

C. 研究結果

TG マウスでは神経細胞の Syn 蓄積が神経変性に関与した。TG マウスの神経細胞とオリゴデンドロサイトの共培養系で、マウス脳オリゴデンドロサイトのヒト Syn の発現に続いて、培養後第21日から神経細胞にマウス Syn の蓄積が神経突起や神経細胞に観察された。一方、同じ共培養でオリゴデンドロサイトを含むグリア細胞の発育を阻止すると、神経細胞内の Syn 蓄積は著明に低下した。以上の結果より、オリゴデンドロサイトに Syn 蓄積は神経細胞の Syn 蓄積を誘導することを示した。

次にTG マウス脳に蓄積する Syn の生化学的性質について検討した。TG マウス脳に蓄積する Syn は、MSA 患者脳組織と同様に不溶化する性質を示した。さらに、神経細胞の Syn 蓄積のメカニズムを明らかにするために、Syn と同様に不溶化し、Syn と相互作用する蛋白を検討する。

D. 考察

今日、多系統萎縮症(MSA)の神経変性に対する根本的な治療法はなく、MSA に対する治療法の開発が望まれる。MSA を含む神経変性疾患の治療法を開発するためには、発病の機序を解明し、その過程の中から治療可能な標的をさがすことが重要である。本研究では、MSA の疾患モデルマウスにより発病機序を解明し、ヒト組織で解明された機序を検証した。本研究により、MSA 発病機序の解明のために有用なモデル動物が得られた。さらに、治療を目的とした細胞レベルの研究を行うために、初代培養系を確立した。今後、細胞レベルの治療、モデル動物の治療、さらにヒトへの応用と治療に関する研究を段階的に進める。

E. 結論

- ・ MSA の治療研究を行うために、重要なモデルマウスが得られた。
- ・ 神経細胞に起こる Syn の蓄積と不溶化は、MSA の発病に関与する。

F. 研究発表

1. 論文発表

矢澤生. 脳バンク 日本における現状と問題点. 医学のあゆみ. 220 巻, 820-823 頁, 2007 年

2. 学会発表

矢澤生, 鈴木康予, 中山貴美子. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)蛋白分解の検討. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 2007 年 5 月 18 日

中山貴美子, 鈴木康予, 矢澤生. 多系統萎縮症モデルマウスにおける神経細胞内 α -synuclein 複合体の動態解析. 第 30 回日本神経科学大会, 横浜, 2007 年 9 月 11 日

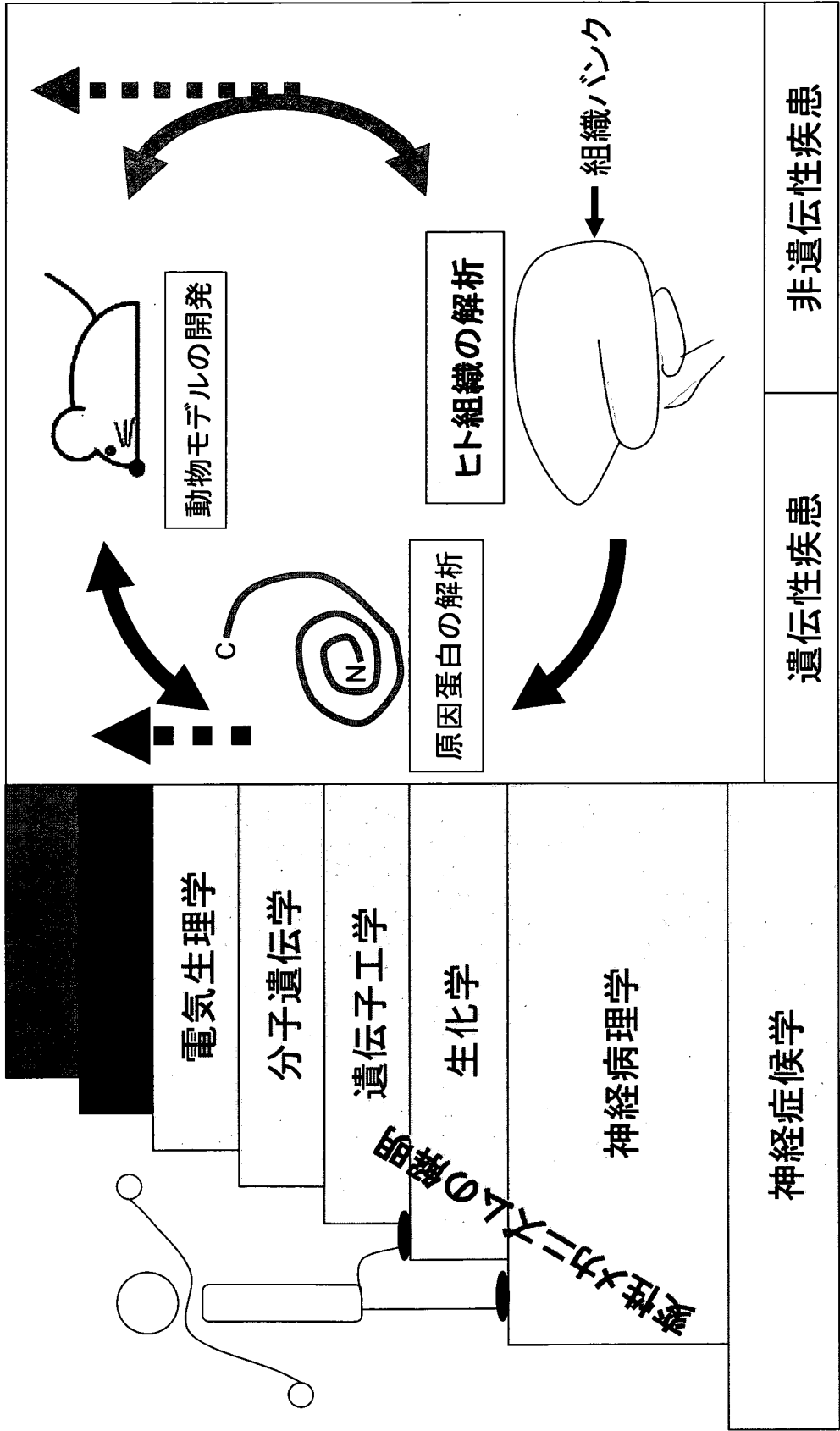
鈴木康予, 中山貴美子, 矢澤生. 異なる発現系で産生される DRPLA 原因遺伝子産物の比較. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2007), 横浜, 2007 年 12 月 13 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

