

200500/172 A

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 17 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 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

祖父江 元 1

II. 分担研究報告

1. Dornfin-CHIP 融合タンパク質による筋萎縮性側索

硬化症(ALS)の治療

道勇 学 11

2. 蛋白質分解系の破綻による運動ニューロン疾患の

発症機構解明

田中 啓二 15

III. 研究成果の刊行に関する一覧 22

IV. 研究成果の刊行物・別刷 27

I. 総括研究報告

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

我々が同定した新規ユビキチンリガーゼ (E3) である Dorfin は、*in vitro* において変異 SOD1 を特異的に認識し、神経細胞保護活性を有している。Dorfin トランスジェニック (Tg) マウスとの交配により変異 SOD1-Tg マウスの生存期間が延長したが、Dorfin の *in vivo* における半減期が極めて短いことからその治療効果は十分でない。本研究において、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しつつ、より安定して高発現する人工 E3 を作成するために、CHIP (Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein) と Dorfin の基質結合部位を融合したキメラタンパク質を開発した。Dorfin キメラタンパク質は、より高い変異 SOD1 特異的 E3 活性と神経毒性軽減作用を有しており、変異 SOD1 に伴う ALS の治療に有望と思われる。

2) SBMAについて

SBMA の病態に基づく治療法として Hsp90 阻害剤 (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: 17-AAG)、および Hsp70 誘導剤 (geranylgeranylacetone: GGA) の有効性と安全性を細胞およびマウスモデルを用いて解析した。また、すでにマウスモデルで有効性が示されている LHRH アナログ (leuprorelin) につき、SBMA 患者を対象とする第 II 相臨床試験を実施し、また病態を反映するバイオマーカーの探索を行った。17-AAG はプロテアソームによる変異アンドロゲン受容体 (AR) 分解を促進することにより、GGA は Hsp70 などの分子シャペロンの発現を誘導することにより、それぞれ培養細胞モデルとマウスモデルにおいて治療効果を発揮した。臨床第 II 相試験において Leuprorelin は陰嚢皮膚における変異 AR 核内集積を抑制し、嚥下機能を改善した。また、陰嚢皮膚における変異アンドロゲン受容体の核内集積は SBMA の病態のみならず重症度を強く反映する優れたバイオマーカーであると考えられた。

3) 運動ニューロン変性とユビキチンシステム

運動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、われわれが発見した N-結合型糖蛋白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^{Fbs1} を中心に解析した。とくに SCF^{Fbs1} の構造生物学的研究によって標的識別の分子機構を解明すると共に、Fbs1 がニューロン内では、SCF^{Fbs1} リガーゼとして機能する以外に、糖蛋白質に特異的な分子シャペロン作用を持つという新しい知見を得た。また運動ニューロン疾患を含めて多くの神経変性疾患の患者脳では、プロテアソームの機能異常が報告されているが、その実体は全く不明である。そこで本研究では、神経変性疾患におけるプロテアソームの役割の解明を個体レベルで解析するために変異導入によるプロテアソームの活性低下モデルの作製を行った。

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

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。

SOD1 変異を伴う家族性 ALS において、運動ニューロンが選択的に障害される機序の詳細はいまだ不明であるが、SOD1 の活性低下によるものではなく、変異 SOD1 が運動ニューロンに対する毒性機能を発揮する (gain of toxic function) ことが原因と考えられている。Dorfin はヒト脊髄より我々がクローニングした RING-finger / IBR ドメインを有する新規 E3 であり、培養細胞を用いた実験では、変異 SOD1 を特異的にユビキチン化してプロテアソームによる分解を促進し、神経細胞死を抑制する活性を有している。この Dorfin を導入した Tg マウスと交配することで、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長させることを我々は確認したが、Dorfin の *in vivo* における半減期が極めて短いことからその効果は十分でない。そこで本研究においては、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しながら、より安定して高発現する人工 E3 を CHIP (Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein) と Dorfin の基質結合部位を融合することにより開発し、変異 SOD1 の半減期や毒性に及ぼす影響を検討した。

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) については熱ショック蛋白質 (HSP) がポリグルタミン病の病態に関与していることに基づき、HSP に注目した治療法の開発を行った。また、すでに SBMA のマウスモデルにおいて治療効果が明らかにされている LHRH アナログを用いた臨床試験を行い、同時に SBMA の病体を反映するバイオマーカーの探索を行った。SBMA の病因タンパク質であるアンドロゲン受容体 (AR) は Hsp90 や他の分子シャペロンとともに複合体を形成しているが、Hsp90 阻害剤は AR-Hsp90 複合体の構造変化をもたらし、AR のユビキチン・プロテアソーム系による分解を促進させることが知られている。Hsp90 阻

害剤である 17-AAG を用いて、SBMA 培養細胞およびマウスモデルにてその薬理作用を検討した。また、異常蛋白質の集積を抑制する作用を有する Hsp70 の発現を誘導する効果を有する geranylgeranylacetone (GGA) の治療効果についても、SBMA の培養細胞およびマウスモデルにおいて検討した。

また近年、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蛋白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 N 型糖蛋白質を特異的に標的とするユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs1} を発見した。そして、SCF^{Fbs1} 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。Fbs 分子は少なくとも 5 個の分子種からなるファミリーを構成しているが、Fbs1 のみがニューロンに特異的に発現している。Fbs2 を含むほかの分子はユビキタスに発現しているが、その発現場所の違いの意味は不明である。この解明の謎に迫ることは、非常に重要な課題である。一方、細胞内の蛋白品質機構の要となる 20S プロテアソームは、疎水性、塩基性、酸性アミノ酸のいずれの C 末端側のペプチド結合も分解することができ、それぞれ Chymotrypsin 様、Trypsin 様、Caspase 様活性と呼ばれている。これらの活性は、それぞれ $\beta 5$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 1$ が担っていることがわかっている。酵母および哺乳類 20S プロテアソームの結晶構造解析の結果から、 β サブユニットの基質特異性を決定しているのが、S1 ポケットと呼ばれる部位にあることが分かった (5)。Caspase 様活性を持つ $\beta 1$ は 4 5 番目に塩基性アミノ酸であるアルギニンがあることにより、酸性アミノ酸に対して基質特異性を発揮する。Trypsin 様活性を持つ $\beta 2$ は 5 3 番目に酸性アミノ酸であるグルタミン酸があることにより塩基性アミノ酸に対する基質特異性を示す。Chymotrypsin 様活性を担う $\beta 5$ サブユニットの S1 ポケットは、ほぼ全てが疎水性アミノ酸から構成されており、疎水性相互作用により疎水性アミノ酸に対して基質特異性を有すると予想される。そこで、本年は、最も重要な機能を有する Chymotrypsin 様活性に注目し、その触媒部位近傍のアミノ酸置換により Trypsin 様活性と Caspase 様活性に影響せず、Chymotrypsin 様活性を特異的に低下させるモデル生物の作製を計画した。

