

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

QAG カビート病に対する治療法の開発に関する研究

(H18-脳-006)

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 眞名 信行

平成 14 (2001) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

CAG リpeat 病に対する治療法の開発に関する研究 貫名 信行	----- 3
--------------------------------------	---------

### II. 分担研究報告書

1. CAG リpeat 病モデルシステムを用いた治療法の開発 貫名 信行	----- 13
2. CAG リpeat 病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発 辻 省次	----- 21
3. 球脊髄性筋萎縮症の治療法の開発 祖父江 元	----- 23
4. Machado-Joseph 病原因タンパク質切断酵素の解析 垣塚 彰	----- 25
5. ポリグルタミンにより誘導される細胞死の機序解析とその抑制法の開発 宮下 俊之	----- 27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 31
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 37
-----------------	----------

# I. 総括研究報告書

## CAG リピート病に対する治療法の開発に関する研究

主任研究者 貫名 信行

理化学研究所 脳科学総合研究センター 病因遺伝子研究グループ

### 研究要旨

ポリグルタミン病の病態について伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディングが重要であることを示した。アンフォールディングを促進する因子としてプロセッシングの存在が示唆された。この点に関して治療のための制御対象となるプロセッシング因子の同定の可能性が出てきた。ポリグルタミンの転写調節障害仮説に基づく治療の可能性についても転写障害の解析が進み、その薬物による回復の可能性が示唆された。さらに SBMA では抗アンドロゲン療法の可能性を示した。

### A. 研究目的

CAG リピート病 (ポリグルタミン病) はハンチントン病、遺伝性脊髄小脳変性症、球脊髄性筋萎縮症などの代表的な神経変性疾患を含み、近年病因遺伝子が同定された後その病態解明が急速に進展した疾患群である。しかしながら本疾患は未だ治療法に関しては十分な進展が見られていない。本研究では従来の研究で蓄積した本疾患群のモデルシステム (分子モデル、細胞モデル、マウスモデル) を有効に用い、従来の仮説の検証、病態解明の展開、治療法の開発を行おうというものである。具体的には1) ポリグルタミンによる凝集体形成過程の解明とその抑制、2) ポリグルタミンによる細胞死、あるいは細胞機能障害機構の解明とその抑制、3) 動物モデルを用いた神経細胞死、神経細胞機能障害の抑制の試みを中心的な課題として行う。

### B. 研究方法

シャペロン系とプロテアソーム系を連結する因子の検討

Machado-Joseph 病遺伝子産物 ataxin-3

完全長またはアミノ端を truncate した部分蛋白を EGFP と融合し、この蛋白に対する HSP70,40, の結合と ubiquitin 化を検討した。さらに伸長したポリグルタミン特異抗体 1C2 との反応性を検討した。また CHIP 発現による変異ハンチンチン発現系及び上記の ataxin-3 発現系でのハンチンチン及び ataxin-3 のユビキチン化について検討した。

アミロイドモチーフのよるホスト蛋白への影響

凝集性アミノ酸配列の性質を詳しく検討するために、C-D コーナーに種々の凝集性アミノ酸配列を挿入したキメラミオグロビンを設計した。挿入した凝集性アミノ酸配列はヒトプリオン(OPR)、Sup35p (R5)、 $\alpha$ -シヌクレイン(NAC)、50 グルタミンリピート(Q50)由来の 40-60 アミノ酸からなる凝集体形成に関わると考えられる配列である。これらキメラミオグロビンの構造および性質を分光学的、生化学的手法により検討した。

CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開

## 発

培養細胞系を用い、種々の長さのポリグルタミン鎖、核移行シグナル、GFPの融合タンパクを発現する実験系を確立する。この実験系を用いて、種々の長さのポリグルタミン鎖が、cAMP 応答遺伝子群の転写にどのような影響を与えるか、培地に cAMP analogue を添加することによりその転写を活性化できるかどうかを検討する。

### 球脊髄性筋萎縮症の治療法の開発

Chicken  $\beta$ -actin プロモーターの調節下で異常延長した CAG リピートをもつヒトの全長の AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、雄に対し去勢術、雌に対し testosterone enanthate の皮下投与を施行した。