脊髄小脳変性症の治療法の開発をめざして

治療法の開発



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

運動失調症に関する調査研究

ATXN1 遺伝子における CAG リピートの分子進化

分担研究者	松浦 徹	名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学講座
研究協力者	黒崎 辰昭	名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学講座
	大野 欽司	名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学講座
	植田 信太郎	東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

研究要旨

霊長類 *ATXN1* における CAG リピート比較解析を行い、系統特異的な差を明らかにした。CAG リピートは新世界ザル分岐後の共通祖先段階に出現し、霊長類進化における起源が明らかになった。また類人猿、ヒトにおいて比較的長いリピートが見られたことから、*ATXN1* では神経疾患の危険性を増大させる方向にヒトや類人猿は進化したと考えられる。リピート伸長に伴う機能的優位性の有無や、他のリピート病原因遺伝子における分子進化は今後さらに解明されるべき課題である。

A. 研究目的

SCA1 は *ATXN1* 遺伝子 exon 8 内 CAG リピートの異常伸長が原因となる (>38 リピート)。CAG リピートはげっ歯類において存在しないが、ヒト正常コントロールにおいて 6-44 の範囲に分布を見せる。本研究では CAG リピート不安定性機構に関する知見を得るため霊長類内でリピート配列の比較解析を行い、ヒト進化におけるリピート配列の起源と分子進化様式を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

① *ATXN1* CAG リピート獲得の進化様式を明らかにするため、霊長類 26 種（類人猿 4 種、旧世界ザル 13 種、新世界ザル 7 種、原猿 2 種）においてリピート配列

を PCR 後ダイレクトシーケンス法により決定した。またリピートに heterozygosity が見られた場合はクロニングを行った。

- ② CAG 反復配列や interruption 獲得の分子的背景に関する知見を得るため、霊長類 *ATXN1* リピートの DNA 二次構造比較解析を行った（DNA mfold プログラム）。
- ③ CAG リピート獲得進化に伴う分子間相互作用の変化を解析するため、大腸菌内で組み替えタンパク質を発現後カラムクロマトグラフィーで精製し、表面プラズモン共鳴法（SPR 法）にて解析した。

C. 研究結果

① ダイレクトシーケンスの結果、原猿・新世界ザルの *ATXN1* オルソログでは明確

なりリピート構造を形成せず、モザイク状構造を形成することがわかった。CAG リピートは旧世界ザル・類人猿・ヒト共通の遺伝的形質であり、新世界ザル・原猿のモザイク状リピートに比べ反復回数多様性が大きいことが明らかになった。また比較的リピートの長い類人猿において interruption が配列内に出現することが判明した。

②類人猿・旧世界ザル・新世界ザルにおいて独特の二次構造（ヘアピン構造）が形成され、リピート長依存的にその構造が安定化することが判明した。また逆に interruption がヘアピン構造を不安定化させることがわかった。

③ PolyQ を特異的に認識し結合する因子 polyQ binding protein 1 (PQBP1) と ATXN1 polyQ との相互作用を SPR 法によって解析した。その結果 PQBP1 は旧世界ザル型 polyQ (Q11) と結合するものの、新世界ザル型モザイク配列 (Q2PQ2P4Q2) とは結合しないことが判明した。

D. 考察

旧世界ザル・類人猿・ヒトの CAG リピートは原猿、新世界ザルのモザイク状リピートよりも反復回数多様性が増す傾向が見られたが、リピート伸長機構の一因として CAG リピートが形成するヘアピン構造が考えられる。ヘアピン安定性がリピート長依存的に増加することや、逆に interruption によって不安定化することが明らかとなった。この結果は *ATXN1* CAG リピートが霊長類進化の過程で獲得され、ヘアピン形成を介してリピート長が多様性を増し、比較的リピートの長い種（類人猿、ヒト）にお

いて interruption を獲得し、それ以上の伸長が抑制されるという進化的シナリオを示唆する。CAG リピート獲得に伴うタンパク質機能の変化として、*ATXN1*-*PQBP1* の相互作用変化が考えられる。*PQBP1* は発生段階の中樞神経系で発現が強くみられる因子で、神経細胞死を制御するとされる。今回の結果は霊長類進化（新世界ザル分岐後の共通祖先段階）において、*ATXN1* と *PQBP1* のタンパク質間相互作用様式に変化が起こった一つの証拠と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

・Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, et al. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet* 16: 215-222, 2008

・Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Long-range PCR for the diagnosis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurogenetics* in press.