B. 研究方法

Dorfin-CHIP キメラタンパク質発現コンストラクトの作成および培養細胞における発現解析：Dorfin の一部分のみを発現するベクター (Dorfin mutants) を作成し、Dorfin mutants を種々の変異 SOD1 発現ベクターと培養神経細胞に共発現させ、免疫沈降法を用いて変異 SOD1 と結合する Dorfin のドメインを同定した。同定した Dorfin の変異 SOD1 認識部位である C 末側部分と、強力なタンパク質品質管理活性を有する CHIP の E3 活性を有する U-Box 部位を様々な組み合わせで融合した種々の Dorfin キメラタンパク質を発現するコンストラクトを作成し、作成した Dorfin キメラタンパク質を、培養神経細胞株 Neuro2a に導入し、各キメラタンパク質の発現レベルや安定性をウェスタンブロット、cycloheximide chase 法、pulse chase 法などを用いて解析した。

Dorfin キメラタンパク質が変異 SOD1 に及ぼす影響の解析：各 Dorfin キメラタンパク質を、変異 SOD1 とともに Neuro2a に共発現し、各キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合の強さや変異 SOD1 のユビキチン化の程度を検討した。さらに、Dorfin キメラタンパク質が変異 SOD1 の半減期に及ぼす影響を、cycloheximide chase 法および pulse chase 法を用いて解析した。Dorfin キメラタンパク質を変異 SOD1 と共発現させた時の神経細胞 viability の改善効果を、MTT アッセイにより解析した。

SBMA モデルマウスに対する 17-AAG および GGA の投与：CAG 繰り返し配列が 24 及び 97 リピートのヒト全長の AR (AR-24Q および AR-97Q) を導入した細胞モデル (SH-SY5Y)、及びトランスジェニックマウスを用いた。マウスへの投与については、17-AAG は週 3 回腹腔内注射を行い、GGA は粉末試料に混和して経口投与を行った。

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ールに基づき、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、および陰嚢皮膚生検所見の変化を観察した。

SBMA のバイオマーカーの探索同定：生検あるいは剖検患者陰嚢皮膚に対し、抗ポリグルタミン抗体を用いた免疫組織化学を行った。

一定面積における陽性細胞数を測定し、各種臨床、遺伝的パラメータと比較検討した。

SCF^{Fbs1} リガーゼの分子構造と作用機構の解明：

1) 生化学的方法：リコンビナント蛋白質は、大腸菌あるいは昆虫細胞系で発現・精製した。これらを用いてインビトロのユビキチン化アッセイ系を構築し、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：目的蛋白質を大腸菌で大量に発現させた後、単一標品に精製した。精製蛋白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：哺乳動物の発現ベクターに目的蛋白質をコードした cDNA を組み込み細胞内に導入した後、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蛋白質の発現を抑制し loss-of-function の表現型 (細胞に与える影響) を観察した。

変異導入によるプロテアソームの活性低下モデルの作製：

1) 酵母発現ベクターと変異型 β サブユニット発現ベクターの作製：pRS316、pRS315 ベクターの EcoRI-XhoI 間に、 β 5 (PRE2) の開始コドン約 1500bp 上流から終止コドン約 500bp 下流まで、ゲノムより PCR 法で増幅させた遺伝子を挿入した。pRS315- β subunit 発現ベクターに、Quick-change Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて 1 アミノ酸置換を起こさせた。得られたベクターに目的の変異が挿入されているかどうかは、シーケンス反応によって確認した。

2) 形質転換体酵母株の作製：4ml YPD 液体培地で培養した片方の β 5 が破壊された 2 倍体株を回収後、WT の β subunit を発現する pRS316 ベクターを Transform し、SD(-Ura) Plate に蒔いた。2-3 日後、生えてきた colony から 5 つを選び、SD(-Ura) Plate に植え継いだ。得られた形質転換体を減数分裂させ四分子解析によりゲノムの β 5 が破壊され、導入したプラスミド依存的に増殖が可能となっている株を選択した。選別後の株を 4ml の YPD 液体培地で培養して回収した後、pRS315 ベクターに WT もしくは変異型 β subunit を組み込んだプラスミドを導入し、SD(-Leu) Plate にまいた。2-3 日後、生え

てきた colony から 5 つを選び、FOA(-Leu) Plate に植え継いだ。26°Cで一晩培養後、SD(-Ura), SD(-Leu) Plate に植え継ぎ、SD(-Ura) plate で生えず、SD(-Leu) plate で生える株を選別し、pRS316- β 5WT を持たず pRS315 ベクターに WT もしくは変異型 β 5 が組み込まれたプラスミドのみを持つ形質変換体を取得した。

3) ターゲティングベクターの作製: マウス β 5 (Psm β 5) 遺伝子を含む BAC クローンより、以下に示す断片を単離し、pBluescript-SKII にサブクローニングすることでターゲティングベクターを作製した。2.0kb の SacI-SacI 断片を 5'側相同部位、5.5kb の BamHI-BamI 断片を 3'側相同部位とした。その間に exon2, exon3 の β 5cDNA 配列、pcDNA3-3 \times FLAG 由来の 3 \times FLAG 配列およびポリ A 付加シグナル配列、そしてポジティブ選別のために MC1 プロモーターのネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) を、lox 配列に挟んだ配列をサブクローニングした。3'側 lox 配列と 3'側相同部位との間には exon2, exon3 の β 5cDNA 配列にそれぞれ任意の変異を導入したもの、pcDNA3-3 \times HA 由来の 3 \times HA 配列およびポリ A 付加シグナル配列をつなげた配列をサブクローニングした。さらにこれらの配列を、ERP 配列で挟み、その 3'相同部位との間に exon2, exon3 の β 5cDNA 配列、pcDNA3-Venus 由来の Venus 配列およびポリ A 付加シグナル配列をつなげた配列をサブクローニングした。非相同組み替えに対するネガティブ選別のために 1.0kb 断片のジフテリア毒素遺伝子 (MC1DT-A) を 3'相同部位の下流にサブクローニングした。

4) 遺伝子ターゲティング: ターゲティングベクターを SalI により線状化した後、TT2 ES 細胞に GENE PULSERII を用いて 210V, 950uF にて電圧ポレーション法による遺伝子導入を行った。ES 細胞は電圧ポレーション 48 時間後から 200ug/ml G418 により、6-8 日間選別した。ネオマイシン耐性クローンは PCR 法により遺伝子型同定を行った。この PCR 法により、5.1kb 断片の増幅のみが見られるものを野生型アリル、5.1kb, 3.5kb 両方の断片の増幅が見られるものをノックインアリルとして相同組み替え ES 細胞を同定した。PCR は LA-Taq を用いて行った。