### Machado-Joseph 病原因タンパク質切断酵素の解析

MJD 蛋白質がプロセシングされた細胞で薬剤耐性遺伝子が発現するシステムを構築し、MJD 蛋白プロセシング活性を有する細胞を単離し、解析した。

### ポリグルタミンにより誘導される細胞死の機序解明とその抑制法の開発

ラット褐色細胞腫由来細胞株 PC12 を用いてテトラサイクリン (Tet) 依存性に正常ポリグルタミン (19 回) と伸長したもの (56 回) をそれぞれ発現する遺伝子導入株を作成した。これらの細胞株を神経細胞に分化させた後、Tet を培地に添加する前後で遺伝子発現プロファイルを解析した。一方すべての IRSp53 アイソフォームに反応する共通の抗体の他に L, S, T にそれぞれ特異的に反応する抗体を作成し、ラットの組織及びヒト細胞株における各アイソフォームの発現をウェスタンブロット法で解析した。

## C. 研究結果

### シャペロン系とプロテアソーム系を連結する因子の検討

HSP70,40 の結合とユビキチン化は truncation によって増強した。CHIP の発現によってユビキチン化が増強し、U-box を除いた CHIP の発現ではユビキチン化は減少した。

### アミロイドモチーフのよるホスト蛋白への影響

キメラミオグロビンは、中性条件下、37°C 放置により Q50>R5>OPR>NAC>WT の速さで凝集体を形成した。凝集体の性質を生化学的手法、電子顕微鏡などで調べたところ、R5 と Q50 変異体の凝集体は SDS に不溶性のアミロイド繊維を含むことが明らかになった。また、Q50 の繊維は R5 の繊維よりも長く、また量も多いことから、グルタミンリピートはアミロイド繊維形成能がより高いことが判明した。これらキメラミオグロビンの安定性を尿素変性実験により検討した。R5、Q50 変異体の安定性は他の変異体に比べて大きく不安定化し、またこれら蛋白質の慣性半径も予想値以上に増加していることが X 線小角散乱の実験から明らかになった。

### CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発

Neuro2a 細胞に、種々の長さのポリグルタミン鎖、核移行シグナル、GFP の融合タンパクを発現する実験系を確立した。c-fos, リン酸化 CREB の発現を経時的に観察したところ、Q0, Q19, Q57 とポリグルタミン鎖長依存性に、c-fos, リン酸化 CREB の発現が抑制された。また、この抑制は、2mM CPT+cAMP の添加により、可逆性に回復した。

### 球脊髄性筋萎縮症の治療法の開発

CAG リピートが異常延長した全長 AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (Tg) では、その症状や病理所見の性差が著しく、雄が雌より重症化した。タンパク質レベルで変異 AR の発現を雄に多く認め、

その殆どは核分画に存在しており、核への変異 AR の蓄積量に性差がみられることが証明された。次に、4 週齢の雄 Tg に去勢術を施行したところ、対照群に比べ表現型、病理学的所見、western blot 解析のいずれについても著明な改善が得られた。雌 Tg に対し testosterone enanthate の皮下投与を施行したところ、いずれの所見も著明に悪化した。

#### Machado-Joseph 病原因タンパク質切断酵素の解析

MJD 蛋白質がプロセッシングされた細胞で薬剤耐性遺伝子が発現するシステムを構築し、PC12 細胞の亜株を選別することにより、プロセッシング活性の高い細胞株（約 300 倍に上昇）を選別・樹立することに成功した。MJD 蛋白質の切断は、ポリグルタミンの長さには影響されないようであった。また、切れた蛋白の分子量から、MJD 蛋白質の 200 番目のアミノ酸近傍が切断点と考えられた。しかしながら、その付近のアミノ酸配列からは、切断酵素の予想を立てるには至らなかった。

#### ポリグルタミンにより誘導される細胞死の機序解明とその抑制法の開発

病的範囲のポリグルタミンによってのみ、113 個の遺伝子発現が 3 倍以上誘導され、89 個の遺伝子発現が 1/3 以下に抑制された。これらの遺伝子の中には neuronatin  $\alpha$ , apolipoprotein C1 等があった。