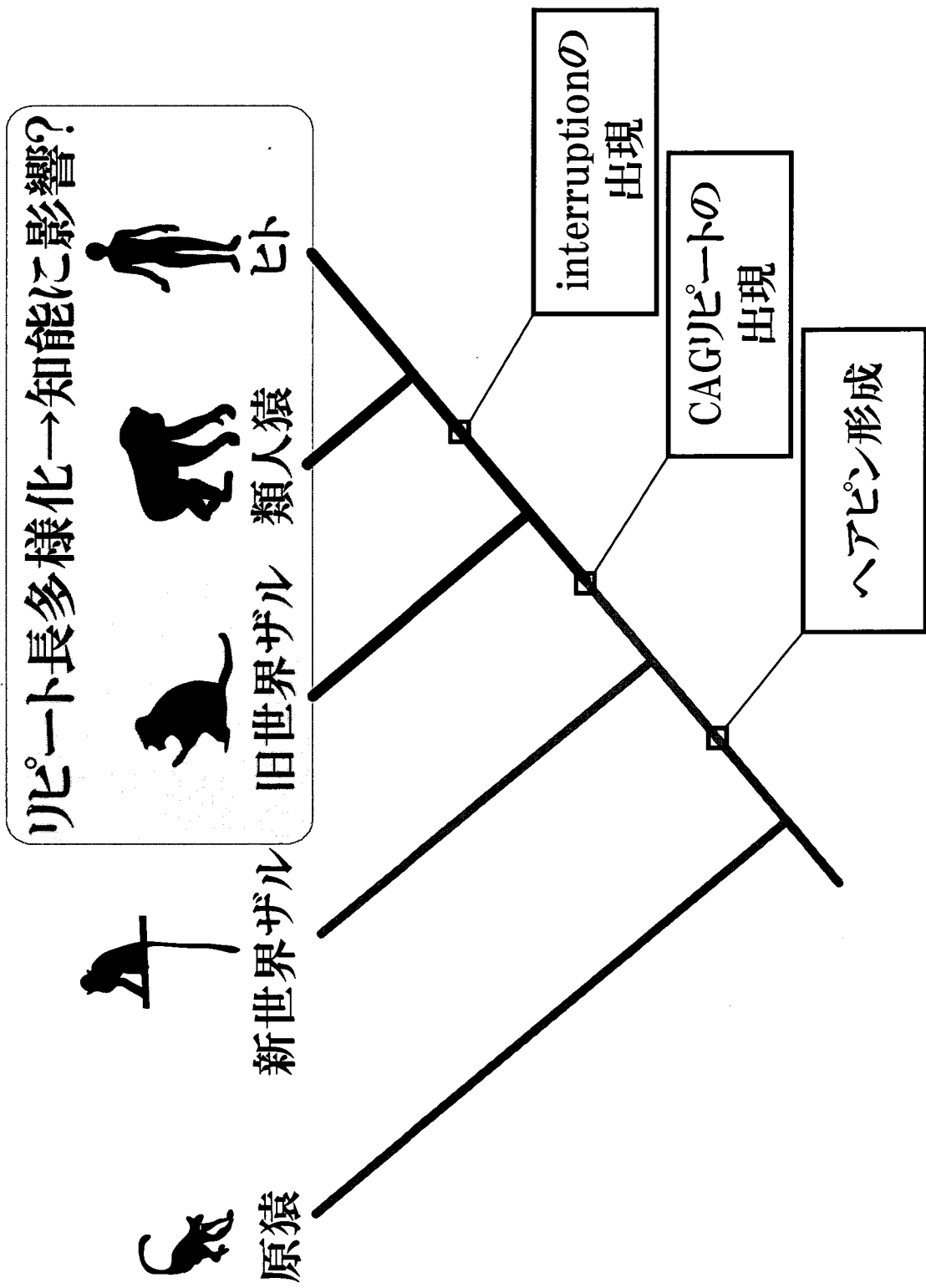
2. 学会発表

・Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Comparative analysis of the ATTCT pentanucleotide repeat in *ATXN10* gene reveals that the pathogenic repeat derived from *A/u*. Society for Molecular Biology and Evolution 2007 Annual Meeting, Halifax, Nova Scotia, Canada, 2007, July 24-28.

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ATXN1(CAG)リピートは新世界ザル分岐後の共通祖先段階
 に出現し、ヒトに至る霊長類進化の過程で伸長した



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

運動失調症に関する調査研究班

DRPLA タンパク移行経路解析

分担研究者 研究協力者	辻	省次	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	出岡	顕	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	伊達	英俊	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	後藤	順	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科

研究要旨

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の病態機序及び治療法開発に関連して重要と考えられる DRPLA タンパクの核移行機序を明らかにするため、DRPLA タンパクの核移行シグナルの解析と核移行に関与するシステムを解析した。DRPLA タンパクでは、33-99aa に核移行シグナルが存在し、importin β superfamily 依存的核輸送経路にて核移行が行われていることが示唆された。

A. 研究目的

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)病態機序として、変異 DRPLA タンパクの核内集積が重要であることを明らかにしてきた。DRPLA タンパクの核移行の機序を明らかにすることを目的として、核移行シグナルの同定をめざした。

