

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

運動ニューロン変性に関わる分子の同定と
病態抑止治療法の開発

平成 18 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 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

運動ニューロン変性に関わる分子の同定と病態抑止治療法の開発

..... 祖父江 元 1

II. 分担研究報告

1. 古細菌プロテアソームによる家族性筋萎縮性側索硬化症治療の

試み 道勇 学 13

2. 球脊髄性筋萎縮症における逆行性軸索輸送障害とその可逆性

..... 田中 章景 16

3. 運動ニューロン変性に関わる分子の同定と病態抑止治療法の

開発 田中 啓二 20

III. 研究成果の刊行に関する一覧 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 31

I. 総括研究報告

運動ニューロン変性に関わる分子の同定と病態抑止治療法の開発

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

1. 球脊髄性筋萎縮症の分子病態解明と病態抑止治療法

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)のトランスジェニックマウスの病態初期における逆行性軸索輸送障害を検討した。SBMA マウス脊髄や前根では発症前から dynactin1 の蛋白質発現レベルが低下していたが、中枢神経内の非病変部では蛋白量は保たれていた。坐骨神経結紮および Fluorogold の腓腹筋内投与ないし座骨神経への直接投与いずれによっても、SBMA マウスでは発症前から逆行性軸索輸送が障害されていた。これらの異常はいずれも去勢により改善し、可逆性であることが示された。SBMA の培養細胞モデルにおいても dynactin1 の mRNA および蛋白質発現レベルが低下していたが、dynactin1 の強制発現により細胞死が抑制された。以上より、dynactin1 の発現低下による逆行性軸索輸送の障害が SBMA の発症に深く関与しており、治療のターゲットとなりうると考えられた。

2. 筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と病態抑止治療法

20S プロテアソーム(PS)は細胞内で不要となったタンパク質の分解を行っているプロテアーゼ複合体である。我々は古細菌 *Methanosarcina mazei* の PS (Mm-PS) のサブユニット α と β が、PS 活性を持つ機能的な複合体を培養哺乳動物細胞内でも形成しうることを見出した。野生型および家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因である変異 SOD1 と共発現させると、Mm-PS は変異 SOD1 選択的な分解促進により用量依存性に SOD1 タンパク質量を低下させ、神経細胞毒性を軽減した。さらに、変異 SOD1 以外の異常凝集体を形成するタンパク質の分解も促進することが明らかとなり、Mm-PS 発現は、家族性 ALS の新規治療法となりうる可能性があるのみならず、パーキンソン病やアルツハイマー病等の異常タンパク質凝集が関与する他の神経変性疾患の治療法としても有望であると考えられた。

3. 運動ニューロン疾患における恒常性監視機構の異常と治療開発

ニューロン死に密接に関係することが示唆されている蛋白質の品質管理について二種のユビキチンリガーゼ(E3)、SCF^{Fbs1} (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 E3) と CHIP (分子シャペロン依存的 E3) を中心に解析を進めた。SCF^{Fbs1} は小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation)に関与する E3 として発見したが、その基質識別サブユニット Fbs1 はニューロンに特異的に発現している。本年は、この Fbs1 が小胞体(ER)膜に会合して SCF^{Fbs1} 複合体を形成して ERAD に関与する他、サイトゾルでは Fbs1 単独(実際には Skp1 との二量体)で、糖蛋白質の変性を防ぐ新規な分子シャペロンとして作用することを見出した。また CHIP 研究においては、その KO マウスが神経変性疾患様の症状を示した。さらにこれまで CHIP のパートナーシャペロンとしては、Hsp90 と Hsp70 が知られているが、その Hsp70 に対する Co シャペロンとしてニューロンに特異的に発現している Hsj-1 を発見し、その KO マウスも作出した。実際 CHIP は Hsp70・Hsj-1 と協調してモデル蛋白質(熱変性ルシフェラーゼ)を効果的にユビキチン化した。これらの研究成果は、運動ニューロン疾患を初めとする様々な神経変性疾患の発症における蛋白質の品質管理装置の役割を理解する上で重要な知見と考えられる。

A. 研究目的

運動ニューロン疾患は運動ニューロンが選択的に変性脱落する神経変性疾患であり、成人で発症するものとして筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) とが知られており、両者の症状や病理所見は類似点が多く、その病態にも共通する点が少なくないと考えられている。しかし、未だもって有効性が確立された治療法はなく、克服が切望されている難治性疾患である。神経変性疾患の治療を開発するためには、とくに初期病態の分子機構を明らかにすることが重要であり、さらに治療による病態の可逆性についても検討が必要である。我々はこれまで、ALS と SBMA に共通する病態機構の解明を目指し研究を進めてきた。

SBMA はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の CAG リピートの異常延長を原因とする神経変性疾患であり、下位運動ニューロンの変性による緩徐進行性の四肢筋萎縮および筋力低下、球麻痺を主症状とする。治療法はなく、進行性の経過をたどり、予後は極めて悲観的である。我々はこれまでに SBMA のマウスモデルを用い、病態を抑止する治療法の開発とその臨床応用を行ってきた。我々が作成した SBMA のモデルマウスでは、神経症状が雌に比べ雄において重篤かつ急速に進行し、雄マウスに去勢あるいは LHRH アナログの投与を行ったところ血清テストステロン濃度の低下に伴い変異 AR の核内移行が抑制され、運動障害は著しく改善した。すなわち、テストステロン依存性の変異 AR の核内集積が SBMA の病態の中心をなしており、同時に治療の標的になると考えられた。マウスでの研究成果に基づき、我々は LHRH アナログの第 II 相臨床試験を行い、その結果、LHRH アナログにより陰囊皮膚における変異 AR 蛋白質の核内集積が有意に抑制され、血清 CK も有意に減少することが明らかとなった。また、LHRH アナログにより嚥下障害が改善する傾向が示された。以上の結果に基づき、我々は昨年 9 月から第 III 相臨床試験として多施設共同二重盲験試験を医師主導治験として実施している。今年度は、とくに軸索輸送に注目し、SBMA の初期病態における分子機構の解明と、治療による可逆性の解析を行った。