IRSp53 のアイソフォームのうち、L と S は主に脳で発現が見られた。T は調べた範囲ではラットでの発現は認められず、HeLa 細胞で発現していた。

#### D. 考察

本年度の研究によって CAG リピート病に対する治療法の開発のための幾つかの着実な成果が得られた。

シャペロン系とプロテアソーム系に関しては異常ポリグルタミンに対する細胞の

反応はシャペロン系によって異常を認識され、CHIP によってユビキチン化され処理機構へ運ばれることを示唆している。このような機構を増強することがポリグルタミン病における発症予防に有効であるかどうかについてはプロテアソーム活性の異常が細胞死を引き起こしている可能性もあり、今後の検討を要する。一方 1C2 の反応性が truncation によって増強するという点は 1C2 がポリグルタミン鎖を認識していると考えられ、興味深い。1C2 はおそらくポリグルタミン鎖による  $\beta$ シートを認識し、その turn 部分の構造が反応性に関与していると想定される。ポリグルタミン鎖の伸長とともに 1C2 との反応性を増すような構造変化が分子の truncation によっても増強するということは完全長の安定した構造がポリグルタミン鎖のとり構造に影響しすることを示しており、一方で変異ミオグロビンの検討からは伸長したポリグルタミン鎖がホスト蛋白の構造に影響するという相互関係が存在することを示している。我々の提唱する伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディングが病態に重要であるという仮説はプロセッシングによって増強されることが示唆され、プロセッシングの制御も治療の標的となりうると考えられる。

この点で Machado-Joseph 病(MJD)では、原因遺伝子から MJD 蛋白質が作られたのち、MJD 蛋白質は特異的にプロセッシングを受け、伸長したポリグルタミンを含む C 末部分が切り出され、蓄積することが、発症の第 1 ステップとする考えによる MJD 蛋白質を限定分解する活性を有する神経細胞を実際に同定できたことは、その証明にむけての大きな前進となり、治療の標的の同定につながる可能性が出た。

核内封入体の形成による転写調節障害による神経機能障害については今回の結

果より, c-fos, リン酸化 CREB などの内在性の cAMP 応答遺伝子群の転写が, 伸長ポリグルタミン鎖の共発現によって阻害されることを示し, cAMP 応答遺伝子群の転写阻害が, ポリグルタミン病の病態機序に深く関与する可能性を見出した。さらに, CPT-cAMP の添加によりこの転写の阻害が回復することを見出したことは, 治療法開発に向けての重要なステップであると考えられる。

また SBMA モデルトランスジェニックマウスは, 運動機能障害や病理学的な所見に明らかな性差がみられ, SBMA の病態発現に内分泌学的要因が強く関与していることが推定された。雄への去勢術が顕著な治療効果を, 雌へのテストステロン投与が増悪効果を示したことから, testosterone を減少させることで変異 AR の核移行が阻害され, 治療効果が得られると考えられた。

さらに細胞モデル系で伸長したポリグルタミンによって多くの遺伝子が発現制御を受けていることがわかった。今後の解析によって病態に関与する重要な因子の同定により治療の標的が同定される可能性が出てきた。

#### E. 結論

ポリグルタミン病の病態について伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディングが重要であることを示した。アンフォールディングを促進する因子としてプロセッシングの存在が示唆された。プロセッシング因子の同定の可能性はこのような病態仮説に基づく治療戦略からも有効な制御対象の同定につながる。ポリグルタミンの転写調節障害仮説に基づく治療の可能性についても転写障害の解析が進み, その薬物による回復の可能性が示唆された。さらに SBMA では抗アンドロゲン療法の可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Sawada, M., and Nukina, N.:  $\alpha$ -synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J. Neurochem.* 77:239-252, 2001.

Jana, N-R., Zemskov, E-A, Wang, G-H., and Nukina, N.: Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* 10:1049-1059, 2001.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., and Nukina, N.:  $\alpha$ -synuclein affects the MAP kinase pathway and accelerates cell death. *J. Biol. Chem.* 276:45320-45329, 2001.

Tanaka, M., Morishima, I., Akagi, T., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Intra- and intermolecular  $\beta$ -pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases. *J. Biol. Chem.* 276:45470-45475, 2001.

