

2004-00752A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発
(H15-こころ-020)

平成16年度 総括・分担研究報告書

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. 総括研究報告書

- 運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発…………… 1
祖父江 元

II. 分担研究報告書

1. 運動ニューロン疾患治療に向けた標的分子の同定
-Dorfin 結合蛋白質の探索から……………8
道勇 学
2. 運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発……………11
犬飼 晃
3. 運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発……………14
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……………25

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

総括研究報告書

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

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

成人発症の運動ニューロン疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)および球脊髄性筋萎縮症(SBMA)について、運動ニューロン変性を惹起する分子病態を解明し、それに基づく治療開発を行った。その結果、病態と治療に関する以下の知見を得た。

1) ALS について

我々は、ALSの病態にユビキチンリガーゼである Dorfin が深く関与していることを明らかにしてきた。今回、運動ニューロン内ユビキチン化封入体に局在する Dorfin の結合蛋白質の探索のため、高感度マス(MS/MS)スペクトロメーターを駆使した大規模なハイスループット・プロテオミクス解析を行い複数の候補タンパク質を得た。そのうち VCP/p97 は培養細胞内で Dorfin と共局在し、in vitro および in vivo にて Dorfin と結合していた。マウス組織及び複数の培養細胞内で Dorfin は 400kD-600kD の複合体を形成しており、VCP/p97 と複合体を形成していることが示唆された。VCP/p97 のドミナントネガティブ変異体は Dorfin のユビキチンリガーゼ(E3)活性を阻害し、Dorfin の E3 活性制御に VCP/p97 が重要であることが判明した。

2) SBMA について

我々はこれまで、動物モデルを用いて変異アンドロゲン受容体(AR)がテストステロン依存性に核内へ蓄積することが SBMA 病態の中心であることを明らかにしてきた。今回、SBMA 患者の剖検組織において、抗ポリグルタミン抗体を用いた詳細な免疫組織化学的検索を行った。本症の原因タンパクである変異 AR は主として核内にびまん性に分布し、従来病理学的特徴とされてきた核内封入体よりもはるかに高頻度かつ広範囲に観察された。脊髄運動ニューロンの変異 AR の核内びまん性集積は AR 遺伝子の CAG リピート数と相関しており、変異タンパクの核内びまん性集積が病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。SBMA 患者を対象とした LHRH アナログのオープン試験では、陰囊皮膚における変異 AR タンパクの核内集積が治療により著明に阻害され、病態の中心に治療介入し得たことが示された。

3) 運動ニューロン変性とユビキチンシステム

ニューロン死に密接に関係することが示唆されている、小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation)、についてそのメカニズムの解明を行った。ERAD は小胞体で発生した異常タンパク質をサイトソルに逆輸送してユビキチン・プロテアソーム系で処理する機構であるが、われわれは小胞体で合成されるタンパク質の大部分を占める N-結合型糖タンパク質の糖鎖を識別してユビキチン化するユニークなユビキチンリガーゼ SCF^{Fba} ファミリーを世界に先駆けて発見し、その包括的な研究を推進してきた。本年は、この新規リガーゼの構造生物学的研究とその作用機構の解明から分子識別に関する新知見を得ることに成功した。現在、運動ニューロン疾患との関連性を探るために発生工学的研究を遂行中である。

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

犬飼 晃:名古屋大学医学部附属病院 神経内科学講師

田中啓二:東京都医学研究機構東京都臨床医学研究所 副所長

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)および球脊髄性筋萎縮症(SBMA)における運動ニューロン変性には、異常タンパク質の蓄積とタンパク質品質管理機構の破綻という共通した病態が関与していることが示唆されている。ALSおよびSBMAの神経変性の病態における分子機構を明らかにし、病態に基づく治療開発を行った。

Dorfin は、われわれが発見した新規ユビキチンリガーゼ(E3)で、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン内に認められるユビキチン化封入体にALSが孤発性か家族性かを問わず局在しており、その基質の一つは家族性ALSの原因である変異SOD1であることをこれまでに報告している。SOD1に関してDorfinは、野生型とは反応せず変異型のみを認識してこれをユビキチン化することから、Dorfinは運動ニューロン内において異常タンパク質のみを分別しユビキチン化分解を行う「タンパク質品質管理」装置として機能していると言える。孤発性ALSの原因はこれまで明らかとはなっていないが、変異SOD1による家族性ALSとのアナロジーから、孤発性ALSにおいても運動ニューロン障害性の毒性タンパク質が脊髄において蓄積しており、Dorfinはその異常タンパク質を認識しユビキチン化を行っていると考えられる。従って、Dorfinのユビキチンリガーゼ活性を増強することができれば、孤発性ALSの治療に有用であると思われる。実際に前年度の研究において、Dorfinを高発現させることにより変異SOD1トランスジェニックマウスの治療に有望な結果が得られており、Dorfinの活性を制御する分子は孤発性ALSの治療において重要な分子標的となりうる。そこで本研究においては、Dorfinと相互作用しそのE3活性に影響する分子を探索した。われわれはDorfin結合タンパク質を高感度に効率良く同定するために、高感度マス(MS/MS)スペクトロメーターを駆使した大規模なハイスループット・プロテオミクス解析手法を用いた。

SBMAは、CAGリピートの異常延長を病因とす

る遺伝性神経変性疾患であり、ハンチントン病や脊髄小脳失調症とならぶポリグルタミン病である。本疾患の原因遺伝子はアンドロゲン受容体(AR)であり、成人男性に発症する四肢の筋萎縮、筋力低下、球麻痺を主症状とする緩徐進行性の下位運動ニューロン疾患である。他のポリグルタミン病と同様、病理学的には病変部のニューロンの脱落および残存する神経細胞の核内に変異タンパクの集積を認め、病態への関与が示唆されて来た。我々の作成したSBMAのトランスジェニックマウスモデルでも、神経細胞の核内に変異タンパクの集積を認め、その程度は症状に強く相関し、雌よりも症状の重篤な雄マウスにおいて顕著にみられた。さらに、去勢やLHRHアナログ投与による血清テストステロン濃度低下にともない変異タンパクの核内集積が抑制されるとともに、症状の劇的な改善が認められた。すなわち、変異ARタンパクの核内集積が病態の中心であることが動物モデルにおいて示唆されてきた。今回SBMA剖検組織を用い、本症の原因タンパクである変異ARの存在様式を病理学的に検討し、その病態形成への関与につき解析した。また、抗アンドロゲン療法の有効性と安全性の検討のため、SBMA患者を対象とした臨床試験を施行した。

運動ニューロン疾患を含む様々な神経変性疾患の発症機構として、細胞内のタンパク質の品質管理(立体構造の正常と異常を区別して、損傷タンパク質を選択的に除去する機構)の破綻が示唆されているが、その分子メカニズムは不明である。ごく最近、ニューロンが細胞内のストレスを感知するときのセンサーとして働く小胞体(ER: endoplasmic reticulum)の役割が注目されている。とくに小胞体内で発生した異常タンパク質を処理する機構として小胞体関連分解(ERAD: ER associated degradation)の機構解明が飛躍的に進展している。われわれは、ERADに関与するニューロン特異的なユビキチンリガーゼSCF^{Fba1}を発見した。そして、SCF^{Fba1}について構造、機能、病態に関する多面的な研究を展開してきた。本研究では、SCF^{Fba1}の病態生理学的研究を通して運動ニューロン疾患の発症機構解明を目指す。