一方、ALS については細胞内への異常蛋白

質蓄積が初期病態として注目されており、その阻害が病態を抑止するものとして期待される。20S プロテアソーム (PS) は不要となった細胞内タンパク質の分解を行っているプロテアーゼ複合体である。PS は変性した異常タンパク質の分解にも関与し、ユビキチン-プロテアソーム系のこの働きは、「タンパク質品質管理」と呼ばれている。アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病を初めとする様々なポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など多くの神経変性疾患では、中枢神経系の病変部位にタンパク質凝集体の蓄積が見られるため、PS の活性低下が病態に大きく関与していると考えられている。家族性 ALS の疾患モデルマウスの病変部位である脊髄前角組織においては、実際に PS の局所的活性低下が示されており、変異 Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) による異常タンパク質凝集体が運動ニューロン内に進行性に蓄積することが報告されている。今回我々が用いた古細菌 PS は、真核細胞の PS の祖先にあたる。真核細胞の PS が各々 7 種類の α および β サブユニットからなる複雑な巨大タンパク質複合体であるのに対し、1 種類のみ α および β サブユニットからなる単純な構成を持つが、異常タンパク質の *in vitro* における分解活性は真核細胞の PS に比べて強力であると報告されている。本研究においては、我々は古細菌の PS が真核細胞内において毒性を示すことなく機能して異常タンパク質の分解を促進し、神経変性疾患の治療法として有望であるかどうかを検討した。

また、運動ニューロン疾患を含む様々な神経変性疾患の発症機構として、神経細胞内の蛋白質の品質管理機構の破綻が有力な説として登場し、国内外で注目されている。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作用する機構は、多面的である。その代表例として昨今注目を浴びているオルガネラが、小胞体 (ER: endoplasmic reticulum) である。最近 ER 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) の研究が飛躍的に進展している。1992 年、我々は、ERAD に関与する N 型糖蛋白質を標的とするユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs1} を発見

した。その後 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。即ち 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 のみがニューロン特異的に発現していることを見出すと共に SCF^{Fbs1} の作用機構については Fbs1 とキトビオース (GlcNAc-GlcNAc) 複合体の X 線結晶構造解析による立体構造解析と SCF^{Fbs1} の4次構造の解析 (水島ら、投稿中) 及び標的分子の変性度による識別機構の生化学的解明で明確になった。その結果、Fbs1 は全く新しいレクチン (糖鎖を認識して特異的に結合する分子群の総称) であることが判明した。本年は、Fbs1 のニューロン特異的分布の分子機構に焦点を絞って解析した。

他方、サイトゾル (細胞質) においても蛋白質の品質管理は極めて重要であり、我々はこれまでこのプロセスにおいて重要な働きを担っていると推定される Parkin (常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症候群 AR-JP の責任遺伝子産物で機能的にはユビキチンリガーゼである) について精力的に研究してきた。例えば、Parkin が RING-finger 型の E3 であること、プロテアソームと相互作用すること、正負の活性制御機構が存在すること、インビトロでは、モノユビキチン化反応を触媒すること、その KO マウスがドーパミン代謝に異常を引き起こすことなどである。さらに本年度は CHIP ユビキチンリガーゼについてもこれまでの研究をさらに発展させた。特にその新規パートナー分子として Hsj-1 を同定すると共にその詳しい解析を行った。

B. 研究方法

SBMA における逆行性軸索輸送

1) 免疫組織化学

用いた主な抗体は以下の通り：抗 dynactin1 (610473, BD, 1:250)、phospho NF-H (SMI31, Sternberger, 1:1000)、抗 polyglutamine (MAB1574, Chemicon, 1:10000)。Dynactin1 染色には microwave による抗原賦活を使用した。

2) Immunoblotting

用いた主な抗体は以下の通り：抗 dynactin1 (1:250)、dynein IC (MAB1618, Chemicon, 1:1000)、抗 kinesin HC (MAB1614,

Chemicon, 1:10000)。

3) mRNA 解析

In situ hybridization および real time RT-PCR (iCycler) による定性および定量的解析を行った。

4) Fluoro gold labelling

Ketamine-xylazine 麻酔下で 2.5% Fluoro gold 溶液 4.5 μ l をハミルトンシリンジを用いマウス腓腹筋に投与、ないし大腿中央で座骨神経を結紮し断端を Fluoro gold 溶液に浸透した。

5) 座骨神経結紮

ketamine-xylazine 麻酔下でマウス大腿中央で座骨神経を結紮し、免疫組織化学および結紮部近傍の神経から蛋白質を抽出し immunoblotting を行った。

古細菌プロテアソームによる ALS の治療

1) 古細菌プロテアソームのクローニングと哺乳動物細胞における発現の検討

37 $^{\circ}$ C が至適発育温度の古細菌 *Methanosarcina mazei* から、PS (Mm-PS) を構成する2種類のサブユニット (α および β サブユニット) をクローニングした。 β サブユニットの C 末端には Histidine タグを付加した。 β サブユニットの活性中心 (Thr1) を変異 (Thr \rightarrow Cys) させ、PS 全体の活性を喪失させた変異 β サブユニット (m β 1) を作成し、対照として全ての実験に用いた。Neuro2a および HEK293 培養細胞に Mm-PS の α 、 β サブユニットをトランスフェクションにより一過性に発現させ、Mm-PS が哺乳動物細胞内で機能的複合体を形成しうるかどうかを、超遠心によるタンパク質画分および Ni+カラムにより単離した Mm-PS の活性測定などにより検討した。

