

700400208 B

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発
(H15-長寿-018)

平成15年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 祖父江 元
(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総合研究報告書

Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発	1
祖父江 元	

II. 総合分担研究報告書

Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発	8
道勇 学	

Dorfinによる老年期神経変性疾患の治療法の開発	13
田中啓二	

III. 研究成果の刊行に関する一覧	19
--------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	27
-----------------	----

Dorfin による老年期神経変性疾患の治療法の開発

主任研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病(PD)、アルツハイマー病(AD)は、運動・認知機能の進行性の低下をきたす老年期神経変性疾患の代表的な疾患であり、原因究明と治療法開発が急務である。これらの疾患ではいずれも中枢神経の病変部位にユビキチン化した異常蛋白質が蓄積していることが病理学的特徴である。ユビキチン-プロテアソーム系による異常蛋白質の選択的分解は、神経細胞の機能を正常に保つための「蛋白質品質管理」において主要な役割を果たしている。われわれが同定した新規ユビキチンリガーゼ(E3) Dorfin は、幅広い老年期神経変性疾患のユビキチン化封入体に局在していることが判明し、Dorfin の高発現あるいは活性増強は老年期神経変性疾患の重要な治療戦略となりうる。われわれは Dorfin を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製することで ALS モデルマウスである変異 SOD1-Tg マウスの治療を試み、生存期間・罹病期間の延長することができた。さらに、Dorfin の治療効果を増強するため、Dorfin の活性を制御する分子のハイスループットプロテオミクス解析による同定、および 遺伝子工学的手法を用いた安定して高発現し E3 活性を増強した Dorfin 改変人工 E3 の開発を行った。また、ユビキチンに発現している Dorfin が老年期神経変性疾患において病変選択的に異常蛋白質を認識し排除しうる可能性を明らかにした。Dorfin を用いたユビキチン-プロテアソーム系の増強による老年期神経変性疾患の治療戦略は有望であり、今後臨床応用に向け、病変部位への効果的なデリバリー法の開発等さらなる検討を重ねてゆく必要がある。

分担研究者

道勇 学 名古屋大学大学院神経内科学助教授
田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所副所長

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病(PD)、アルツハイマー病(AD)はいずれも、中高年期以降に運動機能や認知機能の進行性の低下をきたす老年期神経変性疾患の代表的な疾患であり、患者自身の多大な苦痛のみならず、介護の必要性が大きく家族・社会への負担が重い原因究明と治療法の開発が急務となっている。

神経細胞内には「蛋白質品質管理」機構が存在し、その中心をユビキチン-プロテアソーム系が担っている。神経細胞内において遺伝子変異や酸化ストレス等の環境要因により障害を受けた蛋白質はユビキチン化されプロテアソームにより分解除去されているが、異常となった蛋白質が十分分解されず神経細胞内に蓄積す

ると凝集体を形成し、カスパーゼカスケードを活性化するなどして神経細胞は変性し死滅する。ALS における変異 SOD1、PD における α -synuclein、synphilin-1、AD における β -amyloid、tau など、いずれも中枢神経系の病変部位特異的に凝集し蓄積していることが知られており、老年期変性疾患は蛋白質品質管理機構が破綻して神経細胞に対し毒性を有する異常蛋白質が蓄積して神経細胞障害を引き起こされる「蛋白質蓄積病」であると考えられることができる。

本研究期間において、われわれがヒトより同定した新規ユビキチンリガーゼ(E3) Dorfin が、ALS のみならず、PD・びまん性レビー小体病(DLB)、多系統萎縮症(MSA)、AD などの幅広い老年期神経変性疾患において蓄積している蛋白質凝集体に局在していることを見出し、Dorfin のユビキチン化基質として、変異 SOD1 の他に新たに PD に関連する synphilin-1 を同定した。

異常蛋白質を特異的に認識すると考えられる Dorfin を高発現することは、「蛋白質蓄積病」である ALS、PD、AD などの老年期神経変性疾患の治療法開発の上で

非常に有望な戦略であると思われる。本研究期間において、われわれは Dorfin トランスジェニック(Tg)マウスを開発し、老年期神経変性疾患モデルマウスの治療を試み有効性を確認した。さらに、Dorfin による治療効果を増強するために、ハイスループットプロテオミクス解析を用いた Dorfin の活性制御に重要な分子の同定や、遺伝子工学的手法を用いて、安定して高発現し E3 活性を増強した Dorfin 改変蛋白質の開発などの多面的なアプローチを行った。

B. 研究方法

1) 抗 Dorfin 抗体を用いた老年期神経変性疾患の神経病理学的解析

病理学的に ALS、PD・DLB、MSA、AD と診断された症例の剖検中枢神経病理組織標本を抗 Dorfin 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 α -synuclein 抗体、抗 tau 抗体などを用いて免疫組織化学および western blot 等を用いて検討した。抗 Dorfin 抗体(Dorfin-30)は、Dorfin のアミノ酸 678-690 に対応するペプチド抗原をウサギに免疫しアフィニティー精製することにより作製した。

2) α -synucleinopathy 培養細胞モデルの構築

COS7・HEK293 細胞や神経系細胞株である Neuro2a 細胞などの培養細胞へ、 α -synuclein や synphilin-1 の発現ベクターを導入することにより α -synucleinopathy 培養細胞モデルを構築し、細胞質内凝集体形成や細胞障害の程度を定性的・定量的に解析した。また Dorfin を同時に導入することにより、 α -synuclein や synphilin-1 のユビキチン化の変化等を解析した。

3) Dorfin の in vivo における異常蛋白質認識様態の解析

変異 SOD1 が中枢神経系に進行性に蓄積し進行性の運動障害を伴う G93A 変異 SOD1-Tg マウス [B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur] (The Jackson Laboratory)を用い、病期を発症前(5 週齢)、発症時(10 週齢)、早期(14 週齢)、末期(20 週齢)に分類した。各病期のマウスおよび non-Tg マウスについて免疫組織化学的検討および生化学的解析を行った。

G93A 変異 SOD1-Tg マウス、non-Tg マウスの中枢神経組織および一般臓器を TBS buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS)でホモゲナイズした後遠心して核分画を除去した上清を用い、抗

Dorfin 抗体により免疫沈降を行い抗 SOD1 抗体で western blot 解析を行った。

4) Dorfin-Tg マウスの作出と老年期神経変性疾患治療の試み

pCAGGS ベクターを用いて chicken β -actin プロモータ調節下に全身で全長 Dorfin を発現するコンストラクトを作製した。コンストラクト DNA を BDF1 マウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg マウスを作出した。導入遺伝子の確認は、マウス tail ゲノムのサザンブロットにより行い、導入遺伝子の発現を RT-PCR および western blot、免疫組織化学により行った。

変異 SOD1-Tg マウス雄と Dorfin-Tg マウス雌を交配することで変異 SOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作出して Dorfin の治療効果を Rotarod (Colombus Instruments) や cage activity monitor (AB system, Neuroscience Inc.)を用いた運動・行動学的解析や病理学的、生化学的解析を行い検討した。

