ

た。内顆粒層の顆粒細胞、ゴルジ細胞では、プルキンエ細胞層やプルキンエ細胞の樹状突起および平行線維が分布する分子層に対して、比較的弱い蛍光シグナルが観察された (図 14A, B)。小脳核の細胞群では顆粒細胞よりも強い蛍光シグナルが観察された (図 14C)。

脳幹

脳幹部では他の領域より若干強い蛍光シグナルが認められた。中でも、黒質、橋核、台形核、前庭核およびオリブ核では特に強い蛍光シグナルが局在していた (図 13, 15)。これらの神経核では大型の神経細胞の細胞体および樹状突起に蛍光が見られた。脳幹部を走る神経線維束の断面にも蛍光シグナルが観察され、ミオシンVaタンパク質がこれらの繊維束を形成する軸索中にも存在することが示唆された。

大脳皮質

大脳皮質では、I層からVI層まで一様に中程度の強さの蛍光が観察され、層による差異は認められなかった (図 16)。高倍率による観察では、細胞体および樹状突起全体にわたって蛍光が認められた。

その他の領域

嗅球においては、シナプスを多く形成している糸球体層に非常に強い蛍光シグナルが観察された (図 17A)。これに対し、顆粒細胞層ではバックグラウンドよりわずかに高い蛍光シグナルしか認められなかった。

視床下部では嗅球糸球体層と同程度の強い蛍光シグナルが観察された。ここでは大型の神経細胞の細胞質に強いシグナルが見られた (図 17B)。

海馬では、錐体細胞層に中程度の強さの蛍光が観察された。また、歯状回の多形細胞層の一部の細胞で特に強い蛍光が認められた。これらの細胞形態は多様で、細胞体および樹状突起の細胞質まで一様に強い蛍光が認められた (図 17C)。海馬多形細胞層のそれ以外の細胞、顆粒細胞層での蛍光シグナルはごく弱く一様に観察された。

これ以外の領域ではミオシンVaに対する抗体染色のシグナルは、中程度の強さでほぼ一様に分布していた。

3-4 考察

ラットの脳の組織切片では、抗ミオシンVa抗体による染色はほとんどの領域で認められた。マウスの脳における *in situ* hybridization では、ミオシンVa mRNA が脳の全域にわたって分布していることが示されており (Mercer et al., 1991)、本研究の結果から得られたミオシンVaタンパク質の分布とほぼ一致する。さらに、今回の検討ではこれまで報告されていなかったミオシンVaタンパク質の特徴的な局在を明らかにした。脳幹で強いシグナルが認められた神経核の多くは、姿勢の維持や運動制御に関わることが知られている。黒質は姿勢の維持や随意運動に重要な役割を有し、黒質の神経細胞の変性は運動障害を伴うパーキンソン病を引き起こす。また橋核は体平衡や動眼反射、前庭核は前庭器官からの感覚入力と運動出力を担うと考えられている。下オリーブ核からはプルキンエ細胞への刺激伝達を行う登上線維が発し、やはり運動制御に関与していると考えられる。ミオシンVaの欠損がこれらの神経核における神経伝達に障害をもたらし、*dop*ラットで見られる運動失調や神経症状の要因となる可能性が考えられる。

海馬歯状回の多形細胞層には、複数の種類の細胞が存在する。今回の観察で強い蛍光シグナルが認められた一群の細胞がどのような神経機能を担っているかは明らかにされていないが、ミオシンVaがこれらの細胞で多く発現してその細胞特異的な機能に関与していることが示唆される。一方で、大脳皮質などで認められる一様なシグナルからは、ミオシンVaがこれらの細胞全般に共通した機能に関わっているこ

とが考えられる。これらの結果から、ミオシンVaは細胞内で複数の異なる機能に
与している可能性が示唆された。

今回明らかにしたミオシンVaタンパク質の分布が、今後さらに神経機能における
ミオシンVaの役割を解析する上での手がかりとなることが期待される。

4章

結論と展望

本研究では、遺伝性神経疾患を示す *dop* ラットの分子遺伝学的解析により、*dop* ラットがミオシンVa遺伝子変異を有すること、劣性ホモ個体の脳においてミオシンVaタンパク質を欠損していることを明らかにした。また、ミオシンVaタンパク質の欠損が脳に与える影響を検討するための手がかりとして、ラットの脳におけるミオシンVaタンパク質の分布を明らかにし、ミオシンVaが小脳のみならず、大脳においても広く分布しており、特定の細胞に多く局在していることを示した。この結果から、ミオシンVaの欠損が脳における複数の神経機能に障害をもたらし、*dop* ラットの示す多様な神経症状の要因となっていることが示唆された。

dop ラットおよび *d'* マウスの脳では、これまでに小脳のプルキンエ細胞を除いては顕著な形態異常が見い出されていない。したがって神経症状の原因としては、脳の構造異常ではなく、神経伝達の機能的な障害が予想される。

宮田らによる電気生理学的手法を用いた解析によって、*dop* ラットにおける神経機能の異常の一例が明らかとなった。小脳のプルキンエ細胞スパインは、平行線維からの入力を受けるシナプスを形成しており、条件刺激によってこのシナプスの伝達効率が低下する長期抑圧 (LTD) とよばれる現象を示す。しかし *dop* ラットではこのLTDが認められない (Miyata et al., 1997)。LTDを誘発するためには細胞内のイノシトール1, 4, 5-三リン酸 (IP3) により誘導されるスパイン内の局所的なカルシウムイオン濃度の上昇が必要であることが報告されており (Finch and Augustine, 1998)、カルシウムイオンはIP3受容体 (IP3R) を介して滑面小胞体 (SER) から細胞質中に放出されると考えられている。したがって、*dop* ラットのプルキンエ細胞のスパインにおいて

はSERが欠損しているために局所的なカルシウムイオンの放出が起こらず、LTDが誘発されないと考えられる。プルキンエ細胞のLTDは、運動学習や姿勢制御の過程に重要な役割を果たすと考えられており (Ito, 1989)、LTDの欠損が*dop*ラットで観察される神経症状の一因であることが推察できる。

この推論を支持する結果として、プルキンエ細胞のSERに多く存在しているI型IP3R (IP3R1) を欠いたノックアウトマウス、およびIP3R1遺伝子に変異を持つ*opisthotonus* (*opt*) マウスでは、*dop*ラットと極めて類似した神経症状が認められ (Matsumoto et al., 1996; Street et al., 1997)、さらにIP3R1ノックアウトマウスにおいてプルキンエ細胞のLTDが欠如していることが報告された (Inoue et al., 1998)。しかしながら、IP3R1の機能欠損による神経症状発症のメカニズムが、LTDの欠如にのみ起因するのか、脳の他の領域の異常が関与するのかについては、*dop*ラットの場合と同様、明らかにされていない。IP3R1の発現はプルキンエ細胞を始め、海馬CA1領域、尾状核、大脳皮質に多く認められる (Matsumoto et al., 1996)。本研究で示したようにミオシンVaタンパク質は脳で広く分布しており、これらの領域の細胞でもIP3R1とミオシンVaがともに存在することが考えられる。これらの細胞におけるミオシンVaタンパク質の欠損が、プルキンエ細胞の場合と同様に、細胞末端のSERの形態に影響を及ぼし、IP3R1を介してSERから放出されるCa²⁺イオンに依存した神経伝達に対して異常をもたらす可能性が考えられる。

ミオシンVaはまた、ラットの海馬においてシナプス前終末からの神経伝達物質の放出にも関与することが示唆されている。Prekerisらは、シナプス構造が保たれた小

胞であるシナプトソームを多く含む分画を海馬から精製し、これを用いて神経伝達物質であるグルタミン酸の放出がアクチンATPase阻害剤によって阻害されることを示した。さらに、このシナプトソーム分画ではミオシンVaタンパク質がシナプス小胞タンパク質であるsynaptobrevinおよびsynaptophysinと複合体を形成していることも明らかにした (Prekeris and Terrian, 1997)。シナプス前終末では、神経伝達物質を含むシナプス小胞が中心部から細胞膜直下へと移動し、細胞膜と融合して神経伝達物質を放出した後に再び膜から分離して中心部へと移動して循環していると考えられている (Augustine et al., 1999)。したがって、ミオシンVaタンパク質はsynaptobrevinおよびsynaptophysinを介してシナプス小胞と結合し、その循環過程に何らかの役割を果たしているのではないかと考えられる。シナプス小胞に結合し、その循環に関与するsynapsin-Iおよびsynapsin-IIのノックアウトマウスでは、生後2ヶ月程で背面に反るてんかん様の発作があらわれ、姿勢制御が困難になる等の症状が認められた (Rosahl et al., 1995)。これらの症状は*dop*ラットに見られるものと類似しており、ミオシンVaの欠損によってシナプス小胞の循環が阻害され、その結果神経伝達物質の放出に異常を来すことが*dop*ラットの神経症状の一因として考えられる。

一方、神経伝達物質の放出にはミオシンIIも関与することが、ラットの上頸神経節細胞を用いた研究から示唆されており (Mochida et al., 1994)、ミオシンVaと機能が重複している可能性が考えられる。*dop*ラットをミオシンVa欠損モデルとして解析に用いることにより、ミオシンIIとの機能分担について新たな知見が得られることが期待される。

IP3R1などの神経伝達機能に関わる遺伝子のノックアウトマウスは、その神経症状にてんかん様の発作が含まれることから、ヒトにおけるてんかんのメカニズムを解析する上でのモデルと考えられている (Noebels, 1996; Puranam and McNamara, 1999)。同様にミオシンVaの機能異常もヒトにおいて神経症状をもたらすことが知られており (Menasche et al., 2000; Pastural et al., 1997; Pastural et al., 2000)、その疾患モデルとしての *dop* ラット、*d¹* マウスの神経症状のメカニズムを明らかにすることは、ヒトにおける疾患を理解する上でも重要と考えられる。

*In vivo*での神経機能の解明においては、遺伝子操作の可能なマウスが多く用いられてきた一方で、生理学的な解析にはラットを用いて行われてきた研究も少なくない。今後 *dop* ラットがミオシンVaの機能と神経症状のメカニズムを生理学的な手法を用いて解析する上での有用なモデル動物として用いられることが期待される。

謝辞

マウスのミオシンVa cDNAを贈与していただき、ミオシンVa遺伝子変異に関して有益な御助言を賜りましたNCI-FCRDCのDr. Nancy A. Jenkinsにお礼申し上げます。抗ミオシンVa抗体を快く贈与して下さったWashington大学のDr. Paul Bridgman、San Pauro大学のDr. Roy E. LarsonおよびNorth Carolina大学のDr. Richard E. Cheneyに感謝致します。ミオシンのhead構造に関して有益な御助言を賜りましたCalifornia大学のDr. M. Jamie T. V. Copeに感謝致します。DOP系統ラットの維持にあたって御指導を賜りました名古屋大学農学部織田銑一博士ならびに林富子さんにお礼申し上げます。名古屋大学環境医学研究所、内分泌・代謝分野の林良敬博士には遺伝子解析について御指導を賜り、妹尾久雄教授には有益な御助言を戴きましたことに、心より感謝致します。同研究所、発生・遺伝分野の高岸芳子博士の御指導、御助言に深く感謝致します。本研究をすすめるにあたり、終始御指導、御鞭撻戴きました環境医学研究所、発生・遺伝分野の村田善晴教授、人間情報学研究科の岩井川幸生教授に心より感謝致します。

参考文献

- Augustine, G. J., Burns, M. E., DeBello, W. M., Hilfiker, S., Morgan, J. R., Schweizer, F. E., Tokumaru, H., and Umayahara, K. (1999). Proteins involved in synaptic vesicle trafficking. *J Physiol* 520, 33-41.
- Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* 11, 369-375.
- Bridgman, P. C. (1999). Myosin Va movements in normal and *dilute-lethal* axons provide support for a dual filament motor complex. *J Cell Biol* 164, 1045-1060.
- Cheney, R. E., O'Shea, M. K., Heuser, J. E., Coelho, M. V., Wolenski, J. S., Espreafico, E. M., Forscher, P., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1993). Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75, 13-23.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Cope, M. J. T., Whisstock, J., Rayment, I., and Kendrick-Jones, J. (1996). Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* 4, 969-987.
- Copeland, N. G., Hutchison, K. W., and Jenkins, N. A. (1983). Excision of the DBA ecotropic provirus in dilute coat-color revertants of mice occurs by homologous recombination involving the viral LTRs. *Cell* 33, 379-387.
- Costa, M. C., Mani, F., Santoro, W., Jr., Espreafico, E. M., and Larson, R. E. (1999). Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. *J Biol Chem* 274, 15811-15819.
- Critchlow, S. E., and Jackson, S. P. (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 23, 394-398.
- Dekker-Ohno, K., Hayasaka, S., Takagishi, Y., Oda, S., Wakasugi, N., Mikoshiba, K., Inouye, M., and Yamamura, H. (1996). Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of Purkinje cells of the ataxic mutant rat. *Brain Res* 714, 226-230.

Dekker-Ohno, K., Oda, S., Yamamura, H., and Kondo, K. (1993). An ataxic mutant rat with dilute coat color. *Lab Anim Sci* 43, 370-372.

Engle, L. J., and Kennett, R. H. (1994). Cloning, analysis, and chromosomal localization of myoxin (*MYH12*), the human homologue to the mouse *dilute* gene. *Genomics* 19, 407-416.

Espindola, F. S., Espreafico, E. M., Coelho, M. V., Martins, A. R., Costa, F. R., Mooseker, M. S., and Larson, R. E. (1992). Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *J Cell Biol* 118, 359-368.

Espreafico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimento, A. A., De Camilli, P. V., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1992). Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* 119, 1541-1557.

Evans, L. L., Hammer, J., and Bridgman, P. C. (1997). Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from *dilute-lethal* neurons. *J Cell Sci* 110, 439-449.

Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Finch, E. A., and Augustine, G. J. (1998). Local calcium signalling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature* 396, 753-756.

Futaki, S., Takagishi, Y., Hayashi, Y., Ohmori, S., Kanou, Y., Inouye, M., Oda, S., Seo, H., Iwaikawa, Y., and Murata, Y. (2000). Identification of a novel *myosin-Va* mutation in an ataxic mutant rat, *dilute-opisthotonus*. *Mamm Genome* 11, 649-655.

Hodge, T., and Cope, M. J. T. V. (2000). <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/trees/trees.html>

Huang, J. D., Brady, S. T., Richards, B. W., Stenolen, D., Resau, J. H., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* 397, 267-270.

Huang, J. D., Cope, M. J., Mermall, V., Strobel, M. C., Kendrick-Jones, J., Russell, L. B., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1998a). Molecular genetic dissection of mouse unconventional myosin-VA: head region mutations. *Genetics* 148, 1951-1961.

Huang, J. D., Mermall, V., Strobel, M. C., Russell, L. B., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1998b). Molecular genetic dissection of mouse unconventional myosin-VA: tail region mutations. *Genetics* 148, 1963-1972.