5) ペプチダーゼ活性の測定: 100mM Tris-HCl pH8.0 の反応バッファーに終濃度 1mM の基質を加え、これに 0.1mg/ml のサンプルもしくは各グリセロールフラクションから 10ul を混合し、37°Cで40分経過後、Twinkle LB にて測定した。ペプチダーゼ活性は 1nmol の蛍光基質を 1分で分解する活性を 1単位とし

た。Chymotrypsin 様活性 (Sue-LLVY-AMC)、Trypsin 様活性 (Boc-LRR-AMC)、Caspase 様活性 (Cbz-LLE-AMC) を活性測定に供した。

(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。患者の個人情報とは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ー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 のキメラタンパク質: 作成した各種 Dorfin キメラタンパク質はいずれも野生型 Dorfin に比較して培養細胞において高発現した。Dorfin キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合を検討した結果、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有するキメラタンパク質 (D, E, F, J, K, L) において、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を N 末側に持つキメラタンパク質よりも強い変異 SOD1 結合能を有していた。いずれのキメラタンパク質も、野生型 Dorfin に比べて培養細胞内での半減期は長く、安定した高発現が得られた。

Dorfin キメラタンパク質、変異 SOD1、ユビキチンを培養細胞に導入し、in vivo ユビキチン化アッセイを行い検討した結果、いずれのキメラタンパク質においても E3 活性を認めたと、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有するキメラタンパク質の場合に、より強い変異 SOD1 ユビキチン化活性を認めたと。さらに、CHIP の U-Box 部位に隣接した charged region を含む (J, K, L) キメラタンパク質で、変異 SOD1 のユビキチン化活性が増強した。Dorfin キメラタンパク質による変異 SOD1 のユビキチン化の強さは、キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合の強さに比例していた。

Dorfin キメラタンパク質の中では、キメ

ラタンパク質 L で、野生型 Dornfin よりも強いユビキチン化活性が観察された (図 3A)。さらに、変異 SOD1 の半減期に対するキメラタンパク質共発現の効果を検討したところ、キメラタンパク質 L は野生型 Dornfin に比べ、変異 SOD1 の分解をより促進した (図 3B)。MTT アッセイにより、Dornfin キメラタンパク質の Neuro2a 培養神経細胞に対する変異 SOD1 の毒性抑制効果を解析した結果、野生型 Dornfin に比較して強い変異 SOD1 ユビキチン化活性を有するキメラタンパク質 L においてのみ、野生型 Dornfin よりも優れた毒性抑制効果が認められた

SBMA のモデルに対する 17-AAG の治療効果 : 培養細胞モデルでは、17-AAG 投与により濃度依存性に AR の蛋白量減少効果を認めたが、その減少効果は AR-97Q でより強く認められた。17-AAG による AR 減少効果は、プロテアソーム阻害剤である MG132 併用により相殺された。Pulse chase 法により蛋白質の半減期を測定したところ、AR-97Q のほうが AR-24Q より速く分解される傾向が認められた。AR-Hsp90 複合体の構成を検討したところ、AR-97Q は AR-24Q に比較して p23 と結合した複合体を形成しやすい傾向が認められた。17-AAG を投与すると AR-Hsp90 複合体から p23 が解離し、AR がより分解を受けやすくなることが示唆された。マウスモデルでは 17-AAG 投与により筋萎縮、歩行運動能などの有意な改善が認められ、1C2 抗体を用いた免疫染色にて病理学的検索を行ったところ、脊髄などにおける変異 AR の核内集積が有意に減少していた。マウスモデルにおいても 17-AAG は変異型 AR をより選択的に分解した。17-AAG は AR-Hsp90 複合体から p23 を離脱させるとによりユビキチン-プロテアソーム系による変異 AR の分解を促進し、神経変性を抑制することが示された。

SBMA のモデルに対する GGA の治療効果 : 培養細胞では、GGA は濃度依存性に細胞死を抑制し、その効果は 10-9M において最も強く認められた。至適濃度において GGA は heat shock factor-1 (HSF-1) の活性化を促進し、Hsp70、Hsp90、Hsp105 の発現を誘導した。核分画の変異 AR の凝集は至適量の GGA 投与により著明に抑制された。マウスでは、GGA 0.5 ないし 1% の投与により運動機能、体重、寿命が有意に改善した。Hsp70 および Hsp105 の蛋白量は野生型に比べモデルマウスの脊髄において低下していたが、GGA の至適量投与により野生型以上に増加した。変異 AR の核内集積も GGA 投与により抑制された。GGA は HSF-1 の活性化を介して Hsp70 などの分子シャペ

ロンの発現量を上昇させることで変異 AR 蛋白の refolding を促進し、凝集体形成を抑制して神経変性を軽減すると考えられた。

SBMA 患者に対する leuprorelin の臨床第 II 相試験 : 50 例の SBMA 患者を登録し、leuprorelin 群 25 例、placebo 群 25 例に無作為化割り付けを行った。leuprorelin 群の 1 例は、陰萎のため 20 週目に本人希望で投薬を中止した。結果は intention to treat 解析にて行った。Leuprorelin 投与により血清テストステロンは全例去勢レベルまで低下した。血清 CK は有意に減少し、有意差は認められないものの血清 AST (GOT)、血清 ALT (GPT) の低下を認めた。さらに leuprorelin 投与により陰囊皮膚の免疫染色における抗ポリグルタミン抗体陽性細胞の割合は有意に低下した。また、嚥下の自覚的改善が認められ、嚥下造影における咽頭部バリウム残留率が低下し、咽頭期移行時間 (STD) は短縮、食道入口部開大時間 (DOOUES)、舌骨挙上保持時間は延長し、嚥下機能が改善したと考えられた。主な有害事象の種類や頻度は概ね前立腺癌に対する投与試験のものと同等であった。例外的に陰萎がより高頻度でみられたが、これは本疾患においてアンドロゲン不応症状が高率にみられることを反映したものと考えられる。なお、SBMA 患者では前立腺癌患者に比べて hot flush の頻度が少なかった。

SBMA のバイオマーカーの探索同定 : 抗ポリグルタミン抗体を用いた剖検組織の免疫染色では、陰囊皮膚における変異アンドロゲン受容体の核内集積の程度は、脊髄における集積の程度と相関する傾向が認められた ($r = 0.84$, $p = 0.08$)。電子顕微鏡による解析では、脊髄運動ニューロンの核に集積している変異アンドロゲン受容体は顆粒状を示したが、同様の所見が陰囊皮膚においても観察された。さらに生検組織を用いた解析では、陰囊皮膚における抗ポリグルタミン抗体陽性率と CAG リピート数および患者の運動機能スコアとの間に相関がみとめられた。