2) Mm-PS による神経変性疾患原因タンパク質の分解促進活性の解析

家族性 ALS の原因の一つである変異 SOD1 および野生型 SOD1 と Mm-PS を共発現させ、SOD1 タンパク質の turnover に Mm-PS が与える影響を pulse-chase 解析などにより検討した。さらに、ポリグルタミン病の一つで運動ニューロンが障害される球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の原因である異常伸長したポリグルタミン (Q) 鎖を持つアンドロゲンレセプター (AR)、パーキンソン病に関連する α -synuclein、アルツハイマー病に関連する

tau についても同様の実験を行った。

SCF^{Fbs1} リガーゼの分子構造と作用機構の解明

1) 構造生物学的な方法: 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。

2) 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。

CHIP 及び Hsj-1 の機能解析研究

1) CHIP と Hsj-1 のリコンビナント蛋白質は、大腸菌で合成し、精製した。ユビキチン化反応は、以前の方法に従って調整した。基質は熱マイルド変性したルシフェラーゼを用いた。ユビキチン化蛋白質の同定は、SCF^{Fbs1} リガーゼのアッセイ方法に準じて行った。

2) 遺伝子欠損 (KO) マウスの作製
CHIP 遺伝子と Hsj-1 遺伝子について、定法に従ってターゲティングベクターを作製した後、Sa11 により線状化し、TT2 ES 細胞に GENE PULSER II を用いて 210V, 950uF にてエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行った。ES 細胞はエレクトロポレーション 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 (及び最終的にサザン法によって確認し)、野生型アリル・変異型アリル・両方の遺伝子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。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主として培養細胞およびマウスを用いた基礎的研究およびリコンビナント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. 研究結果

SBMA における逆行性軸索輸送

まず、SBMA モデルマウスの骨格筋の免疫組織化学を解析したところ、ニューロフィラメントが筋線維間に蓄積していた。この蓄積はマウスの神経症状発症に先行して認められ、症状の進行とともに増強した。抗ニューロフィラメント抗体と α -bungarotoxin を用いた免疫蛍光法で詳細に観察すると、ニューロフィラメントは終板近傍の運動ニューロン遠位軸索に集積していた。同様の集積は患者肋間筋でも観察された。また、シナプス小胞関連蛋白質のうちシナプトフィジンはニューロフィラメントと同様の蓄積を示したが、Rab-3A の蓄積は認められなかった。ニューロフィラメントやシナプトフィジンは軸索内を順行性および逆行性に輸送されるが、Rab-3A は順行性にのみ輸送されることに着目し、SBMA マウスにおいて逆行性軸索輸送の異常が軸索蛋白質の異常蓄積の原因であると仮説を立てた。坐骨神経結紮法によりシナプス小胞関連蛋白質の軸索輸送を調べたところ、Rab-3A の順行性軸索輸送には異常は認められなかった。シナプトフィジンに関しても順行性軸索輸送には異常は認められなかったが、野生型マウスに比べて SBMA マウスでは逆行性に輸送されるシナプトフィジンの量が有意に減少していることが明らかとなった。この減少はマウスの神経症状発症前から認められ、進行とともに顕著となった。さらに、軸索内を逆行性に輸送される蛍光マーカーであるフルオロゴールドの腓腹筋内投与により脊髄前角の運動ニューロンをラベルしたところ、野生型マウスに比べて SBMA マウスでは発症前からラベルされるニューロン数が減少していることが明らかとなった。軸索末端での異常による影響を除外する目的で、フルオロゴールドの坐骨神経内直接投与も解析したが、腓腹筋内投与の結果と同様、SBMA マウスでは発症前からラベルされるニューロン数が減少していた。次に、SBMA マウスにおける軸索輸送障害の分子機構を解明するため、軸索輸送を担うモーター蛋白質の発現量を定量したところ、SBMA マウスの脊髄運動ニューロンおよび前根では

dynactin 1 蛋白質の発現量が発症前から有意に減少しており、その mRNA レベルも発症前から減少していた。Dynactin 1 は dynein などと複合体を形成し、順行性および逆行性軸索輸送を制御する蛋白質であり、その遺伝子変異により遺伝性運動ニューロン疾患が生じることが報告されている。Dynactin 1 以外の複合体の構成蛋白質としては、dynein heavy chain の発現は発症早期では野生型と差がなかったが、進行期のマウスでは前根で発現が減少していた。それ以外の dynein intermediate chain や dynamitin (p50) については発現に異常は認められなかった。In situ hybridization を解析すると dynactin 1 の mRNA レベルは変異アンドロゲン受容体の核内集積を伴うニューロンでは低く、変異アンドロゲン受容体が核内に集積していないニューロンでは高いことが明らかとなった。以上から、ポリグルタミン鎖の延長した変異アンドロゲン受容体の核内集積による dynactin 1 の転写障害が逆行性軸索輸送障害の原因であると考えられた。

一方、SBMA マウスでは著しい神経症状にもかかわらず神経細胞死が認められないことから、神経細胞の機能障害が神経症状発現の原因と考えられる。この神経細胞機能障害の可逆性を解析するため、神経症状発症後早期の SBMA マウスに去勢術を行ったところ、症状は可逆的に改善した。また、発症前の SBMA マウスでは逆行性に輸送されたフルオロゴールドによりラベルされるニューロンの数は野生型マウスより減少していたが、去勢後のマウスではその数の増加が認められた。併せて、去勢の前後で dynactin 1 の発現を解析したところ、神経症状発症後早期の SBMA マウスでは dynactin 1 の発現量が減少していたが、去勢後には野生型マウスのレベルに近いところまで増加した。また、SBMA の培養細胞モデルでも dynactin 1 の発現レベルが低下していたが、dynactin 1 を強制発現したところ、細胞死は有意に抑制された。以上から、dynactin 1 の発現量低下が SBMA の神経変性過程に深く関与していることが明らかとなった。

古細菌プロテアソームによる ALS の治療

Mm-PS は、哺乳動物培養細胞内において、内在性 PS と同様のタンパク質画分に存在し、

正常な活性を有するタンパク質複合体を形成していた。また Mm-PS 過剰発現による哺乳動物細胞への明らかな毒性は認められなかった。

培養細胞内において共発現させると、Mm-PS は変異 SOD1 の形成する凝集体と共存していた。培養細胞内の変異 SOD1 タンパク質発現量は、Mm-PS タンパク質発現により用量依存性に低下した。Mm-PS の発現は、野生型 SOD1 には影響を与えなかった。

