

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。

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えたが、その効果は臨床応用するにはまだ十分でない。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た。従って、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することにより、野生型 Dorfin に比較してはるかに強力な変異 SOD1 のユビキチン化・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が得られた。このキメラタンパク質は、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、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 ALS 以外の神経変性疾患の治療戦略としても有望であると思われる。

Dorfin の活性に必須の分子として、本研究により VCP/p97 を同定したが、VCP/p97 は最近、パーキンソン病やポリグルタミン病などにおいても重要な役割を果たしていることが報告されている。ALS の病態に VCP/p97 の機能である ERAD がどのように関

連しているのかについては今後さらに研究が必要であるが、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

(1) Dorfin を発現させることにより、変異 SOD1-Tg マウスの生存期間を改善し、脊髄における SOD1 の蓄積を減少できた。

(2) Dorfin-Tg マウスによる治療効果は臨床応用するにはまだ十分とは言えないが、Dorfin の生体内での半減期が短いために高レベルの発現が難しいことが考えられた。Dorfin のこ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 部位を融合したキメラ E3 タンパク質の作成を試み、Dorfin に比較して安定で、E3 活性と神経毒性抑制作用の強い人工タンパク質を作製することができた。

(3) VCP/p97 を Dorfin の E3 活性を制御する分子として同定した。VCP/p97 はタンパク質品質管理に重要な役割を果たす分子であり、運動ニューロン疾患を治療する上で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. 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.
5. 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.
6. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. (2004) Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* **128**:659-70.
7. 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
8. 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.
- 89**:64-72.
9. Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G. (2003) Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med.* **9**:768-73.
10. Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* **163**: 609-19.
11. Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. (2003) Dorfin localizes to lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem.* **278**: 29106-14.
12. Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. (2003) Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord: a study using laser microdissection and real-time RT-PCR. *Neurochem Res.* **28**: 839-46.
13. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G. (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci.* **23**:2203-11.
- 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 SCF^{Fbs1}(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 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。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。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。

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。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病の原因解明と治療法開発を目指す。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 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。この解明の謎に迫ることは、非常に重要な課題である。

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

「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、 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。

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、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 液体培養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、pRS316- β 5 WT 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 (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 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。

「プロジェクト III : 蛋白質の品質管理機構の解明」

発生工学的的方法: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)

本研究は、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蛋白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. D. 研究結果と考察

「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」

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。

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 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、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、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。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。

「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」

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。

「プロジェクト III：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。

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冗進がこれらの疾病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。

E. 結論

「プロジェクト I」

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。

「プロジェクト II」

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。

「プロジェクト III」

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。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, T., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. (2002) E3 ubiquitin-ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418, 438-442.
- (2) 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.* 2003; 278: 43877-43884
- (3) 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.
- (4) Yoshida, Y., Fukiyu, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. *EMBO Rep.* 6. 239-244.
- (5) Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., and Tsukihara, T. (2002) The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10, 609-618.

2. 学会発表

- Keiji Tanaka : The Quality Control of Proteins in the Cells. workshop on "Ubiquitin in Cancer and Chronic Diseases" , 2004.5.16-21, Jerusalem (Israel)
- Keiji Tanaka : 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
- Keiji Tanaka : Ubiquitin-Proteasome System Normal Function and Outcome of its Dysfunction in Neurodegeneration. 12th International Winter Conference on Neurodegeneration. 2004.11.29-12.2, Kyoto
- Keiji Tanaka : Cellular apparatus responsible for the protein quality control in cells. The 27th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2004.12.8-11, Kobe
- Yoshida, Y., Mizushima, T., and Tanaka, K. : Recognition of glycosylated substrates by SCF^{Fbs} ubiquitin ligases. Keystone Symposia Meeting entitled "Ubiquitin and Signaling" Feb 22 - Feb 27, 2005 Taos, USA
- Keiji Tanaka : 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