5) Dorfin 結合蛋白質の大規模ハイスループットプロテオミクス解析

HEK293 細胞に FLAG-tagged Dorfin をトランスフェクションして FLAG-tagged Dorfin に会合してくる細胞内蛋白質を FLAG ペプチドで溶出した。精製した蛋白質を直接 Lysylendopeptidase で消化した後、MS/MS プロテオミクス time-of flight hybrid mass spectrometer (Q-ToF Ultima, Micromass)で解析した。得られたペプチドのアミノ酸配列をヒトゲノム情報と照合し、Dorfin に結合する蛋白質を同定した。Dorfin の E3 活性は、Dorfin と変異 SOD1 (対照として野生型 SOD1)を HEK293 細胞にトランスフェクション(基質と酵素の両者を共発現)してから、SOD1 抗体で免疫沈降後、抗 SOD1 抗体および抗ユビキチン抗体で western blot する方法で測定した。

6) Dorfin 改変人工 E3 の開発

Dorfin の基質結合部位である疎水性ドメインを含む領域を、神経系で高発現しており神経変性疾患との関連も報告されている carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein (CHIP)のユビキチン化活性を有する U-box 領域と結合した多数のコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトを HEK293 細胞にトランスフェクションし、発現量および変異 SOD1 に対する in vivo ユビキチン化活性を測定した。

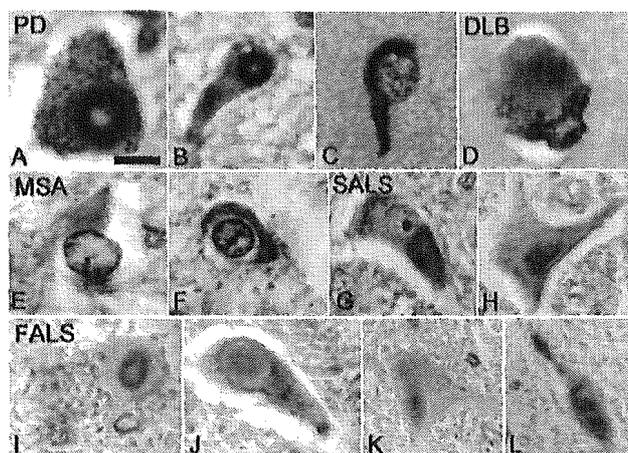
(倫理面への配慮)

本研究は事前に各々の分担研究者の所属機関の倫理委員会より承認を得ており、剖検組織および RNA・ゲノム DNA の収集にあたっては、本研究の目的や方法などについて口頭および文書により十分な説明を行った後、文書により同意を得て行った。また実験動物の扱いには各々の分担研究者の所属大学動物実験施設の指針に従い、実験動物に苦痛を与えないよう配慮した。

C. 研究結果

1) Dorfin は、ユビキチン化した封入体である ALS の運動ニューロン内ユビキチン化封入体、PD・DLB のレビー小体、MSA のグリア細胞内封入体、AD の神経原線維変化にユビキチンと共局在していた(図 1)。PD・DLB、MSA においては α -synuclein が不溶化して中枢神経組織内に蓄積しているが、不溶性となった高分子蛋白質複合体を検出する filter-trap アッセイや組織より抽出した蛋白質を界面活性剤への可溶性により分画することにより、Dorfin はこれらの老年期神経変性疾患において不溶性蛋白質複体内に存在し、老年期神経変性疾患のユビキチン化蛋白質凝集体の形成と密接に関わることが判明した。

図 1 ユビキチン陽性封入体への Dorfin の局在(抗 Dorfin 染色)(A) PD 黒質、(B) PD Edinger-Westphal 核、(C) PD グリア細胞内封入体、(D) DLB 側頭葉皮質型 Lewy 小体、(E, F) MSA 被殻 GCI、(G, H) 孤発性 ALS 脊髄運動ニューロン内封入体、(I, J) 家族性 ALS 脊髄運動ニューロン内 Lewy 小体様封入体、(K, L) 家族性 ALS skein-like inclusion



2) 培養細胞に PD・DLB のレビー小体の構成要素であることが知られている α -synuclein、synphilin-1 を導入することにより α -synucleinopathy 培養細胞モデルを構築した。この実験系では、 α -synuclein に比較して synphilin-1 は容易に細胞質内に凝集体を形成した。synphilin-1 は単独で凝集体形成能と細胞毒性を有し、synphilin-1 内部のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成能と細胞毒性を有していることが明らかとなった。Dorfin は α -synuclein とは結合せず、synphilin-1 の中央領域が Dorfin のユビキチン化基質となっていることが判明した(図 2)。さらに、新たな PD モデル動物の開発のために、pCAGGS ベクターを用い chicken β -actin プロモータ調節下に脳・脊髄を含む全身で神経毒性を有する synphilin-1 中央領域を高発現する Tg マウスの作出を行っている。

3) G93A 変異 SOD1-Tg マウスにおいて、抗 SOD1 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 Dorfin 抗体陽性の凝集体形成は一般臓器には見られず、中枢神経組織のみに存在した。中枢神経組織における凝集体形成を詳細に検討してみると、大脳、小脳、脳幹の順に凝集体形成が増加し、脊髄において最も著明であった。Dorfin は in vitro では野生型 SOD1 には結合せず変異 SOD1 のみと結合するが、SOD1-Tg マウスの各組織における Dorfin と変異 SOD1 の結合の程度を免疫沈降法で検討した(図 3A)。Dorfin は肝臓では変異 SOD1 とは結合せず、病変の存在する中枢神経組織の変異 SOD1 を特異的に認識していた。さらに中枢神経組織の中で Dorfin の認識する変異 SOD1 の量は、病変の程度とよく相関しており、最も病変の強い脊髄において Dorfin は変異 SOD1 と最も強く結合した。中枢神経組織においては SDS 抵抗性の SOD1 ダイマーが病変の強いところほど多く出現し、Dorfin と変異 SOD1 の結合の程度と SOD1 オリゴマー形成量はよく相関していた(図 3B)。

図 2 Dorfin は synphilin-1 の中央領域をユビキチン化する

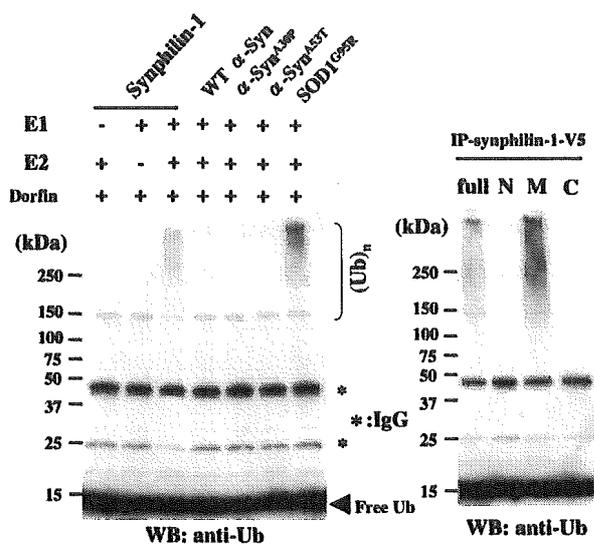
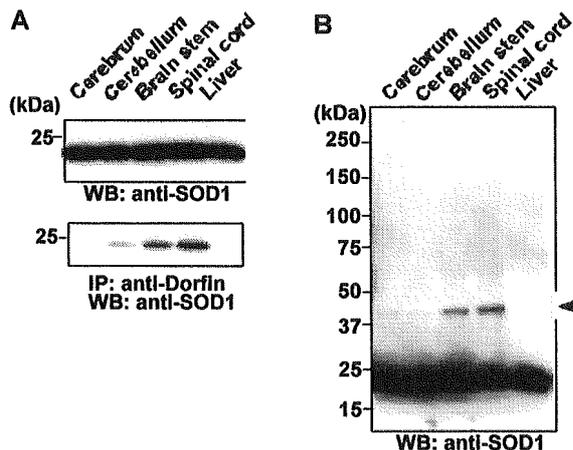