Cycloheximide chase 法および pulse chase 法を用いた検討から、Mm-PS は変異体特異的に SOD1 の分解を促進することで、変異 SOD1 タンパク質の発現量を減少させていることが示された。MTS assay および caspase-3/7 assay の結果から、Mm-PS は変異 SOD1 による細胞毒性を用量依存性に軽減した。活性中心を失活させた変異 β サブユニットを含む変異 Mm-PS を発現させた場合には、変異 SOD1 の分解促進、毒性抑制効果は認められなかったことから、Mm-PS による上記の改善効果は Mm-PS が哺乳動物細胞内において PS として機能したことによるものであると推定された。

同様に、Mm-PS は正常 AR の分解に影響を与えず、SBMA の原因となる伸長した Q 鎖を持つ異常な AR の分解のみを促進した。さらに、Mm-PS はパーキンソン病で蓄積していることが知られている α -synuclein およびアルツハイマー病で蓄積していることが知られている tau の分解も促進した。しかしながら、Mm-PS は正常細胞内にも豊富に存在している α -tubulin や GAPDH などの正常タンパク質には影響を与えなかった。

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、ほとんどが N 型糖鎖修飾を受ける。この糖蛋白質は、小胞体内の様々な分子シャペロンの助けを借りて、フォールディングやアセンブリーなどの高次構造形成 (S-S 結合の形成を含む) が行われる。そこで正しい高次構造を形成した蛋白質

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。前述したように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（あるいは繰り返す反応による再生）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）と呼ばれている。

ERADの基本経路は、小胞体内でERADの基質となる蛋白質の識別、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ている。近年我々は、糖鎖を識別するユビキチンリガーゼとして“SCF^{Fbs1}”を発見し、この酵素がERADに関与していることを突き止めた。

即ち、我々は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を解明した(1)。更に我々は、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及び投稿中)。Fbs1の糖鎖結合ドメイン(SBD)の立体構造は10本の逆平行β構造が二層に重なった・サンドイッチ構造をしており、その一端に位置するループ領域により糖蛋白質では糖鎖の還元末端に位置するキトビオース(GlcNAc・1-4GlcNAc)を認識し結合している。レクチンの立体構造として・サンドイッチ構造は一般的な構造であるが、これまでに立体構造の報告されたレクチンの糖鎖認識部位は・シート領域であったのに対しSBDではループ領域で糖鎖と結合する新しい様式をとっていた。

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

また本年、Fbs1-Skp1の二量体のX線結晶構造解析に成功、SCF^{Fbs1}全体の立体構造のモデル化も行った(論文投稿中)。さらに基質であるRNaseと結合したSCF^{Fbs1}全体の立体構造解析にも成功した(論文投稿中)。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。

一方、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。当初我々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、サイトゾルに存在する遊離の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。

シャペロン依存性品質管理リガーゼ CHIP

我々はCHIPがTPR (tetratricopeptide repeat) ドメインとU-box (RING-finger 都類似の構造) を併せ持つユニークな分子であり、前者でHsp70やHsp90の分子シャペロンと結合し、後者でユビキチンリガーゼ活性を発揮することにより、変性タンパク質を選択的にユビキチン化するE3であることを見いだした。また、CHIPの生体内での機能を明らかにするため、CHIP欠損マウスを作製し解析を行った。現在までのところ、CHIP欠損マウスは、短寿命、白内障、失調歩行を呈しており、現在詳細にこの原因を探索中である(投稿準備中)。

一方Hsp70やHsp90の分子シャペロンには、これらの作用支援するCoシャペロンと呼ばれる多数の分子群が存在する。典型的には、Hsp70に対するHsp40である(CHIPも当初はユビキチンリガーゼとしてではなくCoシャペロンとして発見された分子である)。ゲノム情報(データベース)を丹念に調べると、哺乳類にはHsp40のHsp70と相互作用するドメイン(DnaJ)を持つファミリー分子が多数存在することが分かる。その中でも我々はニューロン特異的に存在するHsj-1に注目した。その理由は、Hsj-1のC末端側には、二つのUIM (ubiquitin-interacting motif) モチーフを有するドメインが存在したからである。即ち、Hsj-1は、DnaJドメイン(Hsp70と相

相互作用する配列)とUIMドメイン(ユビキチンと相互作用する配列)を併せ持つユニークな分子であった。そして我々は、Hsj-1がCHIP、Hsp70とともに三者複合体を形成し、CHIPによるユビキチン化(熱変性したルシフェラーゼを基質として使用)を促進することを明らかにした(投稿準備中)。そしてHsj-1のUIMモチーフを欠損させると、ユビキチン化活性は大幅に低下したことから、CHIPが触媒するユビキチン化反応には、Hsj-1がポリユビキチン鎖と相互作用することが必須であることが判明した。さらにHsj-1のインビボにおける機能を解析するために、Hsj-1欠損させたマウスを作製した。Hsj-1ノックアウトマウスは見かけ上正常に誕生し、生後1年を過ぎても、表現型として顕著な異常は観察されなかった(継続観察中)。

D. 考察

SBMAについて

今回の検討により、SBMAの病変部位では初期からdynactin1の転写障害がみられ、このため逆行性軸索輸送障害がもたらされ、軸索内を輸送される細胞骨格やシナプス小胞関連蛋白質などが軸索遠位に異常蓄積することが明らかとなった。Dynactin1の遺伝子変異が家族性運動ニューロン疾患の原因であることが知られており、またdynactin1と複合体を形成するdyneinの遺伝子変異によって運動ニューロン変性が生じることがマウスにおいて明らかにされている。また、軸索輸送障害や軸索蛋白質の異常蓄積は筋萎縮性側索硬化症や脊髄性筋萎縮症(SMA)においてもみられることが多数報告されていることから、軸索輸送障害は運動ニューロン疾患の治療の標的として極めて重要であると考えられる。今後は軸索輸送を改善する薬剤の探索が重要であると考えられる。