わる trans-element を探索する目的で、Importin β super family 依存的核輸送についての検討を行った。

B. 研究方法

DRPLA タンパクの核移行に関わる cis-element を検出する目的で、DRPLA タンパクのアミノ酸配列から核移行シグナル(NLS)と予想される配列を PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/>)により検討した。

検出された二つのアミノ酸配列(Seg1, Seg3)とその間の配列(Seg2)に対し site-directed mutagenesis により変異を導入したコンストラクトを HEK293 細胞において発現させ、標的配列が DRPLA タンパクの核局在に必要であるかを免疫細胞染色法で検討した。

次に、それらの配列が NLS として機能することを示すために、3xEGFP の C 末端に標的配列を連結したコンストラクトを発現させ、その細胞内局在を検討した。

さらに、DRPLA タンパクの核移行に関

C. 研究結果および考察

Seg1 (16-32aa, putative NLS1), Seg2 (33-86aa), Seg3 (87-93aa, putative NLS2) について、site-directed mutagenesis 法により変異を導入した DRPLA タンパクを発現させた HEK293 細胞を免疫細胞染色法で観察した結果、mSeg2, mSeg3 は核への局在性を失っていた。

3xEGFP の C 末端に Seg1, 2, 3 を様々な組み合わせで連結したコンストラクトを発現させた HEK293 細胞の観察の結果、3xEGFP-Seg1+Seg2+Seg3, 3xEGFP-Seg2+Seg3 は顕著な核局在を示した。このことから、Seg2, Seg3 がタンパクの核移行に十分な element であり、DRPLA タンパクの NLS は Seg2, Seg3 (33-93aa)であることが示唆された。

次に、importin β superfamily 依存的核輸送経路に関わる Ran の dominant negative mutant である Ran Q69L と DRPLA タンパクを発現させた HEK293 細胞の免疫細胞染色の結果、Ran Q69L と DRPLA タンパクが共発現している細胞においては

DRPLA タンパクの核局在が阻害されていた。このことから、DRPLA タンパクは importin β superfamily 依存的核輸送経路によって核移行していることが示唆された。

DRPLA タンパクが古典的核移行経路により核移行を行っているという仮説に基づき、DRPLA タンパクを一過性に強制発現させた HEK293 細胞に対し anti-DRPLA タンパク抗体を用いて免疫沈降を行い、importin α を western blotting 法で検出した結果、importin $\alpha 3, 5$ が検出された。一方、mSeg3 に対する免疫沈降では importin α は検出されなかった。このことから DRPLA タンパクは importin $\alpha 3, 5$ と interaction しており、その interaction には Seg3 が必要であることが示唆された。

D. 結論

DRPLA タンパクは 33-93a.a に存在する核移行シグナルを介して、importin $\alpha 3, 5$ と interaction し、さらに importin $\beta 1$ とヘテロ三量体を形成すると考えられ、その結果 Nuclear pore complex を通過する。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

増大ポリグルタミン鎖によるオリゴマーの細胞障害性の解析

分担研究者 小野寺理 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター)

研究協力者

菊地信矢 (新潟大学脳研究所神経内科学分野)、堅田慎一 (新潟大学脳研究所神経内科学分野)、高橋俊昭 (新潟大学医学部生体情報学講座) 西澤正豊 (新潟大学脳研究所神経内科学分野)

研究要旨

ポリグルタミン病は、原因遺伝子内のグルタミン繰り返し配列の異常伸長による一連の神経変性疾患群であるが、増大したポリグルタミン鎖による細胞障害性の機序については解明されていない。本研究では、FRET (fluorescence resonance energy transfer) 技術を用いて、増大ポリグルタミン鎖のオリゴマー形成を可視化することに成功し、オリゴマーが細胞死を引き起こすことを示した。一方、封入体は、細胞障害性に対し防御的であることを示した。オリゴマーの形成は、本疾患の分子病態の解明や治療ターゲットとしても重要な意義をもつと考えた。

A. 研究目的

ポリグルタミン病では核内封入体の形成が病学的に特徴とされ、細胞死を引き起こすとされてきた。しかし、近年、核内封入体は、細胞死に対しむしろ抑制的、予防的に働いており、封入体の形成前に生じる増大ポリグルタミン鎖によるオリゴマーが細胞障害性を獲得する可能性が示唆されている¹⁾²⁾。

本研究は、蛋白質相互作用の解析に広く用いられるFRET法(fluorescence resonance energy transfer)を応用し³⁾、封入体形成に先行するポリグルタミンオリゴマーを可視化し、ポリグルタミンオリゴマーの細胞障害性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

ポリグルタミン鎖(部分DRPLA蛋白およびハンチンチン exon1)に mCFP (donor), mYFP (acceptor) を付加したプラスミドを作成し parallel および anti-parallel の組み合わせの下で培養細胞(COS7)に一過性導入し共焦点レーザー顕微鏡 (CSU10) を用いFRET解析を行った⁴⁾。

さらに増大ポリグルタミン鎖を安定発現するSH-SY5Y細胞株を確立し、レチノイン酸、BDNF添加により神経細胞に分化誘導後、FRET陽性細胞群、FRET陰性細胞群、封入体形成群の3群において、各群の細胞生存期間を観察した。

C. 結果

生細胞内でポリグルタミン鎖のオリゴマー形成をFRET法により、可視化しえた。これにより、ポリグルタミン鎖発現細胞を 1) FRET陽性細胞(オリゴマー形成細胞) 2) FRET陰性細胞(オリゴマー非形成細胞) 3) 封入体陽性細胞の3群に判別した。