B. 研究方法

Dorfin結合タンパク質の探索:HEK293細胞にFLAGタグで標識したDorfinを強制発現させ、抗FLAG抗体でコーティングしたビーズに結合したタンパク質をマススペクトロメーターにより解析した。DorfinとVCPp97の結合の解析にあたっては、

Dorfin の N 末に MBP タグをつけた融合タンパクを大腸菌を用いて作製し、また C 末に His タグを付加した VCP/p97 をバキュロウィルスシステムを用いて作製した。両者を用いて *in vitro* の binding assay を行った。マウスの全脳よりタンパクを抽出し、超遠心による glycerol gradient fractionation により分画し、Western blotting により Dorfin と VCP/p97 の存在する画分を確認した後に両者が存在する fraction を用いて Dorfin と VCP/p97 の結合の有無を抗 Dorfin 抗体を用いた免疫沈降法によって検討した。HEK293 細胞に GFP-Dorfin と VCP-myc タンパクを同時に発現させ、蛍光顕微鏡下に両者の細胞内局在を観察した。

SBMA 剖検組織の病理学的検討: 遺伝子検査で診断が確定した SBMA 患者 11 名の剖検組織を用い、抗ポリグルタミン抗体 (1C2) などによる免疫組織化学および免疫電子顕微鏡による観察を行った。

SBMA に対する LHRH アナログの臨床試験: 名古屋大学医学部付属病院 IRB の承認を得たプロトコルに基づき、インフォームドコンセントの得られた 5 人の SBMA 患者に対し、Leuprorelin 3.75mg 4 週毎の皮下投与を 6 ヶ月間行った。投与に伴う患者 ADL、QOL、筋力、血清 creatine kinase (CK) 値、および陰囊皮膚生検所見の変化を観察した。

ユビキチン・プロテアソーム系の解析: 生化学的方法としては、関連分子を大腸菌あるいは昆虫細胞系で発現・精製し、得られたリコンビナントタンパク質を用いて再構成ユビキチン化システムを構築した。このインビトロのアッセイ系を用いて、ユビキチンリガーゼ活性を測定した。その他、電気泳動 (SDS-PAGE)・Western blot 分析などについては、定法に従って行った。また、構造生物学的な方法として、目的タンパク質を大腸菌で大量に発現させた後、単一標品に精製した。精製タンパク質を結晶化してその立体 (高次) 構造を X 線結晶構造解析によって原子レベルで解析した。また必要に応じて NMR (核磁気共鳴装置) を使用して相互作用するアミノ酸残基を同定した。細胞生物学的には、目的タンパク質をコードした cDNA を細胞内に導入して発現させ、この強制発現効果に対する (ユビキチン化反応を含む) 細胞応答を観察した。また標的遺伝子の siRNA を細胞内に導入して目的タンパク質の発現を抑制し loss-of-function の表現型 (細胞に与える影響) を観察した。

(倫理面への配慮)

臨床試験にあたっては、実施の目的と方法について、対象となる患者に文書による説明を行った。文

書によるインフォームド・コンセントが得られたもののみを対象とし、試験への参加が患者の自由意思に基づくものであること、参加撤回はいつでも可能であること、および不参加や参加取り下げにより患者が不利益な取扱いを受けないことも、文書に明記し、説明した。患者の個人情報特定の責任者の元番号にて取扱い、試験の結果が公表される場合であっても、患者に関わる秘密は保全するものとした。以上の対策により、試験中参加する患者の人権及び利益が保護されるよう最大限配慮した。我々は以上に示した患者の人権及び利益の保護に関するプロトコルを名古屋大学医学部 IRB に既に提出し、平成 14 年 7 月 24 日付けで承認を得た。動物実験は名古屋大学動物実験指針に基づき、動物の苦痛の緩和除去に十分配慮した。

C. 研究結果

Dorfin 結合蛋白質の探索: マススペクトロミーの解析の結果 6 つの候補蛋白質が得られた。我々はこのうち小胞体関連輸送 (ERAD) など多くの細胞機能を担っている valosin-containing protein (VCP)/p97 に注目した。大腸菌由来の精製 Dorfin とバキュロウィルスを用いて精製した VCP/p97 との結合を *in vitro* にて確認した。VCP/p97 は Dorfin の C 末を介して Dorfin に結合した。マウス脳の lysate を用いた glycerol gradient fraction analysis より内在性 Dorfin は VCP/p97 と同様に分子量約 400-600kD の複合体中に存在し、両者が共存する fraction を用いて免疫沈降法を行った結果から、内在性の Dorfin は内在性の VCP/p97 と結合していることが判明した。HEK293 細胞において Dorfin と VCP を共発現させると両者はプロテアソーム阻害剤下で核近傍の aggresome に一致した部位に共局在した。VCP/p97 の Dorfin の機能に対する影響を調べるために Dorfin が変異 SOD1 をユビキチン化する条件にドミナントネガティブ型の VCP を加えて、変異 SOD1 のユビキチン化の程度を調べたところ、コントロールに比べてユビキチン化の程度が減少することが分かった。

SBMA 剖検組織の病理学的検討: 患者は死亡時 51-84 才、発症は 20-75 才であり、死因の多くは肺炎であった。AR 遺伝子の CAG リピート数は 40-50 であった。1C2 を用いた免疫組織化学では脊髄前角細胞および後根神経節の神経細胞で核のびまん性染色が認められ、それより低い頻度で核内封入体が認められた。一部の細胞では両者の共存がみられた。大脳および小脳皮質で

は申した染色はみられなかったが、脊髄や脳幹以外にも被殻、尾状核、視床などでも一部の神経細胞で核の染色が認められ、陰囊皮膚、精巣、肝、腎でも核の染色がみられた。核への変異タンパク集積に加え、後根神経節などでは神経細胞の細胞質にも封入体が観察された。二重染色では、これら細胞質内封入体はゴルジ装置との共存が示唆されたが、小胞体やミトコンドリア、ライソソームとの共存は認められなかった。電子顕微鏡では神経細胞の核内に 1C2 陽性の顆粒状凝集体が認められた。脊髄前角細胞における核のびまん性染色の頻度は AR 遺伝子の CAR リピート数と正の相関を示したが、核内封入体の出現頻度と CAG 数との間には相関は認められなかった。

LHRH アナログの臨床試験：患者の年齢は 43-68 歳、発症からの経過年数は 4-15 年、CAG リピート数は 43-54 であった。血清 creatine kinase (CK) 値は有意に低下し、5 例中 4 例では歩行速度の改善がみられた。振戦や線維筋攣縮、転倒傾向の改善を自覚した例もみられた。また陰囊皮膚生検での変異 AR の異常蓄積は、投与前に比し著明に減少した。全ての対象患者において陰萎を認めたが、他の副作用は認めなかった