Yamada, M., Wood, J.D., Shimohata, T., Hayashi, S., Tsuji, S., Ross, C. A., and Takahashi, H.: Widespread occurrence of intranuclear atrophin-1 accumulation in the central nervous system neurons of patients with

- dentatorubral pallidoluysian atrophy. *Ann. Neurol.* 49:14-23, 2001.
- Yamada, M., Hayashi, S., Tsuji, S., and Takahashi, H.: Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol.* 101:140-144, 2001.
- Shimohata, T., Onodera, O., and Tsuji, S.: Expanded polyglutamine stretches lead to aberrant transcriptional regulation in polyglutamine diseases. *Hum. Cell* 14:17-25, 2001.
- Nakamura, K., Jeong, S.E., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S., and Kanazawa, I.: SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum. Mol. Genet.* 10:1441-1448, 2001.
- Yamada, M., Sato, T., Shimohata, T., Hayashi, S., Igarashi, S., Tsuji, S., and Takahashi, H.: Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *Am. J. Pathol.* 159:1785-1795, 2001.
- Ishigaki, S., Niwa, J., Yoshihara, T., Mitsuma, N., Doyu, M., and Sobue, G.: Two novel genes, human neugrin and mouse m-neugrin, are upregulated with neuronal differentiation in neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 279:526-533, 2000.
- Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Do, J., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G.: Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Hum. Mol. Genet.* 10:1039-1048, 2001.
- Kobayashi, Y., Sobue, G.: Protective effect of chaperones on polyglutamine diseases. *Brain Res. Bull.* 563:165-168, 2001.
- Qiao, S., Iwashita, T., Furukawa, T., Yamamoto, M., Sobue, G., and Takahashi, M.: Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. *J. Biol. Chem.* 276(12):9460-9467, 2001.
- Yoshihara, T., Ishigaki, S., Yamamoto, M., Liang, Y., Niwa, J., Takeuchi, H., Doyu, M., and Sobue, G.: Differential expression of inflammation and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 80:158-167, 2002.
- Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., and Kakizuka, A.: Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell Death Differ.* 8:871-873, 2001.



- Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A. H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S., and Kakizuka, A.: VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8: 977-984, 2001.
- Maeda, H., Hori, S., Nishitoh, H., Ichijo, H., Ogawa, O., Kakehi, Y., and Kakizuka, A.: Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 61:5432-5440, 2001.
- Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., and Fujita, T.: Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. *Genes Cells* 6:887-897, 2001.
- Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., and Kakizuka, A.: Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 9:264-273, 2002.
- Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., and Kakizuka, A.: Unequal crossing-over in unique PABP2 Mutations: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Arch. Neurol.* 59:474-477, 2002.
- Cuddeback, S.M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S., and Wang, H.G.: Molecular Cloning and Characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J. Biol. Chem.* 276:20559-20565, 2001.
- Shikama, Y., U, M., Miyashita, T., and Yamada, M.: Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-Inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* 264:315-325, 2001.
- U, M., Miyashita, T., Ohtsuka, Y., Okamura-Oho, Y., Shikama, Y., and Yamada, M. Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death Diff.* 8:377-386, 2001.
- Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., and Yamada, M.: Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:957-960, 2001.
- U, M., Miyashita, T., Shikama, Y., Tadokoro, K., and Yamada, M.: Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family. *FEBS Lett.* 509:135-141, 2001.
- Shikama, Y., Shen, L., Yonetani, M., Miyauchi, J., Miyashita, T., and Yamada, M.: Death effector domain-only polypeptides of caspase-8

and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:484-493, 2002.

## 2. 学会発表

Nukina, N.: Toward gene expression analysis of human brain: a lesson from mouse brain study. Genes and Minds Initiative Workshop on Ape Genomics (Tokyo, Japan), Mar. 2001.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., and Nukina, N.: Alpha-synuclein affects MAP kinase pathway and accelerate cell death. The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (Kyoto, Japan), Apr. 2001.

Kotliarov, Y-V., Kotliarova, S-E., and Nukina, N.: Multiple comparison analysis program: further analysis of GeneChip data. The American of Human Genetics 51th Annual Meeting (San Diego, USA), Oct. 2001.

Kotliarova, S-E., Uchikawa, C., Kotliarov, Y-V., Kamide, Y., Oyama, F., and Nukina, N.: Transcriptome analysis in two transgenic mouse models for Huntington's disease. The American of Human Genetics 51th Annual Meeting (San Diego, USA), Oct. 2001.

Oyama, F., Kotliarova, S-E., Harada, A., Ito, M., Ueyama, Y., Hirokawa, N., and Nukina, N., Ihara, Y. Gene expression alterations in tau-deficient mice. The American of Human

Genetics 51th Annual Meeting (San Diego, USA), Oct. 2001.