FRET値およびFRET陽性となる細胞頻度について、グルタミン伸長数との関連性を検討した。ポリグルタミン鎖は、グルタミン伸長数依存性にFRET陽性細胞の出現頻度が増加し、かつFRET値も増加した。

ポリグルタミン鎖は parallel の組合せの時のみ蛋白間相互作用を示した。すなわち、FRETは蛍光蛋白(donor, acceptor)がポリグルタミン鎖の同じサイドに結合されたconstruct同士の組み合わせにおいてのみ観察された。ポリグルタミン鎖によるダイマーは、parallelに配置(互いにN末、C末をそろえて蛋白間結合)、あるいはcylindrical β -sheet構造をとっている可能性が示唆された。

封入体が形成とオリゴマー形成の関連を検討した。封入体形成がはじまると、封入体のFRET値が急速に増大するとともに、細胞質のFRET値および蛍光値は同じく急速に低下した。この結果からは、細胞内のオリゴマーは、封入体に取り込まれることが示唆された。

最後に、オリゴマーの細胞毒性を検討するために、ポリグルタミン鎖安定発現SH-SY5Y細胞でFRET陽性細胞、FRET陰性細胞、封入体形成細胞の3

群において生存日数を検討した。生存日数はそれぞれ3.0日、4.0日、6.0日であった。すなわち、オリゴマーが形成されているFRET陽性細胞群では生存期間が有意に短縮し、封入体を形成した細胞群では生存期間が延長していた ($p < 0.0001$)。活性型 Caspase 3 の免疫染色陽性率も、FRET陽性細胞群では封入体形成群に比べ有意に増加した。

D. 考察

従来、ポリグルタミン病は、増大ポリグルタミン鎖による封入体が細胞障害性を持つと考えられてきた。そのため、それをメルクマールに細胞障害機序や治療候補薬剤の検討がなされてきた。

しかし、近年、封入体は細胞毒性を持たないとする知見が集積されつつある。Arrasateらは封入体形成細胞の生存率が、封入体非形成細胞より高いという結果を示し、細胞障害性は封入体を形成しないポリグルタミン鎖にあることを明らかとした²⁾。すなわち、封入体形成前の可溶性のオリゴマーもしくはモノマーの状態のポリグルタミン鎖に細胞障害性があると想定されるに至った。しかし、従来、オリゴマーとモノマーを生細胞下で区別することは困難であり、十分な検証がなされてはいなかった。

我々は、FRET解析法を応用し増大ポリグルタミン鎖によるオリゴマーを生細胞下で可視化する方法を確立した。これにより、オリゴマーが形成された細胞ではモノマーや封入体形成細胞に比して、細胞死リスクがより高いことを示した。一方、封入体形成に伴い細胞内オリゴマーは減少し、封入体形成は結果として細胞死に対して防御的に働くことを示した。

今後、オリゴマー形成を阻害する薬剤をスクリーニングすること、また、オリゴマー形成による細胞障害機序が明らかにされることにより、本症の新たな治療方法が開発されることが期待される。

E. 結論

FRET解析を用いて、ポリグルタミン鎖のオリゴマー形成を可視化することに成功した。

ポリグルタミンオリゴマー形成が重要な細胞障害因子であることを示した。

引用文献

1) Ross CA et al. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A.

100(1), 1-3.

2) Arrasate M et al. (2004) Nature. 431, 805-810.

3) Xia Z. and Liu Y. (2001) Biophys. J. 81, 2395-2402.

4) Zacharias DA et al. (2002) Science. 296, 913-916.

F. 研究発表

Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. (2007 Nov.) Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. Takahashi et al.