Inoue, T., Kato, K., Kohda, K., and Mikoshiba, K. (1998). Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 18, 5366-5373.

Ito, M. (1989). Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 12, 85-102.

Jeggo, P. A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 150, S80-S91.

Kambe, F., Seo, H., Murata, Y., and Matsui, N. (1988). Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid coding for human thyroxine-binding globulin (TBG): existence of two TBG messenger ribonucleic acid species possessing different 3'-untranslated regions. *Mol Endocrinol* 2, 181-185.

Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125-8148.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lambert, J., Naeyaert, J. M., Callens, T., De Paepe, A., and Messiaen, L. (1998). Human myosin V gene produces different transcripts in a cell type-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 329-333.

Langford, G. M., and Molyneaux, B. J. (1998). Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Res. Brain Res. Review* 28, 1-8.

Lewin, B. (1994). Chapter 31; The apparatus for nuclear splicing. In *Genes V* (Oxford: Oxford University Press).

Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., Takano, H., Minowa, O., Kuno, J., Sakakibara, S., Yamada, M., Yoneshima, H., Miyawaki, A., Fukuuchi, Y., Furuichi, T., Okano, H., Mikoshiba, K., and Noda, T. (1996). Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* 379, 168-171.

Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999). Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* 400, 590-593.

Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., and de Saint Basile, G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 25, 173-176.

Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* 349, 709-713.

Mermall, V., Post, P. L., and Mooseker, M. S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279, 527-533.

Miyata, M., Hashimoto, K., Ohno, D. K., Inouye, M., Oda, S., Takagishi, Y., and Kano, M. (1997). Deficient cerebellar long-term depression in the mutant rat lacking smooth endoplasmic reticulum in dendritic spines. Abstracts of 27th annual meeting of Society for neuroscience 23.

Mochida, S., Kobayashi, H., Matsuda, Y., Yuda, Y., Muramoto, K., and Nonomura, Y. (1994). Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* 13, 1131-1142.

Moore, K. J., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Swing, D. A., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1988). Dilute suppressor *dsu* acts semidominantly to suppress the coat color phenotype of a deletion mutation, *d¹²⁰¹*, of the murine dilute locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8131-8135.

Murata, Y., Seo, H., Sekiguchi, K., Imai, T., Lee, J., and Matsui, N. (1990). Specific induction of fibronectin gene in rat liver by thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 4, 693-699.

Nakai, K., and Sakamoto, H. (1994). Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. *Gene* 141, 171-177.

Noebels, J. L. (1996). Targeting epilepsy genes. *Neuron* 16, 241-244.

Ohno, K., Kanou, Y., Oda, S., Wakasugi, N., Inouye, M., and Yamamura, H. (1996). Mapping of the *dilute-opisthotonus (dop)* gene on chromosome 8 of the rat. *Exp Anim* 45, 71-75.

Pastural, E., Barrat, F. J., Dufourcq-Lagelouse, R., Certain, S., Sanal, O., Jabado, N., Seger, R., Griscelli, C., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (1997). Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* 16, 289-292.

Pastural, E., Ersoy, F., Yalman, N., Wulffraat, N., Grillo, E., Ozkinay, F., Tezcan, I., Gedikoglu, G., Philippe, N., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2000). Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus. *Genomics* 63, 299-306.

Pellegrino, L. J., Pellegrino, A. S., and Cushman, A. J. (1979). A stereotaxic atlas of the rat brain (New York: Plenum Press).

Perry, W. L., Hustad, C. M., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1998). The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in *a¹⁸¹* mice. *Nat Genet* 18, 143-146.

Prekeris, R., and Terrian, D. M. (1997). Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J Cell Biol* 137, 1589-1601.

Provance, D. W., Jr., Wei, M., Ipe, V., and Mercer, J. A. (1996). Cultured melanocytes from *dilute* mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14554-14558.

Puranam, R. S., and McNamara, J. O. (1999). Seizure disorders in mutant mice: relevance to human epilepsies. *Curr Opin Neurobiol* 9, 281-287.

Reck-Peterson, S. L., Provance, D. W., Jr., Mooseker, M. S., and Mercer, J. A. (2000). Class V myosins. *Biochim Biophys Acta* 1496, 36-51.

Rosahl, T. W., Spillane, D., Missler, M., Herz, J., Selig, D. K., Wolff, J. R., Hammer, R. E., Malenka, R. C., and Südhof, T. C. (1995). Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375, 488-493.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed. Edition (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

Searle, A. G. (1952). A lethal allele of *dilute* in the house mouse. *Heredity* 6, 395-401.

Seperack, P. K., Mercer, J. A., Strobel, M. C., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1995). Retroviral

sequences located within an intron of the *dilute* gene alter dilute expression in a tissue-specific manner. EMBO J 14, 2326-2332.

Smider, V., and Chu, G. (1997). The end-joining reaction in V(D)J recombination. Semin Immunol 9, 189-197.

Street, V. A., Bosma, M. M., Demas, V. P., Regan, M. R., Lin, D. D., Robinson, L. C., Agnew, W. S., and Tempel, B. L. (1997). The type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene is altered in the opisthotonos mouse. J Neurosci 17, 635-645.

Strobel, M. C., Seperack, P. K., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1990). Molecular analysis of two mouse dilute locus deletion mutations: spontaneous dilute lethal^{20l} and radiation-induced dilute prenatal lethal Aa2 alleles. Mol Cell Biol 10, 501-509.

Takagishi, Y., Oda, S., Hayasaka, S., Dekker-Ohno, K., Shikata, T., Inouye, M., and Yamamura, H. (1996). The *dilute-lethal(d)* gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. Neurosci Lett 215, 169-172.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22, 4673-4680.

Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer, J. A. r., Trinick, J., and Knight, P. J. (2000). Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. Nature 405, 804-807.

Wang, F. S., Wolenski, J. S., Cheney, R. E., Mooseker, M. S., and Jay, D. G. (1996). Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones. Science 273, 660-663.

Wei, Q., Wu, X., and Hammer, J. A. r. (1997). The predominant defect in *dilute* melanocytes is in melanosome distribution and not cell shape, supporting a role for myosin V in melanosome transport. J Muscle Res Cell Motil 18, 517-527.

Zhao, L. P., Koslovsky, J. S., Reinhard, J., Bahler, M., Witt, A. E., Provance, D. W., Jr., and Mercer, J. A. (1996). Cloning and characterization of *myr 6*, an unconventional myosin of the *dilute/myosin-V* family. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 10826-10831.

図 表

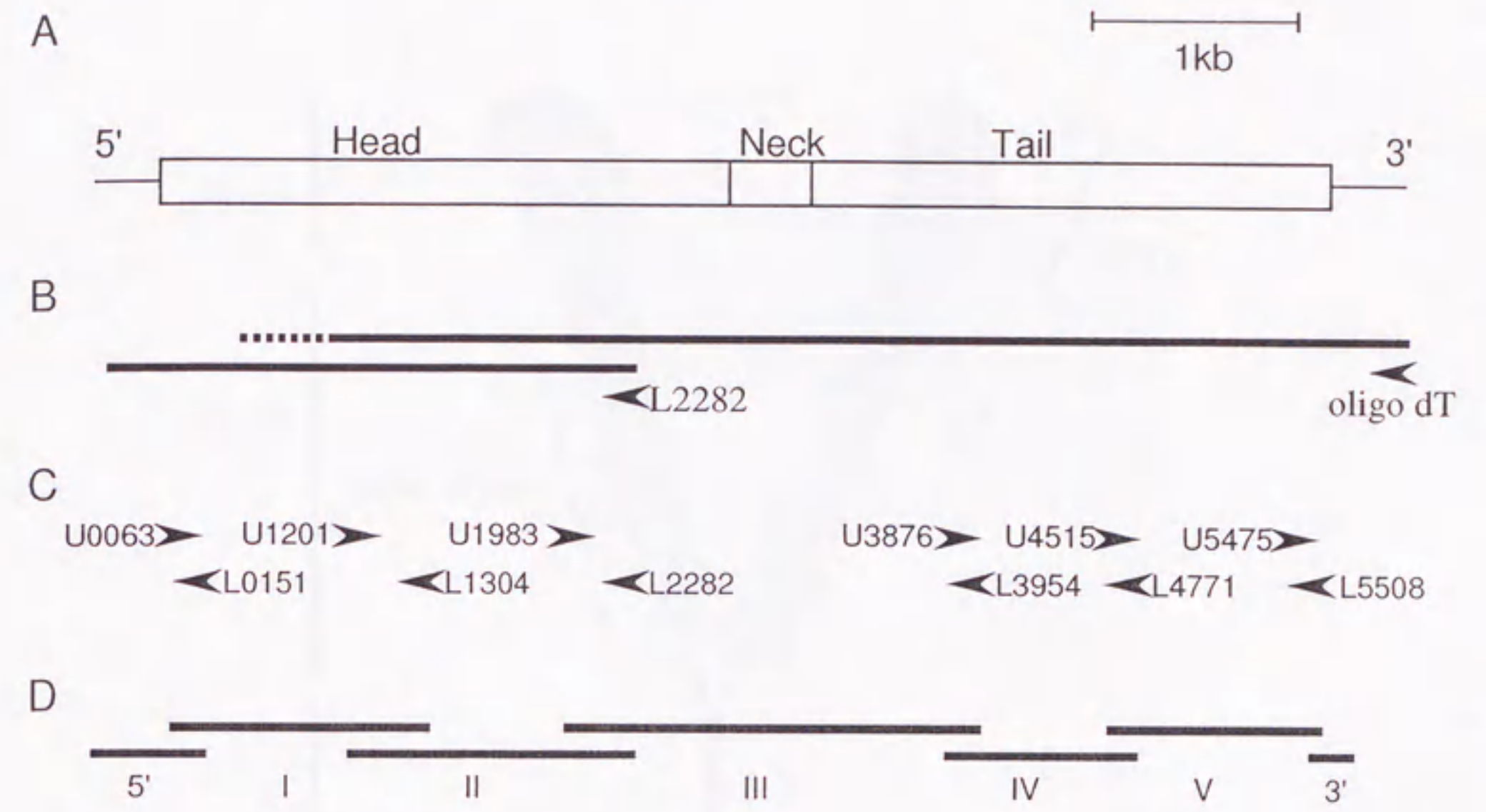


図1

(A) ミオシンVaの一次構造の模式図。タンパク質コード領域を帯で、非翻訳領域を線で表わした。

(B) RT反応に用いたプライマーと一本鎖cDNAの模式図。

(C) RT-PCRおよびRACE法に用いたプライマーの位置と名称。

(D) RT-PCRおよびRACE法により増幅されたcDNA断片の位置と名称。

[(B)から(D)は(A)の模式図の領域に対応している。]

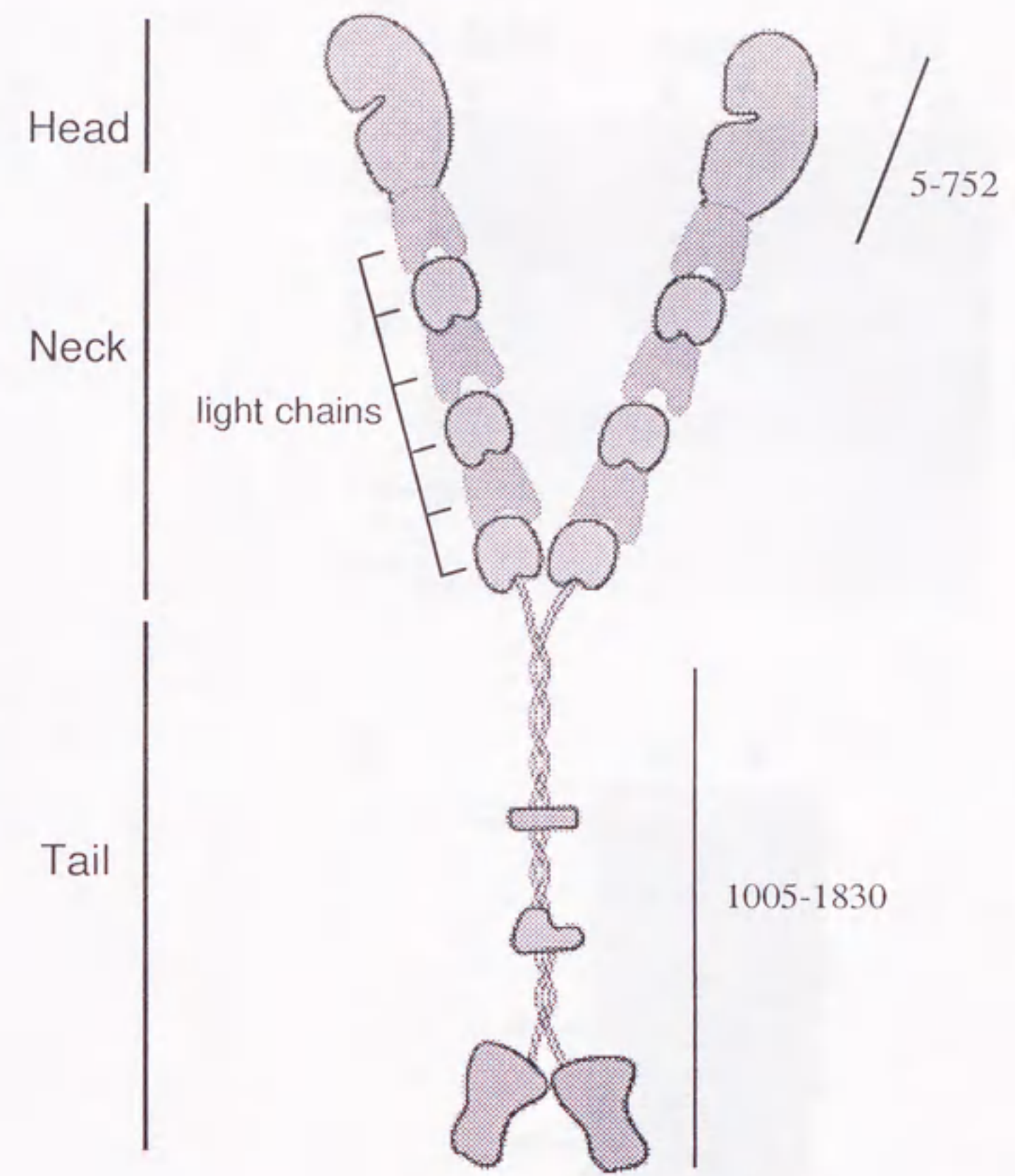


図2

ニワトリ脳から抽出されたミオシンVa 2量体分子の模式図 (Hodgeらの図より改変)。模式図の左に各ドメインの名称及び構造を示した。右の数字は抗ミオシンVa抗体の抗原として用いられた領域とアミノ酸の番号を示す。

