

200500792 B

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 15 年度～17 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 18 (2006) 年 3 月

# 目次

## I. 総合研究報告

### 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. 運動ニューロン疾患の病態に基いた治療法の開発

道勇 学 . . . 15

### 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 . . . 19

III. 研究成果の刊行に関する一覧 . . . . . 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 33

# I. 総合研究報告

## 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

Dorfin は筋萎縮性側索硬化症（ALS）の脊髄運動ニューロン内ユビキチン化封入体に局在し、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ユビキチンリガーゼである。Dorfin を発現するトランスジェニックマウスと、変異 SOD1 マウスと交配した結果、変異 SOD1 マウスの生存期間を延長しえた。Dorfin の治療効果をさらに増強するために、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。さらに、高感度マスペクトロメーターを駆使したハイループト・プロテオミクス解析を行い、Dorfin と相互作用するタンパク質として VCP/p97 を同定した。

#### 2) SBMA

SBMA の病態に基づく治療法として酪酸ナトリウム（SB）、17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin（17-AAG）、および 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 アンログ（leuprorelin）につき、SBMA 患者を対象とする第Ⅱ相臨床試験を実施した。さらに、患者中枢神経系および陰囊皮膚の病理学的解析を行った。SB はヒストンのアセチル化を亢進することにより、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、また 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、それぞれ治療効果を発揮した。臨床第Ⅱ相試験において Leuprorelin は陰囊皮膚における変異 AR 核内集積を抑制し、嚥下機能を改善した。また、陰囊皮膚における変異 AR の核内集積は、脊髄運動ニューロンにおける集積と相関する傾向を示し、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病の原因を解明し、その治療法の開発を目指した。本研究では、サイトゾル（細胞質）での蛋白質の品質管理に関与する CHIP（シャペロン依存型ユビキチンリガーゼ）と小胞体における異常蛋白質の廃棄（ERAD: 小胞体関連分解）に関与する SCFFbs（糖鎖を認識するユビキチンリガーゼ）について分子から個体レベルでの解析を行い、これらの酵素が蛋白質の品質管理に果たす役割を解明した。とくに SCFFbs1 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、SCFFbs1 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。さらにオートファジー（自食作用）も蛋白質の品質管理に関与することを発見し、細胞内の品質管理には、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系が連携していることを世界で初めて証明した。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。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。そこで我々は、Dorfin を発現する Tg マウスを作出して ALS モデル動物である変異 SOD1-Tg マウスと交配することで、Dorfin による ALS 治療を試みた。ALS 脊髄運動ニューロン内に認められるユビキチン化封入体に、孤発性か家族性かを問わず Dorfin が局在していることから、Dorfin は孤発性 ALS においても蓄積している異常タンパク質のユビキチン化を行っていると考えることができ、Dorfin の E3 活性増強は、孤発性 ALS の治療にも有用であると思われる。そこで、Dorfin の E3 活性を増強した人工 E3 タンパク質の開発と、高感度マス

スペクトロメーターによる大規模ハイスループット・プロテオミクス解析を用いた Dorfin の E3 活性を制御する分子の探索同定を行った。

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）はアンドロゲン受容体（AR）の CAG 繰り返し配列の異常延長を原因とする成人発症の運動ニューロン疾患であり、同時に Huntington 病や脊髄小脳変性症失調症と並ぶポリグルタミン病でもある。その分子病態については、病因タンパク質である変異 AR タンパク質がリガンドであるテストステロン依存性に核内に集積し、ヒストンのアセチル化を阻害することなどにより転写障害を惹起することが病態の中核をなすと考えられている。酪酸ナトリウム（SB）などのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤はヒストンのアセチル化を促進し、細胞の転写機能を改善することが知られている。また、分子シャペロンである熱ショックタンパク質（HSP）は、変異タンパク質の凝集を阻害し、分解を促進することで、ポリグルタミン病の病態に防御的に働くとの知見が得られている。本研究では、転写機能と HSP に注目した治療法の開発を行った。SBMA における転写障害に対する治療法として SB を、また HSP を介した治療法として Hsp90 阻害剤である 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)、および HSP 誘導剤である geranylgeranylacetone (GGA) をそれぞれ SBMA マウスモデルに投与し、有効性と安全性とを検討した。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。