ALSについて

古細菌PSが、哺乳動物細胞内においても毒性を発揮せずに、活性を有する機能的な複合体を形成しうる事を明らかにした。さらに、培養細胞内において、異常凝集体を形成しやすく細胞毒性を持つ変異SOD1を初めとする神経変性疾患原因タンパク質の分解を特異的に促進しうることを見出した。培養細胞の内在性19Sとの結合はせず、シャペロンタン

パク質である各種HSPの発現量変化もないことや、活性を喪失した変異 β サブユニットからなる変異Mm-PSでは異常タンパク質の分解促進効果が消失することなどから、Mm-PSが哺乳動物細胞内で直接PSとして異常タンパク質を除去していると推測された。今後、Mm-PSを神経系に高発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、変異SOD1-Tgマウスなどの神経変性疾患モデルマウスと交配することにより、神経変性疾患の新規治療法としてMm-PSが有用であることをin vivoでも検討してゆく予定である。

運動ニューロン疾患における恒常性監視機構について

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、その解明は、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。

シャペロン依存性品質管理リガーゼであるCHIPは、分子シャペロンと提携して再生できなくなった変性蛋白質を迅速に分解するという典型的な品質管理リガーゼと考えられる。

E. 結論

SBMAについて

SBMAマウスモデルおよび培養細胞モデルの解析により、本疾患における神経細胞機能障害は発症後早期であれば適切な治療により可逆的に改善すること、およびその分子機構として逆行性軸索輸送障害が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。軸索輸送障害は運動ニューロン疾患の治療法開発を考える上で、治療のターゲットとして極めて重要であると考えられる。

ALSについて

古細菌のPSを、細胞内の内在性PSでは処理しきれずに蓄積して疾患の原因となる異常タンパク質の処理機構として用いる本研究

の成果は、家族性ALSを初めとする異常タンパク質凝集が関与することが知られている様々な神経変性疾患に広く応用可能であると考えられた。

運動ニューロン疾患における恒常性監視機構について

ERAD に関与する糖鎖識別ユビキチンリガーゼとして発見したニューロン特異的なSCF^{Fbs1}の機能解析を分子レベルで行った。そしてFbs1とキトビオース(蛋白質のAsp残基に結合するGlcNAc-GlcNAc糖)の結合や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(論文投稿中)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サイトゾルで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、CHIPの新規パートナーとしてHsj-1を見出し、生化学的及び遺伝学的解析を行った。またHsj-1はCHIPと同様に、神経組織に特異的に発現しており、CHIPとともに神経細胞におけるタンパク質品質管理に重要な役割を果たしていることが予想された。現在、CHIP欠損マウスとHsj-1欠損マウスを交配して、二重ノックアウトマウスを作製中である。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, Katsuno M, Waza M, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. (2006) Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 1086:1-10.
- (2) Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2006) Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J. Neurosci.*

- 26:12106-17.
- (3) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. (2006) Alleviating neurodegeneration by an anticancer agent: an Hsp90 inhibitor (17-AAG). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086:21-34.
 - (4) Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Banno H, Suzuki K, Katsuno M, Tanaka F, Tamakoshi A, Sobue G. (2006) Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. *Brain* 129: 1446-1455.
 - (5) Sugiura M, Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. (2006) Clinicopathologic features of nonsystemic vasculitic neuropathy and microscopic polyangiitis-associated neuropathy: a comparative study. *J. Neurol. Sci.* 241: 31-37.
 - (6) Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. (2007) *Neurobiol Dis.* 25:331-41.
 - (7) Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. (2006) Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J. Biol Chem.* 281:23842-51.
 - (8) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2006) Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J. Mol. Med.* 84:635-46.
 - (9) 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.* 200:8-18.
 - (10) Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2006) Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: A pathogenic marker. *Ann Neurol.* 59:520-6.
 - (11) Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K., (2007) A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. *J Biol Chem.* in press.
 - (12) Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N, and Tanaka, K. (2006) 14-3-3 \cdot is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J.* 25, 211-221.
 - (13) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 3204-3209.
 - (14) Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. *J. Neurosci, Res.* 84, 1350-1357.
- ## 2. 学会発表
- (1) Sobue G: Pathogenesis-based therapeutic approaches for spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program, Korea-Japan Joint Seminar "Molecular and systemic basis of neurological disorders". Okazaki, February 9- 10, 2006
 - (2) Sobue G: Molecular targeted therapy for spinal and bulbar muscular atrophy. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 2, 2006
 - (3) Sobue G: Molecular targeted therapy for polyglutamine disease. French-Japanese Workshop on <Translational research from genome-based sciences to clinical medicine> French Academy of Sciences -

- Japan Society for the Promotion of Science. Paris, France, September 5, 2006
- (4) Sobue G: Molecular targeted therapy for spinal and bulbar muscular atrophy. 5th International Conference on Unstable Microsatellites and Human Disease. Granada, Spain, November 11-16, 2006
 - (5) Sobue G: Molecular targeted therapeutics for Spinal Bulbar Muscular Atrophy (SBMA). 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, November 30 - December 2, 2006
 - (6) Sobue G: Symposium Highlight: Clinical. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, November 30 - December 2, 2006
 - (7) Tanaka F, Jiang YM, Yamamoto M, Huang Z, Katsuno M, Adachi H, Niwa JI, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
 - (8) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Modulation of Hsp90 function: A molecular targeted therapy for neurodegenerative disorders. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
 - (9) Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Jiang YM, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Reversible disruption of retrograde axonal transport in spinal and bulbar muscular atrophy. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
 - (10) Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. CHIP overexpression reduces the mutant AR protein and ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
 - (11) Yamada S, Niwa J, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archeal proteasomes degrade mutant superoxide dismutase-1 and reduce its cellular toxicity. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
 - (12) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Sone J, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Alleviating polyglutamine-induced motor neuron degeneration by an Hsp90 inhibitor. 5th International Conference on Unstable Microsatellites & Human Disease. Granada, Spain, November 11-16, 2006.
 - (13) Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. CHIP over-expression reduces the mutant AR protein and ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model. 36th The Society for Neuroscience Annual meeting. Atlanta, USA, Oct, 2006.
 - (14) Keiji Tanaka : Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems] . January 12-13, 2006, Osaka, Japan.
 - (15) Keiji Tanaka : Ablation of autophagy causes neurodegeneration . The Movement Disorder Society's (MDS) 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (November 1, 2006), Kyoto.
 - (16) Keiji Tanaka, Yuko Hirano, and Shigeo Murata : Multiple Chaperones Assist the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . The Fourth NIBB-EMBL Symposium "Biology of Protein Conjugation: Structure and Function" . Okazaki Conference Center, Aichi, Japan (October 3-5, 2006), Okazaki.
 - (17) Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Eiki Kominami: Selective autophagy suppresses the formation of ubiquitin-positive aggregates, 4th International Symposium of Autophagy, October 1-4, 2006 Shizuoka, Japan.
 - (18) Noriyuki Matsuda, Toshiaki Kitami,