図3 中枢神経組織(大脳、小脳、脳幹、脊髄)、一般臓器(肝臓)におけるDorfinと変異SOD1の結合

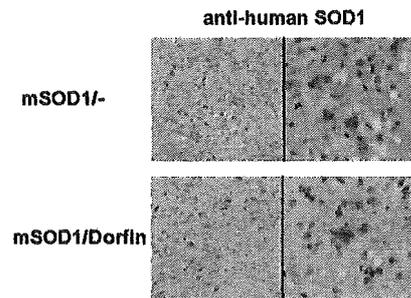


4) Dorfin-Tgマウスが5系統得られ、そのうち比較的高コピー数のDorfinが導入されたTgマウスが2系統得られた。サザンブロットにより高コピー数のDorfin-Tgマウスでは、約20コピーのDorfin遺伝子が導入されていた。Dorfin-Tgマウスの各臓器より抽出したRNAを用いたRT-PCRでは、Dorfin導入遺伝子はTgマウスの全身で発現しており、脳および脊髄において比較的高い発現が見られた。Dorfin遺伝子の導入のみでは、生後1年以上経過を観察した限りにおいては運動機能や病理組織所見などには明らかな異常を認めず、non-Tgとの相違は見られなかった。

ALS症状の発症時期は、変異SOD1-Tg(mSOD1/-)では生後109.0日、ダブルTgマウス(mSOD1/Dorfin)

では109.4日と差は認められなかった。生存期間については、変異SOD1-Tg(mSOD1/-)は生後131.5日、ダブルTgマウス(mSOD1/Dorfin)では、153.0日と有意差が認められ、Dorfinの導入は変異SOD1-Tgマウスの罹病期間および生存期間を延長した。変異SOD1-Tgマウス脊髄前角組織においては、運動ニューロンおよび周囲のニューロピルにSOD1およびユビキチンの蓄積が観察され、その蓄積はALS症状の進行とともに増加する。Dorfinは変異SOD1を特異的に認識してユビキチン化し、プロテアソームによりその分解を促進するE3活性を有することから、実際にin vivoにおいても変異SOD1量が減少しているかどうかを免疫組織化学的に検討した。ダブルTgマウスでは変異SOD1-Tgマウスに比較して、SOD1およびユビキチン蓄積の軽減が観察された(図4)

図4 Tgマウス脊髄前角におけるSOD1蓄積の比較(抗ヒト特異的SOD1抗体)

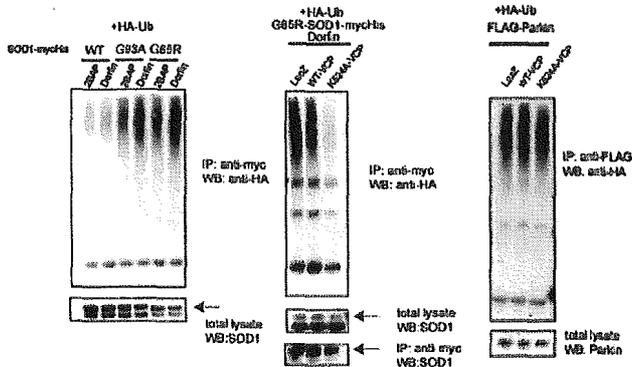


5) ハイスルーブットのMS/MSプロテオミクス法によりDorfinと選択的に結合する分子として、多機能性の分子シャペロン型ATPase complexであるVCP(別名:Cdc48 or p97)を同定した。マウス脳抽出液のグリセリン密度勾配遠心法による解析から、Dorfinは400-600kDaのかなり重い分画に沈降した。一方、対照として使用したParkinは、比較的軽い低分子量の分画に沈降した。Dorfinが沈降してくる分画にはVCPも沈降してくるから、DorfinとVCPはマウス脳においても生理学的な状態でも会合している可能性が示唆された。この物理的な相互作用は、DorfinとVCPを共トランスフェクションしてからの免疫沈降法でも直接的に確認された。さらにドメイン解析からDorfinのC末端側領域と結合することが判明した。DorfinのC末端側領域には基質結合部位が存在するが、この領域における両者の機

能的な関連性は今のところ不明である。

変異 SOD1 を基質とした Dorfin の E3 活性の測定から、VCP が Dorfin の機能 (E3 活性) 維持に必須であることを見出した。実際に機能的に不活性型として知られている VCP^{K524A} (VCP の ATPase 活性を喪失した変異体) を強制発現させると、ドミナントネガティブ的に Dorfin の E3 活性をほぼ完全に抑制した (図 5)。この結果、VCP は Dorfin の E3 活性を正に活性化する因子であることが判明した。

図 5 VCP/p97 のドミナントネガティブ型は Dorfin の変異 SOD1 に対するユビキチン化能を阻害する



6) Dorfin 蛋白質は半減期が短いために脳および脊髄において発現量が低く、強制発現させた場合にも同様に高レベルの発現が得られにくい。老年期神経変性疾患の治療応用におけるこの Dorfin の欠点を克服するために、Dorfin を改変した人工 E3 のコンストラクトを多数作製し、HEK293 細胞にこれらのコンストラクトを導入し発現量を確認したところ、N 末端側に CHIP の U-Box を持ち C 末端側に Dorfin の基質結合部位を持つ融合蛋白質で、野生型 Dorfin に比べてはるかに高いレベルの蛋白質発現が得られ、発現も安定して継続できた。さらに、HEK293 細胞に種々の Dorfin 改変コンストラクトと変異 SOD1 を共発現し、in vivo ユビキチン化アッセイを行い、野生型 Dorfin による変異 SOD1 のユビキチン化と比較したが、N 末端側に CHIP の U-Box を持ち C 末端側に Dorfin の基質結合部位を持ついくつかの人工蛋白質で、野生型 Dorfin に比較して変異 SOD1 ユビキチン化の増強が認められた。

D. 考察

Dorfin はわれわれが ALS において同定した新規 E3 であり、蛋白質品質管理能を持つ。本研究期間において、Dorfin がユビキチン化された封入体である ALS の脊髄運動ニューロン内ユビキチン化封入体、PD・DLB のレビー小体、MSA のグリア細胞内封入体、AD の神経原線維変化などに局在しており、幅広い老年期神経変性疾患のユビキチン化蛋白質凝集体形成に密接に関連することを明らかにした。PD・DLB・MSA はいずれも α -synuclein および synphilin-1 が中枢神経系内に蓄積しており、 α -synucleinopathy と総称されるが、培養細胞モデルによる本研究の結果から synphilin-1 が凝集体形成能と細胞毒性を持ち、synphilin-1 のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成と細胞毒性発揮に重要な役割を有していることが判明した。Dorfin は synphilin-1 の中央領域に結合し、これをユビキチン化することで神経細胞保護的に働くと考えられた。