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受し恒常性の破綻をきたす。運動ニューロンの恒常性維持（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解明と治療法開発を目指した。特にニューロン変性疾患の患者の病変部の病理所見においてしばしば観察されている抗ユビキチン抗体陽性の蛋白質凝集体（封入体）の形成は、ユビキチン代謝系の破綻が深く関与している。従って、この封入体形成機構と処理機構の解明は、運動ニューロン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。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。また、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) の役割も注目されている。特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 SCFFbs1 を発見した。そして、SCFFbs1 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。以上のように、本研究においては、プロテアソーム系、とリソソーム系という二種の異常蛋白質処理の分子機構を解明することにより、運動ニューロン疾患の発症機構解明を目指した。

## B. 研究方法

Dorfin-Tg マウスの作出: pCAGGS ベクターを用いて chicken b-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った。導入遺伝子の発現の確認を RT-PCR, ウェスタンブロット, 免疫組織化学により行った。

Dorfin による mSOD1-Tg マウスの治療: mSOD1-Tg マウスとして、B6SJL-TgN (SOD1-G93A)1Gur (Jackson Laboratory) を用いた。mSOD1-Tg マウス雄と Dorfin-Tg マウス雌を交配し、mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作出した。各週齢ごとに mSOD1/Dorfin-Tg マウスの臨床症状の観察、体重測定、行動・運動解析 (Rotarod, cage activity) を、mSOD1-Tg マウスと比較しながら行った。また、Tg マウス組織より RNA, DNA, タンパク質の抽出を行い、分子生物学的解析や免疫組織化学的解析を行った。

Dorfin 結合タンパク質の同定: 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マスプロメーターにより解析した。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。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。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。

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 マウスモデルにおける SB の効果: 2、4、8、16g/l の濃度で SB 水溶液を調整し、給水瓶により 5 週齢からマウスに *ad libitum* で経口投与した。マウスの症状は Rotarod や cage activity による運動機能測定や、体重、生存期間の測定を行い評価した。ヒストンのアセチル化はアセチル化ヒストンに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学およびウェスタンブロットにより解析した。

SBMA モデルマウスにおける 17-AAG および GGA の効果: 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組織に対し、抗ポリグルタミン抗体を用いた免疫組織化学を行った。脊髄および陰嚢皮膚の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ともに比較検討した。

SCFFbs1 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  $\beta$  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- $\beta$  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。

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  $\beta$  subunit を発現する pRS316 ベクターを Transform し、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  $\beta$  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  $\beta$  subunit を組み込んだプラスミドを導入し、pRS316- $\beta$  5 WT を持たず pRS315 ベクターに WT もしくは変異型  $\beta$  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  $\beta$  5 (Psm5) 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  $\beta$  5 cDNA 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  $\beta$  5 cDNA 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' 側相同部位との間に exon2, exon3 の  $\beta$  5 cDNA 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' 側相同部位の下流にサブクローニングした。

蛋白質の品質管理機構の解明：定法に従ってストレートに遺伝子改変 (ノックアウト) マウスを作製した他、目的遺伝子に "lox" を挿入して標的遺伝子の発現を "on-off" に調節できるコンディショナル (条件的) ノックアウトマウスも作製した。

(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 による mSOD1-Tg マウスの治療 : Dorfin-Tg マウスが 5 系統得られ、そのうち比較的高コピー数で導入された Tg マウスが 2 系統得られた。RT-PCR による検討で、脳および脊髄において Dorfin 導入遺伝子の高発現が確認された。Dorfin-Tg マウスにおいては、運動機能や病理組織所見に悪影響は見られなかった。変異 SOD1/Dorfin ダブル Tg マウスにおいて、変異 SOD1-Tg マウスの罹病期間および生存期間が延長した。変異 SOD1-Tg マウス脊髄前角においては、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が、変異 SOD1/Dorfin ダブル Tg マウスでは、SOD1 およびユビキチン蓄積の軽減が観察された。

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 活性を認めしたが、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

Dorfin 結合タンパク質の同定 : Dorfin 結合タンパク質として 6 つの候補蛋白質が得られたが、この中から不要タンパク質の小胞体関連分解 (ERAD) など多くの細胞機能を担っている VCP (valosin-containing protein)/p97 が同定された。マウス脳 lysate を用いた glycerol gradient fraction analysis から、内在性 Dorfin は VCP/p97 と同じ分子量約 400-600kD の複合体中に存在し、内在性 Dorfin が内在性 VCP/p97 と結合していることが明らかとなった。ドミナントネガティブ型 VCP を用いた実験により、VCP/p97 が Dorfin の変異 SOD1 ユビキチン化活性に必要であることが判明した。