Toshiaki Suzuki, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori and Keiji Tanaka : Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. World Parkinson Congress February 22-26, 2006 Washington DC (Convention center), USA.

- (19) Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka ; Molecular assembly of mammalian 20S proteasomes ; 20th IUBMB ; June 23 2006 Kyoto.
- (20) Yuko Hirano, Klavs B Hendil, Keiji Tanaka, Shigeo Murata : Molecular Mechanism of assembly of mammalian 20S proteasomes. American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting, December 9-13, 2006, San Diego, USA.
- (21) Yasushi Saeki, Akio Toh-e, Keiji Tanaka : The 26S proteasome can recognize and degrade lysine 63-linked polyubiquitinated Sic1PY. FASEB Summer Research Conference on Ubiquitin and Cellular Regulation- July 22-27, 2006 Vermont, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法(特許出願中2006-076789)

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

II. 分担研究報告

古細菌プロテアソームによる家族性筋萎縮性側索硬化症治療の試み

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 20S プロテアソーム(PS)は細胞内で不要となったタンパク質の分解を行っているプロテアーゼ複合体である。古細菌は原始的なPS有するが、真核細胞のPSに比して分解力が強く、しかも2種類のみサブユニットからなる単純な構成を持つ。我々は古細菌 *Methanosarcina mazei* のPS (Mm-PS)のサブユニット α と β が、PS活性を持つ機能的な複合体を培養哺乳動物細胞内でも形成しうることを見出した。野生型および家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因である変異SOD1と共発現させると、Mm-PSは変異SOD1選択的な分解促進により用量依存性にSOD1タンパク質量を低下させ、神経細胞毒性を軽減した。さらに、変異SOD1以外の異常凝集体を形成するタンパク質の分解も促進することが明らかとなり、Mm-PS発現は、家族性ALSの新規治療法となりうる可能性があるのみならず、パーキンソン病やアルツハイマー病等の異常タンパク質凝集が関与する他の神経変性疾患の治療法としても有望であると考えられた。

A. 研究目的

20S プロテアソーム(PS)は不要となった細胞内タンパク質の分解を行っているプロテアーゼ複合体である。PSは変性した異常タンパク質の分解にも関与し、ユビキチン-プロテアソーム系のこの働きは、「タンパク質品質管理」と呼ばれている。アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病を初めとする様々なポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)など多くの神経変性疾患では、中枢神経系の病変部位にタンパク質凝集体の蓄積が見られるため、PSの活性低下が病態に大きく関与していると考えられている。家族性ALSの疾患モデルマウスの病変部位である脊髄前角組織においては、実際にPSの局所的活性低下が示されており、変異Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1)による異常タンパク質凝集体が運動ニューロン内に進行性に蓄積することが報告されている。今回我々が用いた古細菌PSは、真核細胞のPSの祖先にあたる。真核細胞のPSが各々7種類の α および β サブユニットからなる複雑な巨大タンパク質複合体であるのに対し、1種類のみ α および β サブユニットからなる単純な

構成を持つが、異常タンパク質の *in vitro* における分解活性は真核細胞のPSに比べて強力であると報告されている。本研究においては、我々は古細菌のPSが真核細胞内において毒性を示すことなく機能して異常タンパク質の分解を促進し、神経変性疾患の治療法として有望であるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. 古細菌プロテアソームのクローニングと哺乳動物細胞における発現の検討

37°Cが至適発育温度の古細菌 *Methanosarcina mazei* から、PS (Mm-PS)を構成する2種類のサブユニット(α および β サブユニット)をクローニングした。 β サブユニットのC末端にはHistidineタグを付加した。 β サブユニットの活性中心(Thr1)を変異(Thr→Cys)させ、PS全体の活性を喪失させた変異 β サブユニット(m β 1)を作成し、対照として全ての実験に用いた。Neuro2aおよびHEK293培養細胞にMm-PSの α 、 β サブユニットをトランスフェクションにより一過性に発現させ、Mm-PSが哺乳動物細胞内で機能的複合体を形成しうるかどうかを、

超遠心によるタンパク質画分およびNi+カラムにより単離した Mm-PS の活性測定などにより検討した。
2. Mm-PS による神経変性疾患原因タンパク質の分解促進活性の解析

家族性 ALS の原因の一つである変異 SOD1 および野生型 SOD1 と Mm-PS を共発現させ、SOD1 タンパク質の turnover に Mm-PS が与える影響を pulse-chase 解析などにより検討した。さらに、ポリグルタミン病の一つで運動ニューロンが障害される球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の原因である異常伸長したポリグルタミン (Q) 鎖を持つアンドロゲンレセプター (AR)、パーキンソン病に関連する α -synuclein、アルツハイマー病に関連する tau についても同様の実験を行った。