ERAD 分子機構の解明：ERAD の基本経路は、小胞体内で ERAD の基質となるタンパク質の識別、小胞体から細胞質への逆行輸送、細胞質におけるユビキチン化とプロテアソームによる分解の 3つのステップよりなる。その中で、分泌系タンパク質の多くは N-結合型糖鎖修飾を受けた糖タンパク質であるが、糖鎖が異常タンパク質の識別・ERAD へのターゲティング・分解の一連のタグとして機能していることが明確となってきた。最近われわれは、糖鎖を識別するユビキチンリガーゼとして“SCF^{Fbs1}”を発見し、この酵素が ERAD に関与していることを突き止めた。即ち、われわれは N 結合型糖タンパク質の結合する細胞内レクチンを探索する目的で、高マンノース糖鎖をもったフェチュインをリガンドとした親和性クロマトグラフィーを作製してウシ脳抽出液を解析した結果、Fbs1 (別称 Fbx2/Fbg1) の分離に成功した。Fbs1 は F-box ファミリータンパク質の一つであり、SCF 複合体 Skp1-Cullin1-F-box 蛋白質 (略記：F-box)-Roc1 型ユビキチンリガーゼの標的識別サブユニットであった。試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF^{Fbs1} 複合体が N 型糖鎖依存的に糖タンパク質をポリユビキチン化するユビキチンリガーゼであることが判明した。そして (基質結合能は保持しているが) SCF 複合体を形成し

ないドミナントネガティブ Fbs1 変異体を強制発現させたところ既知の ERAD 基質 (異常 CFTR: 濃縮性線維症の責任遺伝子産物や余剰に生合成される T 細胞リセプター-TCR α サブユニット) の分解が抑制されたことから SCF^{Fbs1} は ERAD 機構で作用していることが裏付けられた。さらに興味深いことに、Fbs1 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤で誘導される Aggresomes (ERAD 基質の分解異常による異常タンパク質の凝集体) の形成を完全にブロックした。この結果は、Fbs1 が封入体形成に関係している可能性を示唆するものとして注目される。Fbs1 の発現は成体脳、それもニューロン特異的である。ERAD はすべての細胞・臓器で普遍的に見られる現象であることから、SCF^{Fbs1} は神経細胞における品質管理に特化して進化してきたと推定される。このことは、ニューロンのような非分裂細胞では、タンパク質の品質管理機構を厳格に維持することが細胞の生存戦略として極めて重要であることを示唆している。一方、最近、Fbs には少なくとも 5 種類のアイソフォームが存在し、これらが遺伝子ファミリーを形成していることを突き止めた。そしてあらゆる組織にユビキタスに発現している Fbs2/Fbg2 が、SCF^{Fbs1} と同様に、SCF^{Fbs2} 複合体を形成、ERAD に作用するユビキチンリガーゼであることを見出した。更にわれわれは、Fbs1 単独分子及び Fbs1 とキトビオースの複合体の X 線結晶構造解析による立体構造解析に成功し、Fbs1 による糖鎖識別機構を原子レベルで解明した。SCF 型ユビキチンリガーゼは Skp1-Cullin1-F-box-Rbx1/Roc1 から構成された 4 分子複合体であり、標的識別サブユニットである F-box を変換することによって多様性を確保したユニークな蛋白質識別機構を持った酵素である。SCF の標的蛋白質は、細胞周期やシグナル伝達にかかわるものなど生体内において非常に重要な蛋白質であることから、これら標的蛋白質の識別機構を構造生物学的に明らかにする研究が進められている。SCF^{Fbs1} は N 結合型糖鎖を認識することにより小胞体関連分解 (ERAD) において標的蛋白質にユビキチンを付加する機能を持ったユニークな酵素である。Fbs1 の糖鎖結合ドメイン (SBD) の立体構造は 10 本の逆平行 β 構造が二層に重なった・サンドイッチ構造をしており、その一端に位置するループ領域により糖蛋白質では糖鎖の還元末端に位置するキトビオース (GlcNAc-1-4GlcNAc) を認識し結合している。レクチンの立体構造として・サンドイッチ構造は一般的な構造であるが、これまでに立体構造の報告されたレクチンの糖鎖認識部位は・シート領域であったのに対し SBD ではループ領

域で糖鎖と結合する新しい様式をとっていた。そして、この時見られた キトビオースとSBDの結合様式は、キトビオースの片側の GlcNAc (A)がSBDのW280の側鎖に重なって結合し、もう一方のGlcNAc(B)は水素結合とNAcのアセチル基がY177、F279、K281から形成された小さい疎水性のポケットに入るといったものであった。この分子表面の小さな疎水性ポケットはFbs1と糖蛋白質の結合において、マンノースとGlcNAcを識別する役割を果たしている。また、SBDと結合しているキトビオースは水素結合により2つのGlcNAcの向きを一定にして、これにより複合体形成時に糖蛋白質の位置を決定しユビキチンをチャージしたE2に提示していることが判明した。標的となる糖蛋白質において修飾された糖鎖の根元部分は、通常自身のペプチド部分と相互作用しているためFbs1との結合は困難であると考えられる。しかしFbs1の標的となる糖蛋白質はERADにおいて細胞質に輸送された高次構造の崩れた蛋白質であることから、根本のキトビオース部分も溶媒に露出していると考えられるためにFbs1と相互作用が可能となると推定された。このことは同じN結合型糖蛋白質でも変性させた方が、Fbs1と高い親和性を示すという実験事実とも一致しており、これらのことからFbs1が分子の先端で糖鎖と特異的に結合することは、アンフォールド状態にある糖蛋白質と不必要な相互作用することなく、ユビキチンを付加するために合理化された機構であると考えられる。またFbs1-Skp1の二量体のX線結晶構造解析にも成功、SCF^{Fbs1}全体の高次構造のモデル化にも成功した。加えてSCF^{Fbs1}がp97 ATPaseと共に小胞体膜のサイトゾル表面に存在し、p97のエネルギーを利用して小胞体内腔から引きずり出した異常糖タンパク質をユビキチン化していることを示唆した。この際上記したようにSCF^{Fbs1}やSCF^{Fbs2}複合体がハイマノース型糖鎖の根本のキトビオースを識別することで、基質タンパク質の変性状態を識別していることも見出した(4)。これらの結果からSCF^{Fbs}リガーゼファミリーが巧みな仕組みで、糖タンパク質の品質管理に関与していることが判明した。ERADを含む小胞体の品質管理はニューロン死に密接に関係していることが判明しているため、本研究は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できると思われる。

D. 考察

ALSについて:われわれはこれまでにDorfinが変異SOD1やSynphilin-1を基質とするE3でありALSやパーキンソン病などの神経変性疾患病変

部位におけるユビキチン化封入体に局在する事を報告してきた。今回われわれはDorfinがVCP/p97とin vitroおよびin vivoで結合しており、培養細胞内でaggresomeに共局在することを見出した。ALSをはじめとする様々な神経変性疾患において、DorfinとVCP/p97の機能はユビキチン化封入体を通じて密接に関係しているものと考えられる。また、内在性のDorfinが400-600kDと比較的大きな複合体を形成していることは、VCP/p97のような結合因子がDorfinの機能に必須もしくは極めて大きな役割を担っていることを示唆している。実際に我々はVCP/p97のドミナントネガティブ体によりDorfinのユビキチンリガーゼ活性が阻害されることを見出し、VCP/p97がDorfinのユビキチンリガーゼ活性に大きく寄与している事を今回明らかにした。VCP/p97はAAA+ファミリーに属するATPaseであるが膜融合や転写、細胞周期など多岐に渡る細胞機能に関与するといわれている。その中でも最近パーキンソン病やポリグルタミン病などに強い関与を示唆されているERADにおいて、小胞体の内側からポリユビキチン化された蛋白質を細胞質側に引きずり出してプロテアソームへ移送する働きを担っていると報告されている。興味深いことにVCP/p97のドミナントネガティブ体を培養神経細胞に導入するとALSなど神経変性疾患の障害を受けた神経細胞に認められるものと同様な空胞を生じることも報告されている。ERADがALSの病態とどのように関連するののかは今のところ十分明らかではないが、DorfinのE3活性を制御するVCP/p97は、ユビキチン-プロテアソーム系の機能障害が原因の一つとして注目されているALSの治療薬創成において魅力的な標的分子である。