SCF^{Fbs1} リガーゼの分子構造と作用機構の解明 : 分泌蛋白質や膜蛋白質などの分泌系蛋白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のチャ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蛋白質は小胞体内の分子シャペロンと呼ばれる蛋白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蛋白質だけが、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。

細胞外に異常蛋白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蛋白質を選別し、再生・破壊するための様々な機構が兼ね備えられている。このような異常蛋白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。小胞体には沢山の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、新生蛋白質の約 30%以上は高次構造形成に失敗し、細胞内で分解を受けており、この分解機構は ERAD (小胞体関連蛋白質分解) と総称されている。

ERAD の基本経路は、小胞体内で ERAD の基質となる蛋白質の識別、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、分泌系蛋白質の多くは N-結合型糖鎖修飾を受けた糖蛋白質であるが、糖鎖が異常蛋白質の識別・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。近年われわれは、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 結合型糖蛋白質が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 ファミリー蛋白質の一つであり、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。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ユビキチンリガーゼである。

試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF^{Fbs1} 複合体が N 型糖鎖依存的に糖蛋白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 (1)。Fbs1 の発現は成体脳、それもニューロン特異的である。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見出した。そして種々の組織にユビキチンに発現している 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 とキトビオースとの複合体の 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)。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 β 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 β 1-4GlcNAc) を認識し結合している。レクチンの立体構造として β 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 β 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。

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。また本年、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。さらに基質である RNase と結合した SCF^{Fbs1} 全体の構造解析にも成功した (論文投稿準備中)。この結果、SCF^{Fbs1} のユビキチンリガーゼとしての作用機構が分子レベルで判明した。

変異導入によるプロテアソームの活性低下モデルの作製: Chymotrypsin 様活性の低下した酵母の変異体作製: マウスをもちいた実験を行う前に、導入しようとしている変異が適切であるかどうかを、遺伝学的解析が容易である出芽酵母を用いて検討を行った。内在性プロモーターで発現する活性変異型 $\beta 5$ 発現ベクターを導入した株に対して、野生型 $\beta 5$ の遺伝子を欠失させ、20S プロテアソームが完全に活性変異型 $\beta 5$ サブユニットに置き換わる株を $\beta 5$ (A20T), $\beta 5$ (M45K), $\beta 5$ (M45R) について樹立した。

樹立した酵母を用いて、プロテアソームの活性を Caspase, Trypsin, Chymotrypsin 様

活性の三種について測定したところ、野生株に比べてそれぞれ 30%, 40%, 70% の Chymotrypsin 様活性の低下を認めたと、Caspase, Trypsin 様活性は変化していなかった。これらの株は通常の生育条件 (YPD 培地、26°C) では、野生株と同等の生育速度を示した。アミノ酸アナログである Canavanine においても、生育に大きな影響はなく、M45R (最も Chymotrypsin 様活性が低下している株) のみのごく弱い感受性をしめした。

次に酵母に導入したものと同一変異を哺乳類細胞に起こさせるベクターを作製し、293T 細胞にトランスフェクションした。細胞から蛋白質を抽出後、沈降速度解析にかけ、グリセロール濃度勾配によってサンプルをフラクションに分けた。Suc-LLVY-AMC を用いた活性測定の結果から、哺乳類細胞においても酵母と同様の変異を持たせることで Chymotrypsin 様の活性が低下することが確認できた。また、ウェスタンブロット法の結果より、活性測定の結果から 20S プロテアソーム、26S プロテアソーム画分であると予想されたフラクションに、過剰発現させた β サブユニットのバンドが現れ、プロテアソームの複合体に正常に組み込まれていることが確認できた。

ターゲティングベクターをエレクトロポレーション法により ES 細胞に導入した。この細胞を、G418 (GIBCO) を添加した ES 培地で遺伝子が導入された細胞を選択した。さらに PCR 法により 5.1kb 断片の増幅のみが見られるものを野生型アリル、5.1kb, 3.5kb 両方の断片の増幅が見られるものをノックインアリルとして相同組換え ES 細胞を同定した。

樹立した変異導入型 ES 細胞から蛋白質を抽出し、FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行ったところ、野生型 ES 細胞には見られないバンドが検出され、導入した $\beta 5$ が発現していることが確認できた。さらに、これらのサンプルを沈降速度解析にかけ、グリセロール濃度勾配によって分けられた画分をウェスタンブロット法で解析した。FLAG 抗体で見ると、野生型の ES 細胞ではバンドが現れないのに対し、単離された相同組換え ES 細胞ではバンドが検出された。 $\beta 5$ 抗体で見ると、野生型 ES 細胞ではバンドが一本であるのに対して、相同組み替え ES 細胞では、本来の $\beta 5$ と一緒に、3 × FLAG の分だけシフトしたバンドが確認できた。この結果、変異導入型サブユニットが正しくプロテアソームに組み込まれていることが判明した。現在、この変異導入型 ES 細胞をマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、翌日仮親の子宮に移植し、ヘテロマウスの作

製を進めている。ヘテロマウスがジャームラインに入っていることを確かめ、交配により導入型サブユニットを持った条件的ノックインマウスを作製する計画である。

D. 考察

ALS について：本研究により野生型 Dorsin に比べ、より強力な変異 SOD1 ユビキチン化・分解促進活性を有し、安定して発現するキメラタンパク質 L が得られた。キメラタンパク質 L は、Neuro2a に対する変異 SOD1 の毒性軽減効果も野生型 Dorsin に比較して強く、このキメラタンパク質を導入することで、変異 SOD1-Tg マウスの治療効果が野生型 Dorsin を導入した場合よりも高まることが期待できる。遺伝子工学的手法を用いて、神経変性疾患の原因となる異常タンパク質をより強力に分解する人工タンパク質を開発する手法は、ALS のみならず、パーキンソン病やアルツハイマー病などの異常タンパク質蓄積により生ずる神経変性疾患の治療戦略として今後有望であると思われる。