Shinbo, I., Jana, N-R., Zemskov, E-A., Wang, G-H, and Nukina, N.: Altered proteasomal function in Huntington disease cellular model. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting (San Diego, USA), Nov. 2001.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., and Nukina, N.: Generation of  $\alpha$ -synuclein expressing mice in oligodendrocytes. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting (San Diego, USA), Nov. 2001.

Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Purifying aggregates of GFP-fused polyglutamine-containing protein by cell sorter to analyze the aggregate-interacting proteins. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting (San Diego, USA), Nov. 2001.

Nukina, N.: Cellular response to misfolded polyglutamine proteins. China-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI-2001) (Hangzhou, Korea), Nov. 2001.

Nukina, N.: Proteasomal degradation: Impaired breakdown of poly-Q-expanded polypeptides?. *Frontiers in Neurodegeneration: Huntington's disease* (Reisensburg, Germany), Jan. 2002.

Adachi, H., and Sobue, G.: Transgenic mice with human AR promoter-driven extremely expanded CAG repeats show wide-spread polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction. The 13<sup>th</sup> Naito conference on molecular biological approaches for intractable disease II (Kanagawa, Japan), Nov. 2000.

Kakizuka, A.: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> recruits Daxx and ASK1 to re-organized PML bodies and activates SEK1-JNK cell death kinase cascade in APL cells. Jolly Midas Hotel (Rome, Italy), Oct. 2001.

Kakizuka, A.: Molecular analysis of polyglutamine diseases. Japan-America Frontier of Science (Tokyo, Japan), Oct. 2001.

岩田 淳, 丸山美枝子, 金澤一郎, 貫名信行:  $\alpha$ シヌクレインはMAPkinase系の低下を生じ、細胞死を誘発する。第42回日本神経学会総会(東京), 2001年5月

王 光輝, 澤井紀子, 金澤一郎, 貫名信行: ataxin-3は酵母RAD23ホモログのHHR23に結合する。第42回日本神経学会総会 P2-M-3(東京), 2001年5月

佐藤俊哉, 山田光則, 小宅睦郎, 木村哲也, 勝木元也, 高橋 均, 辻 省次: 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症の分子機構。第74回日本生化学会(京都), 2001年10月

川上速人, 松原幸枝, 鹿間芳明, 宮下俊之: GFP標識したカスパーゼ10プロドメインの細胞内局在 - 電顕組織化学的

検討。第106回日本解剖学会総会・全国学術集会(高知), 2001年4月

鹿間芳明, 宮下俊之, 山田正夫: カスパーゼ8、10のプロドメインによるFasを介する細胞死の抑制。第60回日本癌学会総会(横浜), 2001年9月

於保祐子, 中村真耶, 宮下俊之, 山田正夫: DRPLA蛋白に結合能を持つinsulin/IGF-I受容体基質IRSp53の機能。日本人類遺伝学会第46回大会(さいたま), 2001年10月

宮下俊之, 押田忠弘: グルココルチコイドによる白血病細胞における遺伝子発現プロファイルの変化。第62回小児血液・腫瘍懇話会(東京), 2001年11月

於保祐子, 中村真耶, 宮下俊之, 山田正夫: DRPLA蛋白の機能ドメイン解析。第24回日本分子生物学会年会(横浜), 2001年12月

鹿間芳明, 禹麻美, 大塚裕子, 米谷元邦, 宮下俊之, 山田正夫: カスパーゼ8、10のプロドメインによるFas及びTRAILを介する細胞死の抑制。第24回日本分子生物学会年会(横浜), 2001年12月

米谷元邦, 鹿間芳明, 大塚裕子, 宮下俊之, 山田正夫: カスパーゼ8、10のプロドメインによるNF- $\kappa$ B活性化のメカニズムの検討。第24回日本分子生物学会年会(横浜), 2001年12月

禹麻美, 鹿間芳明, 宮下俊之, 山田正夫: Bcl-2ファミリータンパク質Bimの新規アイソフォームの同定とその機能解析。第24回日本分子生物学会年会(横浜), 2001年12月

柳澤比呂子, 宮下俊之, 中野芳朗, 山元大輔: キイロショウジョウバエ Spin のヒト相同蛋白質による細胞死誘導とその機構. 第 24 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2001 年 12 月

Yoshida N., 宮下俊之, 山田正夫, Reed, J. C., 杉田雄二, 押田忠弘: Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. 第 24 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2001 年 12 月