老年期神経変性疾患の神経細胞変性は、異常蛋白質がオリゴマーや protofibril を形成して蓄積することによる神経細胞の機能障害が原因であると推定されている。ALS モデル動物である G93A 変異 SOD1-Tg マウスでは中枢神経のみならず一般臓器でも広く変異 SOD1 が発現しているが、変異 SOD1 高分子複合体は病変の生じない部位では観察されず神経障害と関連性が深いと考えられる。本研究期間の検討から、Dorfin は病変の存在する中枢神経組織の変異 SOD1 のみを特異的に認識することが明らかになった。病変の存在する中枢神経組織では変異 SOD1 を misfold させやすい状態 (病変特異的に SOD1 を misfold させる因子の存在が推定される) が存在し、misfold した変異 SOD1 のみを Dorfin は特異的に認識していると考えられる。Dorfin は病変の存在する組織の異常蛋白質のみ認識するため、Dorfin は老年期神経変性疾患の病変選択性や毒性獲得の機序解明に有用なツールとなりうると考えられた。

Dorfin-Tg マウスを開発し、ALS の動物モデルである変異 SOD1-Tg マウスと交配することで ALS 治療を試み、一定の治療効果をあげることができた。Dorfin は ALS と同様に、PD や AD においても異常蛋白質のユビキチン化を通して神経細胞内の蛋白質品質管理を行うことにより神経細胞の生存に重要な役割を果たして

いることが示唆され、Dorfin によりユビキチン-プロテアソーム系の活性を増強する老年期神経変性疾患の治療戦略は有望であると思われる。Dorfin の外来性発現によりALSモデルマウスの生存期間および罹病期間を延長させたが、その生存期間・罹病期間の延長効果はまだ十分とは言えず、今後さらに治療効果を増強することが必要である。

本研究では、VCP が Dorfin と会合して大きな複合体を形成していることをはじめて明らかにすると共にその活性を正に制御していることを突き止めた。これまでに VCP はプロテアソームと相互作用し、ユビキチン化された蛋白質をプロテアソームに提示して分解に供する作用のあることが知られているほか、ERAD 機構において ER 内の異常蛋白質を ATP 依存的に引き抜くことなどが示唆されている。VCP は神経変性疾患と密接に関係しているとの知見が集積しつつあり、これらのことを併せて考えると、VCP が Dorfin と会合してその活性を正に制御していることは、老年期神経変性疾患の発症機構の解明と治療法開発の上で重要な分子標的となりうることを示唆している。

Dorfin による老年期神経変性疾患治療法を開発する上での問題点の一つに、中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く、結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまうことがあげられる。本研究において、Dorfin の老年期神経変性疾患の原因となりうる異常蛋白質の特異的認識部位を残し、他の部分を安定に発現しユビキチン化活性の強い別の E3 のユビキチン化活性部位に置き換えることにより作製した人工 E3 により、Dorfin の基質特異性を残しつつユビキチン化活性増強に成功した。本研究により開発した人工 E3 を臨床応用に近づけるべく、今後人工 E3 の生体内での安全性の検討やアデノ随伴ウイルス等を用いた運動ニューロンへの効果的なデリバリー方法の開発が必要である。

E. 結論

Dorfin は老年期神経変性疾患において、病変部位特異的に異常蛋白質を認識する活性を有していることが判明し、病態機序解明および治療法開発の双方に今後ますます重要な役割を担うと考えられた。Dorfin による老年期神経変性疾患の治療効果を高めるため

に、Dorfin の活性を制御し治療の標的分子となりうる VCP を同定し、さらに発現の安定性と E3 活性を高めた Dorfin 改変人工 E3 を開発した。今後臨床応用に向け、病変部位への効果的なデリバリー法の開発等さらなる検討を重ね、一刻も早く老年期神経変性疾患の有効な治療法の開発を行ってゆきたい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

(1) Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2005) Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 57:236-51.

(2) Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2004) Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128:659-70.

(3) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. (2004) Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 275:124-42.

(4) Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G. (2004) Physical and functional interaction between Dorfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J Biol Chem*. 279:51376-85.

(5) Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. (2004) Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Mol Med*. 82:298-307.

(6) Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G. (2004) Sodium Butyrate Ameliorates Phenotypic Expression in a Transgenic Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet*.

13:1183-92.

(7) Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2004) Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **89**:64-72.

(8) Katsuno, M, Sobue, G. (2004) Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* **41**: 677-679.

(9) Katsuno, M, Adachi, H, Sobue, G. (2004) Sweet relief for Huntington disease. *Nat. Med.* **10**:123-124.

(10) Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* **163**: 609-19.

(11) Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem.* **278**: 29106-14.

(12) Katsuno, M, Adachi, H, Doyu, M, Minamiyama, M, Sang, C, Kobayashi, Y, Inukai, A, Sobue, G. (2003) Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Med.* **9**: 768-773.

(13) Adachi, H, Katsuno, M, Minamiyama, M, Sang, C, Pagoulatos, G, Angelidis, C, Kusakabe, M, Yoshiki, A, Kobayashi, Y, Doyu, M, Sobue, G. (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J. Neurosci.* **23**: 2203-2211.

(14) Katsuno, M, Adachi, H, Inukai, A, Sobue, G. (2003) Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Cytogenet. Genome Res.* **100**: 243-251.

(15) Sobue, G, Adachi, H, Katsuno, M. (2003) Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). In Neurodegeneration: The Molecular Pathology of

Dementia and Movement Disorders. Dickson Dickinson ed. INS Neuropath Press, LA, USA, pp275-279.

(16) Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. (2003) Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord - A study using laser microdissection and real-time RT-PCR. *Neurochem Res.* **28**: 839-46.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Dorfin による老年期神経変性疾患の治療法の開発

分担研究者 道勇 学 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学助教授

研究要旨 われわれが同定した新規ユビキチンリガーゼ (E3) Dorfin は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病 (PD)、アルツハイマー病 (AD) など幅広い老年期神経変性疾患のユビキチン化蛋白質凝集体の形成に密接に関わっていることを見出し、Dorfin の基質として PD に深く関わる synphilin-1 を新たに同定した。Dorfin トランスジェニック (Tg) マウスを開発して、ALS モデル動物である変異 SOD1-Tg マウスと交配することにより治療効果を確認し、Dorfin を用いたユビキチン-プロテアソーム系を増強する老年期神経変性疾患治療戦略の有効性を確認した。Dorfin の外来性発現による生存期間・罹病期間の延長効果はまだ十分とは言えず、今後さらに治療効果を上げる必要がある。中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまう欠点を補うために、Dorfin 蛋白質を遺伝子工学的手法を用いて改変し、高発現でユビキチンリガーゼ活性を増強した人工ユビキチンリガーゼ (E3) の開発を試みた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病 (PD)、アルツハイマー病 (AD) はいずれも中高年期以降に運動機能や認知機能の進行性の低下をきたす老年期神経変性疾患の代表的な疾患である。患者自身の苦痛が大きいのみならず、介護等のため家族・社会への負担が重く原因究明と治療法の開発が急務である。

神経細胞内には「蛋白質品質管理機構」が存在し、異常蛋白質はユビキチン化されプロテアソームにより分解除去されている。ALS における変異 SOD1、PD における α -synuclein、synphilin-1、AD における β -amyloid、tau、cystatin C など、いずれも病変部位において凝集し蓄積していることが知られており、老年期神経変性疾患においては蛋白質品質管理機構が破綻して神経細胞に対し毒性を有する異常蛋白質が蓄積するため神経障害が引き起こされていると考えることができる。従って、老年期神経変性疾患において蓄積している毒性タンパク質をユビキチン-プロテアソーム系の働きを増強して除去することが、治療法開発において今後の重要な方向