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科)
道勇 学 (名古屋大学大学院医学系研究科)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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
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	119-133	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
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 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	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 mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy.	Brain	128	659-670	2005
Sone J, Hishikawa N, Koike H, Hattori N, Hirayama M, Nagamatsu M, Yamamoto M, Tanaka F, Yoshida M, Hashizume Y, Imamura H, Yamada E, Sobue G	Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease showing motor-sensory and autonomic neuropathy.	Neurology	65	1538-1543	2005
Mori K, Iijima M, Koike H, Hattori N, Tanaka F, Watanabe H, Katsuno M, Fujita A, Aiba I, Ogata A, Saito T, Asakura K, Yoshida M, Hirayama M, Sobue G	The wide spectrum of clinical manifestations in Sjogren's syndrome-associated neuropathy.	Brain	128	2518-2534	2005
Iijima M, Yamamoto M, Hirayama M, Tanaka F, Katsuno M, Mori K, Koike H, Hattori N, Arimura K, Nakagawa M, Yoshikawa H, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakazato M, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G	Clinical and electrophysiologic correlates of IVIg responsiveness in CIDP.	Neurology	64	1471-1475	2005
Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Sobue G	Thiamine-deficiency neuropathy in Japan.	Res Adv in Neurology	2	45-55	2005
Iwasaki Y, Sawada K, Aiba I, Mukai E, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G	Widespread active inflammatory lesions in a case of HTLV-I-associated myelopathy lasting 29 years.	Acta Neuropathol	108	546-551	2005
Koike H, Hirayama M, Yamamoto M, Ito H, Hattori N, Umehara F, Arimura K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Kaji R, Hayasaka K, Nakagawa M, Sakoda S, Masumura K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Kira J, Nakashima K, Oka N, Sobue G	Age associated axonal features in HNPP with 17p11.2 deletion in Japan.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	76	1109-1114	2005

Mabuchi N, Hirayama M, Koike Y, Watanabe H, Ito H, Kobayashi R, Hamada K, Sobue G	Progression and prognosis in pure autonomic failure (PAF): comparison with multiple system atrophy.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	76	947-952	2005
Yamada S, Mori K, Matsuo K, Inukai A, Kawagashira Y, Sobue G	Interferon alfa treatment for Sjögren syndrome associated neuropathy.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	76	576-578	2005
Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H	Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.	Dev Biol	275	124-142	2004
Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, Sobue G	Physical and functional interaction between Dorfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders.	J Biol Chem	279	51376-51385	2004
Mitsuma N, Yamamoto M, Iijima M, Hattori N, Ito Y, Tanaka F, Sobue G	Wide range of lineages of cells expressing nerve growth factor mRNA in the nerve lesions of patients with vasculitic neuropathy: An implication of endoneurial macrophage for nerve regeneration.	Neuroscience	129	109-117	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	1183-1192	2004
Katsuno M, Sobue G	Polyglutamine diminishes VEGF: Passage to motor neuron death?	Neuron	41	677-679	2004
Watanabe H, Fukatsu H, Hisikawa N, Hashizume Y, Sobue G	Field strengths and sequences influence putaminal MRI findings in multiple system atrophy.	Neurology	62	671	2004
Katsuno M, Adachi H, Sobue G	Sweet relief for Huntington disease.	Nature Med	10	123-124	2004

Watanabe H, Fukatsu H, Katsuno M, Sugiura M, Hamada K, Okada Y, Hirayama M, Ishigaki T, Sobue G	Multiple regional 1H-MR spectroscopy in multiple system atrophy: NAA/Cr reduction in pontine base as a valuable diagnostic marker.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	75	103-109	2004
Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): Ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspective.	J Mol Med	82	298-307	2004
Koike H, Misu K, Sugiura M, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, Sobue G	Pathologic differences between early-and late-onset type I (TTR Met30) familial amyloid polyneuropathy.	Neurology	63	129-138	2004
Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localiaing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurochem	89	64-72	2004
Nodera H, Bostock H, Kuwabara S, Sakamoto T, Asanuma K, Jia-Ying S, Ogawara K, Hattori N, Hirayama M, Sobue G, Kaji R	Nerve excitability properties in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A.	Brain	127	203-211	2003
Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G	Leuprorelin rescue polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.	Nature Med	9	768-773	2003
Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G	Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1.	J Biol Chem	278	29106-29114	2003
Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, Adachi H, Kobayashi Y, Sobue G, Ohtsuka K, Hatayama T	Hsp 105 α suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity.	J Biol Chem	278	25143-25150	2003

Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G	Dorfin localizes to the ubiquitinated inclusions in Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis.	Am J Pathol	163	609-619	2003
Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa N, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan	Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients.	Brain	126	134-151	2003
Hishikawa N, Hashizume Y, Yoshida M, Sobue G	Clinical and neuropathological correlates of Lewy body disease.	Acta Neuropathol	105	341-350	2003
Hamada K, Hirayama M, Watanabe H, Kobayashi R, Ito H, Ieda T, Koike Y, Sobue G	Onset age and severity impairment are associated with reduction of myocardial 123I-MIBG uptake in Parkinson's disease.	J Neurol Neurosurg Psychiat	74	423-426	2003
Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatus G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, 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
Abe Y, Kachi T, Arahata Y, Yamada T, Washimi Y, Iwai K, Ito K, Yanagisawa N, Sobue G	Occipital hypoperfusion in Parkinson's disease without dementia: correlation to impaired cortical visual processing.	J Neurol Neurosurg Psychiat	74	419-422	2003
Koike H, Iijima M, Sugiura M, Mori K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G	Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy.	Ann Neurol	54	19-29	2003

Wada M, Kimura M, Daimon M, Kurita K, Kato T, Johmura Y, Johkura K, Kuroiwa Y, Sobue G	An unusual phenotype of Mcleod syndrome with late onset axonal neuropathy.	J Neurol Neurosurg Psychiat	74	1697-1698	2003
Katsuno M, Adachi H, Inukai A, Sobue G	Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA).	Cytogenet Genome Res	100	243-251	2003
Mori K, Iijima M, Sugiura M, Koike H, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G	Sjögren's syndrome associated painful sensory neuropathy without sensory ataxia.	J Neurol Neurosurg Psychiat	74	1320-1322	2003

雑誌

田中 啓二 (東京都臨床医学総合研究所)

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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., and Keiji Tanaka, K.	Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro.	J. Biol. Chem.	281	3204-3209	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
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
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	537-545	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, and 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
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. Mo	11	365-370	2004
Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., and Tanaka, K.	A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier.	EMBO J.	23	1977-1986	2004
Yashiroda, H. and Tanaka, K.	Hub1 is an essential ubiquitin-like protein without functioning as a typical modifier in fission yeast	Genes to Cells	9	1189-1197	2004

Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G.	Physical and functional interaction between Dorfin and VCP that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders	J. Biol. Chem.,	279	51376-51385	2004
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
Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and Tanaka, K.	The molecular chaperone Hsp90 interacts with 26S proteasomes and	EMBO J.	22	3557-3567	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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Tanaka, K., Yashiroda, H., and Tanahashi, N.	Preparation of proteasomes, in Cell Biology	Raymond J. Deshaies	A Laboratory Handbook" (Ed. by J. E. Celis) 3rd edition.	Academic Press	New York	2005	91-96
Hirano, Y., Murata, S. and Tanaka, K.	Large- and small-scale purification of mammalian 26S proteasomes	Raymond J. Deshaies	Methods in Enzymology 399 (Ubiquitin and protein degradation, Part B)	Academic Press	New York	2005	227-240
Tanaka, K., Yashiroda, H., and Murata, S.	Ubiquity and diversity of the proteasome system.	R.J.Mayer, A. Ciechanover, M. Rechsteiner	In " Protein Degradation" (Eds. By Mayer, R. J., Ciechanover, A., and Rechsteiner, M.)	Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim	Germany	2006	129-156

IV. 研究成果の刊行物・別刷



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Experimental Neurology xx (2006) xxx–xxx

Experimental
Neurologywww.elsevier.com/locate/yexnr

Review

Pathogenesis, animal models and therapeutics in Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)

Masahisa Katsuno, Hiroaki Adachi, Masahiro Waza, Haruhiko Banno, Keisuke Suzuki,
Fumiaki Tanaka, Manabu Doyu, Gen Sobue*

Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

Received 12 December 2005; revised 18 January 2006; accepted 20 January 2006

Abstract

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a hereditary neurodegenerative disease characterized by slowly progressive muscle weakness and atrophy of bulbar, facial, and limb muscles. The cause of SBMA is expansion of a trinucleotide CAG repeat, which encodes the polyglutamine tract, in the first exon of the androgen receptor (AR) gene. SBMA chiefly occurs in adult males, whereas neurological symptoms are rarely detected in females having mutant AR gene. The cardinal histopathological finding of SBMA is loss of lower motor neurons in the anterior horn of spinal cord as well as in brainstem motor nuclei. Animal models carrying human mutant AR gene recapitulate polyglutamine-mediated motor neuron degeneration, providing clues to the pathogenesis of SBMA. There is increasing evidence that testosterone, the ligand of AR, plays a pivotal role in the pathogenesis of neurodegeneration in SBMA. The striking success of androgen deprivation therapy in SBMA mouse models has been translated into clinical trials. In addition, elucidation of pathophysiology using animal models leads to emergence of candidate drugs to treat this devastating disease: HSP inducer, Hsp90 inhibitor, and histone deacetylase inhibitor. Utilizing biomarkers such as scrotal skin biopsy would improve efficacy of clinical trials to verify the results from animal studies. Advances in basic and clinical researches on SBMA are now paving the way for clinical application of potential therapeutics.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Spinal and bulbar muscular atrophy; Polyglutamine; Androgen receptor; Testosterone; Luteinizing hormone-releasing hormone analog; Heat shock protein; Geranylgeranylacetone; 17-Allylamino geldanamycin; Histone deacetylase inhibitor; Axonal transport

Contents

History and nomenclature	0
Clinical features	0
Etiology	0
Pathology	0
Molecular pathogenesis and therapeutic strategies	0
Ligand-dependent pathogenesis in animal models of SBMA	0
Testosterone blockade therapy for SBMA	0
Role of heat shock proteins in pathogenesis of SBMA	0
Transcriptional dysregulation in SBMA	0
Axonal trafficking defects in SBMA	0
Clinical application of potential therapeutics	0
Acknowledgments	0
References	0

* Corresponding author. Fax: +81 52 744 2384.

E-mail address: sobueg@med.nagoya-u.ac.jp (G. Sobue).

History and nomenclature

More than a hundred years have elapsed since the first description of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) from Hiroshi Kawahara, who described the clinical and hereditary characteristics of two Japanese brothers with progressive bulbar palsy (Kawahara, 1897). This work was followed by several reports on similar cases with or without X-linked pattern of inheritance (Katsuno et al., 2004). SBMA is also known as Kennedy disease (KD), named after William R. Kennedy, whose study on 11 patients from 2 families depicted the clinical, genetical, and pathological features of this disorder (Kennedy et al., 1968). Other names for this disease are bulbospinal neuronopathy and bulbospinal muscular atrophy.

In 1991, the cause of SBMA was identified as the expansion of a trinucleotide CAG repeat in the androgen receptor (AR) gene (La Spada et al., 1991). This was the first discovery of polyglutamine-mediated neurodegenerative diseases, and subsequent studies using transgenic animal models opened the door to development of pathogenesis-based therapies for this devastating disease.

Clinical features

SBMA exclusively affects adult males. The prevalence of this disease is estimated to be 1–2 per 100,000, whereas a considerable number of patients may have been misdiagnosed as other neuromuscular diseases including amyotrophic lateral sclerosis (Fischbeck, 1997). Patients of various ethnic backgrounds have been reported around the world.

Major symptoms of SBMA are weakness, atrophy, and fasciculations of bulbar, facial and limb muscles (Sperfeld et al., 2002; Katsuno et al., 2004). In extremities, involvement is usually predominant in proximal musculature. The onset of weakness is usually between 30 and 60 years but is often preceded by nonspecific symptoms such as postural tremor and muscle cramps. Although fasciculations in the extremities are rarely present at rest, they are easily induced when patients hold their arms horizontally or bend their legs while lying on their backs. These contraction fasciculations are especially noticeable in the face, neck, and tongue and are usually present in the early stage. Fatigability after exercise might also be accompanied. Bilateral facial and masseter muscle weakness, poor uvula and soft palatal movements, and atrophy of the tongue with fasciculations are often encountered. Speech has a nasal quality in most cases due to reduced velopharyngeal closure. Advanced cases often develop dysphagia, eventually resulting in aspiration or choking. Muscle tone is usually hypotonic, and no pyramidal signs are detected. Deep tendon reflex is diminished or absent with no pathological reflex. Sensory involvement is largely restricted to vibration sense which is affected distally in the legs. Cerebellar symptoms, dysautonomia, and cognitive impairment are absent. Patients occasionally demonstrate signs of androgen insensitivity such as gynecomastia, testicular atrophy, dyserection, and decreased fertility, some of which are detected before the onset of motor symptoms. Abdominal obesity is common, whereas male pattern baldness is rare in patients with SBMA.