滝田順子, 宮下俊之, 陳 玉彦, 陳 迎章, 花田良二, 山本圭子, 林 泰秀: 神経芽種における 1p36 領域に存在する caspase 9 遺伝子の解析. 第 17 回日本小児がん学会 (東京), 2001 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



## Ⅱ. 分担研究報告書

## 1. CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発

主任研究者 貫名 信行

理化学研究所 脳科学総合研究センター 病因遺伝子研究グループ

## 研究要旨

ポリグルタミン病の病態について伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディング、それを認識しリフォールドしようとするシャペロン、さらにそれをプロテアソーム分解系に連結する CHIP の関与に関して示した。アンフォールディングを促進する因子としてプロセッシングの存在が示唆された。さらにアミロイド形成モチーフは変異ミオグロビン分子モデルの検討によって、宿主分子の部分アンフォールドを引き起こす点においてポリグルタミンと同様の作用を宿主蛋白に持つことを示した。今後ポリグルタミン病を含みアミロイド形成疾患の治療戦略を考える上で分子の安定化が標的となると考える。

## A. 研究目的

CAG リピート病の病態においてポリグルタミン凝集体の形成が、重要な役割を果たす可能性が、疾患脳の病理やモデルマウスの病理において核内封入体が形成されること、細胞モデルにおいて凝集体形成が細胞死と関連することから示唆されている。我々は1) 細胞モデル系においてシャペロン系がこれらの凝集体形成以前の可溶性の伸長ポリグルタミン含有蛋白を認識すること、2) さらにこの細胞モデル系ではプロテアソームが伸長したポリグルタミンの発現とともに不溶性分画にシフトし、これによってプロテアソーム活性が低下し、P53などの基質の上昇が認められることを示した。さらにポリグルタミンをミオグロビンに挿入した分子モデルを用いた検討によって伸長したポリグルタミンは分子内 $\beta$ シートを形成すること、時間とともに分子間 $\beta$ シートを形成してアミロイド線維となることを示した。また伸長したポリグルタミンの宿主蛋白は部分的アンフォールディングの状態をとっているこ

とを示した。このような結果から我々は伸長したポリグルタミンはこれを含む遺伝子産物の部分的アンフォールディングを引き起こし、この変化をシャペロン系が認識し、リフォールディングを試みるが、これが十分働かない場合タンパク分解系としてプロテアソームが働くが、伸長したポリグルタミンの沈着がこの機能を阻害し、その基質の蓄積をもたらす、細胞死をもたらすという病態仮説をうち立てた。この仮説からポリグルタミンの発症予防の方針としては1) 異常ポリグルタミンの発現を抑える、2) 異常ポリグルタミン含有蛋白の分解を促進する、3) 異常ポリグルタミン含有蛋白のアンフォールディングを抑えるといった方向が考えられる。本研究ではポリグルタミン含有蛋白のシャペロン系とプロテアソーム系を連動する因子の検討を行い、宿主蛋白のプロセッシングがこれら両システムの関与を増強すること、また両システムを連結する分子としてCHIPが存在することを示した。

一方我々の分子モデルの有効性をさらに

確認するため他のアミロイド形成モチーフを挿入したミオグロビンを作成し、その構造解析を行い、部分アンフォールディングがアミロイド形成モチーフによって引き起こされることを示した。

## B. 研究方法

### シャペロン系とプロテアソーム系を連結する因子の検討

Machado-Joseph 病遺伝子産物 ataxin-3 完全長またはアミノ端を truncate した部分蛋白を EGFP と融合し、この蛋白を Neuro2a に発現し、GFP 抗体によって免疫沈降した。これによって沈降する分画のプロットを HSP70,40,ubiquitin 抗体によって検討した。さらに伸長したポリグルタミン特異抗体 1C2 との反応性を検討した。

また CHIP およびその活性部位である U-box を削除した蛋白を変異ハンチンチン発現系及び上記の ataxin-3 発現系に発現し、これによるハンチンチン及び ataxin-3 のユビキチン化についてユビキチン抗体によるイムノプロットによって検討した。