SBMAについて:剖検組織の病理学的検索においては、伸長ポリグルタミン鎖を認識する特異抗体を用いることで、SBMAの原因タンパクである変異ARが、従来知られているより多くの臓器に分布していることが明らかとなった。その分布様式としては、核内へのびまん性が主なものであり、従来ポリグルタミン病の病理学的特徴とされてきた核内封入体よりも広い範囲で高頻度に観察された。さらに重要なことに、脊髄前角細胞における変異ARの核内びまん性集積は、その頻度がCAG数と相関しており、運動ニューロン変性の病態に直接的に関与しているものと考えられた。また、Leuprorelinによる抗アンドロゲン療法は、動物モデルのみならず患者においても変異ARの核内集積を阻害し、SBMAの病態を改善する可能性が示唆された。LeuprorelinはSBMA患者においても性機能障害以外の重篤な副作用を示さ

なかった。現在われわれは、SBMA に対する Leuprorelin のプラセボ対照二重盲検試験を施行中である。

運動ニューロン変性とユビキチンシステム:アルツハイマー病・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症(ALS)をはじめ多くの神経変性疾患での病理所見として、ユビキチン化された異常タンパク質の集積が残存ニューロン内に頻りに観察されていることから、タンパク質の品質管理機構の破綻がこれらの疾患に共通した発症原因になっている可能性が高まっている。われわれは、これらの知見を分子レベルで理解するための成果として、今回、N-結合型糖タンパク質(ERADの主な基質)に特異的に作用するユビキチンリガーゼ(SCF^{Fbs1}/SCF^{Fbs2})を見出し、分子レベルでの機能解析に成功した。今後、これらの発見を基盤にタンパク質の品質管理機構を解明して、神経変性疾患の発症機能の共通のメカニズム解明を目指す。

E. 結論

ALS の病態関連分子である Dorfin の結合蛋白質である VCP/p97 は、Dorfin のユビキチンリガーゼ活性に重要であり、運動ニューロン疾患治療のための重要な標的分子となりうる。一方、変異 AR のびまん性集積は SBMA の病態形成の鍵となるものであり、その制御が治療の重要な標的と考えられる。また、ERAD に関与する糖鎖識別ユビキチンリガーゼとしてニューロン特異的な SCF^{Fbs1} とユビキチンに発現している普遍的 SCF^{Fbs2} の発見と、キトビオース(タンパク質の Asp 残基に結合する GlcNAc-GlcNAc 糖)が結合した Fbs1 の立体構造解析(X 線結晶解析や NMR 解析)に基づく原子レベルで標的識別機構の解明は、運動ニューロンの変性機構を解明するための有益な情報を提供するものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. EMBO Rep. in press

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.

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. (2005) Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128: 659-70.

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.

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.

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.

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.

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

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

Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K.,

Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 11, 365-170.

2. 学会発表

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

Keiji Tanaka: Cellular apparatus responsible for the protein quality control in cells. The 27th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec 8-11, 2004, Kobe.

Keiji Tanaka : Ubiquitin-Proteasome System Normal Function and Outcome of its Dysfunction in Neurodegeneration. 12th International Winter Conference on Neurodegeneration. Nov 29-Dec 2, 2004, Kyoto.

Keiji Tanaka: Structure, Function, and Assembly of Proteasome Complex . The 21 COE International Symposium on "Molecular Mechanisms of Cell Proliferation and Evolution", Oct 31-Nov 2, Fukuoka.

Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Tanaka F, Doyu M, and Sobue G. Medical induction of heat shock protein alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Neuroscience 2004*, Oct 23-27, 2004, San Diego, USA.

Tanaka K. The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on "Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases", May 16-21, 2004, Jerusalem, Israel.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗ポリグルタミン病剤。2004年8月26日出願(特願2004-246980)

2. 実用新案登録

なし

運動ニューロン疾患治療に向けた標的分子の同定
-Dorfin 結合蛋白質の探索から

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 筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロン内ユビキチン化封入体に局在する Dorfin の結合蛋白質の探索のため、高感度マス(MS/MS)スペクトロメーターを駆使した大規模なハイスループット・プロテオミクス解析を行い複数の候補タンパク質を得た。そのうち VCP/p97 は培養細胞内で Dorfin と共局在し、in vitro および in vivo にて Dorfin と結合していた。マウス組織及び複数の培養細胞内で Dorfin は 400kD-600kD の複合体を形成しており、VCP/p97 と複合体を形成していることが示唆された。VCP/p97 のドミナントネガティブ変異体は Dorfin のユビキチンリガーゼ(E3)活性を阻害し、Dorfin の E3 活性制御に VCP/p97 が重要であることが判明した。

A. 研究目的

Dorfin は、われわれが発見した新規ユビキチンリガーゼ(E3)で、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン内に認められるユビキチン化封入体に ALS が孤発性か家族性かを問わず局在しており、その基質の一つは家族性 ALS の原因である変異 SOD1 であることをこれまでに報告している。SOD1 に関して Dorfin は、野生型とは反応せず変異型のみを認識してこれをユビキチン化することから、Dorfin は運動ニューロン内において異常蛋白質のみを分別しユビキチン化分解を行う「蛋白質品質管理」装置として機能していると言える。孤発性 ALS の原因はこれまで明らかとはなっていないが、変異 SOD1 による家族性 ALS とのアナロジーから、孤発性 ALS においても運動ニューロン障害性の毒性蛋白質が脊髄において蓄積しており、Dorfin はその異常蛋白質を認識しユビキチン化を行っていると考えられる。従って、Dorfin のユビキチンリガーゼ活性を増強することができれば、孤発性 ALS の治療に有用であると思われる。実際に前年度の研究において、Dorfin を高発現させることにより変異 SOD1 トランスジェニックマウスの治療に有望な結果が得られており、Dorfin の活性を制御する分子は孤発性 ALS の治療において重要な分子標的となりうる。そこで本研究におい

ては、Dorfin と相互作用しその E3 活性に影響する分子を探索した。われわれは Dorfin 結合蛋白質を高感度に効率良く同定するために、高感度マス(MS/MS)スペクトロメーターを駆使した大規模なハイスループット・プロテオミクス解析手法を用いた。

B. 研究方法

1) HEK293 細胞に FLAG タグで標識した Dorfin を強制発現させ、抗 FLAG 抗体でコーティングしたビーズに結合したタンパク質をマススペクトロメーターにより解析した。