SBMA のモデルに対する SB の治療効果 : SB 4g/l の投与により、運動機能の発症が有意に遅延し、症状の進行も抑制された。また脊髄前根の軸索萎縮や神経原性筋萎縮などの病理所見にも有意な改善が認められた。8g/l では発症の遅延はみられたものの運動機能障害の進行は抑制されなかった。より低い濃度 (2g/l) や高い濃度 (16g/l) では運動機能改善効果は乏しかった。16g/l の投与ではむしろ生存期間の短縮傾向が認められた。ヒストン H3 のアセチル化は野生型に比べ Tg において有意に低下しており、SB の投与により用量依存性に増加した。SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化は認められなかった。



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のタンパク量減少効果を認められたが、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法によりタンパク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<sup>-9</sup>M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、GGA0.5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のタンパク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タンパクの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leurprorelinの臨床第II相試験：50例のSBMA患者を登録し、leurprorelin群25例、placebo群25例に無作為化割り付けを行った。leurprorelin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。Lourprorelin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leurprorelin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様であった。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、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。一方、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。

SCFFbs1リガーゼの分子構造と作用機構の解明：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 SCFFbs1 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、SCFFbs1 と同様に、SCFFbs2 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。Fbs1 の糖鎖結合ドメイン(SBD)の立体構造は 10 本の逆平行  $\beta$  構造が二層に重なった  $\beta$  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<sub>6</sub>-4GlcNAc) を認識し結合している。レクチンの立体構造として  $\beta$  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  $\beta$  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、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をすることなく、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し、SCFFbs1 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 SCFFbs1 全体の構造解析にも成功した。この結果、SCFFbs1 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: マウスを用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が、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  $\beta$  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。

蛋白質の品質管理機構の解明：品質管理ユビキチンリガーゼ(CHIP)は Hsp70 や Hsp90 と会合し、これらの分子シャペロンが捕捉した変性蛋白質を選択的にユビキチン化するリガーゼである。Hsp70 の作用には Hsp40 のようなコシャペロンが必要であるが、われわれはニューロン特異的な Hsj-1(DnaJ ドメインを有し Hsp70 と相互作用することができるコシャペロン)を CHIP の新規パートナー分子として同定した。また CHIP が DRiPs(フォールディングに失敗した蛋白質の急速分解)に関係していることも突き止めた。DRiPs 経路の損傷は、細胞内に異常蛋白質の蓄積を誘発する可能性が予想されるので、この分解系に関わるユビキチンリガーゼの同定は、非常に重要であった。さらに CHIP のノックアウトマウスを作製した結果、CHIP 欠損マウスは失調性歩行異常の症状を呈し神経細胞の機能異常が示唆された。一方、Northern-blot 及び Western-blot 分析から CHIP と Hsj-1 が、運動ニューロンを含む種々のニューロンに高発現していることも見出した。したがって CHIP はニューロン細胞の健康を守るユビキチンリガーゼとして生理的に極めて重要であることが示唆された。

一方、オートファジーはオートファゴソーム(自食胞：細胞成分を取り込んだ二重膜小胞)による標的成分の取り囲みの形成機構であり、その後リソソーム/液胞と融合して内容物を分解する細胞内の蛋白質分解機構である。近年、異常オートファジーが多くの神経変性疾患やミオパチー患者の変性組織部位の病理像の形態学的観察から報告されており、オートファジーの異常あるいは亢進がこれらの疾患の発症機構に関与する可能性が示唆されている。しかしこれまで、高等動物でのオートファジーを分子レベルで解析する実験系は皆無であった。最近、オートファゴソーム形成に関する Atg(autophagy)システムが発見され、注目されている。これは Atg8 と Atg12 をモディファイヤーとする翻訳後修飾機構であり、オートファゴソーム(自食胞)の膜形成に必須なユビキチン化類似のモディファイヤーシステムである。そこで本年、われわれは、この二つの Atg システムの共通の活性化因子 Atg7 の条件的ノックアウトマウスを作製した。そして肝臓でオートファジーを完全に欠損させると、顕著な肝臓の肥大と肝炎を引き起こすのみならず、ユビキチン化蛋白質の凝集体が細胞内に大量に集積するという驚くべ

き結果を得た。このことは、オートファジー依存性の蛋白質分解系が非分裂細胞であるニューロンにおいてもユビキチン代謝関連の蛋白質の品質管理システムにおいて大きな役割を果たしていることを示唆している。