SBMA について：17-AAG はすでに我々が報告した LHRH アナログ、ヒストンアセチル化酵素阻害剤などともに SBMA に対する多剤併用療法の一部を担う薬剤と考えられる。また、薬剤によるユビキチン-プロテアソーム系の機能増強は、筋萎縮性側索硬化症性 (ALS) など他の神経変性疾患へも応用可能な画期的治療戦略であると考えられる。一方、HSP 誘導剤である GGA は毒性が低く、ポリグルタミン病の経口治療薬として有望である。Lurprorelin の第 II 相臨床試験では、本治療法が SBMA の病態の中心である変異アンドロゲン受容体の核内集積を抑制することが示された。SBMA の病初期に適切に lurprorelin による治療を開始すれば、嚥下障害など誤嚥につながる病期への進展を防止しうる可能性があると考えられる。また、陰囊皮膚における変異アンドロゲン受容体の核内集積は SBMA の病態のみならず重症度を強く反映する優れたバイオマーカーであると考えられる。

運動ニューロン変性とユビキチンシステムについて：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、Fbs1 がニューロンに特異的に発現していることの原因は、これまで推測の域を出ず大きな謎であった。当初われわれはニューロンのような非分裂細胞では、蛋白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り、これらの細胞では、共通の Fbs2

に加えて Fbs1 を特異的に発現させ、神経細胞における品質管理を強化するための進化的に獲得したと考えていた。この仮説を検証するために、Fbs1 や Fbs2 を含むその他のファミリー分子群が正確に SCF 複合体を形成しているか否かを検証した。その結果、Fbs2 を含む他のユビキタスな分子群はほとんど全てが、Cullin1 と結合して SCF^{Fbs2} などの 4 分子複合体を形成していたが、Fbs1 の大部分は Cullin1 と結合していなかった。しかし、小胞体膜結合型の Fbs1 は Cullin1 と結合し SCF^{Fbs1} の複合体として存在し、ERAD に関与していることが示唆された。そこで、遊離の Fbs1 の役割を解析した結果、変性・凝集した Client N 型糖蛋白質をフォールディングして正常な立体構造を持った分子に再生させる分子シャペロン作用をもつことが判明した。この結果、Fbs1 はニューロンでは、Cullin1 と結合し SCF^{Fbs1} の複合体を形成して ERAD に関与するのが主目的でなく、寧ろその大部分は、糖蛋白質に特異的な分子シャペロンとして細胞質で働いていることが判明した。小胞体内腔においてはカルネキシンなど糖蛋白質に対するシャペロン分子は存在するが、細胞質では、Fbs1 が初めてである。なぜニューロンにおいてこのような特殊なシャペロン分子を造成したかは、大きな謎であるが、その説明は、運動ニューロン疾患を含む神経変性疾患の発症機構解明に大きなヒントを与えると思われる。

E. 結論

ALS について：Dorfin の強制発現により、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長させえたが、その効果は十分でなかった。Dorfin の変異 SOD1 結合部位と CHIP の U-Box を融させたキメラ E3 タンパク質は Dorfin に比較して安定で、E3 活性の強いキメラタンパク質が得られ、変異 SOD1 による細胞毒性も改善した。

SBMA について：分子シャペロンを介した治療法は SBMA の病態抑止療法として有望である。すでにマウスモデルで有効性が示されている leuprorelin については第Ⅱ相臨床試験でも有効性が示唆されており、今後第Ⅲ相臨床試験での検証が期待される。陰囊皮膚免疫染色は SBMA のバイオマーカーとして今後臨床試験における surrogate endpoint としての有用性の検証が期待される。

運動ニューロン変性とユビキチンシステムについて：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、キトビオース（蛋白質の Asp 残基に結合する GlcNAc-GlcNAc 糖）や RNase が結合した SCF^{Fbs1} の X 線結晶解析による立体構造解析に成功し、原子レベルで標的（糖蛋白質）の識別機構を解明した。さらにニューロン特異的な Fbs1 が SCF^{Fbs1} リガーゼとしての役割以外に糖蛋白質のための分子シャペロンとして機能していることを初めて見出した。この成果は、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得ることが出来ると期待できる。

また、本研究では変異導入によるプロテアソームの活性低下モデルの作製に取り組んだ。立体構造から予測した触媒活性部位近辺のアミノ酸を構造の異なる種々のアミノ酸に置換することにより、プロテアソームの Caspase 様活性および trypsin 様活性には全く影響せず、最も重要な Chymotrypsin 様活性のみを選択的に 25-50%程度に低下させた変異型プロテアソームを出芽酵母で作製することに成功した。現在、この変異を導入した条件的ノックインマウスを作製中である。すでに変異導入型 ES 細胞の取得に成功、現在、ヘテロマウスの作製に取り組んでいる。このプロジェクトは、プロテアソームがなぜ3種の異なった活性を持っているのかという基本的な命題に答えることができるのみならずプロテアソームの機能低下が神経変性疾患の発症にどのように関係するかについての個体レベルでの解析が初めて可能になる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular targeted therapy against disease-causing protein. *J Mol Med*, in press, (2006).

Katsuno, M., Adachi, H., Waza, M., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Pathogenesis, animal models and therapeutics in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Exp. Neurol.* in press (2006).

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K.

Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature*, in press (2006).

Banno, H., Adachi, H., Katsuno, M., Suzuki, K., Atsuta, N., Watanabe, H., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: A pathogenic marker. *Ann. Neurol.* 59, 520-526 (2006).

Matsumoto, A., Okada, Y., Nakamichi, M., Nakamura, M., Toyama, Y., Sobue, G., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., Okano, H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J. Neurosci. Res.* 83, 119-33 (2006).

Kawahara, Y., Sun, H., Ito, K., Hideyama, T., Aoki, M., Sobue, G., Tsuji, S. & Kwak, S. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci. Res.* 54, 11-4 (2006).

Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. 14-3-3 η is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J* 25: 211-221 (2006).

Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K. Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem* 281: 3204-9 (2006).

Kumanomidou, T., Mizushima, T., Komatsu, M., Suzuki, A., Tanida, I., Sou, Y., Ueno, T., Kominami, E., Tanaka, K., and Yamane, T. The Crystal Structure of Human Atg4b, a Processing and Deconjugating Enzyme for Autophagosome-forming Modifiers. *J Mol Biol* 355: 612-618 (2006).

Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., and Kominami, K. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol Chem* 281: 4035-4041 (2006).

Katsuno, M., Sang, C., Adachi, H.,

Minamiyama, M., Waza, M., Tanaka, F., Doyu, M. & Sobue, G. Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 16801-16806 (2005).

Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Tanaka, F., Inukai, A., Doyu, M. & Sobue, G. 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nature. Med.* 11, 1088-1095 (2005).

Jiang, Y.M., 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. Gene expression profile of motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 57, 236-251 (2005).

Matsuda, N., Azuma, K., Saijo, M., Iemura, S.-I., Hioki, Y., Natsume, T., Chiba, T., Tanaka, K. and Tanaka, K. DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex. *DNA Repair* 4: 537-45 (2005).

Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. *EMBO Rep* 6: 239-244 (2005).

Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K, and Nukina N. Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* 280: 11635-11640 (2005).

Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., Tanaka, K., and Hanaoka, F. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121: 387-400 (2005).

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Murata,

S., Tanida, I., Ezaki, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425-434 (2005).

Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem* 94: 1254-1263 (2005).

Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437: 1381-1385 (2005).

2. 学会発表

Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Tanaka F, Doyu M, and Sobue G. Gordon Research Conference. Jul 24-29, 2005, Boston, USA.

Yoshida, Y., Mizushima, T., and Tanaka, K. : Recognition of glycosylated substrates by SCFFbs ubiquitin ligases. Keystone Symposia Meeting entitled "Ubiquitin and Signaling" Feb 22 - Feb 27, 2005, Taos, USA
Keiji Tanaka : Structure, Function, and Assembly of Mammalian Proteasomes. The 6th Workshop on Proteasomes. April 24-26, 2005, Clermont-Ferrand (France)

Keiji Tanaka : Uncovering the mystery of the ubiquitin-proteasome system . The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (plenary lecture) October 17-18, 2005. Seoul, Korea

Keiji Tanaka : A multistep-ordered Mechanism for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . International Symposium on "Life of Proteins" AWAJI YUMEBUTAI (October 30-November 3, 2005. Awaji

Keiji Tanaka : Structure, Assembly and Functions of Mammalian Proteasomes. 2nd Meeting of Bone Biology Forum. November 18-19, 2005, Mishima

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」2005年2月23日出願(特願2005-47826)

2. 実用新案登録
なし

II. 分担研究報告

Dorfin-CHIP 融合タンパク質による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療

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 我々が同定した新規ユビキチンリガーゼ (E3) である Dorfin は、*in vitro* において変異 SOD1 を特異的に認識し、神経細胞保護活性を有している。Dorfin トランスジェニック (Tg) マウスとの交配により変異 SOD1-Tg マウスの生存期間が延長したが、Dorfin の *in vivo* における半減期が極めて短いことからその治療効果は十分でない。本研究において、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しつつ、より安定して高発現する人工 E3 を作成するために、CHIP (Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein) と Dorfin の基質結合部位を融合したキメラタンパク質を開発した。Dorfin キメラタンパク質は、より高い変異 SOD1 特異的 E3 活性と神経毒性軽減作用を有しており、変異 SOD1 に伴う ALS の治療に有望と思われる。

A. 研究目的

SOD1 変異を伴う家族性 ALS において、運動ニューロンが選択的に障害される機序の詳細はいまだ不明であるが、SOD1 の活性低下によるものではなく、変異 SOD1 が運動ニューロンに対する毒性機能を発揮する (gain of toxic function) ことが原因と考えられている。ALS モデル動物である変異 SOD1-Tg マウスにおいても、変異 SOD1 が進行性に病変部位に蓄積することが知られている。従って、変異 SOD1 タンパク質を減少させることが ALS 治療のために重要であり、近年 RNA 干渉を用いた SOD1 タンパク質のノックダウンなど新たな治療法が開発されてきている。SOD1 は欠損しても、個体の正常な発生および成長に問題は生じないが、SOD1 ノックアウトマウスでは軸索切断に対する運動ニューロンの脆弱性が増強することが知られており、変異 SOD1 のみを特異的に減少させることが治療法確立のためには必要である。

Dorfin はヒト脊髄より我々がクローニングした RING-finger / IBR ドメインを有する新規 E3 であり、培養細胞を用いた実験では、変異 SOD1 を特異的にユビキチン化してプロテアソームによる分解を促進し、神経細胞死を抑制する活性を有している。こ

の Dorfin を導入した Tg マウスと交配することで、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長させることを我々は確認したが、Dorfin の *in vivo* における半減期が極めて短いことからその効果は十分でない (図 1)。

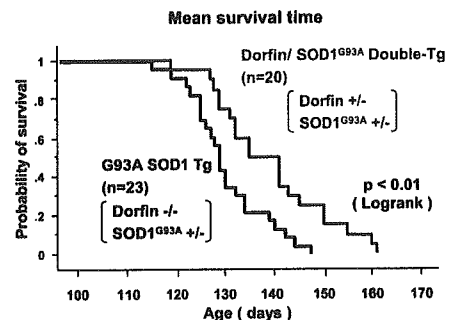


図 1 Dorfin-Tg マウスによる ALS 治療効果

そこで本研究においては、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しながら、より安定して高発現する人工 E3 を CHIP (Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein) と Dorfin の基質結合部位を融合することにより開発し、変異 SOD1 の半減期や毒性に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

(1) Dorfin-CHIP キメラタンパク質発現コンストラクトの作成および培養細胞における発現解析

Dorfin の一部分のみを発現するベクター (Dorfin mutants) を作成し、Dorfin mutants を種々の変異 SOD1 発現ベクターと培養神経細胞に共発現させ、免疫沈降法を用いて変異 SOD1 と結合する Dorfin のドメインを同定した。同定した Dorfin の変異 SOD1 認識部位である C 末側部分と、強力なタンパク質品質管理活性を有する CHIP の E3 活性を有する U-Box 部位を様々な組み合わせで融合した種々の Dorfin キメラタンパク質を発現するコンストラクトを作成した (図 2)。

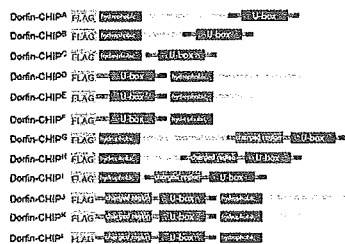


図 2 Dorfin-CHIP (Carboxyl Terminus of Hsc70-Interacting Protein) 融合タンパク質 (キメラタンパク質) 発現コンストラクト

作成した Dorfin キメラタンパク質を、培養神経細胞株 Neuro2a に導入し、各キメラタンパク質の発現レベルや安定性をウェスタンブロット、cycloheximide chase 法、pulse chase 法などを用いて解析した。

(2) Dorfin キメラタンパク質が変異 SOD1 の発現量、ユビキチン化、毒性などに及ぼす影響の解析

各 Dorfin キメラタンパク質を、変異 SOD1 とともに Neuro2a に共発現し、各キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合の強さや変異 SOD1 のユビキチン化の程度を検討した。さらに、Dorfin キメラタンパク質が変異 SOD1 の半減期に及ぼす影響を、cycloheximide chase 法および pulse chase 法を用いて解析した。Dorfin キメラタンパク質を変異 SOD1 と共発現させた時の神経細胞 viability の改善効果を、MTT アッセイにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は商業ベースの培養細胞株を用いた in vitro 研究であり、特に倫理的問題はない。