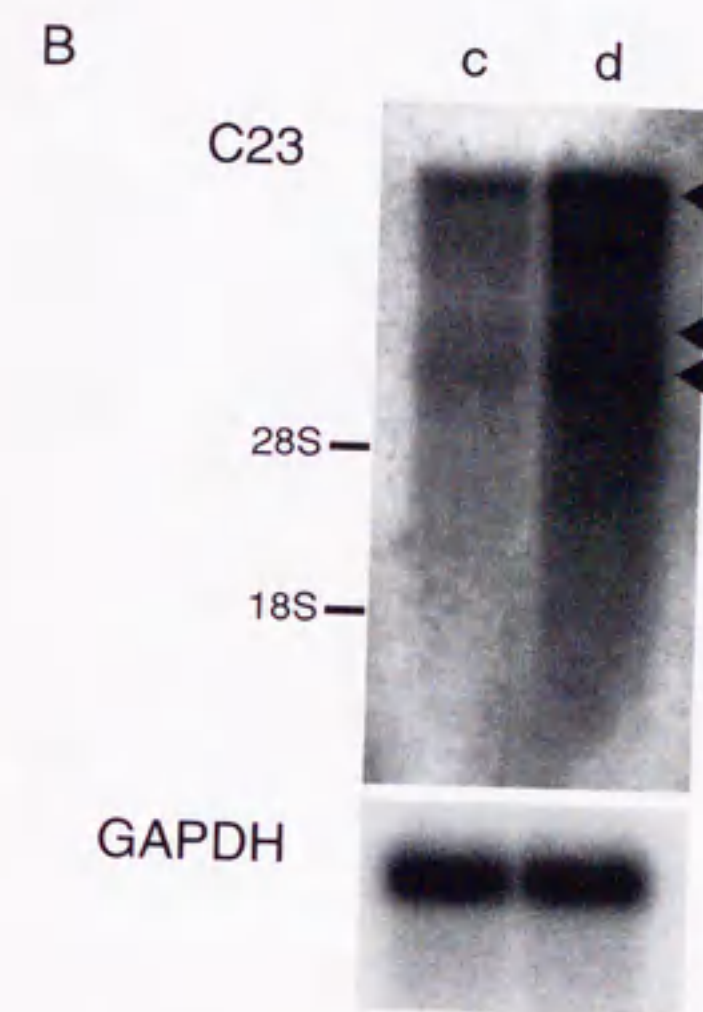
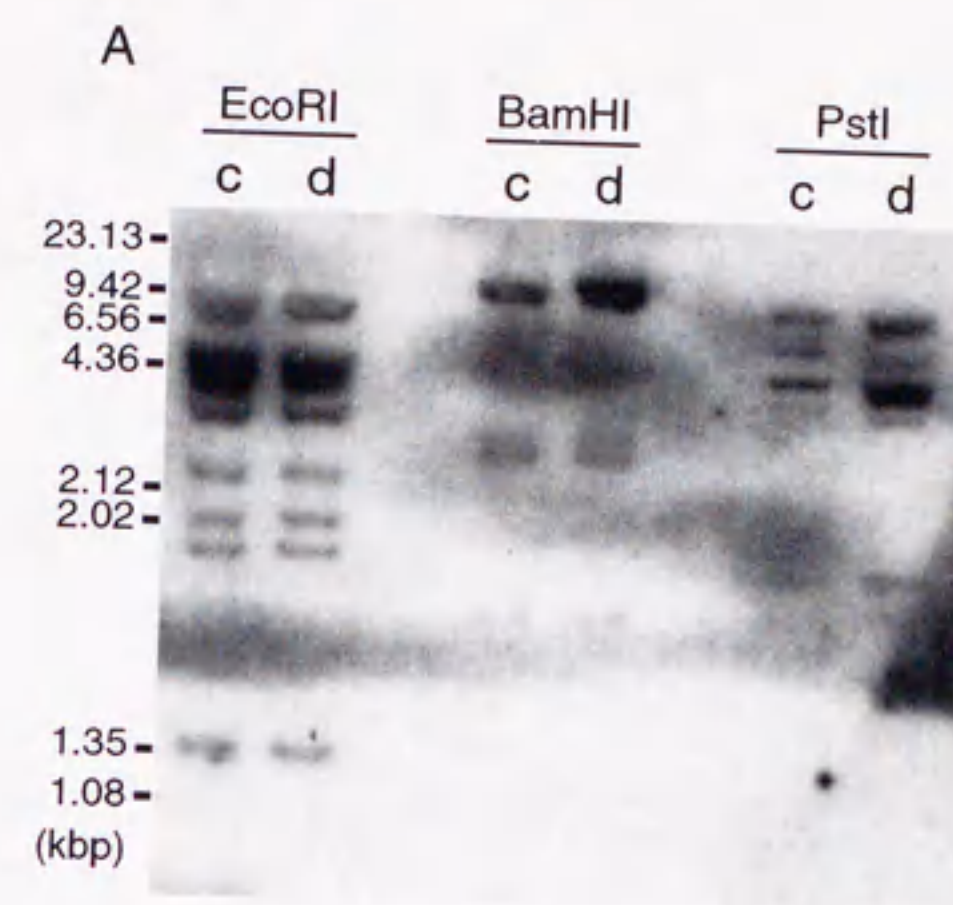


図3

- (A) サザンブロット解析の結果。用いた制限酵素を上を示し、左にDNAサイズマーカーの位置を示した。c; コントロール、d; *dop*ラット。
- (B) ノザンブロット解析の結果。マウスのみオシンVa cDNAプローブを用いたもの(C23)を上、同じメンブレンでGAPDH cDNAプローブを用いたものを下に示した。C23の左にリボソームRNA (28S、18S) の位置を示した。右の矢尻は約7、8、11 kbの3種類の転写産物のバンドを示す。c; コントロール、d; *dop*ラット。

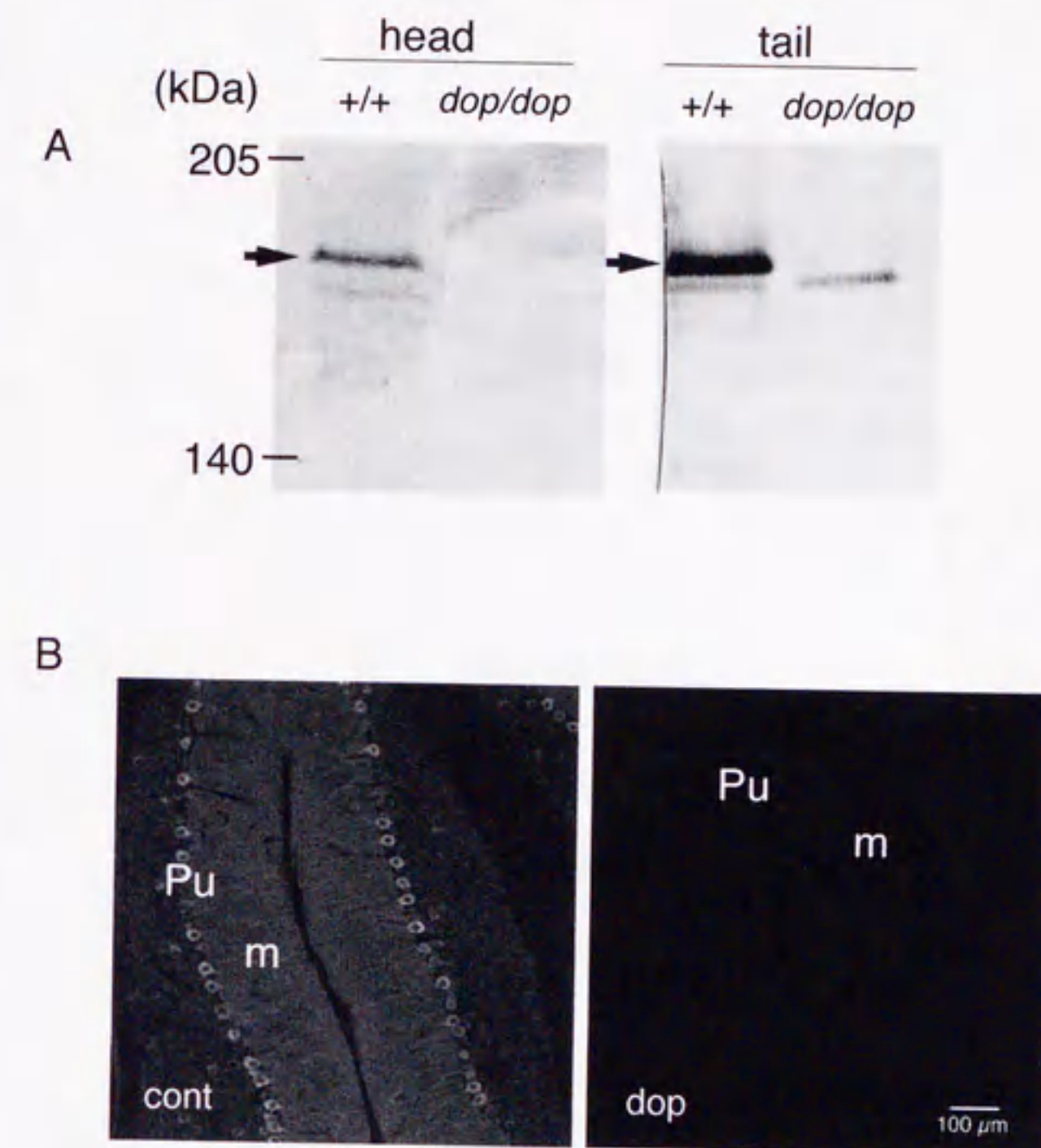


図4

- (A) ウェスタンブロットの結果。左に抗headドメイン抗体、右に抗tailドメイン抗体を用いたメンブレンを示した。コントロール (+/+) で検出された約180kDaの位置の特異的なバンドを矢印で示した。これらのバンドはdopラット (dop/dop) では検出されなかった。左に分子量サイズマーカーの位置を示した。
- (B) 抗tailドメイン抗体を用いた小脳組織切片における蛍光抗体染色の結果。コントロール (cont) では分子層(m)、プルキンエ細胞(Pu)に強い蛍光が観察されたのに対し、dopラット (dop) では特異的な蛍光は認められなかった。