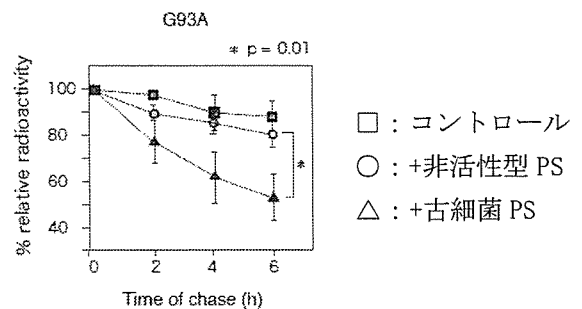
C. 研究結果

Mm-PS は、哺乳動物培養細胞内において、内在性 PS と同様のタンパク質画分に存在し、正常な活性を有するタンパク質複合体を形成していた。また Mm-PS 過剰発現による哺乳動物細胞への明らかな毒性は認められなかった。

培養細胞内において共発現させると、Mm-PS は変異 SOD1 の形成する凝集体と共局在していた。培養細胞内の変異 SOD1 タンパク質発現量は、Mm-PS タンパク質発現により用量依存性に低下した。Mm-PS の発現は、野生型 SOD1 には影響を与えなかった。

Cycloheximide chase 法および pulse chase 法を用いた検討から、Mm-PS は変異体特異的に SOD1 の分解を促進することで、変異 SOD1 タンパク質の発現量を減少させていることが示された (図 1)。MTS assay および caspase-3/7 assay の結果から、Mm-PS は変異 SOD1 による細胞毒性を用量依存性に軽減した。活性中心を失活させた変異 β サブユニットを含む変異 Mm-PS を発現させた場合には、変異 SOD1 の分解促進、毒性抑制効果は認められなかったことから、Mm-PS による上記の改善効果は Mm-PS が哺乳動物細胞内において PS として機能したことによるものであると推定された。

図 1 古細菌プロテアソーム (PS) による変異 SOD1 分解促進



同様に、Mm-PS は正常 AR の分解に影響を与えず、SBMA の原因となる伸長した Q 鎖を持つ異常な AR の分解のみを促進した。さらに、Mm-PS はパーキンソン病で蓄積していることが知られている α -synuclein およびアルツハイマー病で蓄積していることが知られている tau の分解も促進した。しかしながら、Mm-PS は正常細胞内にも豊富に存在している α -tubulin や GAPDH などの正常タンパク質には影響を与えなかった。

D. 考察

我々は古細菌 PS が、哺乳動物細胞内においても毒性を発揮せずに、活性を有する機能的な複合体を形成しうる事を明らかにした。さらに、培養細胞内において、異常凝集体を形成しやすく細胞毒性を持つ変異 SOD1 を初めとする神経変性疾患原因タンパク質の分解を特異的に促進しうることを見出した。培養細胞の内在性 19S との結合はせず、シャペロンタンパク質である各種 HSP の発現量変化もないことや、活性を喪失した変異 β サブユニットからなる変異 Mm-PS では異常タンパク質の分解促進効果が消失することなどから、Mm-PS が哺乳動物細胞内で直接 PS として異常タンパク質を除去していると推定された。今後、Mm-PS を神経系に高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、変異 SOD1-Tg マウスなどの神経変性疾患モデルマウスと交配することにより、神経変性疾患の新規治療法として Mm-PS が有用であることを *in vivo* でも検討してゆく予定である。

E. 結論

古細菌の PS を、細胞内の内在性 PS では処理しき

れずに蓄積して疾患の原因となる異常タンパク質の処理機構として用いる本研究の成果は、家族性ALSを初めとする異常タンパク質凝集が関与することが知られている様々な神経変性疾患に広く応用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. (2007) *Neurobiol Dis.* 25:331-41.
2. Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. (2006) Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J Biol Chem.* 281:23842-51.
3. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2006) Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J Mol Med.* 84:635-46.
4. 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.* 200:8-18.
5. 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.

2. 学会発表

1. Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. CHIP overexpression reduces the mutant AR protein and ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model. 17th International Symposium on

ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.

2. Yamada S, Niwa J, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archaeal proteasomes degrade mutant superoxide dismutase-1 and reduce its cellular toxicity. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
3. Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. CHIP over-expression reduces the mutant AR protein and ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model. 36th The Society for Neuroscience Annual meeting. Atlanta, USA, Oct, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

凝集体形成性タンパク質分解用の発現コントロール、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法(特許出願中 2006-076789)

球脊髄性筋萎縮症における逆行性軸索輸送障害とその可逆性

分担研究者 田中 章景 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学特任助教授

研究要旨 球脊髄性筋萎縮症(SBMA)のトランスジェニックマウスの病態初期における逆行性軸索輸送障害を検討した。SBMA マウス脊髄や前根では発症前から dynactin1 の蛋白質発現レベルが低下していたが、中枢神経内の非病変部では蛋白量は保たれていた。坐骨神経の結紮遠位部に集積するシナプス小胞関連蛋白、ニューロフィラメントの量は発症前から減少していたが、結紮近位部への集積には異常はみられなかった。Fluorogold の腓腹筋内投与および坐骨神経への直接投与いずれによっても、逆行性に標識される脊髄前角細胞数は発症前から減少していた。これらの異常はいずれも去勢により改善し、可逆性であることが示された。SBMA の培養細胞モデルにおいても dynactin1 の mRNA および蛋白質発現レベルが低下していたが、dynactin1 の強制発現により細胞死が抑制された。以上より、dynactin1 の発現低下による逆行性軸索輸送の障害が SBMA の発症に深く関与しており、治療のターゲットとなりうると考えられた。

A. 研究目的

神経変性疾患の治療を開発するためには、治療による病態の可逆性および初期病態の分子機構を明らかにすることが重要である。我々はこれまで、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)の病態解明と治療法の開発を進めてきており、さらに SBMA 以外の運動ニューロン疾患にも共通する病態機構の解明を目指し研究を進めてきた。