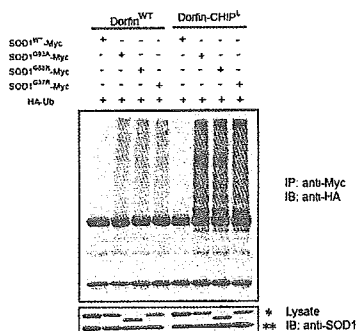
C. 研究結果

作成した各種 Dorfin キメラタンパク質はいずれも野生型 Dorfin に比較して培養細胞において高発現した。Dorfin キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合を検討した結果、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有するキメラタンパク質 (D, E, F, J, K, L) において、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を N 末側に持つキメラタンパク質よりも強い変異 SOD1 結合能を有していた。いずれのキメラタンパク質も、野生型 Dorfin に比べて培養細胞内での半減期は長く、安定した高発現が得られた。

Dorfin キメラタンパク質、変異 SOD1、ユビキチンを培養細胞に導入し、in vivo ユビキチン化アッセイを行い検討した結果、いずれのキメラタンパク質においても E3 活性を認めたが、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有するキメラタンパク質の場合に、より強い変異 SOD1 ユビキチン化活性を認めた。さらに、CHIP の U-Box 部位に隣接した charged region を含む (J, K, L) キメラタンパク質で、変異 SOD1 のユビキチン化活性が増強した。Dorfin キメラタンパク質による変異 SOD1 のユビキチン化の強さは、キメラタンパク質と変異 SOD1 の結合の強さに比例していた。

Dorfin キメラタンパク質の中では、キメラタンパク質 L で、野生型 Dorfin よりも強いユビキチン化活性が観察された (図 3A)。さらに、変異 SOD1 の半減期に対するキメラタンパク質共発現の効果を検討したところ、キメラタンパク質 L は野生型 Dorfin に比べ、変異 SOD1 の分解をより促進した (図 3B)。MTT アッセイにより、Dorfin キメラタンパク質の Neuro2a 培養神経細胞に対する変異 SOD1 の毒性抑制効果を解析した結果、野生型 Dorfin に比較して強い変異 SOD1 ユビキチン化活性を有するキメラタンパク質 L においてのみ、野生型 Dorfin よりも優れた毒性抑制効果が認められた (図 4)。

A



B

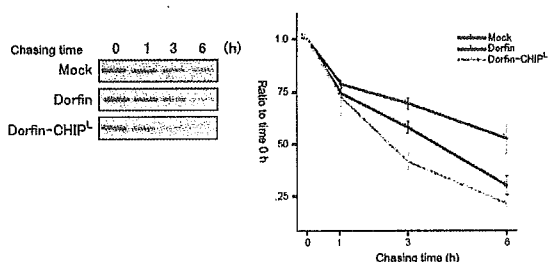


図3 A. Dorfin-CHIP^Lは、野生型 Dorfin よりも強く様々な変異 SOD1 をユビキチン化する B. Dorfin-CHIP^Lは、野生型 Dorfin に比較して変異 SOD1 の分解をより促進する

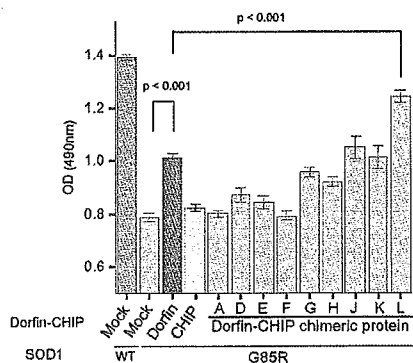


図4 Dorfin-CHIP^Lは、Dorfin よりも効果的に変異 SOD1 の細胞毒性を軽減させる

D. 考察

野生型 Dorfin の導入により ALS モデル動物である変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長しうるが、

その効果は十分でない。その理由として、野生型 Dorfin は *in vivo* において半減期が極めて短く、Tg マウスにおいて十分な高発現を長期間維持することが難しいことが考えられる。従って、本研究において我々は、Dorfin のこの欠点を克服し、変異 SOD1 による ALS 治療効果を高めるために、Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保持しつつ、より安定して発現する人工 E3 の開発を試みた。Dorfin の C 末側にある hydrophobic cluster が変異 SOD1 結合ドメインであることを同定し、強力な E3 活性を有するタンパク質品質管理 E3 である CHIP のユビキチン化活性部位と融合した。変異 SOD1 に対する結合力が強く、十分な E3 活性を保持するためには、CHIP の U-Box 部位を N 末に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末側に有する必要があった。野生型 Dorfin もユビキチン化部位である RING-finger/IBR ドメインを N 末に有するため、N 末側に E3 活性部位、C 末側に基質結合部位を有する構造が、変異 SOD1 特異的 E3 として機能するコンフォメーションをとるために重要であることが示唆された。

本研究により野生型 Dorfin に比べ、より強力な変異 SOD1 ユビキチン化・分解促進活性を有し、安定して発現するキメラタンパク質 L が得られた。キメラタンパク質 L は、Neuro2a に対する変異 SOD1 の毒性軽減効果も野生型 Dorfin に比較して強く、このキメラタンパク質を導入することで、変異 SOD1-Tg マウスの治療効果が野生型 Dorfin を導入した場合よりも高まることが期待できる。遺伝子工学的手法を用いて、神経変性疾患の原因となる異常タンパク質をより強力に分解する人工タンパク質を開発する手法は、ALS のみならず、パーキンソン病やアルツハイマー病などの異常タンパク質蓄積により生ずる神経変性疾患の治療戦略として今後有望であると思われる。

E. 結論

- (1) Dorfin の強制発現により、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長させえたが、その効果は十分でなかった。Dorfin は生体内で半減期が短く、Tg マウスでの高レベルの発現が難しいことが考えられた。
- (2) Dorfin の欠点を克服するために、Dorfin の変

異SOD1結合部位とCHIPのU-Boxを融させたキメラE3タンパク質の作成を試みた。Dorfinに比較して安定で、E3活性の強いキメラタンパク質が得られ、変異SOD1による細胞毒性も改善しえた。

(3) 今後、DorfinキメラE3を高発現するTgマウスを作成し、変異SOD1-Tgマウスの治療効果を検討したい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. Katsuno M, Adachi H, Waza M, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2006) Pathogenesis, animal models and therapeutics in Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Exp Neurol.* in press.

2. Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: A pathogenic marker. (2006) *Ann Neurol.* 59:520-6.

3. Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:16801-6.

4. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Tanaka F, Inukai A, Doyu M, Sobue G. 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. (2005) *Nat Med.* 11:1088-95.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

蛋白質分解系の破綻による運動ニューロン疾患の発症機構解明

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監視機構を蛋白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、われわれが発見した N-結合型糖蛋白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^{Fbs1} を中心に解析した。とくに SCF^{Fbs1} の構造生物学的研究によって標的識別の分子機構を解明すると共に、Fbs1 がニューロン内では、SCF^{Fbs1} リガーゼとして機能する以外に、糖蛋白質に特異的な分子シャペロン作用を持つという新しい知見を得た。また運動ニューロン疾患を含めて多くの神経変性疾患の患者脳では、プロテアソームの機能異常が報告されているが、その実体は全く不明である。そこで本研究では、神経変性疾患におけるプロテアソームの役割の解明を個体レベルで解析するために変異導入によるプロテアソームの活性低下モデルの作製を行った。現在、異常蛋白質の蓄積によるプロテアソームの機能阻害が ERAD 活性の低下を導き、その結果、過剰な小胞体ストレスに適切に対応できないことが、ニューロン死ひいては神経変性疾患発症の主たる原因とする仮説が主流であるが、本研究はこの仮説に真正面から挑む野心的な研究である。上記二つの研究は、表裏の関係で深く結びついており、今後、運動ニューロン疾患との関わりについて検討していく計画である。

A. 研究目的

生物は遺伝子変異や環境汚染などによりしばしば蛋白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神経変性に陥る。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、細胞内の蛋白質の品質管理、特に立体構造の正常と異常を区別して、損傷蛋白質を選択的に分解して除去する機構の破綻が示唆されている。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蛋白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 N 型糖蛋白質を特異的に標的とするユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs1} を発見した。そして、SCF^{Fbs1} 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。Fbs1 分子は少なくとも 5 個の分子種からなるファミリーを構成しているが、Fbs1 のみがニューロンに特異的に発現している。Fbs2 を含むほかの分子はユビキタスに発現しているが、その発現場所の違いの意味は不明である。この解明の謎に迫ることは、非常に重要な課題である。

ユビキチン/プロテアソームシステムにおいて、蛋白質分解の役割を担うプロテアソームはおおよそ 80 のサブユニットから構成される非常に巨大で複雑な複合体プロテアーゼであり、大きく触媒部位と制御部位の二つの複合体の会合からなる。プロテアーゼ活性を担う触媒部位は 20S プロテアソームと呼ばれ、樽状でその内腔にペプチターゼ活性を持つが、単独では基質の入口が閉じた状態にあり、蛋白質分解活性を持

たない。この 20S の両端に 19S と呼ばれる制御因子が結合すると、入口が開くとともに、19S により蛋白質の立体構造が解きほぐされ、蛋白質の分解が可能となる。19S はポリユビキチン化蛋白質の認識、補捉にも重要な役割を果たす。

20S プロテアソームは、それぞれ 7 種の異なるサブユニットからなる α リングと β リングが $\alpha \beta \beta \alpha$ の順で会合している直径 11nm, 全長 15nm の巨大な円筒形粒子である。この複合体は触媒活性部位にスレオニン残基を有するスレオニンプロテアーゼである。真核生物において触媒活性を持つのは $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ サブユニットである(5)。20S プロテアソームの特筆すべき特徴として、活性中心が 2 つの β リングにより形成される空洞内表面に限局されていること、基質蛋白質の通り道となる α リングの入口が α サブユニットの N 末端により閉鎖されていることが挙げられる。このような構造的特徴によりプロテアソームは周りの蛋白質を手当たり次第に分解するのではなく、ユビキチンシステムおよび 19S 複合体により高度に制御された蛋白質分解を担う。

20S プロテアソームは、疎水性、塩基性、酸性アミノ酸のいずれの C 末端側のペプチド結合も分解することができ、それぞれ Chymotrypsin 様、Trypsin 様、Caspase 様活性と呼ばれている。これらの活性は、それぞれ $\beta 5$, $\beta 2$, $\beta 1$ が担っていることがわかっている。酵母および哺乳類 20S プロテアソームの結晶構造解析の結果から、 β サブユニットの基質特異性を決定しているのが、S1 ポケットと呼ばれる部位にあることが分かった(5)。Caspase 様活性を持つ $\beta 1$ は 4 5 番目に塩基性アミノ酸であるアルギニンがあることにより、酸性アミノ酸に対して基質特異性を発揮する。Trypsin 様活性を持つ $\beta 2$ は 5 3 番目に酸性アミノ酸であるグルタミン酸があることにより塩基性アミノ酸に対する基質特異性を示す。Chymotrypsin 様活性を担う $\beta 5$ サブユニットの S1 ポケットは、ほぼ全てが疎水性アミノ酸から構成されており、疎水性相互作用により疎水性アミノ酸に対して基質特異性を有すると予想される。

そこで、本年は、最も重要な機能を有する Chymotrypsin 様活性に注目し、その触媒部位近傍のアミノ酸置換により Trypsin

様活性と Caspase 様活性に影響せず、Chymotrypsin 様活性を特異的に低下させるモデル生物の作製を計画した。

B. 研究方法

「プロジェクト I : SCF^{Fbs1} リガーゼの分子構造と作用機構の解明」

1) 生化学的方法：リコンビナント蛋白質は、大腸菌あるいは昆虫細胞系で発現・精製した。これらを用いてインビトロのユビキチン化アッセイ系を構築し、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) 構造生物学的方法：目的蛋白質を大腸菌で大量に発現させた後、単一標品に精製した。精製蛋白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) 細胞生物学的方法：哺乳動物の発現ベクターに目的蛋白質をコードした cDNA を組み込み細胞内に導入した後、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蛋白質の発現を抑制し loss-of-function の表現型 (細胞に与える影響) を観察した。

「プロジェクト II : 変異導入によるプロテアソームの活性低下モデルの作製」

1) 酵母発現ベクターと変異型 β サブユニット発現ベクターの作製：pRS316, pRS315 ベクターの EcoRI-XhoI 間に、 $\beta 5$ (PRE2) の開始コドン約 1500bp 上流から終止コドン約 500bp 下流まで、ゲノムより PCR 法で増幅させた遺伝子を挿入した。pRS315- β subunit 発現ベクターに、Quick-change Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて 1 アミノ酸置換を起こさせた。得られたベクターに目的の変異が挿入されているかどうかは、シークエンス反応によって確認した。

2) 形質転換体酵母株の作製：4ml YPD 液体培地で培養した片方の $\beta 5$ が破壊された 2 倍体株を回収後、WT の β subunit を発現する pRS316 ベクターを Transform し、SD(-Ura)Plate に蒔いた。2-3 日後、生えてきた colony から 5 つを選び、SD(-Ura)Plate に植え継いだ。得られた形質転換体を減数