GGCACGAGCCTAGGCGGGGGGGCTCGGGCGTGGGCGCCGATGGCCGCGTCCGAGCTCTACACCAAGTTTGCAGGGTTT
GGATCCCTGATCCTGAGGAAGTGTGAAATCGGCAGAGTTGCTCAAGGATTATAAGCCTGGAGATAAAGTCTCTGCTT
CACCTTGAGGAAGGAAGGATTTGGAATACCGCTAGATCCAAGACCAGCGAGCTCCCTCACCTACGGAAACCTGACAT
ACTTGTGGGAGAAAATGACCTCACAGCCCTCAGTACCTTACGAGCCTGCTGTGCTGCACAACTCCCGGCTCCGCTTCA
TCGACTCCAAACTCATTATACGTATTTGGGATAGTCTGGTAGCTATAAATCCCTATGAGCAGTGCCTATCTATGGA
GAAGATATCATTAAATGCATACAGTGGCCAGAACATGGGTFGACATGGACCCTCACACTTTGCAAGTGTGAGAGCCCTA
TAAACAAATGGCAAGGACGAACGAAATCAGTCCATCATTTAAGTGGAGAGTCAAGTGCAGGGGAAAGCAGTCTCGGCTA
AGTATGCCATGAGGTACTTCGCAACTGTAAGTGGCTCTGCCAGTGGGCCAATGTTGAGGAAAAGTCTTGGCCTCCAAAC
CCCATCATGGAGTCAATGGAAATGCTAAAAACAACAGGAATGATAATAGCAGCCGGTTTGGGAAATATATTGAAATGG
TTTTGACAAGAGATATCGAATCATCGGTGCCAATATGAGAACTTACCTTTAGAGAAAATCCAGAGTGGTGTCCAGGCAG
AAGAGGAGAGAAACTACCATATCTTCTATCAGCTCTGTGCTTCGGCAAAGTACCTGAGTTTAAAGTGTGCGGTAGGA
AATGCAGATAGTTCCATTACCAAGCAAGGAGGCGCCCTATGATAGAAGGAGTGGACGATGCGAAGGAGATGGCACA
CACAGGCGCCCTGCACTCTGCTGGGAATTAGTGAATCTTACCAATGGGAATTTTCCGATACTTGTGGCATTCTTC
ACTTAGGCAATGTTGGGTTTGCCTCTCGAGATTCAGACAGCTGCACAACTCCCAAGCACGAGCCTTATCATTTTC
TGTGATCTTATGGGTGTGGATTATGAGAGATGTGTACTGGCTCTGCCACCAGAAAGTACCTACCGCCACAGAGCGTA
CATCAAGCCCATCTCCAAGCTGCAGGCCAAAATGCCGAGACGCTTTAGCAAAGCATATCTATGCAAAGCTTTTAACT
GGATTGTGGCCATGTCAATCAGGCTCTCCATTCAGCTGTCAAGCAGCACTTTTCATCGGCGTGTGGACATTTATGGA
TTTGAACAATTTGAGATAAATAGTTTGAACAGTTCTGCATAAATTTGCAAAATGAAAAGCTACAGCAACAATCAACAT
GCATGTCTTCAAACCTGGAACAGGAGGATACATGAAGGAACAATCCATGGACACTCATAGATTTCTATGATAATCAGC
CTGTATCAACTTATAGAACTTAACTGGGTATTCTAGATTGTCTGGATGAGGAATGTAAGATGCCTAAAGGTACCGCAT
GACACATGGGCCAAAACATATAACAACAACATTTGAACAAAATGTGCTCTCTTTGAGAAGCCCGCATGTCAAAACAAGC
TTTCATCATCAACATTTGCTGCAAAAGTGGAGTACCAGTGTGAAGGTTTCTTGAAGAATAAAGACTGTTTGTG
AAGAACAATTAAGTCTTAAAGTCAAGCAAGTTTAAAGTGTCTACCAGAATTTTCAAGATGACGAGAAGGCCATCAGT
CCCACCTCTGCCACTTCTCAGGACGCACACCTCTCACAGGGTACCTGTAAAGCCCAAGGGTCCGACTGGCCAGAC
TGCCAAAGAGCACAAAGAGCAGTGGGACTTCAAGTTTCGAACTCCCTTCACTGCTTATGAGAAACCTTAAAGCCACTA
CTCTCATATGTTTCGCTGTATTAAAGCCAAATGATTTCAAGTTTCCATTCACTTTGATGAGAAGAGAGCAGTACAGCAG
CTAAGAGCATGTGGTGTCTTGGAGACCATCCGGATCAGCGCAAGAGGGTTTCCCTCAAGGTGACTTATCAAGAGTTT
CAGCCGTCACCGGTCCTAATGAAGCAAAAGGATGTGCTGGGAGATAGAAGCAAACTGCCAGAATGATTAGAGAAAAC
TGATACTGGACAAGGATAAATACCAGTTTGGTAAGACAAGATCTTTTTTCTGCTGGTCAAGTGGCCTATCTAGAAAAA
TTGAGGGCTGACAACTGAGGGCCGCTGCATCCGGATCCAGAAGACGATTCGTGGGTGGCTCTGAGGAAAGGATACCT
GTGTATGCAGAGGGCAGCCATCACAGTGCAGCGATACGTGCGTGGCTATCAGGCTCGATGCTATGCTAAAGTTCTGCGCA
GAACCAAGGAGCAACCCATTGAGAGTACTGGCCGATGTATGTGGTCCCGAGGAAATCAAGATAGACAGCTGCC
ACCATTTGTTCTCAGTCTTATTGAGAGGCTACTTGGCAAGAAAATAGGTATCGCAAGTACTCCGTGAGCAACCAAGCAGT
CATCATTCAGAACTGCTCCGTTGGTGGCTGGCTCGTACACATTATAAGAGGACCATGAAAGCCATCATCTACCTCAAT
GCTGCTTCCGGCGGATGATGGCCAGCGTGAAGTGAAGAACTCAAAATTTGAGGCTCGCTCTGTGGAACTCAAGAAAG
CTCCATATTGGCATGGAAAACAAGATTATGCAGCTGCAACGCAAAAGTGGATGAGCAGAAATAAAGACTCAAAATGCTCAT
GGAGAACTGACCAATCTAGAAGGATATACAACCTCTGAGACTGAAAACACTAGAAATGATAGAAAGCTTCTCAGCTAA
GCGAGGAGGAAGCTAAGGTTGCCACTGGGAGAGTGTAGTCTGCAGGAAGAAAATGGCAAACTCCGAAAAGACTGGAG
CAAACCTCGATCGGAGAAAAGTCCATTGAAGAACGAGCAGATAAATCAAAACAAGAACTGAGCAGCTGGTGTCAAACCT
GAAGGAAGAAAACACTCTGCTGAAGCAGGAAAAGGAGACCCCTCAATCACCTCATGGTGGAGCAGGCTAAGGAGATGCAG
AACTATGGAGAGGAAGTTAGTAGAAGAAAACAACAACCTGGAGCTCGACCTGAAATGATGAGAGGCTGAGGATCAAAAC
CTCTGAAAGAGTTCAGTCTGCTGGAGGAGCGCTATGACGACCTCAAGGAAAGATGACCTGATGCTGAAATGTCCTAA
GCCAGGACCAAGAGAACAGACTTACCCACAGCAGCAATGAGTCTGAATACACCTTCAAGCTCAGAAATTTGCAGAACT
AAGACATTCACCAAGGACAGGAGGCCCACTGAGAAGAAGTGCCTTTGGATATGTCAATGTTCTTAAAGCTCCAGAAG
CGTGTACAGAGCTGGGACAGGAGAAGCAGTTGATGCAAGGATGAGCTGGACCAGAAAGGAGGAGCAGGTGTGGCAGCAA
GGCAAAGGGAGGAGAAAAGACCAGATTAGAGGTGCTGAATGGGATATGAGTCCCTCAAGCGTCAGGAACTGGAGTCA
AAAACAAAAGCTGAAGAAATGAGCTGAATGAGCTACGCAAAAGCCCTGAGTGAAGAGTGGCCCGAAGTGAATGGCCCA
GGCGCCCGCTTACCGCTCCTCATGGAGCAGCTGACCGCCGTGAGCGAGGAGCTCGATGTCCGCAAGGAGGAAGTCTC
CATTTTAAAGTCTCAGCTGGTGGCCAGAAAAGGCAATCCAAACCAAGGATGACAAGAAATCAATGACAGATTCACAA
TACTTTTGAAGATGTACAGAAAATGAAAGCAAAAGTGAATAGCACAAGCATATATTGGTTTGAAGAAAACGAAACAGG
CTCTTAGAATCCAGCTACAGTGCAGAGAGGAGCCATGAAAATGAGGCTGAGGCCCTCCGTGGGGAGATCCAGAGCCT
AAAGGAAGAAAACAACCGGCAACAGCAGCTGCTGGCCAGAACCTGCAAGCTGCCCTGAGGCCCGCATTGAGGCCAGCG
TGCAGCATGAGATCACCCGGTGAACCAATGAAAACCTGGATCTGATGGAAACAATTTGAAAAGCAGGATAAAAACCGTCCG
AACTGAAGAAAACAATAAAGTCTTTGCCAAAATAATCGGTGAAGTGAAGTGGGGCAGATGGAGAACAATCCCCAGG
ACAGATCATCGATGAGCCTATCCGGCCGGTCAACATTTCCCGAAAAGGAAAGGATTTCCAAGGGATGCTGGATACAAGC
GGGAGGACGAACAGAGCTTTGTAAGAACCTGATTTAGAACTAAAGCCACGTGGTGTGGCTGTCAATCTGATTTCAAGG
TTACCGGCATATATCTGTTTATGTGTGTGGACATGCGCACTACTGGAGATGATCAGAAAATGATGATGCTGAC
ATCAACAATTAACAGCATCAAAAAGTCTTGAAGAAAAGAGGTGACGATTTTGAAGTGTCTCTTCTGGCTCTCTAACA
CATGTGATTTTTGCACTGTTTGAAGCAATATAGTGGAGAAGAGGGCTTATGAAAACACAACAGCTCTGCCAGAAATGAA
CACTGCCTCACCAATTTTGACCTTGTGAGTATCGGCAAGTACTGAGTACTTGGCCATTGAGATCTATCAGCAGCTTGT
GAGGGTGTAGAGAACAATTTTCAAGCAATGATAGTCTCAGGCAATGATAGCTCAGGCAATGATAGCAATTCAGGGAGTATCTGGGG
TGAAGCCACAGGACTCAGAAAAGCAACCTCCAGTATCGCCGATGAGGCACTACACACTGGACTCCATCTCGCCGAG
CTCAACTCCTTCCATTCCTCATGTGTGTCAGCATGGCATGGACCCAGAGCTAATCAAGCAGGTGGTCAAGCAGATGTTCTA
CATCTGGGCGCCATCACCTGAAACAACCTCTGCTGCGCAAGGACATGTGCTCTGGAGCAAAAGCAGTCCAGATCAGGT
ACAATGTCAGTCAATTTGAAGAAATGGCTACGTGACAAAGATCTAATGAACAGTGGGGCAAAAGAGACTCTGGAACCTCT
ATCCAGGCTGCTCAGCTTTTGAAGTGAAGAAAAGAACTGACATGACGCGGAAGCCATCTGCTCCATGTGCAACCGCTC
GACCAAGCCAGATTTGCAAAATGTTGAATCTGTACACACCCGTTAATGAGTTTGGAGAAAAGGGTCTGTTTCAATTTA
TCCGCACTATACAGGTGCGGTACGAGACAGGAAAGACTCTCCACAGCTGCTCATGGATGCAAAACACATCTTCTGTC
ACTTTCCCTTTAAACCATCTCCCTGGCCCTAGAAACATCCAGATTCAGCCAGCCTGGGCCCTGGGCTTCAATGCAAG
GGTCTGAAGGGCTACCAAGCAATGTAGAGAAGCAATTTCTCTCAAAACATGAACAGTTGTTCCAGTGGACTACTGA
AAATACATTTTAAAAAAA 5621

図5

クローニングしたラットのミオシンVa cDNAの全塩基配列。翻訳開始
コドン (ATG) を赤で、終始コドン (TGA) を青で示し、タンパク質翻
訳領域を太字で示した。

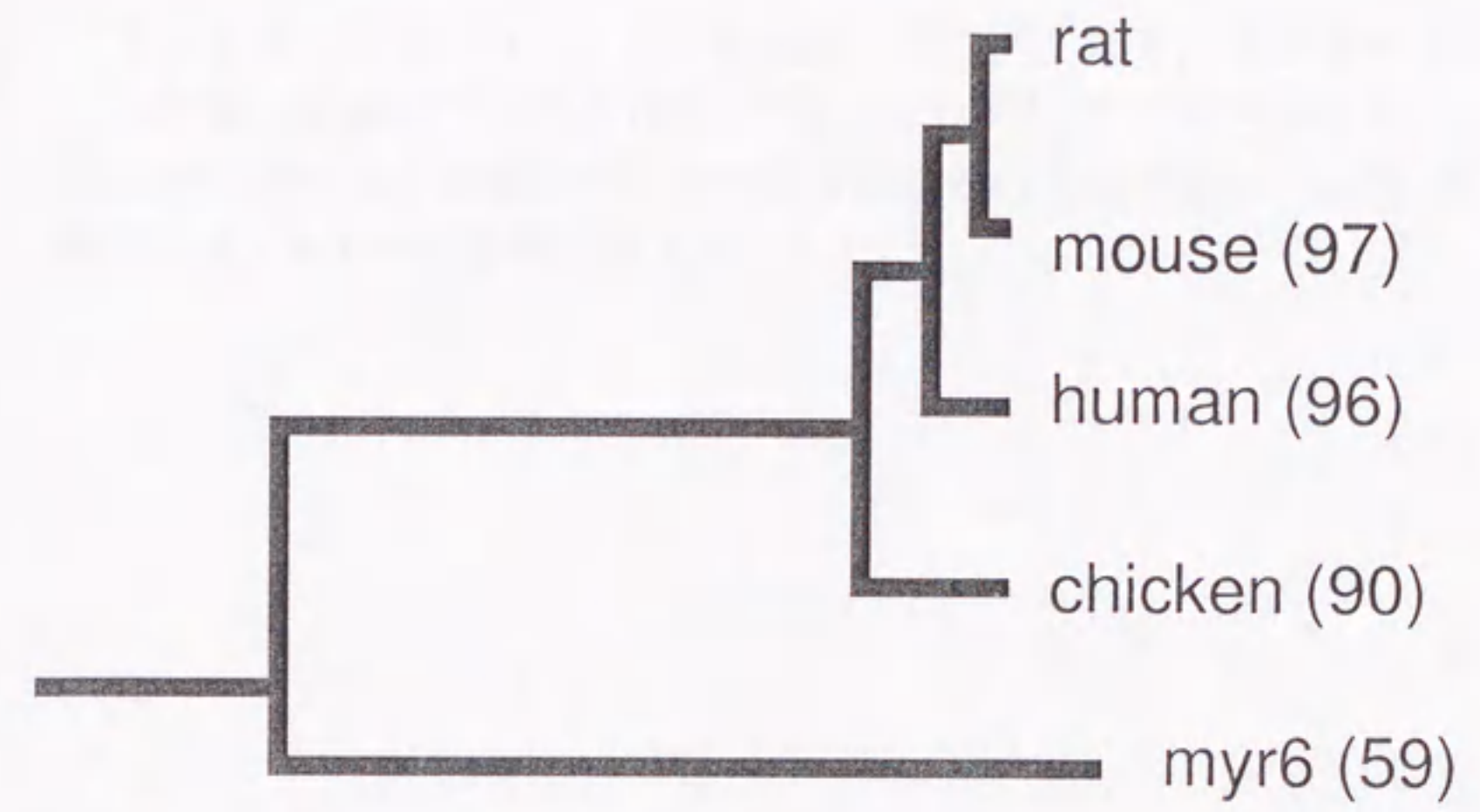


図6

アミノ酸配列の相同性に基づくクラスVミオシン分子間の系統樹。括弧内はラットのみオシンVaアミノ酸配列 (rat) に対する相同性 (%) を示す。mouse、human、chickenはそれぞれの生物種のみオシンVa、myr6はラットの他のクラスVミオシンのアミノ酸配列を比較した。