#### D. 考察

ALS について：本研究から、Dorfin の発現が変異 SOD1 による運動ニューロン障害の治療に *in vivo* で有効であることが示された。これまでに、抗アポトーシスタンパク質の発現やカスパーゼ阻害剤の投与による変異 SOD1-Tg マウス治療の試みが行われ、ある程度の有効性が示されてきた。病因タンパク質に対する E3 を発現することにより病因タンパク質そのものを減少させる治療は、変異 SOD1 による運動ニューロン障害カスケードのより上流での病態に基づいた新規治療戦略であると言える。このユビキチン-プロテアソーム系の増強による神経変性疾患の治療戦略は、異常タンパク質の蓄積が原因となる ALS 以外のさまざまな神経変性疾患の治療においても今後ますます重要な方法論になろう。また、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と期待される。

SBMA について：SBMA の病態に基づく治療法開発を行い、臨床応用可能な治療薬の候補を複数得た。GGA は消化性潰瘍治療薬として臨床で使用されており、また SB と 17-AAG はすでに悪性腫瘍に対する臨床試験が進行していることから、今後 SBMA に対する多剤併用療法の一部を担う薬剤として有望であると考えられる。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や HSP 発現誘導は、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。Laurprorelin 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 Laurprorelin 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 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

SCFFbs1 とユビキタスに発現している普遍的 SCFFbs2 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 SCFFbs1 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 SCFFbs1 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。

非分裂細胞における異常蛋白質の廃棄処理に、ユビキチン・プロテアソーム系（選択的蛋白質分解機構）とオートファジー・リソソーム系（非選択的蛋白質分解機構）が協同で作用していることが判明した。すなわち、細胞内で発生した多くの異常蛋白質は、ユビキチン・プロテアソーム系のみならずオートファジー・リソソーム系によっても処理されることが明らかとなった。

#### 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。Dorfin の結合タンパク質として VCP/p97 を同定した。

SBMA について：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による治療法および分子シャペロン

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。陰嚢皮膚免疫染色は 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<sup>Fbs1</sup> とユビキタスに発現している普遍的 SCF<sup>Fbs2</sup> を発見した。そして、キトビオース（タンパク質の Asp 残基に結合する GlcNAc-GlcNAc 糖）や RNase が結合した SCF<sup>Fbs1</sup> 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（糖タンパク質）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<sup>Fbs1</sup> リガーゼとしての役割以外に糖タンパク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。また、非分裂細胞における異常蛋白質の廃棄処理に、ユビキチン・プロテアソーム系（選択的蛋白質分解機構）とオートファジー・リソソーム系（非選択的蛋白質分解機構）が協同で作用していることが判明した。併せて、プロテアソームの活性低下モデルの作製に取り組んだ。

#### 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. 14-3-3his 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).

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

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

Takeuchi, H., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Tanaka, F., Doyu, M., Sobue, G. Dornin 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 (2004).

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

Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Waza, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Tanaka,

F., Doyu, M., Inukai, A., Sobue, G. Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 13: 1183-92 (2004).

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

Katsuno, M., Adachi, H., and Sobue, G.: 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. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 11, 365-170 (2004).

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

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., Angelidis, C., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G.: 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, (2003).

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

Sobue, G., Adachi, H., and Katsuno, M.: 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, (2003).

Hishikawa, N., Niwa, J., Doyu, M., Ito, T., Ishigaki, S., Hashizume, Y., and Sobue, G.: *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: 609-619, (2003).

Ito, T., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Doyu, M., and Sobue, G.: *Dorfin* localizes to lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem.* 278: 29106-29114, (2003).

Ando, Y., Liang, Y., Ishigaki, S., Niwa, J., Jiang, Y., Kobayashi, Y., Yamamoto, M., Doyu, M., and Sobue, G.: 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: 839-846. (2003).

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.* 4: 301-306, (2003).

Tanahashi-Hori, T., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Chiba, T. Conditional knockdown of proteasomes results in cell-cycle arrest and enhanced expression of molecular chaperones Hsp70 and Hsp40 in chicken DT40 cells. *J. Biol. Chem.* 278: 16237-16243, (2003).

Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K., and Tai, T. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J. Biol. Chem.* 278: 43877-43884, (2003).

Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M., and Sato, R. SREBPs are negatively regulated through SUMO-1 modification

independent of the ubiquitin/26S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 278: 16809-16819, (2003).

Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., and Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 11285-11290, (2003).