の一つである。

われわれがヒトより同定した Dorfin はユビキチンリガーゼ (E3) であり、孤発性および家族性 ALS 脊髄運動ニューロンに出現するユビキチン化封入体に局在し、家族性 ALS の原因となる変異 SOD1 を特異的にユビキチン化して分解を促進する活性を有していることをこれまでに報告してきた。本研究期間において Dorfin が、ALS のみならず、PD・びまん性レビー小体病 (DLB)、多系統萎縮症 (MSA)、AD などの幅広い老年期神経変性疾患において蓄積している蛋白質凝集体にユビキチンとともに局在していることを見出し、Dorfin のユビキチン化基質として、変異 SOD1 の他に新たに PD に関連する synphilin-1 を同定した。

Dorfin を老年期神経変性疾患の治療に応用するために、Dorfin トランスジェニック (Tg) マウスを開発し、本研究において、老年期神経変性疾患の一つである ALS の動物モデルである変異 SOD1-Tg マウスと交配することにより ALS 治療を試みた。Dorfin の外来性発現により ALS モデルマウスの生存期間および罹病期間を延長させえたが、その生存期間・罹

病期間の延長効果はまだ十分とは言えず、今後さらに治療効果を増強することが必要である。

Dorfin による老年期神経変性疾患治療法を開発する上での問題点の一つに、中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く、結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまうことがあげられる。そこで、本研究では Dorfin 蛋白質を遺伝子工学的手法を用いて改変し、高発現と E3 活性を増強した人工 E3 の開発を行った。また、Dorfin の基質であり、神経細胞障害性を有することをわれわれが明らかにした synphilin-1 の中央領域や分泌シグナルを欠損した cystatin C を高発現する Tg マウスを作製することにより新たな老年期神経変性疾患の動物モデルを作出することを試みた。

B. 研究方法

1) 抗 Dorfin 抗体を用いた老年期神経変性疾患の神経病理学的解析

PD 中脳、DLB 側頭葉皮質、MSA 被殻・中脳、ALS 脊髄組織を 20% 中性ホルマリン固定し、パラフィン包埋を行った。Dorfin 抗体は、Dorfin のアミノ酸 396-413 およびアミノ酸 678-690 に対応するペプチド抗原をウサギに免疫し、アフィニティー精製することにより作製し ABC 法により免疫染色を行った。ユビキチン陽性封入体中の Dorfin 陽性封入体の割合は、連続切片を作成し Dorfin およびユビキチンに対する抗体で各々の切片を染色し、封入体の数をカウントし比較することで行った。抗 Dorfin 免疫染色を同様に行った切片を 1% オスミウム固定した後、エポキシ樹脂に包埋し超薄切片を作成し、電子顕微鏡でも観察を行った。

2) α -synucleinopathy 培養細胞モデルの構築

α -synuclein あるいは synphilin-1 を CMV プロモータ制御下に発現するベクターを構築した。 α -synuclein については、野生型のほか、A30P、A53T の変異を site-directed mutagenesis により導入したコンストラクトも作製した。COS7・HEK293 細胞や Neuro2a 細胞へ各発現ベクターを導入することにより α -synucleinopathy 培養細胞モデルを構築した。細胞質内凝集体形成や細胞障害の程度を定性的・定量的に解析し、Dorfin 発現ベクターを共導入するこ

とにより α -synuclein や synphilin-1 のユビキチン化に変化が見られるかどうかについて in vitro および in vivo で検討した。

3) 遺伝子改変動物の作製と Dorfin による治療

β -actin プロモータ調節下に全身で全長 Dorfin を発現するコンストラクトを作製し、BDF1 マウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg マウスを作製した。導入遺伝子の確認は tail ゲノムのサザンプロットにより行い、導入遺伝子の発現の確認を RT-PCR、western blot、免疫組織化学により行った。各週齢ごとに Tg マウスの臨床症状、体重、行動・運動能力 (Rotarod, cage activity) を測定した。

4) Dorfin 結合蛋白質の同定

脳 cDNA ライブラリーを用いて Dorfin を bait とする酵母 Two-Hybrid 法により Dorfin 結合蛋白質を検索した。同定された Dorfin 結合蛋白質を発現するベクターを作製し、Dorfin および Dorfin 結合蛋白質を培養細胞に発現させ免疫沈降法などを用いた解析を行った。

5) Dorfin 改変人工 E3 の開発

Dorfin は、N 末端側に RING-finger/IBR ドメイン (アミノ酸残基 132-332)、C 末端側に変異 SOD1 や synphilin-1 などの基質結合部位である疎水性ドメイン (アミノ酸残基 365-454) を有する構造を持つ。Dorfin の基質結合部位である疎水性ドメインを含む部分を、神経系で高発現しており神経変性疾患との関連も報告されている carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein (CHIP) のユビキチン化活性を有する U-box 部分と融合した多数のコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトを HEK293 培養細胞に強制発現させ、発現量および共導入した変異 SOD1 に対する in vivo ユビキチン化活性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は事前に各々の分担研究者の所属機関の倫理委員会より承認を得ており、剖検組織および RNA・ゲノム DNA の収集にあたっては、本研究の目的や方法などについて口頭および文書により十分な説明を行った後文書により同意を得、個人情報の保護に注意しつつ行った。また実験動物の扱いには

各々の分担研究者の所属研究施設の動物実験施設の指針に従い、苦痛を与えず行うよう配慮した。

C. 研究結果

1) Dorfin は幅広い老年期神経変性疾患ユビキチン化封入体に局在する

PD・DLBにおいてはLewy小体が抗Dorfin抗体により染色された。抗Dorfin抗体によりLewy小体の周辺部が主に染色され、Lewy小体の前駆体と考えられているpale body、Lewy neurite、グリア細胞内封入体なども染色された。PDのユビキチン陽性レビー小体の約92%がDorfin陽性であり、DLBにおいてはユビキチン陽性の皮質型レビー小体の約85%がDorfin陽性であった。MSAにおいてはオリゴデンドログリア内のユビキチン陽性のグリア細胞内封入体(GCI)の約93%がDorfin陽性であった。免疫電顕によりDorfin陽性の封入体を観察すると、PDのLewy小体では封入体周辺部の放射状に配列した線維構造がDorfin陽性であり、中心部はDorfin陰性であった。MSAのGCIにおいては、線維状あるいは顆粒状の構造物がDorfin陽性であった。それに対し家族性ALSのLewy小体様封入体では、中心部の線維状構造物にDorfin陽性反応が見られた。不溶性となった高分子蛋白質複合体を検出するfilter-trapアッセイや組織より抽出した蛋白質を界面活性剤への可溶性により分画することにより、Dorfinはこれらの老年期神経変性疾患において不溶性蛋白質複体内に存在しており、Dorfinがユビキチン化封入体の形成に密接に関わることが明らかとなった。

2) Dorfin は synphilin-1 の中央領域をユビキチン化する

培養細胞に α -synucleinやsynphilin-1の発現ベクターを導入することにより α -synucleinopathy培養細胞モデルを構築した。この実験系では α -synucleinに比較してsynphilin-1は容易に細胞質内に凝集体を形成した。synphilin-1全長を発現させた場合、細胞核近傍にいわゆるaggresome様の大きな封入体を形成したのに対し、synphilin-1内部のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP結合部位を含む

中央領域のみを発現させると細胞質内に散在する微小な凝集体を形成した。synphilin-1の凝集体形成には α -synucleinを必要とせず、synphilin-1単独で凝集体を形成した。synphilin-1の中央領域のみが細胞毒性を有していたが、全長synphilin-1による凝集体がユビキチン化されているのに対し、synphilin-1中央領域による微小凝集体はユビキチン化されておらず、ユビキチン化が封入体形成と細胞保護に重要であることが明らかとなった。Dorfinは α -synucleinとは結合せず、synphilin-1の中央領域と結合しユビキチン化した。Dorfinはsynphilin-1による細胞毒性をE3活性によりユビキチン化することで軽減していると考えられた。