図7

ラットのマヨシン Va アミノ酸配列とマウス、ヒト、ニワトリのマヨシン Va との比較。配列の下の*印は種間で保存されているアミノ酸を示す。Head ドメインの ATP 結合領域、アクチン結合領域を図中に表記し、neck ドメインの 6 箇所の IQ モチーフを棒線により示した。


```

rat      1 MAASELYTKFARVWIPDPEEVVWKS AELLKDYKPGDKVLLHLEEGKDLEYRLDPKTSLEP 60
mouse   MAASELYTKFARVWIPDPEEVVWKS AELLKDYKPGDKVLLHLEEGKDLEYRLDPKTEGELP
human   MAASELYTKFARVWIPDPEEVVWKS AELLKDYKPGDKVLLHLEEGKDLEYRLDPKTKELP
chicken MAASELYTKYARVWIPDPEEVVWKS AELLKDYKPGDKVLLRLLEEGKDLEYCLDPKTRLEP
*****

rat      61 HLRNPDILVGENDLTALS YLHEPAVLHNLRVRFIDSKLIYTYCGIVLVAINPYEOLPIYG 120
mouse   HLRNPDILVGENDLTALS YLHEPAVLHNLRVRFIDSKLIYTYCGIVLVAINPYEOLPIYG
human   HLRNPDILVGENDLTALS YLHEPAVLHNLRVRFIDSKLIYTYCGIVLVAINPYEOLPIYG
chicken PLRNPDIIVGENDLTALS YLHEPAVLHNLRVRFIDSKLIYTYCGIVLVAINPYEOLPIYG
*****

rat      121 EDIINAYSGONMGDMDPHIFAVAEAYKOMARDERNOS IIVSGESGAGKTVSAKYAMRYF 180
mouse   EDIINAYSGONMGDMDPHIFAVAEAYKOMARDERNOS IIVSGESGAGKTVSAKYAMRYF
human   EDIINAYSGONMGDMDPHIFAVAEAYKOMARDERNOS IIVSGESGAGKTVSAKYAMRYF
chicken EDIINAYSGONMGDMDPHIFAVAEAYKOMARDERNOS IIVSGESGAGKTVSAKYAMRYF
*****
ATP binding site

rat      181 ATVSGSASEANVEEKVLASNPIMESIGNAKTTRNDNSSRFGKYIEIGFDKRYRIIGANMR 240
mouse   ATVSGSASEANVEEKVLASNPIMESIGNAKTTRNDNSSRFGKYIEIGFDKRYRIIGANMR
human   ATVSGSASEANVEEKVLASNPIMESIGNAKTTRNDNSSRFGKYIEIGFDKRYRIIGANMR
chicken ATVSGSASEANVEEKVLASNPIMESIGNAKTTRNDNSSRFGKYIEIGFDKRYRIIGANMR
*****

rat      241 TYLLEKSRVVFQAEERNYHIFYOLCASAKLPEFKMLRLGNADSFHYTKOGGSPMIEGVD 300
mouse   TYLLEKSRVVFQAEERNYHIFYOLCASAKLPEFKMLRLGNADSFHYTKOGGSPMIEGVD
human   TYLLEKSRVVFQAEERNYHIFYOLCASAKLPEFKMLRLGNADNFNYTKOGGSPVIEGVD
chicken TYLLEKSRVVFQAEERNYHIFYOLCASAAALPEFKMLRLGNADNFNYTKOGGSPVIEGVD
*****

rat      301 DAKEMAHTROACTLLGISSEYOMGIFRILAGILHLGNVGFASRSDSDCTIPPKHEPLIIF 360
mouse   DAKEMAHTROACTLLGISSEYOMGIFRILAGILHLGNVGFASRSDSDCTIPPKHEPLIIF
human   DAKEMAHTROACTLLGISSEYOMGIFRILAGILHLGNVGFASRSDSDCTIPPKHEPLITIF
chicken DAKEMVNTROACTLLGISDSYOMGIFRILAGILHLGNVGFASRSDSDCAIPPKHDPITIF
*****

rat      361 CDLMGVDYEEMCHWLCHRKLATATETIYKPIISKLOATNARDALAKHIYAKLFNWIVGHVN 420
mouse   CDLMGVDYEEMCHWLCHRKLATATETIYKPIISKLOATNARDALAKHIYAKLFNWIVDHVN
human   CDLMGVDYEEMCHWLCHRKLATATETIYKPIISKLOATNARDALAKHIYAKLFNWIVDNVN
chicken CDLMGVDYEEMAHWLCHRKLATATETIYKPIISKLAHINARDALAKHIYANLFNWIVDHVN
*****

rat      421 QALHSVAVKQHSFIGVLDIYGFETFEINSFEOFCINYANEKLOOFNMHVFKLEOEYMKKE 480
mouse   QALHSVAVKQHSFIGVLDIYGFETFEINSFEOFCINYANEKLOOFNMHVFKLEOEYMKKE
human   QALHSVAVKQHSFIGVLDIYGFETFEINSFEOFCINYANEKLOOFNMHVFKLEOEYMKKE
chicken KALHSTVAVKQHSFIGVLDIYGFETFEINSFEOFCINYANEKLOOFNMHVFKLEOEYMKKE
*****

rat      481 QIPWTLIDFYDNOPCINLIESKLGILDLLDEECKMPKGTDDTWAOKLYNTHLNKCALFEK 540
mouse   QIPWTLIDFYDNOPCINLIESKLGILDLLDEECKMPKGTDDTWAOKLYNTHLNKCALFEK
human   QIPWTLIDFYDNOPCINLIESKLGILDLLDEECKMPKGTDDTWAOKLYNTHLNKCALFEK
chicken QIPWTLIDFYDNOPCINLIEAKMGVLDLLDEECKMPKGSDDTWAOKLYNTHLNKCALFEK
*****
actin binding site

rat      541 PRMSNKAFIIKHFADKVEYQCEGFLEKKNKDTVFEEQIKVLKSSK-FKMLPELFODEKAI 599
mouse   PRMSNKAFIIKHFADKVEYQCEGFLEKKNKDTVFEEQIKVLKSSK-FKMLPELFODEKAI
human   PRLSNKAFIIKHFADKVEYQCEGFLEKKNKDTVFEEQIKVLKSSK-FKMLPELFODEKAI
chicken PRLSNKAFIIKHFADKVEYQCEGFLEKKNKDTVFEEQIKVLKSSKFKLPELFODEKAI
*****

rat      600 SPTSATSSGRTPLTRVPVKPTKGRPGOTAKEHKKTVGLQFRNSLHLLMETLNATPHYVR 659
mouse   SPTSATSSGRTPLTRVPVKPTKGRPGOTAKEHKKTVGLQFRNSLHLLMETLNATPHYVR
human   SPTSATSSGRTPLTRPAKPTKGRPGOMAKEHKKTVGLQFRNSLHLLMETLNATPHYVR
chicken SPTSATSPGRVPLSRTPVKPAKARPGOTSKEHKKTVGLQFRNSLHLLMETLNATPHYVR
*****

rat      660 CIKPNDFKFPFTFDEKRAVOOLRACGVLETIRISAAGFPPSRWTYOEFPSRYRVLKMKQDV 719
mouse   CIKPNDFKFPFTFDEKRAVOOLRACGVLETIRISAAGFPPSRWTYOEFPSRYRVLKMKQDV
human   CIKPNDFKFPFTFDEKRAVOOLRACGVLETIRISAAGFPPSRWTYOEFPSRYRVLKMKQDV
chicken CIKPNDFKFPFTFDEKRAVOOLRACGVLETIRISAAGFPPSRWTYOEFPSRYRVLKMKQDV
*****

rat      720 LGDRKQTCQNVLEKLLDKDKYQFGKTKIFFRAGOVAYLEKLRADKLAACIRIQKTIRG 779
mouse   LGDRKQTCQNVLEKLLDKDKYQFGKTKIFFRAGOVAYLEKLRADKLAACIRIQKTIRG
human   LDRKQTCQNVLEKLLDKDKYQFGKTKIFFRAGOVAYLEKLRADKLAACIRIQKTIRG
chicken LDRKQTCQNVLEKLLDKDKYQFGKTKIFFRAGOVAYLEKIRADKLAACIRIQKTIRG
*****

rat      780 WLLRKYLCMORAAITVORYVRYGQARCYAKFLRRTKAATTIQKYWRMYVVRKYYKIRRA 839
mouse   WLLRKYLCMORAAITVORYVRYGQARCYAKFLRRTKAATTIQKYWRMYVVRKYYKIRRA
human   WLLRKYLCMORAAITVORYVRYGQARCYAKFLRRTKAATTIQKYWRMYVVRKYYKIRRA
chicken WLMRKYLCMORAAITVORYVRYGQARCYATFLRRTKAATTIQKYWRMYVVRKYYKIRRA
*****

rat      840 ATIVLQSYLRGYLARNRYRKILREHKAVIITOKRVRGWLARTHVKRTMKAIIVLQCCFRM 899
mouse   ATIVLQSYLRGYLARNRYRKILREHKAVIITOKRVRGWLARTHVKRTMKAIIVLQCCFRM
human   ATIVLQSYLRGYLARNRYRKILREHKAVIITOKRVRGWLARTHVKRTMKAIIVLQCCFRM
chicken ATIALQSYLRGYLARNRYRKILREHKAVIITOKRVRGWLARTHVKRTMKAIIVLQCCFRM
*****

rat      900 MAKRELKKL 909
mouse   MAKRDVKKL
human   MAKRELKKL
chicken MAKRELKKL
*****

```

(続)

(続き)

rat 910 KIEARVERYKLLHIGMENKIMOLORKVDEONKDYKCLMEKLTNLEGVYNSETEKLRNDV 969
mouse KIEARVERYKLLHIGMENKIMOLORKVDEONKDYKCLMEKLTNLEGVYNSETEKLRNDV
human KIEARVERYKLLHIGMENKIMOLORKVDEONKDYKCLMEKLTNLEGVYNSETEKLRSDV
chicken KIEARVERYKLLHIGMENKIMOLORKVDEONKDYKCLMEKLTNLEGVYNSETEKLRSDV

rat 970 ERLQSEEEAKVATGRVLSLOEEIAKLRKDLQTRSEKKSIEERADKYQETEQVLSNLK 1029
mouse ERLQSEEEAKVATGRVLSLOEEIAKLRKDLQTRSEKKSIEERADKYQETEQVLSNLK
human ERLQSEEEAKVATGRVLSLOEEIAKLRKDLQTRSEKKSIEERADKYQETEQVLSNLK
chicken ERLQSEEEAKVATGRVLSLOEEIAKLRKDLQTRSEKKSIEERADKYQETEQVLSNLK

rat 1030 EENTLLKQEKETLNHLMVEQAKEMTETMERKLVETKOLELDLNDERLRYONLLNEFSRL 1089
mouse EENTLLKQEKETLNHLMVEQAKEMTETMERKLVETKOLELDLNDERLRYONLLNEFSRL
human EENTLLKQEKETLNHLMVEQAKEMTETMERKLVETKOLELDLNDERLRYONLLNEFSRL
chicken EENTLLKQEKETLNHLMVEQAKEMTETMERKLVETKOLELDLNDERLRYONLLNEFSRL

rat 1090 EERYDDLKEEMTLMNVKPGHKRTDSTHSSNESEYTFSEFAETEDIAPRTE-EPTEKK 1148
mouse EERYDDLKEEMTLMNVKPGHKRTDSTHSSNESEYTFSEFAETEDIAPRTE-EPTEKK
human EERYDDLKEEMTLMNVKPGHKRTDSTHSSNESEYTFSEFAETEDIAPRTE-EPSEKK
chicken EERYDDLKEEMTLMNVKPGHKRTDSTHSSNESEYTFSEFAETEDIAPRTE-EPSEKK

rat 1149 VPLDMSLFLKLOKRVTELEQEKOLMODELDRKEEQVLRSAKAGGERPOIRGAELGYESLK 1208
mouse VPLDMSLFLKLOKRVTELEQEKOLMODELDRKEEQVLRSAKAGGERPOIRGAELGYESLK
human VPLDMSLFLKLOKRVTELEQEKOLMODELDRKEEQVLRSAKAGGERPOIRGAELGYESLK
chicken VPLDMSLFLKLOKRVTELEQEKOLMODELDRKEEQVLRSAKAGGERPOIRGAELGYESLK

rat 1209 ROELESNKLLKNELNELRKALSEKSAPEVNPAGAPAYRVLMEOLTAVSEELDVRKEEVL 1268
mouse ROELESNKLLKNELNELRKALSEKSAPEVNPAGAPAYRVLMEOLTAVSEELDVRKEEVL
human ROELESNKLLKNELNELRKALSEKSAPEVNPAGAPAYRVLMEOLTAVSEELDVRKEEVL
chicken ROELESNKLLKNELNELRKALSEKSAPEVNPAGAPAYRVLMEOLTAVSEELDVRKEEVL

rat 1269 ILRSOLVSOKAIOPKDDKNTMTDSTILEDVOKMKDKGEIAQAYIGLKETNRLLESOLO 1328
mouse ILRSOLVSOKAIOPKDDKNTMTDSTILEDVOKMKDKGEIAQAYIGLKETNRLLESOLO
human ILRSOLVSOKAIOPKDDKNTMTDSTILEDVOKMKDKGEIAQAYIGLKETNRLLESOLO
chicken ILRSOLVSOKAIOPKDDKNTMTDSTILEDVOKMKDKGEIAQAYIGLKETNRLLESOLO

rat 1329 SOKRSHENEAEALRGEIOSLKEENNR00LLAONL0LPPEARIEASLOHEITRLTNEIDL 1388
mouse SOKRSHENEAEALRGEIOSLKEENNR00LLAONL0LPPEARIEASLOHEITRLTNEIDL
human SOKRSHENEAEALRGEIOSLKEENNR00LLAONL0LPPEARIEASLOHEITRLTNEIDL
chicken SOKRSHENEAEALRGEIOSLKEENNR00LLAONL0LPPEARIEASLOHEITRLTNEIDL

rat 1389 LMEOLEKODKTVRKLKQKLVFAKKIGELEVGMENISPGOIIDEPVIRPNIPRKGKDFQ 1448
mouse LMEOLEKODKTVRKLKQKLVFAKKIGELEVGMENISPGOIIDEPVIRPNIPRKGKDFQ
human LMEOLEKODKTVRKLKQKLVFAKKIGELEVGMENISPGOIIDEPVIRPNIPRKGKDFQ
chicken LMEOLEKODKTVRKLKQKLVFAKKIGELEVGMENISPGOIIDEPVIRPNIPRKGKDFQ

rat 1449 GMLEYKREDEOKLVKNLILELKPRGVAVNLISGLPAYILFMCVRHADYLDNDOKVRSLLT 1508
mouse GMLEYKREDEOKLVKNLILELKPRGVAVNLISGLPAYILFMCVRHADYLDNDOKVRSLLT
human GMLEYKREDEOKLVKNLILELKPRGVAVNLISGLPAYILFMCVRHADYLDNDOKVRSLLT
chicken GMLEYKREDEOKLVKNLILELKPRGVAVNLISGLPAYILFMCVRHADYLDNDOKVRSLLT

rat 1509 STINSIKKVLKRGDDFETVSFWLSNTRFLHCLKQYSGEEGFMKHNTSRONEHCLTNFD 1568
mouse STINSIKKVLKRGDDFETVSFWLSNTRFLHCLKQYSGEEGFMKHNTSRONEHCLTNFD
human STINSIKKVLKRGDDFETVSFWLSNTRFLHCLKQYSGEEGFMKHNTSRONEHCLTNFD
chicken STINSIKKVLKRGDDFETVSFWLSNTRFLHCLKQYSGEEGFMKHNTSRONEHCLTNFD

rat 1569 LAEYROVLSDLAIOIYQOLVRVLENILOPMIVSGMLEHETIOGVSGVKPTGLRKRRTSSIA 1628
mouse LAEYROVLSDLAIOIYQOLVRVLENILOPMIVSGMLEHETIOGVSGVKPTGLRKRRTSSIA
human LAEYROVLSDLAIOIYQOLVRVLENILOPMIVSGMLEHETIOGVSGVKPTGLRKRRTSSIA
chicken LAEYROVLSDLAIOIYQOLVRVLENILOPMIVSGMLEHETIOGVSGVKPTGLRKRRTSSIA

rat 1629 DEGTYTLDLILROLNSFHSVMCOHGMDPELIKOVVKOMFYIVGAILNLLLRKDMCSWS 1688
mouse DEGTYTLDLILROLNSFHSVMCOHGMDPELIKOVVKOMFYIVGAILNLLLRKDMCSWS
human DEGTYTLDLILROLNSFHSVMCOHGMDPELIKOVVKOMFYIVGAILNLLLRKDMCSWS
chicken DEGTYTLDLILROLNSFHSVMCOHGMDPELIKOVVKOMFYIVGAILNLLLRKDMCSWS

rat 1689 KGM0IRYNVSQLEEWLRDKNLMNSGAKETLEPLIOAAQLLOVKKKTDDDAEAICSMCNAL 1748
mouse KGM0IRYNVSQLEEWLRDKNLMNSGAKETLEPLIOAAQLLOVKKKTDDDAEAICSMCNAL
human KGM0IRYNVSQLEEWLRDKNLMNSGAKETLEPLIOAAQLLOVKKKTDDDAEAICSMCNAL
chicken KGM0IRYNVSQLEEWLRDKNLMNSGAKETLEPLIOAAQLLOVKKKTDDDAEAICSMCNAL

rat 1749 TTAQIVKVLNLYTPVNEFEERVSVSFIRTIQVRLDRKDSPLLMDAKHIFPVTFFPNPS 1808
mouse TTAQIVKVLNLYTPVNEFEERVSVSFIRTIQVRLDRKDSPLLMDAKHIFPVTFFPNPS
human TTAQIVKVLNLYTPVNEFEERVSVSFIRTIQVRLDRKDSPLLMDAKHIFPVTFFPNPS
chicken TTAQIVKVLNLYTPVNEFEERVSVSFIRTIQVRLDRKDSPLLMDAKHIFPVTFFPNPS

rat 1809 SLALETIQIPASLGLGFIARV 1829
mouse SLALETIQIPASLGLGFIARV
human SLALETIQIPASLGLGFIARV
chicken SLALETIQIPASLGLGFIARV