2) Dorfin の N 末に MBP タグをつけた融合タンパクを大腸菌を用いて作製した。また C 末に His タグを付加した VCP/p97 をバキュロウイルスシステムを用いて作製した。両者を用いて in vitro の binding assay を行った。

3) マウスの全脳よりタンパクを抽出し、超遠心による glycerol gradient fractionation により分画した。Western blotting により Dorfin と VCP/p97 の存在する画分を確認した後に両者が存在する fraction を用いて Dorfin と VCP/p97 の結合の有無を抗 Dorfin 抗体を用いた免疫沈降法によって検討した。

4) HEK293 細胞に GFP-Dorfin と VCP-myc タンパクを同時に発現させ、蛍光顕微鏡下に両者の細胞内局在

を観察した。

C. 研究結果

マスペクトロミーの解析の結果 6 つの候補蛋白質が得られた。我々はこのうち小胞体関連輸送 (ERAD) など多くの細胞機能を担っている valosin-containing protein(VCP)/p97 に注目した。大腸菌由来の精製 Dorfin とバキュロウィルスを用いて精製した VCP/p97 との結合を *in vitro* にて確認した。VCP/p97 は Dorfin の C 末を介して Dorfin に結合した。

マウス脳の lysate を用いた glycerol gradient fraction analysis より内在性 Dorfin は VCP/p97 と同様に分子量約 400-600kD の複合体中に存在し、両者が共存する fraction を用いて免疫沈降法を行った結果から、内在性の Dorfin は内在性の VCP/p97 と結合していることが判明した。(図 1)

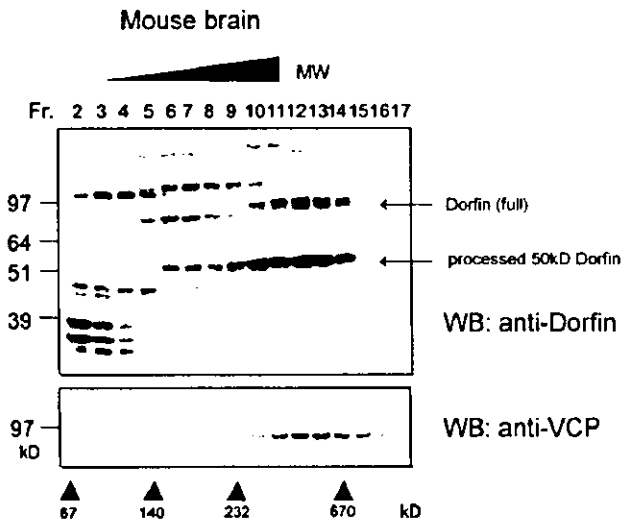


図 1a マウス脳の lysate を用いた glycerol gradient fraction analysis. 内在性の Dorfin と VCP は分子量約 400-600kD 付近の fraction に存在する。

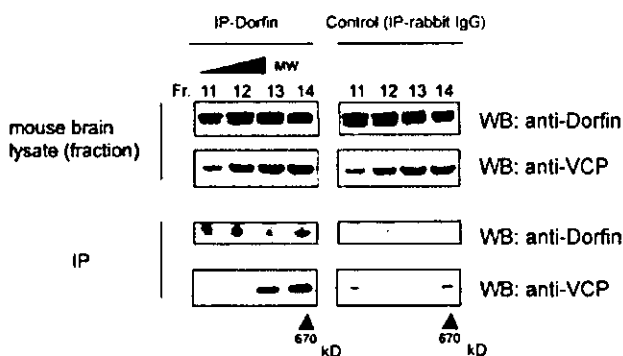
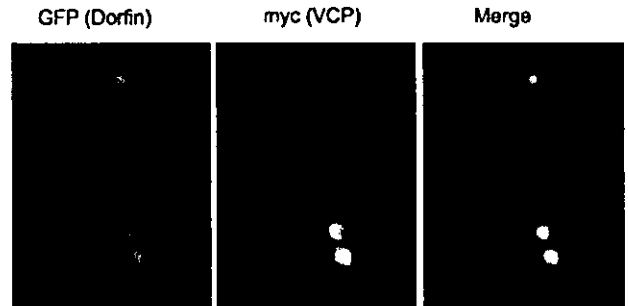


図 1b 図 1a の fraction を用いて抗 Dorfin 抗体で行った免疫沈降。内在性の Dorfin と内在性の VCP/p97 が共沈降する。

HEK293 細胞において Dorfin と VCP を共発現させると両者はプロテアソーム阻害剤下で核近傍の aggresome に一致した部位に共局在した。(図 2)



GFP-Dorfin and VCP-myc were overexpressed in HEK 293 cells. Cells were treated with MG132 of 1μM for 16 hours.

図 2 HEK293 細胞における Dorfin と VCP の局在。HEK293 細胞に Dorfin と VCP を発現させると aggresome に共局在する。

VCP/p97 の Dorfin の機能に対する影響を調べるために Dorfin が変異 SOD1 をユビキチン化する条件にドミナントネガティブ型の VCP を加えて、変異 SOD1 のユビキチン化の程度を調べたところ、コントロールに比べてユビキチン化の程度が減少することが分かった。(図 3)

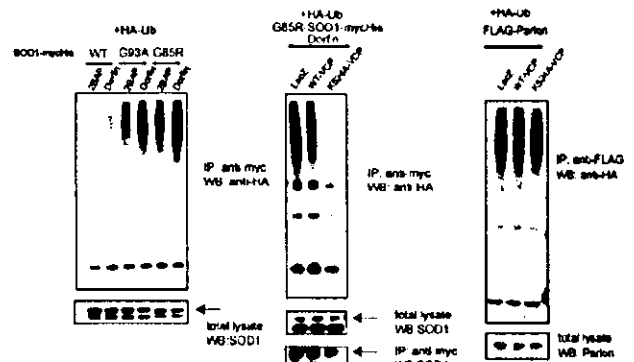


図 3 VCP/p97 のドミナントネガティブ型は Dorfin の変異 SOD1 に対するユビキチン化能を阻害する。Dorfin は変異 SOD1 特異的にユビキチン化能を有する(左)。VCP/p97 のドミナントネガティブ型(K524A)は Dorfin による変異 SOD1 (G85R) のユビキチン化を阻害する

(中)。VCP/p97 のドミナントネガティブ型(K524A)は Parkin の自己ユビキチン化は阻害しない(右)。

D. 考察

われわれはこれまでに Dorfin が変異 SOD1 や Synphilin-1 を基質とする E3 であり ALS やパーキンソン病などの神経変性疾患病変部位におけるユビキチン化封入体に局在する事を報告してきた。今回われわれは Dorfin が VCP/p97 と in vitro および in vivo で結合しており、培養細胞内で aggresome に共局在することを見出した。ALS をはじめとする様々な神経変性疾患において、Dorfin と VCP/p97 の機能はユビキチン化封入体を通じて密接に関係しているものと考えられる。また、内在性の Dorfin が 400-600kD と比較的大きな複合体を形成していることは、VCP/p97 のような結合因子が Dorfin の機能に必須もしくは極めて大きな役割を担っていることを示唆している。実際に我々は VCP/p97 のドミナントネガティブ体により Dorfin のユビキチンリガーゼ活性が阻害されることを見出し、VCP/p97 が Dorfin のユビキチンリガーゼ活性に大きく寄与している事を今回明らかにした。