3) Dorfin-Tg マウスの作製と老年期神経変性疾患治療の試み

Dorfin-Tgマウスが5系統得られ、そのうち比較的高コピー数のDorfinが導入されたTgマウスが2系統得られた。サザンプロットにより高コピー数のDorfin-Tgマウスでは、約20コピーのDorfin遺伝子が導入されていた。Dorfin-Tgマウスの各臓器より抽出したRNAを用いたRT-PCRでは、Dorfin導入遺伝子はTgマウスの全身で発現し、脳および脊髄において比較的高い発現が得られた。Dorfinの導入のみでは、奇形・発育障害や運動機能異常を認めなかった。

Dorfin-Tgマウス雌とALSモデルマウスである変異SOD1(mSOD1)-Tgマウス雄を交配し、変異SOD1/DorfinダブルTgマウスを作製した。Dorfin-Tgマウスと交配することによりALS症状の発症時期は変異SOD1-Tg(mSOD1/-)では生後109.0日、ダブルTgマウス(mSOD1/Dorfin)では109.4日と差は認められなかったが、生存期間については変異SOD1-Tg(mSOD1/-)は生後131.5日、ダブルTgマウス(mSOD1/Dorfin)では153.0日と有意差が認められ、Dorfinの高発現は変異SOD1-Tgマウスの罹病期間および生存期間を延長した。変異SOD1-Tgマウス脊髄前角組織においては、運動ニューロンおよび周囲のニューロピルにSOD1およびユビキチンの蓄積が観察され、その蓄積はALS症状の進行とともに増加することが知られている。Dorfinが変異SOD1を特異的に認識しユビキチン化して分解を促進する

E3 活性を有することから、実際に *in vivo* においても変異 SOD1 量が減少しているかどうかを免疫組織化学的に検討した。ダブル Tg マウスでは変異 SOD1-Tg マウスに比較して、SOD1 およびユビキチン蓄積の軽減が観察された。

4) Dorfin は MAP1B と相互作用する

酵母 Two-Hybrid 法により、ユビキチン結合酵素 (E2) を始めとして複数の Dorfin 結合蛋白質をヒト脳 cDNA ライブラリーより同定した。この中には微小管結合蛋白質 MAP1B が含まれていた。Dorfin は RING-finger/IBR 領域のある N 末端側で MAP1B の C 末端側と結合し、PD のレビー小体や AD の神経原線維変化に Dorfin と共局在していることが判明し、MAP1B が Dorfin とともにユビキチン化凝集体形成に積極的に関与している可能性が示唆された。

5) Dorfin を改変した人工 E3 蛋白質の開発

Dorfin は、半減期が短いために脳および脊髄において発現量が低く、強制発現させた場合にも同様に高レベルの発現が得られにくい。本研究では、老年期神経変性疾患の治療応用におけるこの Dorfin の欠点を克服するために、Dorfin を改変した人工 E3 のコンストラクトを多数作製した。HEK293 培養細胞にこれらのコンストラクトを導入し発現量を確認したところ、N 末端側に CHIP の U-Box 領域と C 末端側に Dorfin の基質結合部位を融合した蛋白質で元の Dorfin 全長に比べてはるかに高いレベルの発現が得られた。さらに、HEK293 に種々の Dorfin 改変蛋白質と変異 SOD1 を共導入し、変異 SOD1 の *in vivo* ユビキチン化を Dorfin によるユビキチン化と比較して検討した。N 末端側に CHIP の U-Box と C 末端側に Dorfin の基質結合部位を融合したいくつかの人工蛋白質で、Dorfin に比較して変異 SOD1 ユビキチン化の増強が認められた。N 末端側に CHIP の U-Box を有し、C 末端側に Dorfin の基質結合部位を持つ人工 E3 は安定して高発現し、ユビキチン化活性も元の Dorfin に比較して高いため、老年期神経変性疾患の治療応用に非常に有望であると考えられた。

D. 考察

Dorfin はわれわれが ALS において同定した新規 E3 であり、蛋白質品質管理能を持つ。本研究期間に

において、Dorfin がユビキチン化された封入体である ALS の脊髄運動ニューロン内ユビキチン化封入体、PD・DLB のレビー小体、MSA のグリア細胞内封入体、AD の神経原線維変化などに局在しており、幅広い老年期神経変性疾患のユビキチン化蛋白質凝集体形成に密接に関連することが明らかになった。PD・DLB・MSA はいずれも α -synuclein および synphilin-1 が中枢神経系内に蓄積しており、 α -synucleinopathy と総称されるが、培養細胞モデルによる本研究の結果から synphilin-1 が凝集体形成能と細胞毒性を持ち、synphilin-1 のアンキリン様リピート、コイルドコイルドメイン、ATP・GTP 結合部位を含む中央領域が凝集体形成と細胞毒性発揮に重要な役割を有していることが判明した。Dorfin は synphilin-1 の中央領域に結合し、これをユビキチン化することで神経細胞保護的に働くと考えられた。

Dorfin-Tg マウスを開発し、ALS の動物モデルである変異 SOD1-Tg マウスと交配することで ALS 治療を試み、一定の治療効果をあげることができた。Dorfin は ALS と同様に、PD や AD においても異常蛋白質のユビキチン化を通して神経細胞内の蛋白質品質管理を行うことにより神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示唆され、Dorfin によりユビキチン-プロテアソーム系の活性を増強する老年期神経変性疾患の治療戦略は有望であると思われる。Dorfin の外来性発現により ALS モデルマウスの生存期間および罹病期間を延長させえたが、その生存期間・罹病期間の延長効果はまだ十分とは言えず、今後さらに治療効果を増強することが必要である。

Dorfin による老年期神経変性疾患治療法を開発する上での問題点の一つに、中枢神経系内での Dorfin のターンオーバーが速く、結果として Dorfin の発現量が低く抑えられてしまうことがあげられる。本研究において、Dorfin の老年期神経変性疾患の原因となりうる異常蛋白質の特異的認識部位を残し、他の部分を安定に発現しユビキチン化活性の強い別の E3 のユビキチン化活性部位に置き換えることにより作製した人工 E3 により、Dorfin の基質特異性を残しつつユビキチン化活性増強に成功し

た。本研究により開発した人工 E3 を臨床応用に近づけるべく、今後人工 E3 の生体内での安全性の検討やアデノ随伴ウイルス等を用いた運動ニューロンへの効果的なデリバリー方法の開発が必要である。

E. 結論

Dorfin は老年期神経変性疾患において、病変部位特異的に異常蛋白質を認識する活性を有していることが判明し、病態機序解明および治療法開発の双方に今後ますます重要な役割を担いうると考えられた。Dorfin による老年期神経変性疾患の治療効果を高めるために、発現の安定性と E3 活性を高めた Dorfin 改変人工 E3 を開発した。今後臨床応用に向け、病変部位への効果的なデリバリー法の開発等さらなる検討を重ね、一刻も早く老年期神経変性疾患の有効な治療法の開発を行ってゆきたい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2005) Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 57:236-51.

2. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2004) Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128:659-70.

3. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G. (2004) Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 13:1183-92

4. Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2004) Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 89:64-72.

5. Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G. (2003) Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med.* 9:768-73.

6. Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 163: 609-19.

7. Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem.* 278: 29106-14.

8. Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. (2003) Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord: a study using laser microdissection and real-time RT-PCR. *Neurochem Res.* 28: 839-46.

9. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G. (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci.* 23:2203-11.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Dorfin による老年期神経変性疾患の治療法の開発

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・副所長

研究要旨 ユビキチン・プロテアソームシステムによる損傷タンパク質の選択的分解は、タンパク質の品質管理において、主要な役割を果たしている。とくに Dorfin (double ring-finger protein) と Parkin (常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症 autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP の原因遺伝子産物) は、共に共通の触媒ドメイン RING-IBR-RING を有するユビキチンリガーゼ（分解マーカであるユビキチンを標的タンパク質に連結する酵素）である。これらは、ニューロンにおいて高発現しており、神経細胞におけるタンパク質の品質管理に重要な役割を演じていると考えられている。本研究期間においてわれわれは、これら2種の品質管理リガーゼ Dorfin と Parkin の活性制御メカニズムを検討した結果、それぞれに特有な活性調節分子が存在することを見出した。Dorfin と Parkin は、ニューロンのような非分裂細胞においてタンパク質の恒常性を監視・維持するために重要な役割を担っている酵素である。これらの酵素の活性を制御する新しい仕組みの解明は、老年期に多発する神経変性疾患の発症機構解明に大きく貢献することが期待される。

A. 研究目的

細胞内のタンパク質は、遺伝子変異や環境汚染などによって不断にストレスを受け、傷害を受ける確立は非常に高いと考えられている。そして細胞内に生じた異常タンパク質が時間経過に応じて蓄積すると、大きな凝集体（封入体）を形成する。この状態が長期間持続すると、細胞はアポトーシスをおこし死滅する。この事態は、非分裂細胞であるニューロンにおいては、致命的であり、この危機的状況を回避するために、細胞には、異常なタンパク質を分解排除してタンパク質の品質を管理しようとする機構が存在する。ユビキチンとプロテアソームによるタンパク質分解装置はその中心的な役割を担っている。とりわけ Dorfin (1) や Parkin (2) などのユビキチンリガーゼは、品質管理リガーゼに該当する酵素であり、異常タンパク質の処理機構において大きな役割を果たしている。

実際、Dorfin は家族性 ALS (amyotrophic lateral sclerosis 筋萎縮性側索硬化症) の責任遺伝子である疾患型変異 SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) を特異的にユビキチン化する (3)。

また Parkin は家族性パーキンソン病 AR-JP の責任遺伝子産物であり、Parkin のユビキチンリガーゼとしての機能喪失は、ドーパミンニューロン死、引いてはドーパミンニューロンの変性を引き起こし、最終的に若年性のパーキンソン病を発症することになる (4, 5)。Dorfin と Parkin はニューロンに高発現している構造的に類似したユビキチンリガーゼであり、これらの活性制御機構を解明することは、細胞内のタンパク質の品質管理機構を理解する要となる。本研究を通して老年期に多発する神経変性疾患の発症機構解明とその進行を防御し治療できる薬剤の開発を目指す。

B. 研究方法

[研究1] Dorfin の研究：Dorfin に結合する分子群を探索するために HEK293 細胞に FLAG-tagged Dorfin をトランスフェクションして FLAG-tagged Dorfin に会合してくる細胞内タンパク質を FLAG ペプチドで溶出した。このようにして精製されたタンパク質を直接 Lysylendopeptidase で消化した後、MS/MS プロ

テオミクス : time-of-flight hybrid mass spectrometer (Q-ToF *Ultima*, Micromass, Manchester, UK) で解析した (6)。得られたペプチドのアミノ酸配列をヒトゲノム情報と照合し、Dorfin に結合するタンパク質を同定した。

Dorfin のリガーゼ活性は、Dorfin と ALS 疾患変異型 SOD1 (対照として野生型 SOD) を HEK293 細胞にトランスフェクション (基質と酵素の両者を共発現) してから、SOD1 抗体で免疫沈降後、SOD1 抗体およびユビキチン抗体で Western blot する方法で測定した (3)。

免疫沈降実験、Western blotting 分析、免疫細胞染色は、定法に従って行った。

[研究 2] Parkin の研究 : マウス脳抽出液を抗ヒト Parkin 抗体で免疫沈降し、Parkin に結合する分子群を Dorfin の場合と同様に high throughput の MS/MS プロテオミクス法で解析した (6)。同定したタンパク質については、それらの cDNA をクローニングしてから動物細胞の発現ベクターに組み込み、細胞にトランスフェクションして個別に相互作用を検討すると共に共発現させた Parkin のユビキチンリガーゼ活性に対する影響を調べた。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主として培養細胞およびマウス組織を用いたインビトロの実験系で行ったので、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

[研究 1] Dorfin の活性調節機構.

(実験 A : Dorfin と VCP の物理的相互作用解析)
High through-put の MS/MS プロテオミクス法により Dorfin と選択的に結合する分子として、多機能性の分子シャペロン型 ATPase complex であ

る VCP (別名 : Cdc48 or p97) を同定した。マウス脳抽出液のグリセリン密度勾配遠心法による解析から、Dorfin は 400-600 kDa のかなり重い (大きな分子量の) 分画に沈降した。一方、対照として使用した Parkin は、比較的軽い低分子量の分画に沈降した。Dorfin が沈降してくる画分には、VCP も沈降してくるから Dorfin と VCP は、マウス脳においても生理学的な状態でも会合している可能性が示唆された。この物理的な相互作用は、Dorfin と VCP を共トランスフェクションしてからの Immuno-precipitation/Western blotting 法でも直接的に確認された。さらにドメイン解析から Dorfin の C-端側領域と結合することが判明した (Dorfin の N-端側領域には触媒部位である RING-IBR-RING 配列がある)。Dorfin の C-端側領域には、基質結合部位が存在するが、この領域における両者の機能的な関連性については、不明である (7)。

(実験 B : VCP の Dorfin リガーゼ活性に対する効果) ALS 疾患変異型 SOD1 を基質とした Dorfin のユビキチンリガーゼ活性の測定から、VCP が Dorfin の機能 (リガーゼ活性) 維持に必須であることを見出した。実際、機能的に不活性型として知られている VCP^{K524A} (VCP の ATPase 活性を喪失した変異体) を強制発現させると、ドミナントネガティブ的に Dorfin のリガーゼ活性をほぼ完全に抑制した。この結果、VCP は Dorfin のユビキチンリガーゼ活性を正に活性化する因子であることが判明した (7)。

(実験 C : ERAD パスウェイへの関与の検討)
VCP は ERAD (小胞体関連分解 : 小胞体内のミスフォールドタンパク質や余剰サブユニットを細胞質へ逆行輸送しユビキチン・プロテアソーム系により分解する品質管理機構) に関与することが知られているので、既知の ERAD 基質 (余剰に生合成される T 細胞リセプター TCR α サブ

ニット)の分解を指標に検定した。その結果、野生型 *Dorfin* を強制発現させると、ERAD 経路による TCR α サブユニットの分解が有意に抑制された。この効果は、不活性型 *Dorfin* (触媒部位である N-末端側の RING 配列を欠失させた変異体)では、みられなかった。この抑制は、対照として使用した糖鎖識別ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbx1} の(複合体形成に必須な F-box 領域を欠損させた)ドミナントネガティブ変異体(基質結合ドメインは保持)を発現させた場合の阻害と同程度であった。この観察は、予想外の結果であり、現在、この野生型(WT) *Dorfin* による ERAD 抑制機構とその生物学的意義について検討中である。