A

```

S F E Q F C I N Y A N E K L Q Q Q F N M H V F K L E Q E E Y 477
mouse TAGTTTGAACAGTTCTGCATAAATTATGCAAATGAAAACTACAACAACAAATTCACATGCATGTCTCAAATGGAACAGGAGGAATA 1470
wild TAGTTTGAACAGTTCTGCATAAATTATGCAAATGAAAAGCTACAGCAACAATTCACATGCATGTCTCAAATGGAACAGGAGGAGTA
dop TAGTTTGAACAGTTCTGCATAAATTATGCAAATGAAAAGCTACAGCAACAATTCACATG-----
S F E Q F C I N Y A N E K L Q Q Q F N M H V S K L E Q E E Y

M K E Q I P W T L I D F Y D N Q P C I N L I E S K L G I L D 507
mouse TATGAAGGAACAGATTCATGGACACTTATAGATTTCTATGATAATCAGCCTTGATCAATCTTATAGAATCTAACTGGGAATCTCGA 1560
wild CATGAAGGAACAATTCATGGACACTCATAGATTTCTATGATAATCAGCCTTGATCAATCTTATAGAATCTAACTGGGTATCTAGA
dop -----
M K E Q I P W T L I D F Y D N Q P C I N L I E S K L G I L D

L L D E E C K M P K G T D D T W A Q K L Y N T H L N K C A L 537
mouse TTTGCTGGATGAGGAATGTAAGATGCCTAAAGGCACAGATGACACATGGGCCAAAACTGACAACACACATTTGAACAAATGTGCCCT 1650
wild TTTGCTGGATGAGGAATGTAAGATGCCTAAAGGTACCGATGACACATGGGCCAAAACTATACAACACACATTTGAACAAATGTGCTCT
dop -----ATGCCTAAAGGTACCGATGACACATGGGCCAAAACTATACAACACACATTTGAACAAATGTGCTCT
L L D E E C K M P K G T D D T W A Q K L Y N T H L N K C A L
  
```

B



C



図8

(A) *dop*ラットの脳から得られたミオシンVa cDNAに見いだされた141 bpの欠失。マウス (mouse)、正常ラット (wild)、*dop*ラット (*dop*) の塩基配列を比較した。マウスのミオシンVaのアミノ酸配列を上段に、正常ラットのミオシンVaのアミノ酸配列を下段に示した。*dop*で欠失している領域は“-”記号で表わした。

(B) mRNA欠失を検出するためのRT-PCRに用いたプライマーの模式図。ミオシンVaの一次構造の模式図に欠失の起こった領域を黒帯で示し、プライマーの位置は矢尻で示した。

(C) RT-PCRの結果。上段にアガロースゲル電気泳動を、下段に解析したラット個体の系図および遺伝子型を、対応させて示した。電気泳動の左にDNAサイズマーカー (M) を示した。検出された2本のバンドの差は約140 bpであった。

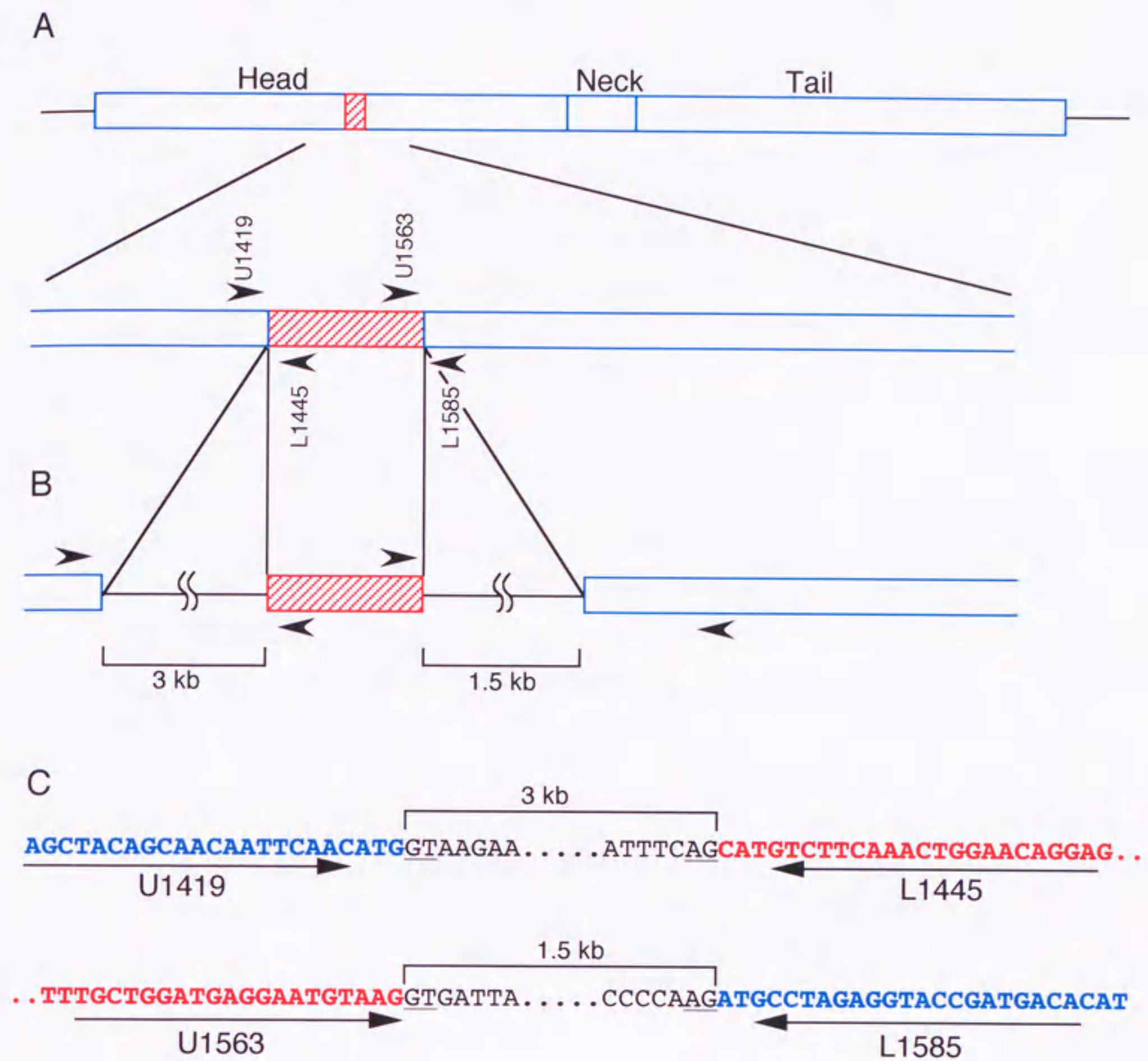
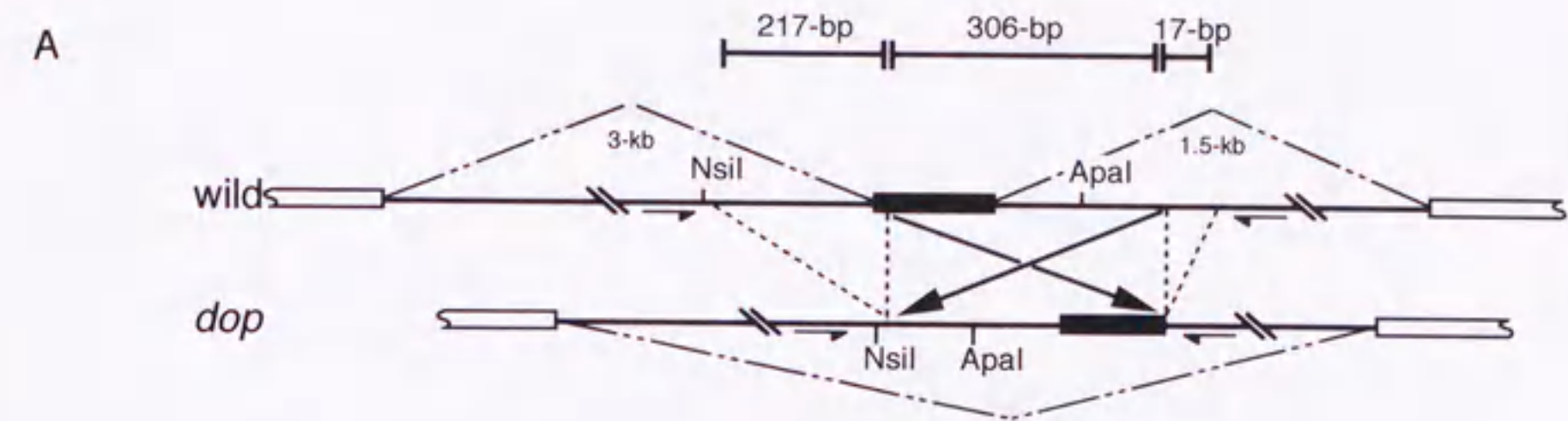


図9

- (A) ミオシンVa head領域のゲノムPCRに用いたプライマーの模式図。dop変異型 mRNAで欠失していた141 bpの配列を赤の斜線で示した。
- (B) 野生型DNAのゲノムPCRにより増幅された領域の模式図。ゲノムDNA上のイントロン (3 kb, 1.5 kb) を線で示した。
- (C) ゲノムPCRにより増幅されたDNA断片の末端の塩基配列。cDNAに対応する部分を青、赤文字で示し、イントロンを黒文字で示した。cDNA領域のプライマー配列を矢印で、エクソン-イントロン認識配列を下線で示した。

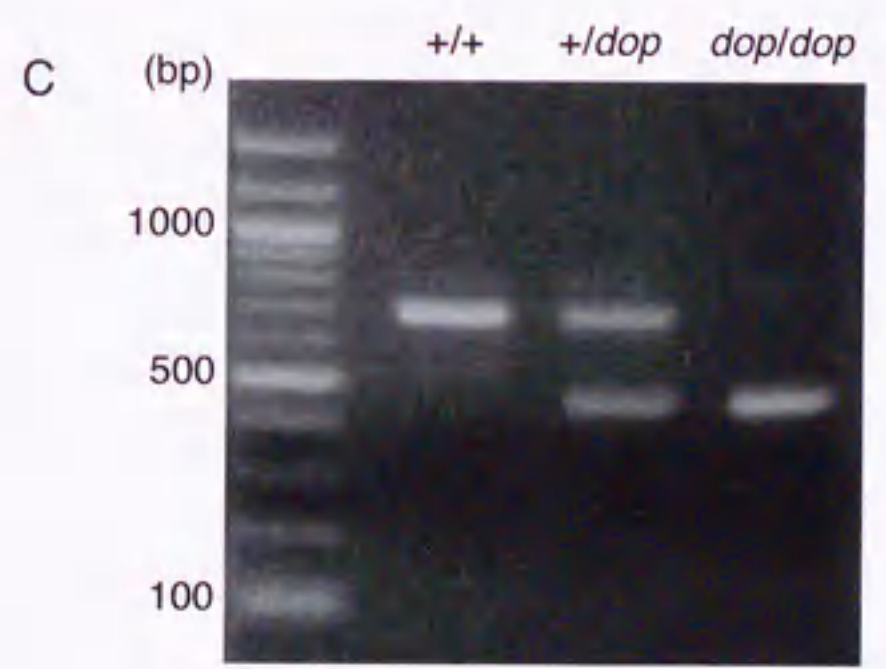
図 10

- (A) *dop* ラットにおける変異型ミオシン Va 遺伝子の模式図。野生型のゲノム DNA (wild) のエクソンを帯で、イントロンを線で示し、RNA スプライシングの様式を破線 (---) で示した。変異型 mRNA で欠失している 141 bp のエクソンは黒で示した。変異型 (*dop*) では 306 bp の領域が反転し、その両端が 217 bp および 17 bp にわたって欠失していた。矢印は遺伝子型検定に用いた PCR プライマーの位置を示す。
- (B) 野生型 (wild) および変異型 (*dop*) のゲノム DNA の塩基配列の比較。野生型のエクソン配列は太字で示し、エクソン-イントロン認識配列は太い下線で示した。野生型で斜体文字で示した配列は変異型では欠失しており、欠失の際の DNA 組換えがおこった部位を星印 (*、**) で示した。枠線で示した配列は変異型では反転していた。細い下線は A) で示した制限酵素 NsiI (ATGCA) および ApaI (GGGCCC) 認識配列。PCR プライマーに用いた配列には下線矢印を施した。
- (C) (A) および (B) で示したプライマーを用いてゲノム PCR により変異部位を増幅した結果。RT-PCR で決定した野生型 (+/+), ヘテロ型 (+/*dop*)、変異型 (*dop/dop*) についてゲノム PCR を行ったところ、野生型に対して変異型では約 240 bp サイズの小さいバンドが検出され、ヘテロ型では両方が認められた。DNA サイズマーカーを右に示した。



B

wild	dop
AAAAGCTACAGCAACAATTCAACATGGTAAGAA.....	AAAAGCTACAGCAACAATTCAACATGGTAAGAA.....
.....CTAAGGCAGAGTGCAAGTTCAGATCTGGCCTGGCTAAGGCAGAGTGCAAGTTCAGATCTGGCCTGG
GCTACATAGAAAATCTCAGGCTAACCTGCAATACATATAG	GCTACATAGAAAATCTCAGGCTAACCTGCAATACATATAG
ATGGATACCCTTTCTCAAGCATAACATTTTAAAATTACA	ATGGATACCCTTTCTCAAGCATAACATTTTAAAATTACA
TGCTTAGATTTACTTATGCATGATGATGCTTATAGCTGAG	TGCTTAGATTTACTTATGCATGATGCACATACATACATGC
GGTTTCTGTACATGATTTCACTCATGCTTCTTCATGAGGC	ACACATACACAGTTAAATAATAAAAAATTTTAAAAGAACC
TATTGTTACTGAGAGCCATGAGCTGTCTCCTTTTGTATC	TTTGGGGTCTAATGTCTCTTCAGAATGAACGAGGGGCCCC
TCCTCAGTGTCTATAGAAATGTGCTCCTTGATTACGTTT	TGACTTGTCTCAATGACATACTTTAGTTTCTGCTTGACC
TTATAATGATAATCTGATAACGACTGCCATCTTCTCTTT	CAATTGACCTGTAGCCTTGATCCATCTATCTTGACAGGCT
ATTTCAAGCATGTCTTCAAACCTGGAAACAGGAGGATACATG	AAGTACTTCAGAAAATTATATTCACCTTACATTCCTCATC
AAGGAACAATTCATGGACACTCATAGATTTCTATGATA	CAGCAAATCTAGAATACCCAGTTTAGATTCTATAAAATTG
ATCAGCCTTGATCAATCTTATAGAATCTAAACTGGGTAT	ATACAAGGCTGATTATCATAGAAATCTATGAGTGTCCATG
TCTAGATTTGCTGGATGAGGAATGTAAGGTGATTATAATT	GAATTTGTTC ^{**} CCAACACTATTGGCAGTCAGAACAACCTT
TTCTGAAGTACTTAGCCTGTCAAGATAGATGGATCAAGGC	CGGGAGCCAGTTCTCTCCTTCCCCTGTGGGT.....
TACAGGTCAATTGGGTGCAAGCAGAACTAAAGTATGTCACCCAAGATGCCTAAAGGTACCGATGACACAT
TTGAGACAAGTCAGGGGCCCTCGTTCATTCTGAAGAGAC	
ATTAGACCCAAAGTCTTTTAAAATTTCTTACTCATT	
TAACTGTGTATGTGTGCATGTATGTATGTATGATGAGGCAC	
ACGTGCC ^{**} CCAACACTATTGGCAGTCAGAACAACCTTTCGGG	
AGCCAGTTCTCTCCTTCCCCTGTGGGTGGG.....	
.....CCCAAGATGCCTAAAGGTACCGATGACACAT	



phenotype	normal		mutant
genotype	+/+	+/ <i>dop</i>	<i>dop/dop</i>
total	16	19	10