Kim, S. J., Sung, J. Y., Um, J. W., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., Paik, S. R., Kim, J., and Chung, K. C. *Parkin* cleaves intracellular  $\alpha$ -synuclein's inclusions via the activation of calpain. *J. Biol. Chem.* 278: 41890-41899, (2003).

Kim, M., Tezuka, T., Tanaka, K., and Yamamoto, T. Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation. *Oncogene* 23: 1645-55, (2003).

Araki, K., Kawamura, M., Suzuki, T., Matsuda, N., Kanbe, D., Ishii, K., Ichikawa, T., Kumanishi, T., Chiba, T., Tanaka, K., and Nawa, H. A palmitoylated RING finger ubiquitin ligase and its homologue, both enriched in the brain membranes. *J. Neurochem.* 86: 749-762, (2003).

Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and Tanaka, K. The molecular chaperone Hsp90 interacts with 26S proteasomes and regulates their assembly. *EMBO J.* 22: 3557-3567, (2003).

Ogura, T. and Tanaka, K. Dissecting various ATP-dependent steps in proteasomal degradation. *Mol Cell* 11: 3-5, (2003).

Imai, J., Yashiroda, H., Maruya, M., Yahara, I., and Tanaka, K. Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins. *Cell Cycle* 2: 585-590, (2003).

Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, T., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. E3 ubiquitin-ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418,

438-442 (2002).

## 2. 学会発表

Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Sang, C., Tanaka, F., Doyu, M., 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).

Tanak, K. 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.

Tanak, K. 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.

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

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

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

Tanak, K. The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on "Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases", 2004. 5. 16-21, Jerusalem, Israel.

Tanak, K. Structure, Function, and Assembly of Proteasome Complex. The 21 COE International Symposium on "Molecular Mechanisms of Cell Proliferation and Evolution" ,2004. 10. 31-11-2, Fukuoka.

Tanak, K. Ubiquitin-Proteasome System Normal Function and Outcome of its Dysfunction in Neurodegeneration. 12th International Winter Conference on Neurodegeneration. 2004. 11. 29-12. 2 , Kyoto.

Tanak, K. 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.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G. : HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. Molecular Mechanisms of neurodegeneration (Milan, Italy) May, 2003.

Adachi, H., Katsuno, M., Kobayashi, Y., and Sobue, G. : Widespread distribution of nuclear and cytoplasmic mutant AR protein complex in the nervous system and visceral organs of patients with spinal and bulbar muscular atrophy Gordon Conference on CAG repeat (Il Ciocco, Italy) May, 2003.

Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Kobayashi, Y., and Sobue, G. : Hormonal intervention therapy in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscle atrophy (SBMA). Gordon conference on CAG triplet repeat disorders (Il Ciocco, Italy) May, 2003.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Waza, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai,



A., Doyu, M., and Sobue, G.: Widespread Occurrence of nuclear and cytoplasmic mutant AR accumulation in the neural and nonneural tissues of SBMA patients. 33rd The Society for Neuroscience Annual meeting (New Orleans, USA) Nov, 2003.

Tanak, K. 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」(NIH, USA) Feb, 2003.

Tanak, K. Ubiquitin E3 ligases responsible for the protein quality control in cells. (Clermont-Ferrand, France) Apr, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

「球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤」2002年8月19日出願(特願2002-238599): 審査請求中

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

「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

## 運動ニューロン疾患の病態に基いた治療法の開発

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 Dorfinは孤発性および家族性筋萎縮性側索硬化症（ALS）両方の脊髄運動ニューロン内ユビキチン化封入体に局在し、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。そこで、Dorfinを発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作出し、ALS モデルマウスである変異 SOD1-Tg マウスと交配することによる ALS 治療を試みた結果、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を延長しえた。しかしながら、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まだ十分とは言えず、治療効果をさらに増強するために、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。この中で、Dorfin よりも高い神経毒性軽減作用を持つ人工ユビキチンリガーゼ(E3)が得られ、変異 SOD1 に伴う ALS の治療に有望と思われた。さらに、孤発性 ALS において病態に関わるタンパク質同定のために、高感度マ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って Dorfin と相互作用するタンパク質を探索した結果、タンパク質品質管理に関わることが知られている VCP/p97 を Dorfin の活性制御に重要な分子

### 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增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。そこで我々は、Dorfin を発現する Tg マウスを作出して ALS モデル動物である変異 SOD1-Tg マウスと交配することで、Dorfin による ALS 治療を試みた。