1. 論文発表

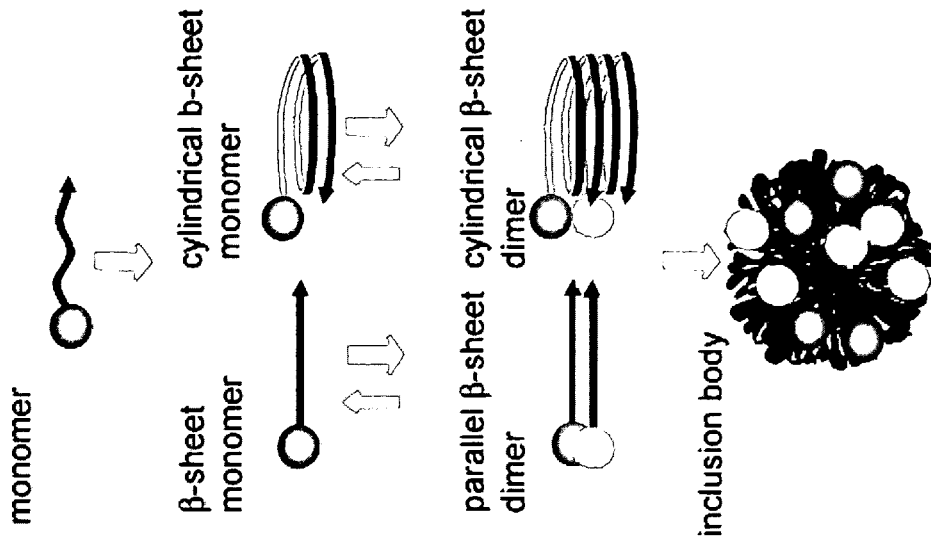
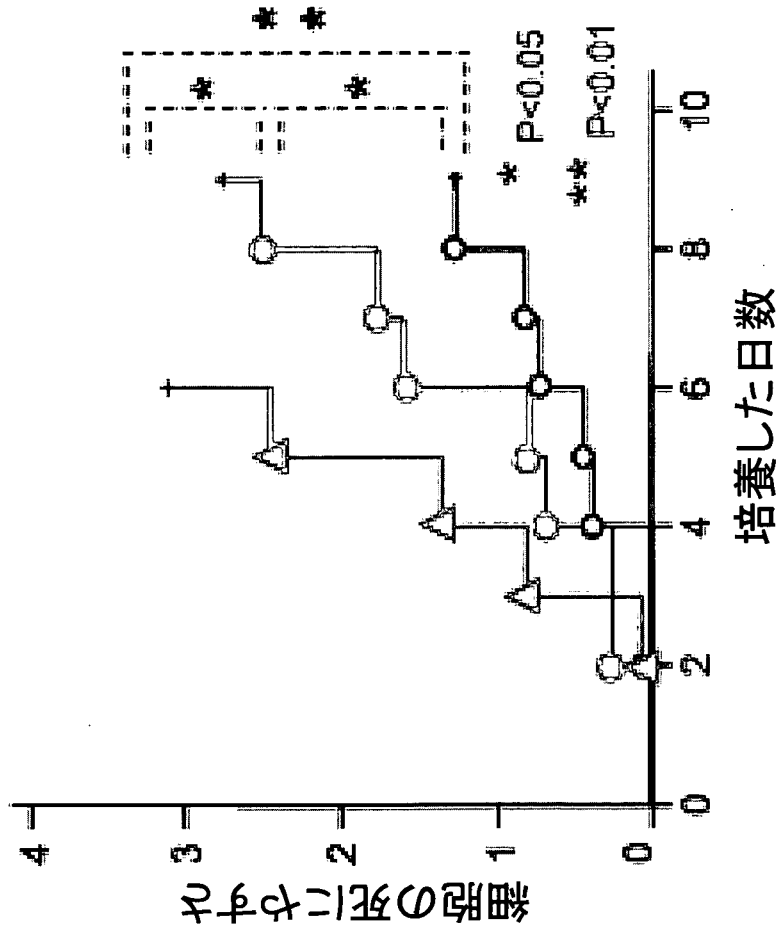
Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2008). Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. Hum Mol Genet 17, 345-356.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

脊髄小脳失調症の原因蛋白“増大ポリグルタミン鎖”の毒性を持つ構造を明らかにしました(新潟大 小野寺)

神経細胞における増大ポリグルタミン鎖の構造別の細胞毒性



従来毒性があるとされたinclusion body(○)より、dimer, oligomer 構造をとったもの(赤△)がより毒性を持つ。この構造に注目した薬剤開発が期待されます。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

運動失調症に関する調査研究班

ポリグルタミン蛋白質の毒性構造体の捕捉—露出 β シート仮説の提唱—

分担研究者	永井 義隆	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
研究協力者	乾 隆	大阪府立大学大学院環境生命科学研究科蛋白質科学
	ポピエル 明子	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
	藤掛 伸宏	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
	後藤 祐児	大阪大学蛋白質研究所蛋白質構造形成
	内木 宏延	福井大学医学部分子病理学
	戸田 達史	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学

研究要旨

近年、ポリグルタミン(PolyQ)病を含む多くの神経変性疾患の発症に共通に異常蛋白質の構造異常・凝集が深く関わると考えられている。しかし、異常伸長 PolyQ 蛋白質が凝集体形成に至る過程で生じる詳細な構造変化、そして神経毒性を発揮する構造体についてはこれまで未解明であった。本研究では PolyQ 蛋白質の構造生物学的解析を行い、その結果異常伸長 PolyQ 蛋白質はモノマーレベルで β シート構造への異常コンフォメーション変移を生じ、その結果アミロイド線維状凝集体を形成することを明らかにした。そして、中間体の可溶性 β シートモノマーが細胞毒性を発揮することを見出した。さらに異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 は、異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移を阻害して神経変性を抑制することから、毒性 β シート変移の阻害が治療標的として重要であると考えられた。以上のことから、PolyQ 病をはじめとするコンフォメーション病において、ミスフォールド蛋白質の β シート変移による細胞毒性獲得と、アミロイド線維形成・凝集による分解抵抗性獲得の両者が神経変性疾患発症に寄与するという露出 β シート仮説を提唱する。

A. 研究目的

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン(PolyQ)病などの多くの神経変性疾患において、蛋白質ミスフォールディングに起因する異常蛋白質の凝集・蓄積が病態に深く関わると考えられるようになり、コンフォメーション病と総称されている。このうち PolyQ 病はハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症など9疾患の総称であり、これらの疾患では PolyQ 鎖の異常伸長(>40)により原因蛋白質がミスフォールディングを起こして異常コンフォメーション変移を獲得し、その結果難溶性の凝集体を形成して最終的に神経細胞内に封入体として蓄積し、このような過程を経て神経変性を引き起こすと考えられている。しかし最近、封入体自身はミスフォールド蛋白質を無毒化するための防御機構として形成され、むしろ可溶性の微細なオリゴマーの方が強い細胞毒性を示すと考えられるようになった。しかしながら、これまで異常伸長 PolyQ 蛋白質が凝集体形成に至る過程で生じる詳細な構造変化、そして神経毒性を発揮する構造体については未解明であった。そこで本研究では、異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常・毒性構造体を解明し