Electromyogram shows neurogenic abnormalities, and distal motor latencies are often prolonged in nerve conduction study. Both sensory nerve action potential and sensory evoked potential are reduced or absent. Endocrinological examinations frequently reveal partial androgen resistance with elevated serum testosterone level. Serum creatine kinase level is elevated in the majority of patients. Hyperlipidemia, liver dysfunction, and glucose intolerance are also detected in some patients. Profound facial fasciculations, bulbar signs, gynecomastia, and sensory disturbance are the main clinical features distinguishing SBMA from other motor neuron diseases, although gene analysis is indispensable for diagnosis. Female patients are usually asymptomatic, but some express subclinical phenotypes including high amplitude motor unit potentials on electromyography (Sobue et al., 1993).

The progression of SBMA is usually slow, but a considerable number of patients need assistance to walk in their fifties or sixties. Life-threatening respiratory tract infection often occurs in the advanced stage of the disease, resulting in early death in some patients. No specific therapy for SBMA has been established. Testosterone has been used in some patients, although it has no effects on the progression of SBMA.

Etiology

The cause of SBMA is expansion of a trinucleotide CAG repeat, which encodes the polyglutamine tract, in the first exon of the androgen receptor (AR) gene (La Spada et al., 1991). The CAG repeat within AR ranges in size from 9 to 36 in normal subjects but from 38 to 62 in SBMA patients. Expanded polyglutamine tracts have been found to cause several neurodegenerative diseases including SBMA, Huntington's disease, several forms of spinocerebellar ataxia, and dentatorubral-pallidoluy-sian atrophy (Gatchel and Zoghbi, 2005). These disorders, known as polyglutamine diseases, share salient clinical features including anticipation and somatic mosaicism, as well as selective neuronal and nonneuronal involvement despite widespread expression of the mutant gene. There is an inverse correlation between the CAG repeat size and the age at onset or the disease severity adjusted by the age at examination in SBMA as documented in other polyglutamine diseases (Doyu et al., 1992). These observations explicitly suggest that common mechanisms underlie the pathogenesis of polyglutamine diseases.

AR, the causative protein of SBMA, is an 110-kDa nuclear receptor which belongs to the steroid/thyroid hormone receptor family (Poletti, 2004). AR mediates the effects of androgens, testosterone, and dihydrotestosterone, through binding to an androgen response element in the target gene to regulate its expression. AR is essential for major androgen effects including normal male sexual differentiation and pubertal sexual development, although AR-independent nongenomic function of androgen has been reported. AR is expressed not only in primary and secondary sexual organs but also in nonreproductive organs including the kidney, skeletal muscle, adrenal gland, skin, and nervous system, suggesting its far-reaching influence on a variety of mammalian tissues. In the central nervous system, the expression level of AR is relatively high in spinal and brainstem

motor neurons, the same cells which are vulnerable in SBMA. The AR gene is located on chromosome Xq11–12. This 90-kb DNA contains eight exons coding for the functional domains specific to the nuclear receptor family. The first exon codes for the N-terminal transactivating domain. Exons 2 and 3 code for the DNA-binding domain, whereas exons 4 through 8 code for the ligand-binding domain. The N-terminal transactivating domain, in which a CAG trinucleotide repeat locates, possesses a major transactivation function maintained by interaction with general transcriptional coactivators such as c-AMP response element binding protein-binding protein (CBP), TAFII130, and steroid receptor coactivator-1 (SRC-1). The CAG repeat beginning at codon 58 in the first exon of AR encodes polyglutamine tract. The length of this repeat is highly variable because of the slippage of DNA polymerase upon DNA replication. Whereas its abnormal elongation causes SBMA, the shorter CAG repeat is likely to increase the risk of prostate cancer (Clark et al., 2003). Transcriptional coactivators also possess glutamine-rich regions modulating protein–protein interaction with the N-terminal transactivating domain of AR.