SBMA はアンドロゲン受容体(AR)遺伝子の CAG リピートの異常延長を原因とする神経変性疾患であり、下位運動ニューロンの変性による緩徐進行性の四肢筋萎縮および筋力低下、球麻痺を主症状とする。治療法はなく、進行性の経過をたどり、予後は極めて悲観的である。我々はこれまでに SBMA のマウスモデルを用い、病態を抑止する治療法の開発とその臨床応用を行ってきた。我々が作成した SBMA のモデルマウスでは、神経症状が雌に比べ雄において重篤かつ急速に進行し、雄マウスに去勢あるいは LHRH アナログの投与を行ったところ血清テストステロン濃度の低下に伴い変異 AR の核内移行が抑制

され、運動障害は著しく改善した。すなわち、テストステロン依存性の変異 AR の核内集積が SBMA の病態の中心をなしており、同時に治療の標的になると考えられた。マウスでの研究成果に基づき、我々は LHRH アナログの第Ⅱ相臨床試験を行い、その結果、LHRH アナログにより陰囊皮膚における変異 AR 蛋白質の核内集積が有意に抑制され、血清 CK も有意に減少することが明らかとなった。また、LHRH アナログにより嚥下障害が改善する傾向が示された。以上の結果に基づき、我々は昨年 9 月から第Ⅲ相臨床試験として多施設共同二重盲験試験を医師主導治験として実施している。

今年度は、とくに軸索輸送に注目し、SBMA の初期病態における分子機構の解明と、治療による可逆性の解析を行った。

B. 研究方法

1. 免疫組織化学

用いた主な抗体は以下の通り：抗 dynactin1 (610473, BD, 1:250)、phospho NF-H (SMI31,

Sternberger, 1:1000)、抗polyglutamine (MAB1574, Chemicon, 1:10000)。Dynactin1染色にはmicrowaveによる抗原賦活を使用した。

2. Immunoblotting

用いた主な抗体は以下の通り：抗dynactin1

(1:250)、dynein IC (MAB1618, Chemicon, 1:1000)、抗kinesin HC (MAB1614, Chemicon, 1:10000)。

3. mRNA解析

In situ hybridizationおよびreal time RT-PCR (iCycler) による定性および定量的解析を行った。

4. Fluoro gold labelling

Ketamine-xylazine麻酔下で2.5% Fluoro gold溶液4.5 μ lをハミルトンシリンジを用いマウス腓腹筋に投与、ないし大腿中央で座骨神経を結紮し断端をFluoro gold溶液に浸透した。

5. 座骨神経結紮

ketamine-xylazine 麻酔下でマウス大腿中央で座骨神経を結紮し、免疫組織化学および結紮部近傍の神経から蛋白質を抽出しimmunoblottingを行った。

C. 研究結果

まず、SBMA モデルマウスの骨格筋の免疫組織化学を解析したところ、ニューロフィラメントが筋線維間に蓄積していた。この蓄積はマウスの神経症状発症に先行して認められ、症状の進行とともに増強した。抗ニューロフィラメント抗体と α -bungarotoxinを用いた免疫蛍光法で詳細に観察すると、ニューロフィラメントは終板近傍の運動ニューロン遠位軸索に集積していた。同様の集積は患者肋間筋でも観察された。また、シナプス小胞関連蛋白質のうちシナプトフィジンはニューロフィラメントと同様の蓄積を示したが、Rab-3Aの蓄積は認められなかった。ニューロフィラメントやシナプトフィジンは軸索内を順行性および逆行性に輸送されるが、Rab-3Aは順行性にのみ輸送されることに着目し、SBMAマウスにおいて逆行性軸索輸送の異常が軸索蛋白質の異常蓄積の原因であると仮説を立てた。坐骨神経結紮法によりシナプス小胞関連蛋白質の軸索輸送を調べたところ、Rab-3Aの順行性軸索輸送には異常は認められなかった。シナプトフィジンに関しても順行性軸索輸送には異常は認められな

かったが、野生型マウスに比べてSBMAマウスでは逆行性に輸送されるシナプトフィジンの量が有意に減少していることが明らかとなった。この減少はマウスの神経症状発症前から認められ、進行とともに顕著となった。さらに、軸索内を逆行性に輸送される蛍光マーカであるフルオロゴールドの腓腹筋内投与により脊髄前角の運動ニューロンをラベルしたところ、野生型マウスに比べてSBMAマウスでは発症前からラベルされるニューロン数が減少していることが明らかとなった。軸索末端での異常による影響を除外する目的で、フルオロゴールドの坐骨神経内直接投与も解析したが、腓腹筋内投与の結果と同様、SBMAマウスでは発症前からラベルされるニューロン数が減少していた。次に、SBMAマウスにおける軸索輸送障害の分子機構を解明するため、軸索輸送を担うモーター蛋白質の発現量を定量したところ、SBMAマウスの脊髄運動ニューロンおよび前根ではdynactin 1蛋白質の発現量が発症前から有意に減少しており、そのmRNAレベルも発症前から減少していた。Dynactin 1はdyneinなどと複合体を形成し、順行性および逆行性軸索輸送を制御する蛋白質であり、その遺伝子変異により遺伝性運動ニューロン疾患が生じることが報告されている。Dynactin 1以外の複合体の構成蛋白質としては、dynein heavy chainの発現は発症早期では野生型と差がなかったが、進行期のマウスでは前根で発現が減少していた。それ以外のdynein intermediate chainやdynamitin (p50)については発現に異常は認められなかった。In situ hybridizationを解析するとdynactin 1のmRNAレベルは変異アンドロゲン受容体の核内集積を伴うニューロンでは低く、変異アンドロゲン受容体が核内に集積していないニューロンでは高いことが明らかとなった。以上から、ポリグルタミン鎖の延長した変異アンドロゲン受容体の核内集積によるdynactin 1の転写障害が逆行性軸索輸送障害の原因であると考えられた。

一方、SBMAマウスでは著しい神経症状にもかかわらず神経細胞死が認められないことから、神経細胞の機能障害が神経症状発現の原因と考えられる。この神経細胞機能障害の可逆性を解析するため、神経症状発症後早期のSBMAマウスに去勢術を行ったと