VCP/p97 は AAA+ファミリーに属する ATPase であるが膜融合や転写、細胞周期など多岐に渡る細胞機能に関与するといわれている。その中でも最近パーキンソン病やポリグルタミン病などに強い関与を示唆されている ERAD において、小胞体の内側からポリユビキチン化された蛋白質を細胞質側に引きずり出してプロテアソームへ移送する働きを担っていると報告されている。興味深いことに VCP/p97 のドミナントネガティブ体を培養神経細胞に導入すると ALS など神経変性疾患の障害を受けた神経細胞に認められるものと同様な空胞を生じることも報告されている。

ERAD が ALS の病態とどのように関連するののかは今のところ十分明らかではないが、Dorfin の E3 活性を制御する VCP/p97 は、ユビキチン-プロテアソーム系の機能障害が原因の一つとして注目されている ALS の治療薬創成において魅力的な標的分子である。

E. 結論

Dorfin 結合蛋白質である VCP/p97 は Dorfin のユビキチンリガーゼ活性に重要であり、運動ニューロン疾

患治療のための重要な標的分子となりうる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1.論文

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.

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.

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.

2.学会発表

Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Tanaka F, Doyu M, and Sobue G. Medical induction of heat shock protein alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Neuroscience* 2004, Oct 23-27, 2004, San Diego, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

分担研究者 犬飼 晃 名古屋大学医学部附属病院神経内科学講師

研究要旨 球脊髄性筋萎縮症(SBMA)患者の剖検組織において、抗ポリグルタミン抗体を用いた詳細な免疫組織化学的検索を行った。本症の原因タンパクである変異アンドロゲン受容体(AR)は主として核内にびまん性に分布し、従来病理学的特徴とされてきた核内封入体よりもはるかに高頻度かつ広範囲に観察された。脊髄運動ニューロンの変異ARの核内びまん性集積はAR遺伝子のCAGリピート数と相関しており、変異タンパクの核内びまん性集積が病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。SBMA患者を対象としたLHRHアナログのオープン試験では、陰囊皮膚における変異ARタンパクの核内集積が治療により著明に阻害され、病態の中心に治療介入し得たことが示された。

A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)は、CAGリピートの異常延長を病因とする遺伝性神経変性疾患であり、ハンチントン病や脊髄小脳失調症とならぶポリグルタミン病である。本疾患の原因遺伝子はアンドロゲン受容体(AR)であり、成人男性に発症する四肢の筋萎縮、筋力低下、球麻痺を主症状とする緩徐進行性の下位運動ニューロン疾患である。他のポリグルタミン病と同様、病理学的には病変部のニューロンの脱落および残存する神経細胞の核内に変異タンパクの集積を認め、病態への関与が示唆されて来た。我々の作成したSBMAのトランスジェニックマウスモデルでも、神経細胞の核内に変異タンパクの集積を認め、その程度は症状に強く相関し、雌よりも症状の重篤な雄マウスにおいて顕著にみられた。さらに、去勢やLHRHアナログ投与による血清テストステロン濃度低下にともない変異タンパクの核内集積が抑制されるとともに、症状の劇的な改善が認められた。すなわち、変異ARタンパクの核内集積が病態の中心であることが動物モデルにおいて示唆されてきた。

今回SBMA剖検組織を用い、本症の原因タンパクである変異ARの存在様式を病理学的に検討し、その病態形成への関与につき解析した。また、抗アンドロゲン療法の有効性と安全性の検討のため、SBMA患者を対象とした臨床試験を施行した。

B. 研究方法

遺伝子検査で診断が確定したSBMA患者11名の剖検組織を用い、抗ポリグルタミン抗体(1C2)などによる免疫組織化学を行った。

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)に対するLHRHアナログ(leuprorelin)の臨床試験については、名古屋大学医学部附属病院IRBの承認を得たプロトコルに基づき、インフォームドコンセントの得られた5人のSBMA患者に対し、Leuprorelin 3.75mg 4週毎の皮下投与を6ヶ月間行った。投与に伴う患者ADL、QOL、筋力、血清creatin kinase(CK)値、および陰囊皮膚生検所見の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

臨床試験にあたっては、実施の目的と方法について、対象となる患者に文書による説明を行う。文書によるインフォームド・コンセントが得られたもののみを対象とし、試験への参加が患者の自由意思に基づくものであること、参加撤回はいつでも可能であること、および不参加や参加取り下げにより患者が不利益な取扱いを受けないことも、文書に明記し、説明する。患者の個人情報特定の責任者の元番号にて取り扱い、試験の結果が公表される場合であっても、患者に関わる秘密は保全するものとする。これまでの臨床使用の経験から、leuprorelinの安全性については確認されているが、万一予期せぬ副作用が生じた場合には迅速かつ適切な診断と治療を行い、それにかかる費用は当講座にて負担するものとする。重篤な副作用がみられ

た場合、および患者からの撤回の要請が合った場合にはすみやかに試験を中止する。以上の対策により、試験中参加する患者の人権及び利益が保護されるよう最大限配慮する。以上に示した患者の人権及び利益の保護に関するプロトコールは名古屋大学医学部 IRB において平成 14 年 7 月 24 日付けで承認を得ている。動物実験は名古屋大学動物実験指針に基づき、動物の苦痛の緩和除去に十分配慮した。

C. 研究結果

剖検組織の病理学的検索：患者は死亡時 51-84 才、発症は 20-75 才であり、死因の多くは肺炎であった。AR 遺伝子の CAG リピート数は 40-50 であった。1C2 を用いた免疫組織化学では脊髄前角細胞および後根神経節の神経細胞で核のびまん性染色が認められ、それより低い頻度で核内封入体が認められた。一部の細胞では両者の共存がみられた。大脳および小脳皮質では申した染色はみられなかったが、脊髄や脳幹以外にも被殻、尾状核、視床などでも一部の神経細胞で核の染色が認められ、陰囊皮膚、精巣、肝、腎でも核の染色がみられた。核への変異タンパク集積に加え、後根神経節などでは神経細胞の細胞質にも封入体が観察された。二重染色では、これら細胞質内封入体はゴルジ装置との共存が示唆されたが、小胞体やミトコンドリア、ライソゾームとの共存は認められなかった。電子顕微鏡では神経細胞の核内に 1C2 陽性の顆粒状凝集体が認められた。脊髄前角細胞における核のびまん性染色の頻度は AR 遺伝子の CAR リピート数と正の相関を示したが、核内封入体の出現頻度と CAG 数との間には相関は認められなかった。

Leuprorelin の臨床試験：患者の年齢は 43-68 歳、発症からの経過年数は 4-15 年、CAG リピート数は 43-54 であった。血清 creatine kinase(CK) 値は有意に低下し、5 例中 4 例では歩行速度の改善がみられた。振戦や線維筋攣縮、転倒傾向の改善を自覚した例もみられた。また陰囊皮膚生検での変異 AR の異常蓄積は、投与前に比し著明に減少した。全ての対象患者において陰萎を認めたが、他の副作用は認めなかった

D. 考察

剖検組織の病理学的検索：伸長ポリグルタミン

鎖を認識する特異抗体を用いることで、SBMA の原因タンパクである変異 AR が、従来知られているより多くの臓器に分布していることが明らかとなった。その分布様式としては、核内へのびまん性が主なものであり、従来ポリグルタミン病の病理学的特徴とされてきた核内封入体よりも広い範囲で高頻度に観察された。さらに重要なことに、脊髄前角細胞における変異 AR の核内びまん性集積は、その頻度が CAG 数と相関しており、運動ニューロン変性の病態に直接的に関与しているものと考えられた。

Leuprorelin の臨床試験：Leuprorelin による抗アンドロゲン療法は、動物モデルのみならず患者においても変異 AR の核内集積を阻害し、SBMA の病態を改善する可能性が示唆された。Leuprorelin は SBMA 患者においても性機能障害以外の重篤な副作用を示さなかった。現在われわれは、SBMA に対する Leuprorelin のプラセボ対照二重盲検試験を施行中である。

E. 結論

変異 AR のびまん性集積は SBMA の病態形成の鍵となるものであり、その制御が治療の重要な標的と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. (2005) Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128: 659-70.