表 1

dop ラットにおけるミオシン Va ゲノム DNA の変異領域を増幅する PCR により 45 個体の遺伝子型 (genotype) を検定した。外見上正常な個体 (normal) の一部は野生型の遺伝子型を示した。変異個体 (mutant) においてはすべて変異型 DNA のみが検出された。例数が増えることにより +/+, +/*dop*, *dop/dop* の比は 1 : 2 : 1 に近づくものと期待される。

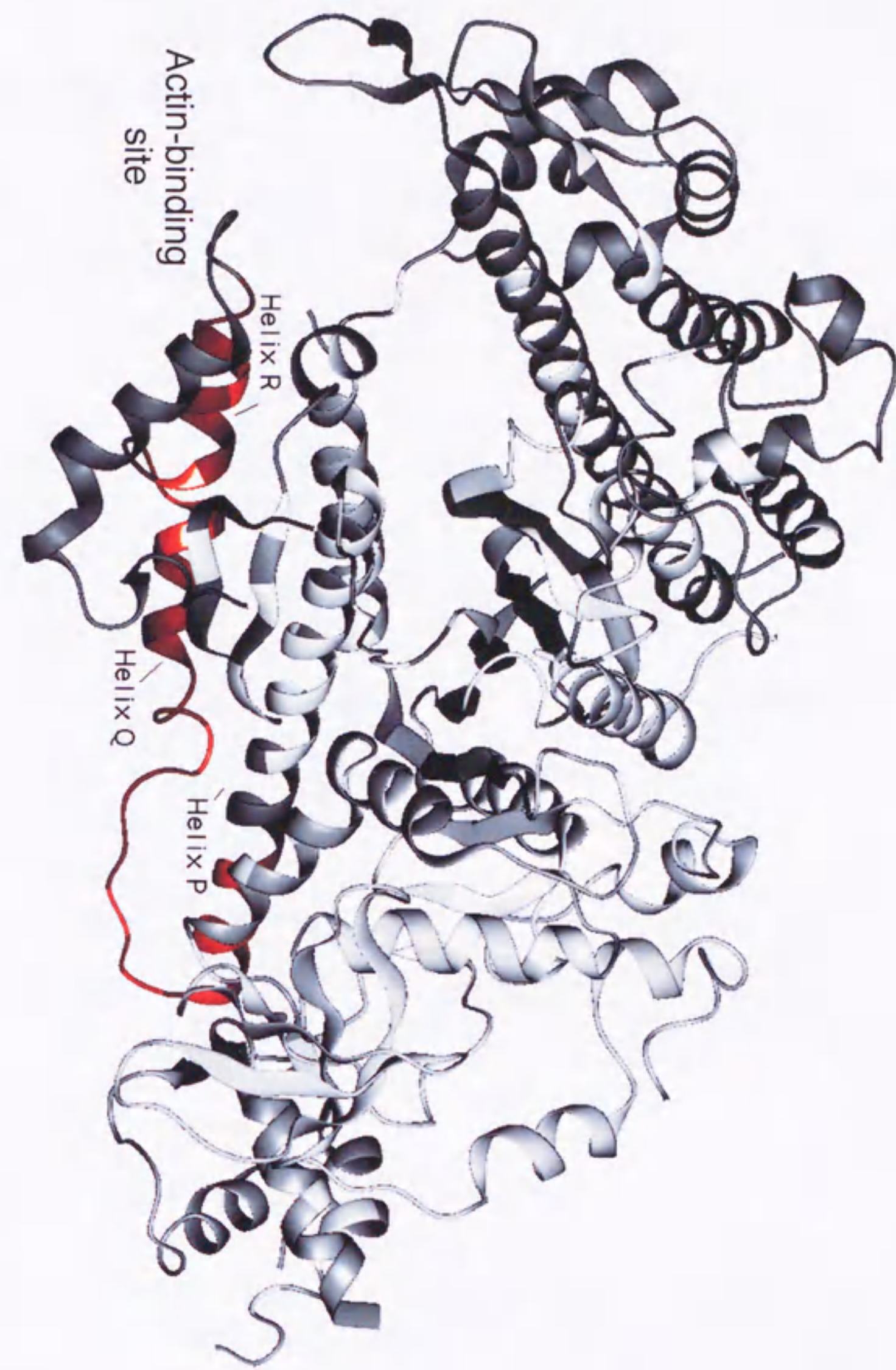
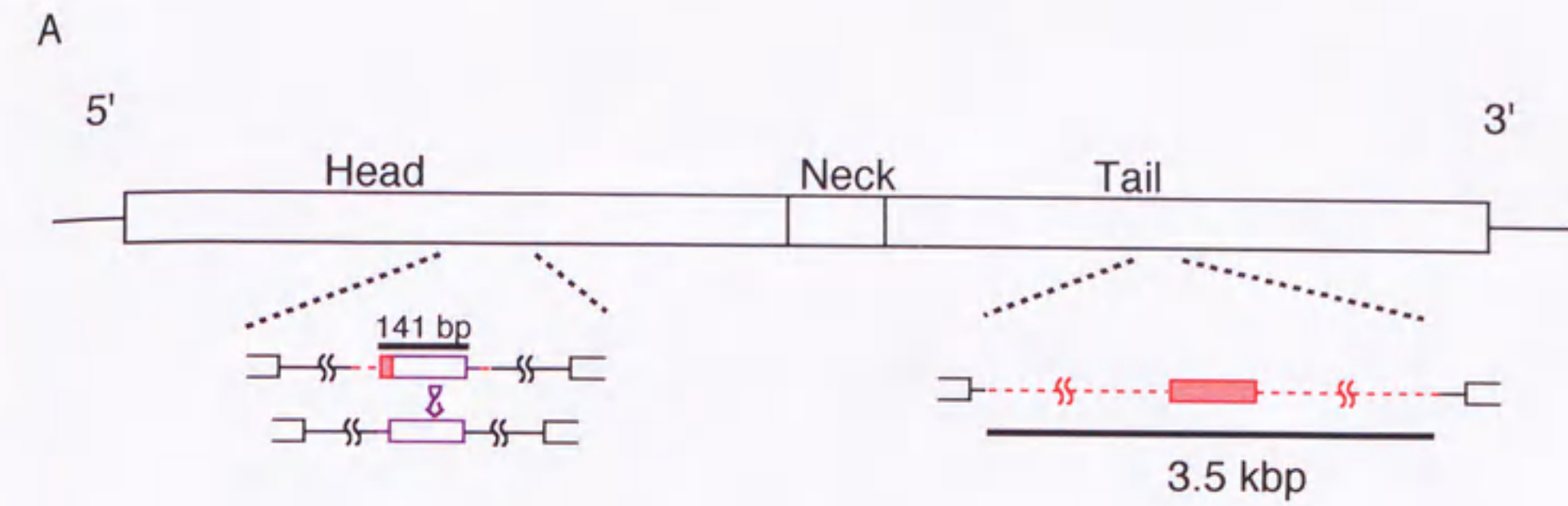


図11

ニワトリのミオシンII headドメインの結晶構造モデル (Dr. J. Copeの図より改変)。 *dop*ラットで発現しているミオシンVa mRNAで認められた欠失部分の塩基配列は、ミオシンVaタンパク質のアミノ酸468-514部分をコードし、ニワトリのミオシンIIでは図中のHelix Pの後半からHelix Qを経てHelix Rの全体に相当する。



B

	<i>dop</i> rat	<i>d^l</i> mouse
mutation	head region	tail region
genome DNA	540 bp rearrangement	3.5 kbp deletion
mRNA	141 bp deletion (exon skip)	reduced level aberrant size
protein	absent	absent

図12

(A) *dop*ラットと*d^l*マウスのみオシンVa遺伝子変異部位の模式図。上段にミオシンVa cDNA、下段にゲノムDNAの構造を示した。下段の左 (head領域) が*dop*ラットのゲノムDNA変異、右 (tail領域) が*d^l*マウスのゲノムDNA変異部位をあらわす。ゲノムDNAのエクソンを帯で、イントロンを線で示し、変異により欠失した部分は赤で示した。

(B) *dop*ラットと*d^l*マウスのゲノムDNA変異、mRNAおよびタンパク質の発現異常の概要。*d^l*マウスの変異についてはMooreら、およびStrobelらの結果を参照した(Moore et al., 1988; Strobel et al., 1990)。

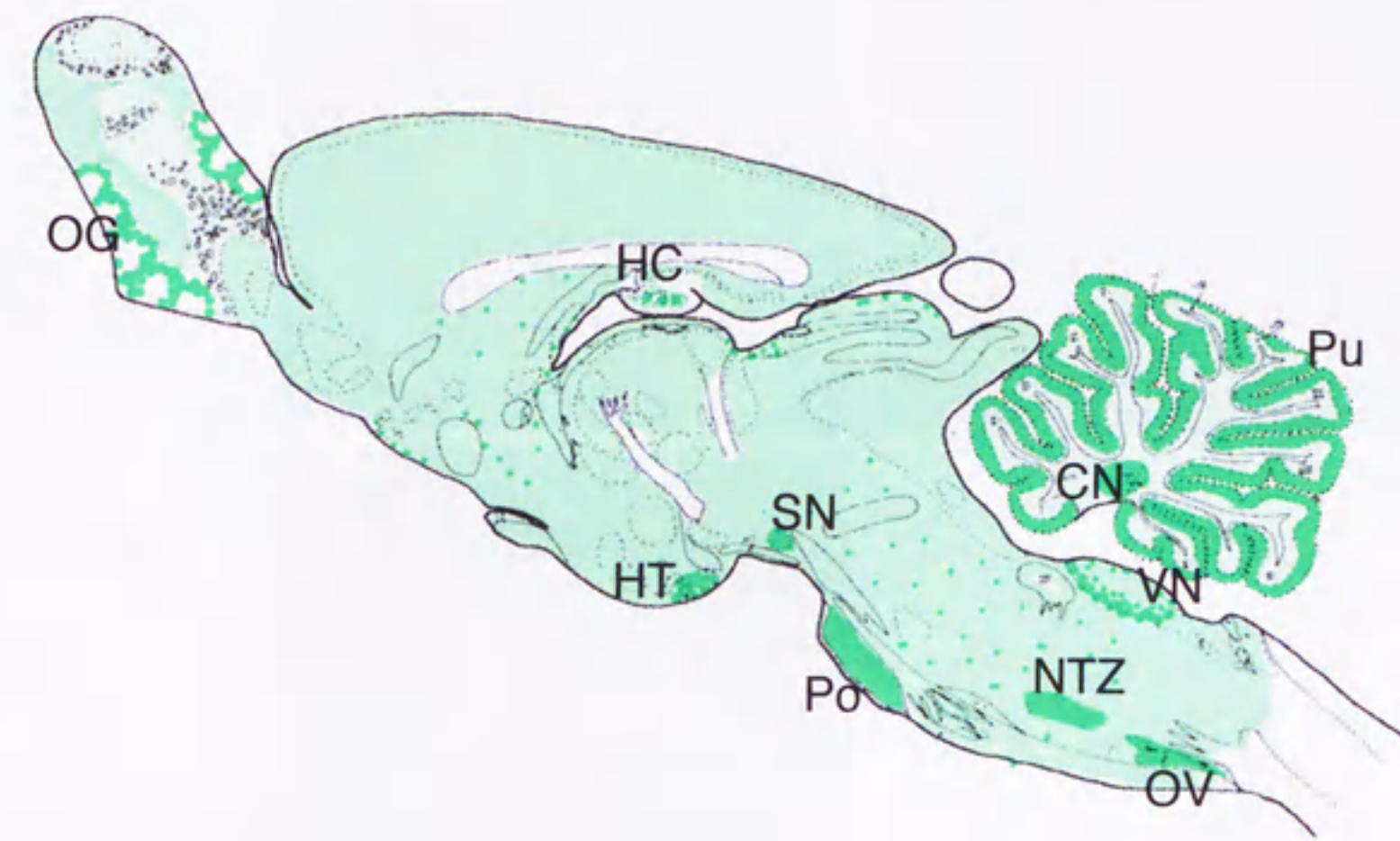


図13

ラット脳矢状断切片の組織図に示した蛍光抗体染色の結果。抗ミオシンVa抗体によるシグナルの強さを模式的に緑色で表わした。彩度が高い部分は強い蛍光が観察されたことを示す。特に強い蛍光が認められた領域の名称を示した。
 OG；嗅球糸球体、HC；海馬、HT；視床下部、SN；黒質、VN；前庭核、NTZ；台形核、OV；オリーブ核、Po；橋、Pu；プルキンエ細胞層および分子層、CN；小脳核