(実験 D:免疫細胞化学染色)これまでの研究から、*Dorfin* は ALS やパーキンソン病の患者の病変部位に観察されている封入体に存在することが、知られている(8, 9)が、HEK293 細胞にプロテアソーム阻害剤を処理することによって形成させた Aggresome を *Dorfin* 抗体と VCP 抗体で共染色すると、両者が共局在することが判明した。このことは、生体内で両分子が相互作用している可能性を示唆していると共に、*Dorfin* と VCP が多くの神経変性疾患で観察されている封入体形成に関与している可能性を示唆している成果として注目される。

【研究 2】パーキンの活性調節機構

われわれは常染色体劣性若年性パーキンソン症候群(AR-JP)の責任遺伝子(PARK2)産物パーキンがユビキチンリガーゼであることを明らかにした(2)。その後、われわれはパーキンの活性調節機構に関する研究を進めてきた。その結果、パーキンのユビキチンリガーゼ活性を負に制御する新しいタンパク質分子として 14-3-3 η (脳に豊富に存在する多機能性のシャペロン様

分子で Lewy Body の構成因子の一つ)の同定に成功した(論文投稿中)。実際マウス脳ライゼートを用いた免疫沈降実験の解析から、パーキンが 14-3-3 η と物理的に結合していることを明らかにした。パーキンは N 端側に UBL ドメイン、C 端側に RING1-IBR-RING2 ドメイン(RING-Box: E3 としての触媒領域)、そして両ドメインを連結するリンカー領域から構成されている。14-3-3 η は、主にパーキンのリンカー領域と結合することを見出した。興味深いことに、AR-JP 患者由来のミスセンス変異を持つパーキン^{K161N}(リンカー領域に変異)は 14-3-3 η との結合能を完全に失っていた。そして 14-3-3 η が結合すると、パーキンの自己ユビキチン化活性および Synphilin-1 (パーキンの既知基質)を標的としたポリユビキチン化活性は完全に抑制された。この結果、14-3-3 η はパーキンの活性阻害因子であることが判明した。

さらに 14-3-3 η と高親和性を有して結合しパーキンの活性阻害を解除する因子として α シヌクレイン(常染色体優性の家族性パーキンソン病の責任遺伝子 *PARK1* の翻訳産物で Lewy Body の主要構成因子)の同定にも成功した。そしてパーキンソン病患者由来の変異 α シヌクレイン^{A30P}あるいは α シヌクレイン^{A53T}は、この 14-3-3 η によるパーキンの阻害抑圧活性を完全に喪失していた(論文投稿中)。今回、このようにパーキンのユビキチンリガーゼ活性が 14-3-3 η と α シヌクレインによる正負の活性調節因子で巧妙に制御されていることを見出した。パーキンと 14-3-3 η は *in vitro* 及び *in vivo* で直接結合するが、14-3-3 η と α シヌクレインの結合は *in vivo* では観察されるもののリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* での結合実験では検出できないことから、われわれはこの相互作用には α シヌクレインの修飾が必要であると考えて

いる。いずれにしても 14-3-3ηは二つのパーキンソン病の責任遺伝子産物パーキンとαシヌクレインを連結させるユニークな調節因子と考えることができる。現在、この調節機構の破綻によってパーキンソン病が発症する可能性について検討中である

D. 考察

ユビキチンリガーゼ Dofin や Parkin に活性調節機構が存在することの発見は、これらの酵素の生理的意義を考察する視点から非常に重要であると考えられる。また、本研究から、Dofin や Parkin などのユビキチンリガーゼが封入体の形成に関与している可能性が示唆されたことは、封入体形成の分子機構解明の手掛かりを得たことになると思われる。今後も、Dofin や Parkin から神経変性疾患の発症機構解明を進めていく。

E. 結論

タンパク質の正常と異常を区別して構造的に破綻した異常タンパク質を処理する「細胞内の品質管理」機構に関する基礎的研究を行った。本研究において、「1」ALS の発症に寄与すると考えられている Dofin については、Dofin の活性発現に必須な役割を担っている VCP の同定に成功した。「2」また、パーキンソン病発症の主要な因子と考えられている Parkin と物理的に会合する因子の同定から、Parkin のユビキチンリガーゼ活性を正負に調節する分子（14-3-3 及びαシヌクレイン）の同定に成功した。今後、これらの研究を基盤に細胞内の品質管理を監視・維持する機構の研究から神経変性疾患の共通の発症機構の解明に迫ることを目指す。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Niwa, J., Ishigaki, S., Doyu, M., Kato, K., Suzuki, T., Tanaka, K., and Sobue, G. (2001) A novel human RING-finger/IBR family protein, Dofin, resides in centrosome and mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 706-713.
- (2) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genet.* 25, 302-305.
- (3) Niwa, J., Ishigaki, S., Hishikawa, N., Yamamoto, M., Doyu, M., Murata, S., Tanaka, K., Taniguchi, N., Sobue, G. (2002) Dofin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 36793-36798.
- (4) Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Kato, K. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the ubiquitin-like domain. *EMBO Rep.* 2003; 4: 301-306
- (5) Tanaka, K., Suzuki, T., Hattori, H., and Mizuno, Y. (2004) Ubiquitin, Proteasome and Parkin. *Biochim. Biophys. Acta MCR Special Issue 'The Ubiquitin-Proteasome System'* *Biochim Biophys Acta.* 1695, 235-247.
- (6) Natsume, T., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Shinkawa, T., Yanagida, M., Takahashi, N. and Sobue, T. (2002) A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal Chem*, 74, 4725-4733
- (7) Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G. (2004) Physical and functional interaction between Dofin and VCP that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.*, 279, 51376-51385.
- (8) Ito, T., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Doyu, M., and Sobue, G. (2003) Dofin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem* 278, 29106-29114
- (9) Hishikawa, N., Niwa, J., Doyu, M., Ito, T., Ishigaki, S., Hashizume, Y., and Sobue, G. (2003) Dofin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 163, 609-619

2. 学会発表

Keiji Tanaka: The ubiquitin-proteasome pathway and the protein quality control of the cell. 日米科学技術協力事業「組み換え DNA」2003.2.18-22 NIH (USA)

Keiji Tanaka: Ubiquitin E3 ligases responsible for the protein quality control in cells. 2003. 4.25-5.1, Clermont-Ferrand (France)

Keiji Tanaka : The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on “Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases” , 2004.5.16-21, Jerusalem (Israel)

Keiji Tanaka : Ubiquitin-Proteasome System Normal Function and Outcome of its Dysfunction in Neurodegeneration. 12th International Winter Conference on Neurodegeneration. 2004.11.29-12.2, Kyoto

Keiji Tanaka : Cellular apparatus responsible for the protein quality control in cells. The 27th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2004.12.8-11, Kobe

Yoshida, Y., Mizushima, T., and Tanaka, K. : Recognition of glycosylated substrates by SCF^{Fbs} ubiquitin ligases. Keystone Symposia Meeting entitled “Ubiquitin and Signaling” Feb 22 - Feb 27, 2005 Taos, USA

Keiji Tanaka and Yoshida, Y. : Structure, function, and assembly of mammalian proteasomes. 2005 4.25-4.29 Clermont-Ferrand (France)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

研究成果の刊行物に関する一覧表