### アミロイドモチーフのよるホスト蛋白への影響

凝集性アミノ酸配列の性質を詳しく検討するために、安定性および水溶性が極めて高いマッコウクジラミオグロビンに着目し、その C-D コーナーに種々の凝集性アミノ酸配列を挿入したキメラミオグロビンを設計した。挿入した凝集性アミノ酸配列はヒトプリオン(OPR)、Sup35p (R5)、 $\alpha$ -シヌクレイン(NAC)、50 グルタミンリピート(Q50)由来の 40-60 アミノ酸からなる凝集体形成に関わると考えられる配列である。そこでこれらキメラミオグロビンの構造および性質を分光学的、生化学的手法により検討した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた実験系であり、倫理面での問題は生じないと考える。

## C. 研究結果

### シャペロン系とプロテアソーム系を連結する因子の検討

ataxin-3 完全長の免疫沈降では 130Q の完全長蛋白に HSP70,40 が弱く結合しているのに対し、部分蛋白では 130Q,80Q においても HSP70,40 の結合が認められた。ユビキチン化についても同様の傾向が認められ、部分蛋白では 130Q,80Q にユビキチン化の増強が認められた。一方 1C2 の免疫反応性を GFP 抗体による反応性によって正規化したところ、完全長の 130Q と同等の反応性が truncate 蛋白の 80Q において認められた。

CHIP の発現による変異ハンチンチン、および ataxin-3 のユビキチン化の検討では CHIP の発現によってユビキチン化が増強し、U-box を除いた CHIP の発現ではユビキチン化は減少した。

### アミロイドモチーフのよるホスト蛋白への影響

各種キメラミオグロビンが大腸菌中で発現させ精製したところ、野生型(WT)とはほぼ同じ可視・紫外吸収スペクトル、常磁性 NMR スペクトルを示した。この結果は、適切にフォールディングされたキメラミオグロビンが単離できたことを意味する。キメラミオグロビンは、中性条件下、37°C 放置により Q50>R5>OPR>NAC>WT の速さで凝集体を形成した。凝集体の性質を生化学的手法、電子顕微鏡などで調べたところ、R5 と Q50 変異体の凝集物は SDS に不溶性のアミロイド繊維を含むことが明らかになった。また、Q50 の繊維は R5 の繊維よりも長く、また量も多いことから、グルタミンリピートはアミロイド繊維形成能がより高いことが判明した。一方、OPR 変異体の凝集物はより細かいアミロイド繊維を含み、NAC 変異体の凝集物には繊維構造は見られなかった。次に、これらキメラミオグロビンの安定性を尿素変性実験により検討した。その結果、R5、Q50 変異体の安定性は他の変異体に比べて大きく不安定



化し、またこれら蛋白質の慣性半径も予想値以上に増加していることがX線小角散乱の実験から明らかになった。

#### D. 考察

シャペロン系とプロテアソーム系は分子を truncation することにより反応性が増強する点で連動している。すなわち異常伸長ポリグルタミンによって引き起こされる分子の構造異常は truncation によって増強してシャペロン系によって認識され、その認識がユビキチン化と連動していることが示唆された。このことと対応するように CHIP がユビキチン化に関与していることが示された。CHIP は最近 HSP によって認識される異常タンパクをユビキチン化する E3 として注目されている。我々の結果は異常ポリグルタミンに対する細胞の反応はシャペロン系とプロテアソーム系と完全に独立したものではなく、シャペロン系によって異常を認識され、ユビキチン化され処理機構へ運ばれることを示唆している。このような機構を増強することがポリグルタミン病における発症予防に有効であるかどうかについてはプロテアソーム活性の異常が細胞死を引き起こしている可能性もあり、今後の検討を要する。一方 1C2 の反応性が truncation によって増強するという点は 1C2 がポリグルタミン鎖を認識していると考えられ、興味深い。1C2 はおそらくポリグルタミン鎖による  $\beta$  シートを認識し、その turn 部分の構造が反応性に関与していると想定される。ポリグルタミン鎖の伸長とともにより 1C2 との反応性を増すような構造変化が分子の truncation によっても増強するということは完全長の安定した構造がポリグルタミン鎖のとり構造に影響することを示しており、一方で変異ミオグロビンの検討からは伸長したポリグルタミン鎖が宿主蛋白の構造に影響するという相互関係が存在することを示している。我々の提唱する伸長したポリグルタミンに

よる分子のアンフォールディングが病態に重要であるという仮説はプロセッシングによって増強されることが示唆され、プロセッシングの制御も治療の標的となりうると考えられる。