て PolyQ 病の治療標的を特定することを目的として、PolyQ 蛋白質の構造生物学的解析を行った。

B. 研究方法

①異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造解析: PolyQ 鎖の溶解度を改善させるため Thioredoxin との融合蛋白質 Thio-PolyQ を作製し、大腸菌で発現・精製した。Thio-PolyQ 蛋白質の二次構造変化を円偏光二色性分散(CD)にて、凝集体形成を濁度測定法にて評価した。そして可溶性 Thio-PolyQ 蛋白質の会合状態を Native PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)、超遠心分析(AU)にて評価した。一方 Thio-PolyQ 蛋白質凝集体の二次構造をフーリエ変換赤外分光(FT-IR)にて、微細構造を電子(EM)/原子間力顕微鏡(AFM)にて評価した。

②異常伸長 PolyQ 蛋白質構造体の細胞毒性評価: Thio-Q62 の様々な構造体を COS-7 細胞へマイクロインジェクションして経時的に細胞生存率を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトを直接対象とした研究および動物実験は行っておらず、特記すべきことはない。

C. 研究結果および考察

①異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常: 溶液中の Thio-PolyQ 蛋白質の CD 測定を行ったところ、PolyQ 鎖長依存的な α ヘリックス含有率の増大が示された。しかし異常鎖長の Thio-Q62 では、経時的に α ヘリックス構造から β シート構造への異常コンフォメーション変移を認め、それに伴って凝集体を形成した。Native PAGE、SEC、AU の結果から、この Thio-Q62 の可溶性 β シート中間体はモノマーであると考えられた。一方 Thio-Q62 の凝集体については、FT-IR 測定から β シート構造に富むことが示され、EM/AFM 観察からアミロイド線維状構造を持つことが明らかになった。以上の結果から、異常伸長 PolyQ 蛋白質モノマーは、 β シート構造への異常コンフォメーション変移を生じ、その結果アミロイド線維状凝集体を形成すると考えられた。

②異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性構造体: Thio-Q62 の α ヘリックスモノマー、 β シートモノマー、およびアミロイド線維状凝集体を COS-7 細胞へマイクロインジェクションした結果、アミロイド線維状凝集体のみならず可溶性 β シートモノマーも濃度依存的に細胞毒性を発揮することを見出した。以上の結果から、異常伸長 PolyQ 蛋白質は、 β シート構造へのコンフォメーション変移を経て細胞毒性を獲得すると考えられた。

③QBP1 による異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移の阻害: 神経変性抑制効果を示す異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合ペプチド QBP1 (SNWKWWPGIFD) について、その作用点を解明するために、Thio-Q62 の構造異常に与える影響を検討した。CD、EM/AFM の結果、QBP1 は Thio-Q62 の毒性 β シート変移を阻害して、その結果アミロイド線維状凝集体形成を阻害することを見出した。さらにマイクロインジェクション実験から、QBP1 は Thio-Q62 の細胞毒性を阻害することを明らかにした。以上の結果から、QBP1 は異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移を阻害して神経変性を抑制すると考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17, 345-356 (2008)
- 2) Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N Toda T, Kinjo M, *Nagai Y. Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 282, 24039-24048 (2007)
- 3) *Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K,

Urade Y, Goto Y, Naiki H, Toda T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nature Struct Mol Biol* 14, 332-340 (2007)

- 4) 永井義隆 ポリグルタミン蛋白質の毒性構造体の発見 *蛋白質・核酸・酵素* (in press)
- 5) 永井義隆 神経変性疾患治療戦略としての低分子による蛋白質凝集阻害 *神経変性疾患のサイエンス* (南山堂) 181-197 (2007)
- 6) 永井義隆、ポピエル明子、藤掛伸宏、戸田達史 ポリグルタミン病に対する治療戦略 *BRAIN and NERVE* 59, 393-404 (2007)

2. 学会発表

- 1) Nagai Y, Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N, Toda T, Kinjo M. Detection of polyglutamine protein oligomer formation in cells by fluorescence correlation spectroscopy. 5th Open Workshop for Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules (Jan, 2008, Nara, Japan)
- 2) Nagai Y, Inui T, Takahashi Y, Popiel HA, Fujikake N, Kinjo M, Goto Y, Naiki H, Toda T. Toxic conformers of the soluble polyglutamine protein formed *in vitro* and *in vivo*. 4th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2007, Aussois, France)
- 3) Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, Muramatsu S, Saeki Y, Ito C, Toda T. AAV5-mediated gene expression of the aggregate inhibitor peptide QBP1 in the mouse brain results in widespread suppression of polyglutamine inclusion body formation. 4th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2007, Aussois, France)
- 4) 永井義隆、高橋保夫、岡本佑馬、ポピエル明子、藤掛伸宏、金城政孝、戸田達史 蛍光相関分光法を用いたポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出とその阻害 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会 (2007.12、横浜)
- 5) 岡本佑馬、永井義隆、藤掛伸宏、戸田達史、乾隆表面プラズモン共鳴法を用いたポリグルタミン鎖結合分子のスクリーニング系の樹立 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会 (2007.12、横浜)
- 6) 滋野 聡、ポピエル明子、永井義隆、伊藤 千代美、藤掛伸宏、戸田達史 凝集阻害ペプチド QBP1 トランスジェニックマウスの作成とポリグルタミン病モデルマウスの治療 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会 (2007.12、横浜)
- 7) 永井義隆、高橋保夫、岡本佑馬、ポピエル明子、藤掛伸宏、金城政孝、戸田達史 蛍光相関分光法による細胞内ポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出 第30回日本神経科学会・第50回日本神経化学会合同大会 Neuro2007 (2007.9、横浜)