The expansion of a polyglutamine tract in AR has been implicated in the pathogenesis of SBMA in two different, but not mutually exclusive, ways: loss of normal AR function induces neuronal degeneration; and the pathogenic AR acquires toxic property damaging motor neurons. Since AR possesses trophic effects on neuronal cells, one can assume that loss of AR function may play a role in the pathogenesis of SBMA. Expansion of the polyglutamine tract mildly suppresses the transcriptional activities of AR, probably because it disrupts interaction between the N-terminal transactivating domain of AR and transcriptional coactivators (Poletti, 2004). Although this loss of function of AR may contribute to the androgen insensitivity in SBMA, the pivotal cause of neurodegeneration in SBMA has been believed to be a gain of toxic function of the pathogenic AR due to expansion of the polyglutamine tract.

This hypothesis is supported by the observation that motor impairment has never been observed in severe testicular feminization (Tfm) patients lacking AR function or in AR knockout mice. Moreover, a transgenic mouse model carrying an elongated CAG repeat driven by human AR promoter demonstrated motor impairment, suggesting that the expanded polyglutamine tract is sufficient to induce the pathogenic process of SBMA (Adachi et al., 2001).

Aggregation of abnormal protein has been considered to be central to the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease, Parkinson disease, amyotrophic lateral sclerosis, and prion disease. An expanded polyglutamine stretch alters conformation of causative proteins, resulting in aggregation of the proteins. It is now widely accepted that aggregation of these abnormal proteins in neurons is the primary event in the pathogenesis of polyglutamine diseases. The rate-limiting step of aggregation has been proposed to be the formation of oligomeric nucleus, which may occur from after a repeat length-dependent conformational change of polyglutamine monomer from a random coil to a parallel, helical β -sheet (Wyttienbach, 2004). Several experimental observations indicate that formation of toxic oligomers, or intermediates, of abnormal polyglutamine-containing protein instigates a series of cellular events which lead to neurodegeneration (Muchowski and Wacker, 2005). This hypothesis is likely to be the case in SBMA.

Pathology

Histopathological studies provide important information on the pathogenesis of polyglutamine-mediated neurodegeneration. The fundamental histopathological finding of SBMA is loss of lower motor neurons in the anterior horn of spinal cord as well as in brainstem motor nuclei except for the third, fourth and sixth cranial nerves (Fig. 1A) (Sobue et al., 1989). The

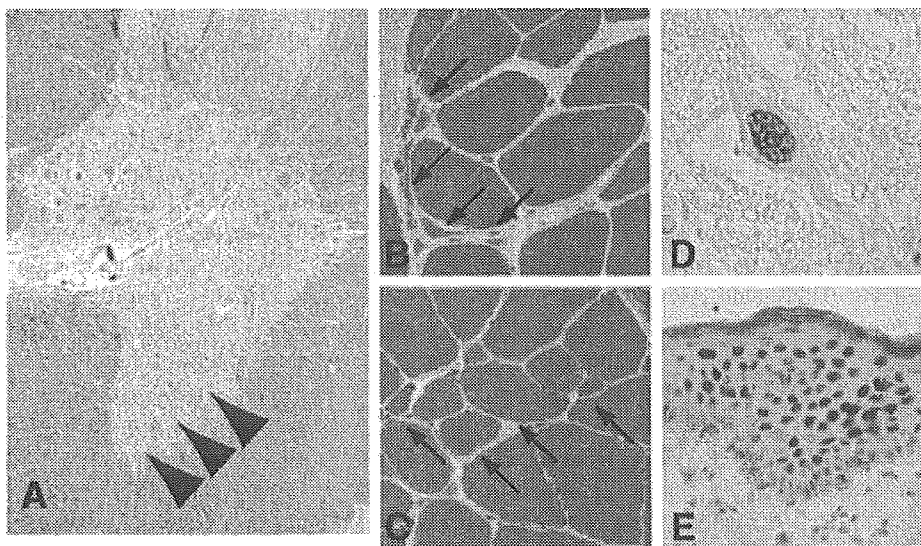


Fig. 1. Histopathology of SBMA. (A) A transverse section of spinal cord demonstrates marked depletion of motor neurons in the anterior horn. (B and C) HE staining of skeletal muscle shows both neurogenic (B, arrows) and myogenic changes (C, arrows). (D) A residual motor neuron in the lumbar anterior horn shows a diffuse nuclear accumulation of pathogenic androgen receptor detected by anti-polyglutamine antibody. (E) Nuclear accumulation of pathogenic AR is also detected in nonneuronal tissues such as scrotal skin (E).