アミロイドモチーフを含む変異ミオグロビンの構造解析の結果、アミロイド繊維形成能と、蛋白質の不安定化・慣性半径の増加には相関が見られた。このことは、蛋白質分子が凝集性アミノ酸配列をもつことで部分的にアンフォールドし、モルテングロビュール様の構造を経てアミロイド繊維が形成されることを示唆している。このことはポリグルタミン病以外でもアミロイド形成を示す疾患においては分子のアンフォールディングを経た凝集過程が病態に関与している可能性を示唆しており、今後本症と他疾患の治療戦略を考える上でも重要である。

#### E. 結論

ポリグルタミン病の病態について伸長したポリグルタミンによる分子のアンフォールディング、それを認識しリフォールドしようとするシャペロン、さらにそれをプロテアソーム分解系に連結する CHIP の関与に関して示した。アンフォールディングを促進する因子としてプロセッシングの存在が示唆された。今後治療戦略を考える上で分子の安定化が標的となると考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Sawada, M., and Nukina, N.:  $\alpha$ -synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J. Neurochem.* 77:239-252, 2001.

Jana, N-R., Zemskov, E-A, Wang, G-H., and Nukina, N.: Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* 10:1049-1059, 2001.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., and Nukina, N.:  $\alpha$ -synuclein affects the MAP kinase pathway and accelerates cell death. *J. Biol. Chem.* 276:45320-45329, 2001.

Tanaka, M., Morishima, I., Akagi, T., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Intra- and intermolecular  $\beta$ -pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases. *J. Biol. Chem.* 276:45470-45475, 2001.

## 2. 学会発表

Nukina, N.: Toward gene expression analysis of human brain: a lesson from mouse brain study. Genes and Minds Initiative Workshop on Ape Genomics (Tokyo, Japan), Mar. 2001.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., and Nukina, N.: Alpha-synuclein affects MAP kinase pathway and accelerate cell death. The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (Kyoto, Japan), Apr. 2001.

Kotliarov, Y-V., Kotliarova, S-E., and Nukina, N.: Multiple comparison analysis program: further analysis of

GeneChip data. The American of Human Genetics 51th Annual Meeting (San Diego, USA), Oct. 2001.

Kotliarova, S-E., Uchikawa, C., Kotliarov, Y-V., Kamide, Y., Oyama, F., and Nukina, N.: Transcriptome analysis in two transgenic mouse models for Huntington's disease. The American of Human Genetics 51th Annual Meeting (San Diego, USA), Oct. 2001.

Oyama, F., Kotliarova, S-E., Harada, A., Ito, M., Ueyama, Y., Hirokawa, N., and Nukina, N., Ihara, Y. Gene expression alterations in tau-deficient mice. The American of Human Genetics 51th Annual Meeting (San Diego, USA), Oct. 2001.

Shinbo, I., Jana, N-R., Zemskov, E-A., Wang, G-H, and Nukina, N.: Altered proteasomal function in Huntington disease cellular model. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting (San Diego, USA), Nov. 2001.

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., and Nukina, N.: Generation of  $\alpha$ -synuclein expressing mice in oligodendrocytes. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting (San Diego, USA), Nov. 2001.

Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., and Nukina, N.: Purifying aggregates of GFP-fused polyglutamine-containing protein by cell sorter to analyze the aggregate-interacting proteins. Society

for Neuroscience 31th Annual Meeting  
(San Diego, USA), Nov. 2001.

Nukina, N.: Cellular response to  
misfolded polyglutamine proteins.  
China-Japan-Korea Joint Workshop on  
Neurobiology and Neuroinformatics  
(NBNI-2001) (Hangzhou, Korea), Nov.  
2001.

Nukina, N.: Proteasomal degradation:  
Impaired breakdown of poly-Q-  
expanded polypeptides?. Frontiers in  
Neurodegeneration: Huntington's  
disease (Reisensburg, Germany), Jan.  
2002.

岩田 淳, 丸山美枝子, 金澤一郎, 貫名信  
行:  $\alpha$ シヌクレインは MAPkinase 系の低  
下を生じ、細胞死を誘発する. 第 42 回日  
本神経学会総会 (東京), 2001 年 5 月

王 光輝, 澤井紀子, 金澤一郎, 貫名信行:  
ataxin-3 は酵母 RAD23 ホモログの  
HHR23 に結合する. 第 42 回日本神経学  
会総会 P2-M-3 (東京), 2001 年 5 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

II. 分担研究報告書  
1. 貫名 信行