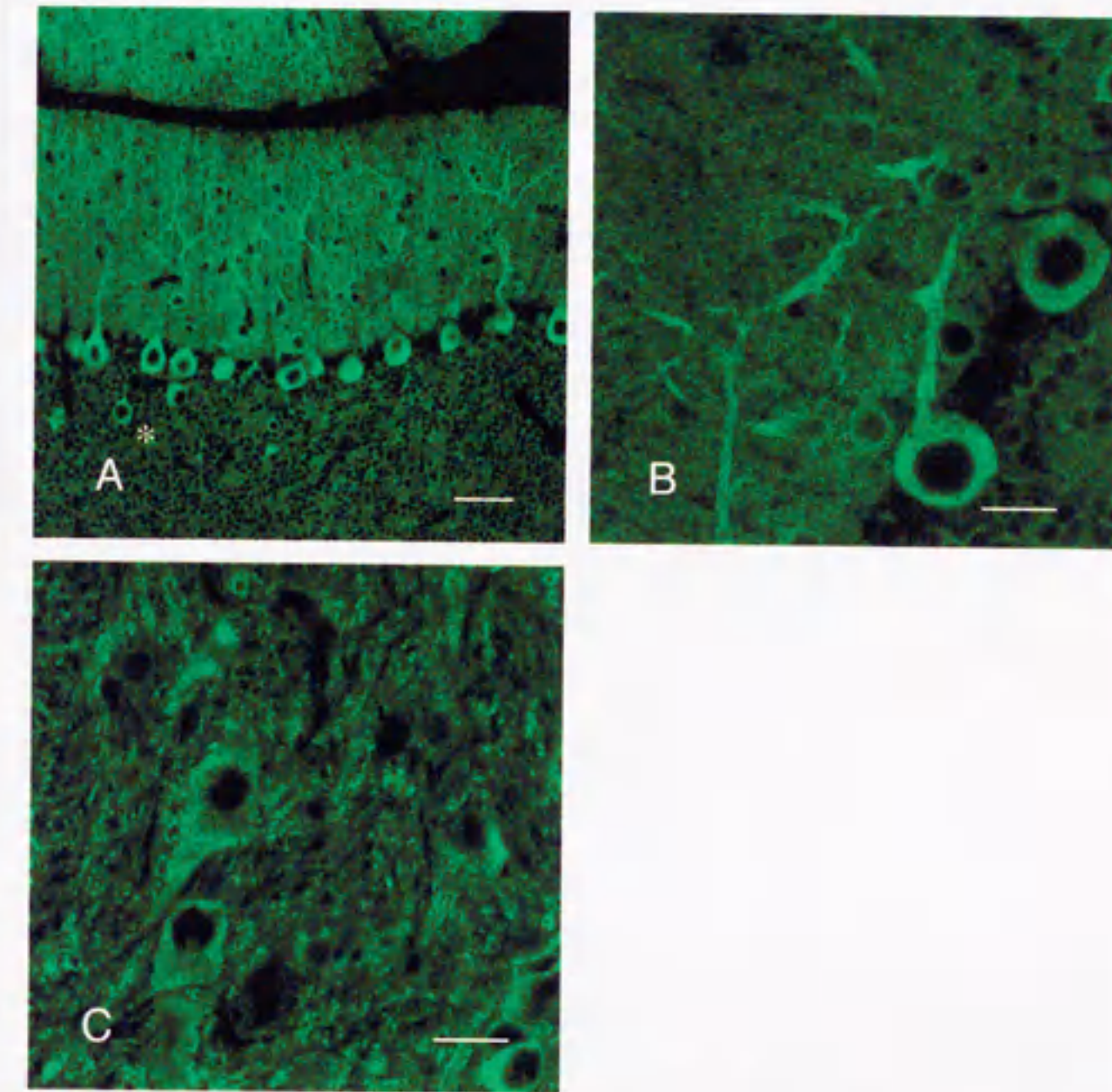


図14

- (A) 小脳分子層、プルキンエ細胞層、顆粒層の蛍光抗体染色。プルキンエ細胞層、分子層には比較的強いシグナルが認められた。内顆粒層の顆粒細胞での蛍光はごく弱く、ゴルジ細胞(*)においては若干強かった。スケールバーは50 μ mを示す。
- (B) 高倍率で観察したプルキンエ細胞。細胞体、樹状突起に粒状の蛍光が認められる。スケールバーは20 μ mを示す。
- (C) 高倍率で観察した小脳核の細胞群。内顆粒層よりも強い蛍光が認められた。スケールバーは20 μ mを示す。

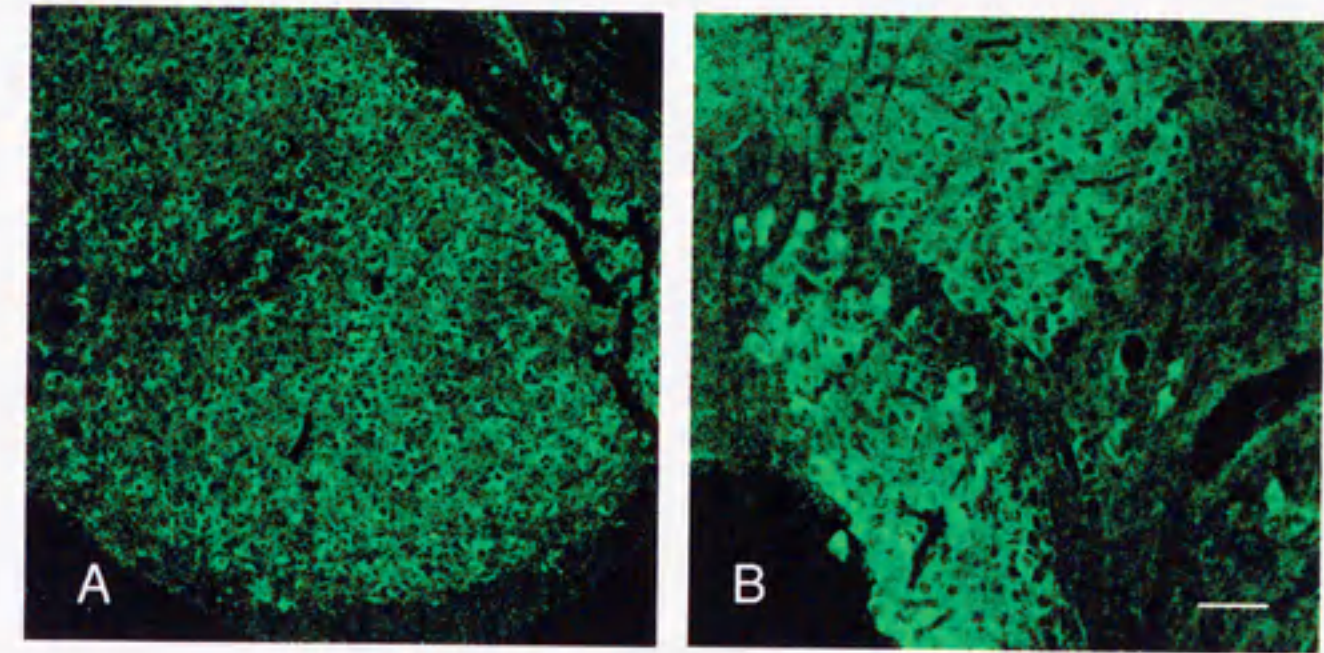


図15

(A) 強い蛍光が認められた橋核の一部。強い蛍光シグナルは橋核の細胞全体にわたって認められた。

(B) 下オリーブ核の蛍光染色像。細胞体に強い蛍光が認められた。スケールバーは(A)、(B)共通で100 μ mを示す。

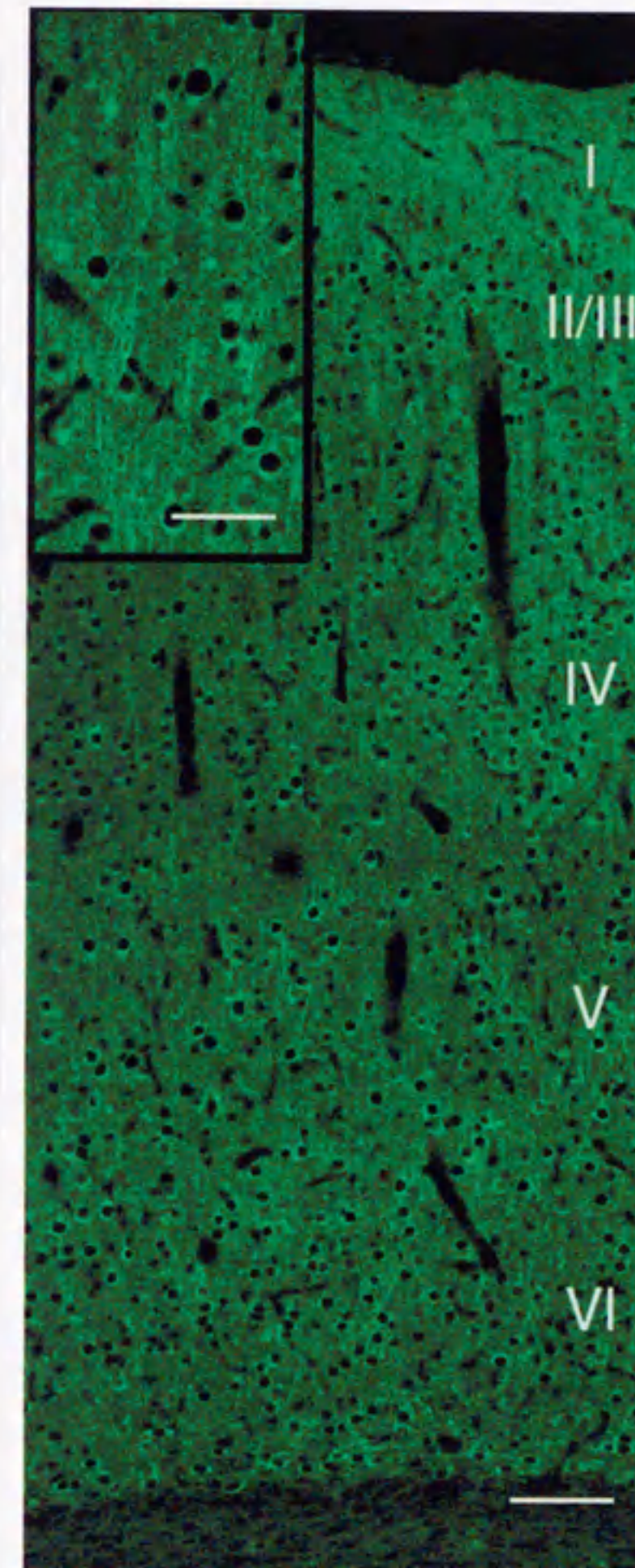


図16

大脳皮質における抗ミオシンVa抗体による蛍光染色。大脳皮質の各層構造 (I-VI) を右に示した。左上枠は高倍率で観察したもの。大脳皮質の細胞群は一様な染色像を示し、顕著に強いシグナルは認められなかった。蛍光は細胞体および神経突起全体に認められた。スケールバーは100 μ m、左上枠内は50 μ mを示す。

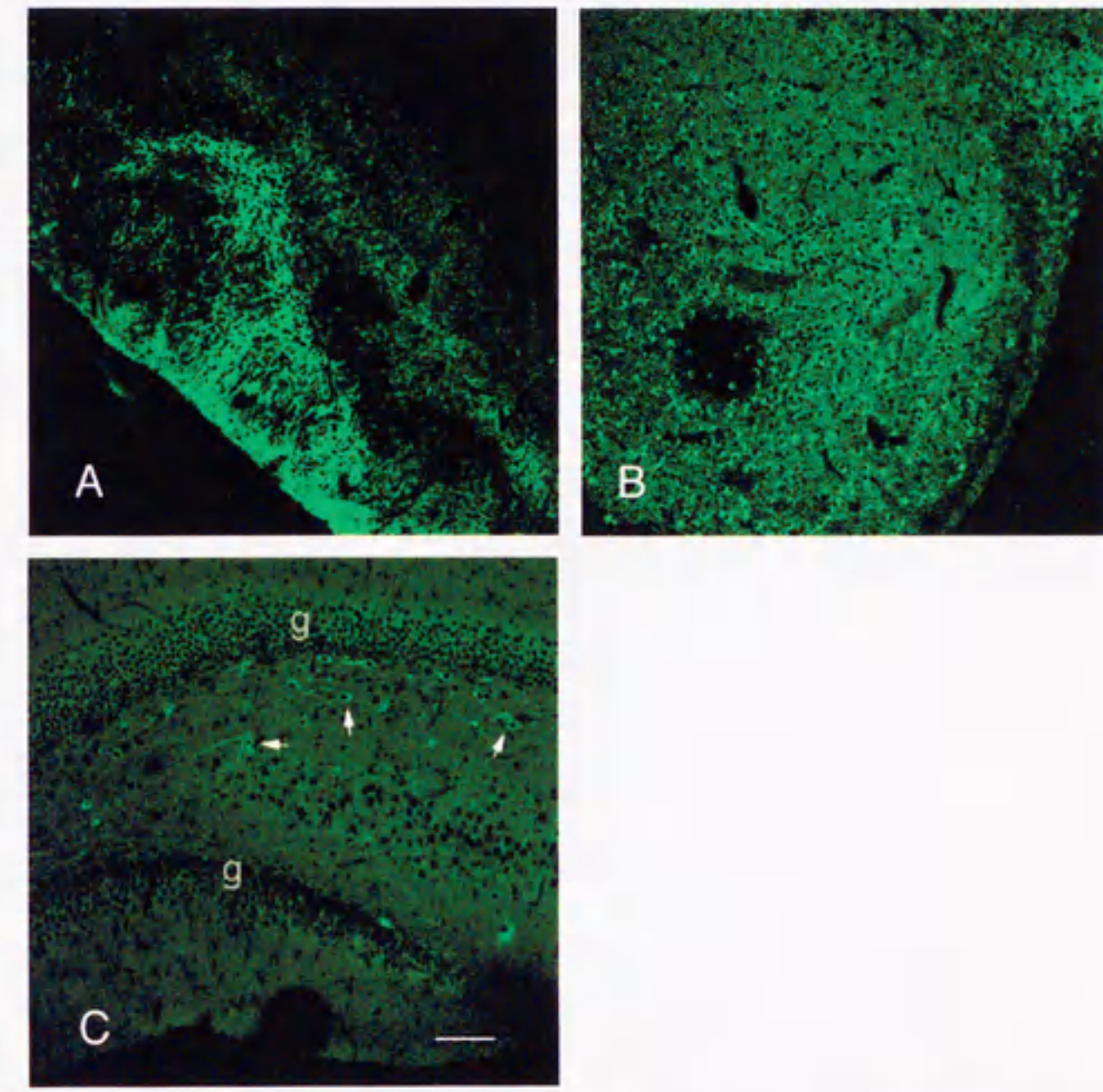


図17

- (A) 顕著に強い蛍光シグナルが認められた嗅球腹側の糸球体層。糸球体を取り巻く細胞群に特に蛍光が強くと認められた。
- (B) 視床下部での蛍光抗体染色像。大型の細胞で特に強い蛍光が認められた。
- (C) 海馬歯状回における蛍光シグナル。顆粒細胞層 (g) にはごく弱い蛍光しか認められないが、内側の多形細胞層の一部の細胞 (矢印) で顕著な蛍光シグナルが観察された。スケールバーは(A)-(C)すべてに共通で $100\mu\text{m}$ を示す。

論文目録

主論文

題目 遺伝性神経疾患(*dilute-opisthotonus, dop*)ラットを用いたミオシン Va の
遺伝子変異とその発現に関する研究

副論文

Eutaki, S., Takagishi, Y., Hayashi, Y., Ohmori, S., Kanou, Y., Inouye, M., Oda, S.,
Seo, H., Iwaikawa, Y., and Murata, Y. (2000). Identification of a novel *myosin-Va*
mutation in an ataxic mutant rat, *dilute-opisthotonus*. *Mamm. Genome* 11, 649-655

Eutaki, S., Takagishi, Y., Hayasaka, S., Iwaikawa, Y., and Murata, Y. (2000).
Immunohistological distribution of myosin-VA in the rat brain. *Environ. Med.*, in
press.

Eutaki, S., Kanou, Y., Kambe, F., Seo, H., Iwaikawa, Y., and Murata, Y. (1998).
Pax-8 protein can bind to the regulatory region of NCAM gene in developing mouse
neural tube. *Environ. Med.* 42, 145-148