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗ポリグルタミン病剤。2004年8月26日出願
(特願 2004-246980)

2. 実用新案登録

なし

厚生労働省科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

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

運動ニューロンの恒常性維持(監視)機構をタンパク質代謝の動態に着目して研究すると共に、その破綻の結果として発症する神経変性疾患の原因を解明し、その治療法の開発を目指す。本研究では、とくにニューロン死に密接に関係することが示唆されている、小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation)、についてそのメカニズムの解明を行った。ERAD は小胞体で発生した異常タンパク質をサイトソルに逆輸送してユビキチン・プロテアソーム系で処理する機構であるが、われわれは小胞体で合成されるタンパク質の大部分を占める N-結合型糖タンパク質の糖鎖を識別してユビキチン化するユニークなユビキチンリガーゼ SCF^{Fba1} ファミリーを世界に先駆けて発見し、その包括的な研究を推進してきた。本年は、この新規リガーゼの構造生物学的研究とその作用機構の解明から分子識別に関する新知見を得ることに成功した。現在、運動ニューロン疾患との関連性を探るために発生工学的研究を遂行中である。

A. 研究目的

生体は遺伝子変異や環境汚染などによりしばしば分子(タンパク質)レベルでストレスを感じ恒常性の破綻をきたす。とくに運動ニューロンのような非分裂細胞がストレスを過剰に感受すると、アポトーシスを誘発しニューロンは死滅する。この状態が長期間持続すると、ほとんどのニューロンが脱落し組織変性に陥る。最近、運動ニューロン疾患を含む様々な神経変性疾患の発症機構として、細胞内のタンパク質の品質管理(立体構造の正常と異常を区別して、損傷タンパク質を選択的に除去する機構)の破綻が示唆されているが、その分子メカニズムは不明である。ごく最近、ニューロンが細胞内のストレスを感知するときのセンサーとして働く小胞体(ER: endoplasmic reticulum)の役割が注目されている。とくに小胞体内で発生した異常タンパク質を処理する機構として小胞体関連分解(ERAD: ER associated degradation)の機構解明が飛躍的に進展している。われわれは、ERAD に関与するニューロン特異的なユビキチンリガーゼ SCF^{Fba1} を発見した。

そして、SCF^{Fba1} について構造、機能、病態に関する多面的な研究を展開してきた。本研究では、SCF^{Fba1} の病態生理学的研究を通して運動ニューロン疾患の発症機構解明を目指す。

B. 研究方法

1) 生化学的方法: 関連分子を大腸菌あるいは昆虫細胞系で発現・精製し、得られたリコンビナントタンパク質を用いて再構成ユビキチン化システムを構築した。このインビトロのアッセイ系を用いて、ユビキチンリガーゼ活性を測定した。その他、電気泳動(SDS-PAGE)・Western blot 分析などについては、定法に従って行った。

2) 構造生物学的的方法: 目的タンパク質を大腸菌で大量に発現させた後、単一標品に精製した。精製タンパク質を結晶化してその立体(高次)構造を X 線結晶構造解析によって原子レベルで解析した。また必要に応じて NMR(核磁気共鳴装置)を使用して相互作用するアミノ酸残基を同定した。

3) 細胞生物学的的方法: 目的タンパク質をコードした

cDNA を細胞内に導入して発現させ、この強制発現効果に対する(ユビキチン化反応を含む)細胞応答を観察した。また標的遺伝子の siRNA を細胞内に導入して目的タンパク質の発現を抑制し loss-of-function の表現型(細胞に与える影響)を観察した。

(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を用いた基礎的研究およびリコンビナントタンパク質を用いた生化学的研究である。従って、これらの実験の実施には、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

分泌タンパク質や膜タンパク質などの分泌系タンパク質は粗面小胞体上のリボソームで合成される。これらは翻訳と共役して小胞体膜上の膜透過装置(トランスロコン)のチャンネルを通して内腔側へ送り込まれる。小胞体内腔もしくは小胞体膜に組み込まれた新生タンパク質は小胞体内の分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群の助けを借りて、フォールディングやアセンブリーなどの高次構造形成が行われる。そこで正しい高次構造を獲得したタンパク質だけが、輸送小胞によりゴルジ体以降のコンパートメントに輸送される。

細胞外に異常タンパク質が蓄積したり分泌されたりすると生体にとって有害になるので、分泌経路の入り口である小胞体には、高次構造形成に失敗したタンパク質を選別し、再生・破壊するための様々な機構が兼ね備えられている。このような異常タンパク質を送り出さない仕組みは「小胞体の品質管理」と呼ばれている。小胞体には高濃度に分子シャペロンが存在し高次構造形成に最適な条件を作り出しているにも関わらず、新生タンパク質の約 30% 以上は高次構造形成に失敗し、細胞内で分解を受けていると推定されており、この分解機構は ERAD (小胞体関連タンパク質分解)と呼ばれている。

ERAD の基本経路は、小胞体内で ERAD の基質となるタンパク質の識別、小胞体から細胞質への逆行輸送、細胞質におけるユビキチン化とプロテアソームによる分解の3つのステップよりなる。その中で、分泌系タンパク質の多くは N-結合型糖鎖修飾を受けた糖タンパク質であるが、糖鎖が異常タンパク質の識別・ERAD へのターゲティング・分解の一連のタグとして機能していることが明確となってきた。最近われわれは、糖鎖を識別するユビキチンリガーゼとして“SCF^{Fbs1}”を発見し、この酵素が ERAD に関与していることを突き止めた(1)。

即ち、われわれは N 結合型糖タンパク質の結合する細胞内レクチンを探索する目的で、高マンノース糖鎖をもったフェチュインをリガンドとした親和性クロマトグラフィーを作製してウシ脳抽出液を解析した結果、Fbs1(別称 Fbx2/Fbg1)の分離に成功した。Fbs1 は F-box ファミリータンパク質の一つであり、SCF 複合体 Skp1-Cullin1-F-box 蛋白質(略記: F-box)-Roc1 型ユビキチンリガーゼの標的識別サブユニットであった。試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF^{Fbs1} 複合体が N 型糖鎖依存的に糖タンパク質をポリユビキチン化するユビキチンリガーゼであることが判明した。そして(基質結合能は保持しているが)SCF 複合体を形成しないドミナントネガティブ Fbs1 変異体を強制発現させたところ既知の ERAD 基質(異常 CFTR:濃縮性線維症の責任遺伝子産物や余剰に生合成される T 細胞リセプター TCR α サブユニット)の分解が抑制されたことから SCF^{Fbs1} は ERAD 機構で作用していることが裏付けられた。さらに興味深いことに、Fbs1 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤で誘導される Aggresomes(ERAD 基質の分解異常による異常タンパク質の凝集体)の形成を完全にブロックした。この結果は、Fbs1 が封入体形成に関係している可能性を示唆するものとして注目される。