ALS 脊髄運動ニューロン内に認められるユビキチン化封入体に、孤発性か家族性かを問わず Dorfin が局在していることから、Dorfin は孤発性 ALS においても蓄積している異常タンパク質のユビキチン化を行っていると考えることができ、Dorfin の E3 活性増強は、孤発性 ALS の治療にも有用であると思われる。そこで、Dorfin の E3 活性を増強した人工 E3 タンパク質の開発と、高感度マスペクトロメーターによる大規模ハイスループット・プロテオミクス解析を用いた Dorfin の E3 活性を制御する分子の探索同定を行った。

## B. 研究方法

### (1) Dorfin-Tg マウスの開発と変異 SOD1-Tg マウス治療

pCAGGS ベクターを用いて chicken  $\beta$ -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、マイクロインジェクション法により Tg マウスを作製した。変異 SOD1-Tg マウスとして、B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (Jackson Laboratory) を用い、変異 SOD1-Tg マウス雄と Dorfin-Tg マウス雌を交配して変異 SOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作製した。各週齢ごとの臨床症状、体重、行動・運動解析 (Rotarod, cage activity) および病理学的・生化学的解析を変異 SOD1-Tg マウスと比較しながら行った。

### (2) Dorfin-CHIP キメラタンパク質の開発

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キメラ人工タンパク質を発現するコンストラクトを作成した。作成した Dorfin キメラタンパク質を、培養神経細胞株 Neuro2a に導入して発現レベルや安定性を検討し、さらに変異 SOD1 と共発現することで、キメラタンパク質が変異 SOD1 のユビキチン化や半減期、神経細胞毒性に及ぼす影響を解析した。

### (3) 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を用いた同定

HEK293 細胞に FLAG タグ標識 Dorfin を発現し、FLAG 抗体結合ビーズにより Dorfin 結合タンパク質を回収し、高感度マススペクトロメーターにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物 (マウス) の取り扱いにつき名古屋大学動物実験指針にもとづき、動物の苦痛の除去・軽減に注意しつつ実験を行った。

## C. 研究結果

(1) Dorfin-Tg マウスが 5 系統得られ、そのうち比較的高コピー数で導入された Tg マウスが 2 系統得られた。RT-PCR による検討で、脳および脊髄において Dorfin 導入遺伝子の高発現が確認された。

Dorfin-Tg マウスにおいては、運動機能や病理組織所見に悪影響は見られなかった。変異 SOD1/Dorfin ダブル Tg マウスにおいて、変異 SOD1-Tg マウスの罹病期間および生存期間が延長した。変異 SOD1-Tg マウス脊髄前角においては、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が、変異 SOD1/Dorfin ダブル Tg マウスでは、SOD1 およびユビキチン蓄積の軽減が観察された。

(2) Dorfin の *in vivo* における半減期が極めて短いことから、変異 SOD1/Dorfin ダブル Tg マウスにおける ALS 治療効果は十分とは言えないため、Dorfin の安定性の改善と治療効果増強のために、Dorfin-CHIP キメラタンパク質を開発した。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。変異 SOD1 結合能およびユビキチン化活性は、CHIP の U-Box 部位を N 末端側に持ち、Dorfin の変異 SOD1 結合部位を C 末端側に有するキメラタンパク質において増強した。Dorfin-CHIP キメラタンパク質の中で、野生型 Dorfin よりもはるかに優れた神経毒性抑制効果を有する人工タンパク質が一つ得られた。

(3) Dorfin 結合タンパク異質として 6 つの候補蛋白質が得られたが、この中から不要タンパク質の小体関連分解 (ERAD) など多くの細胞機能を担っている VCP (valosin-containing protein)/p97 が同定された。マウス脳 lysate を用いた glycerol gradient fraction analysis から、内在性 Dorfin は VCP/p97 と同じ分子量約 400-600kD の複合体中に存在し、内在性 Dorfin が内在性 VCP/p97 と結合していることが明らかとなった。ドミナントネガティブ型 VCP を用いた実験により、VCP/p97 が Dorfin の変異 SOD1 ユビキチン化活性に必要であることが判明した。

## D. 考察

本研究から、Dorfin の発現が変異 SOD1 による運動ニューロン障害の治療に *in vivo* で有効であることが示された。これまでに、抗アポトーシスタンパク質の発現やカスパーゼ阻害剤の投与による変異 SOD1-Tg マウス治療の試みが行われ、ある程度の有