Fbs1 の発現は成体脳、それもニューロン特異

的である。ERADはすべての細胞・臓器で普遍的に見られる現象であることから、SCF^{Fbs1}は神経細胞における品質管理に特化して進化してきたと推定される。このことは、ニューロンのような非分裂細胞では、タンパク質の品質管理機構を厳格に維持することが細胞の生存戦略として極めて重要であることを示唆している。一方、最近、Fbs1には少なくとも5種類のアイソフォームが存在し、これらが遺伝子ファミリーを形成していることを突き止めた。そしてあらゆる組織にユビキタスに発現しているFbs2/Fbg2が、SCF^{Fbs1}と同様に、SCF^{Fbs2}複合体を形成、ERADに作用するユビキチンリガーゼであることを見出した(2)。

更にわれわれは、Fbs1 単独分子及び Fbs1 とキトビオースの複合体の X 線結晶構造解析による立体構造解析に成功し、Fbs1 による糖鎖識別機構を原子レベルで解明した(3 および未発表データ)。SCF 型 ユビキチンリガーゼは Skp1-Cullin1-F-box-Rbx1/Roc1 から構成された4分子複合体であり、標的識別サブユニットである F-box を変換することによって多様性を確保したユニークな蛋白質識別機構を持った酵素である。SCFの標的蛋白質は、細胞周期やシグナル伝達にかかわるものなど生体内において非常に重要な蛋白質であることから、これら標的蛋白質の識別機構を構造生物学的に明らかにする研究が進められている。SCF^{Fbs1}は N 結合型糖鎖を認識することにより小胞体関連分解(ERAD)において標的蛋白質にユビキチンを付加する機能を持ったユニークな酵素である¹⁹⁾。

Fbs1 の糖鎖結合ドメイン(SBD)の立体構造は10本の逆平行β構造が二層に重なった・サンドイッチ構造をしており、その一端に位置するループ領域により糖蛋白質では糖鎖の還元末端に位置するキトビオース(GlcNAc-1-4GlcNAc)を認識し結合している。レクチンの立体構造として・サンドイッチ構造は

一般的な構造であるが、これまでに立体構造の報告されたレクチンの糖鎖認識部位は・シート領域であったのに対し SBD ではループ領域で糖鎖と結合する新しい様式をとっていた。そして、この時見られたキトビオースとSBDの結合様式は、キトビオースの片側のGlcNAc(A)がSBDのW280の側鎖に重なって結合し、もう一方のGlcNAc(B)は水素結合とNAcのアセチル基がY177、F279、K281から形成された小さい疎水性のポケットに入るというものであった。この分子表面の小さな疎水性ポケットはFbs1と糖蛋白質の結合において、マンノースとGlcNAcを識別する役割を果たしている。また、SBDと結合しているキトビオースは水素結合により2つのGlcNAcの向きを一定にして、これにより複合体形成時に糖蛋白質の位置を決定しユビキチンをチャージしたE2に提示していることが判明した。

標的となる糖蛋白質において修飾された糖鎖の根元部分は、通常自身のペプチド部分と相互作用しているためFbs1との結合は困難であると考えられる。しかしFbs1の標的となる糖蛋白質はERADにおいて細胞質に輸送された高次構造の崩れた蛋白質であることから、根本のキトビオース部分も溶媒に露出していると考えられるためにFbs1と相互作用が可能となると推定された。このことは同じN結合型糖蛋白質でも変性させた方が、Fbs1と高い親和性を示すという実験事実とも一致しており(4)、これらのことからFbs1が分子の先端で糖鎖と特異的に結合することは、アンフォールド状態にある糖蛋白質と不必要な相互作用することなく、ユビキチンを付加するために合理化された機構であると考えられる。またFbs1-Skp1の二量体のX線結晶構造解析にも成功、SCF^{Fbs1}全体の高次構造のモデル化にも成功した(投稿準備中)。

加えてSCF^{Fbs1}がp97 ATPaseと共に小胞体膜のサイトソル表面に存在し、p97のエネルギーを利用して小胞体内腔から引きずり出した異常糖タンパ

ク質をユビキチン化していることを示唆した(4)。この際上記したようにSCF^{Fbs1}やSCF^{Fbs2}複合体がハイマノース型棟鎖の根本のキトピオースを識別することで、基質タンパク質の変性状態を識別していることも見出した(4)。これらの結果からSCF^{Fbs}リガーゼファミリーが巧妙な仕組みで、糖タンパク質の品質管理に関与していることが判明した。ERADを含む小胞体の品質管理はニューロン死に密接に関係していることが判明しているため、本研究は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できると思われる。

D. 考察

アルツハイマー病・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症(ALS)をはじめ多くの神経変性疾患での病理所見として、ユビキチン化された異常タンパク質の集積が残存ニューロン内に頻りに観察されていることから、タンパク質の品質管理機構の破綻がこれらの疾患に共通した発症原因になっている可能性が高まっている。われわれは、これらの知見を分子レベルで理解するための成果として、今回、N-結合型糖タンパク質(ERADの主な基質)に特異的に作用するユビキチンリガーゼ(SCF^{Fbs1}/SCF^{Fbs2})を見出し、分子レベルでの機能解析に成功した。今後、これらの発見を基盤にタンパク質の品質管理機構を解明して、神経変性疾患の発症機能の共通のメカニズム解明を目指す。

E. 結論

ERADに関与する糖鎖識別ユビキチンリガーゼとしてニューロン特異的なSCF^{Fbs1}とユビキタスに発現している普遍的SCF^{Fbs2}を発見した。そして、キトピオース(タンパク質のAsp残基に結合するGlcNAc-GlcNAc糖)が結合したFbs1の立体構造解析(X線結晶解析やNMR解析)に成功し、原子レベルで標的識別機構を解明した。この研究成果は、運

動ニューロンの変性機構を解明するための有益な情報を提供するものと期待される。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発

1. 論文発表

Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. EMBO Rep. in press

Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. Nature Struct. & Mol. Biol. 11, 365-170.

2. 学会発表

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

Tanaka K. Cellular apparatus responsible for the protein quality control in cells. The 27th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec 8-11, 2004, Kobe.

Tanaka K. Ubiquitin-Proteasome System Normal Function and Outcome of its Dysfunction in Neurodegeneration. 12th International Winter Conference on Neurodegeneration. Nov 29-Dec 2, 2004, Kyoto.

Tanaka K. Structure, Function, and Assembly of Proteasome Complex. The 21 COE International Symposium on "Molecular Mechanisms of Cell Proliferation and Evolution", Oct 31-Nov 2, 2004, Fukuoka.

Tanaka K. The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on "Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases", May 16-21, 2004, Jerusalem (Israel).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し