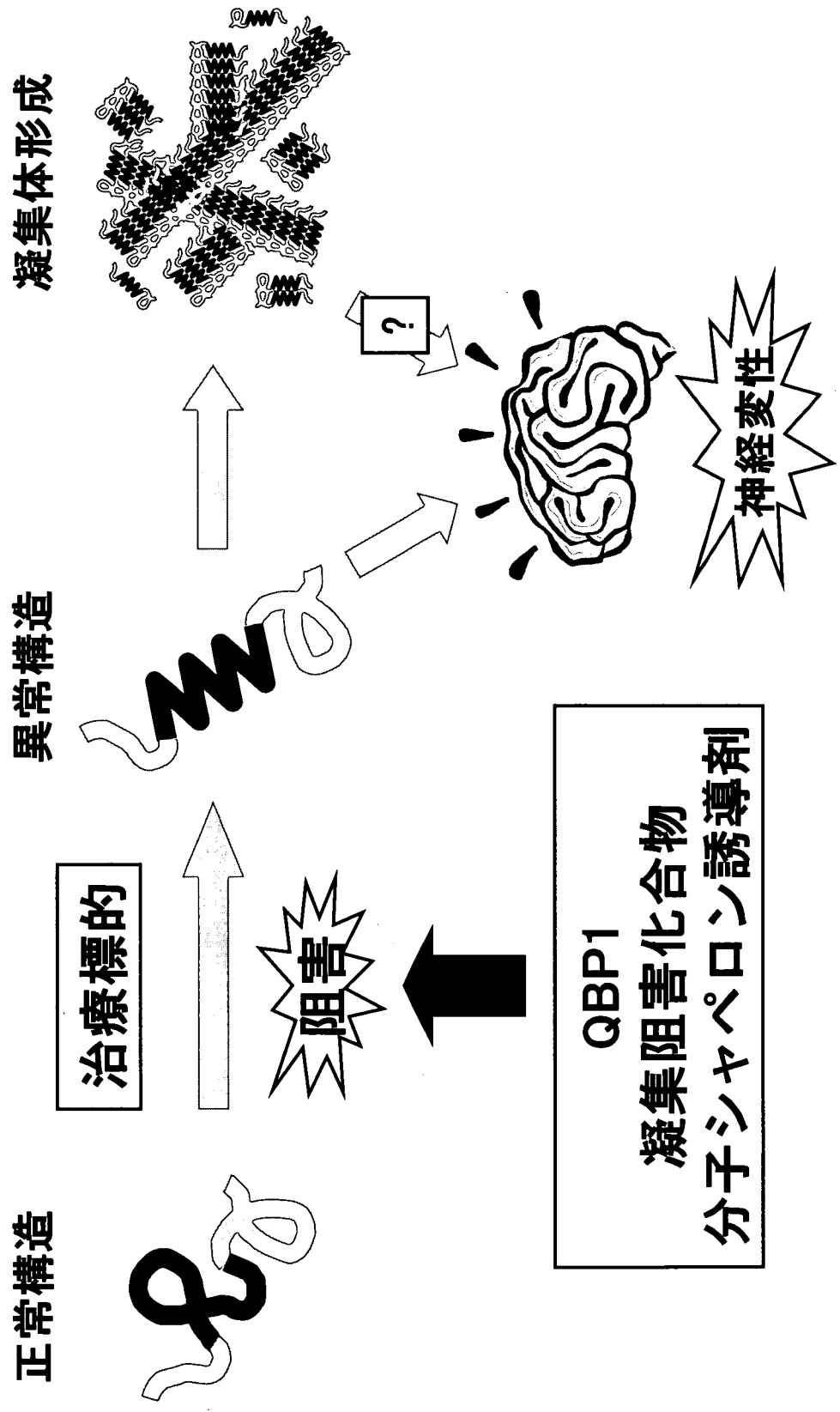
E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

なし

ポリグルタミン病の治療標的としての
たんぱく質の異常構造変化・凝集



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

運動失調症に関する調査研究班

分子シャペロン誘導薬の細胞保護作用に関する検討

分担研究者	和田 圭司	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部
研究協力者	鈴木 泰行	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部
	田中 修二	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部

研究要旨

ポリグルタミン病の治療戦略の一つとして、分子シャペロン誘導薬が注目されている。我々は、様々な神経変性疾患モデル動物において効果が確認されている分子シャペロン誘導薬の一種、Hsp90 阻害剤の細胞保護作用に関して検討を行い、未知の作用機序の存在を示唆する結果を得た。これについて、今後さらなる解析が必要である。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の治療戦略の一つとして、分子シャペロンの発現を誘導する薬剤開発が注目されている。Hsp70 など分子シャペロンは熱ショック転写因子 1(HSF1)により正に発現制御されており、様々な環境ストレスから細胞を保護していると考えられている。一方、脊髄運動ニューロンをはじめとする神経細胞は熱ストレスなどによるストレス応答の閾値が高いことが知られている。今回我々は、Hsp70 発現誘導の閾値が高い神経系培養細胞を用いて、分子シャペロン誘導薬の細胞保護作用について検討することにした。

B. 研究方法

ヒト、ラット、およびマウス神経系培養細胞から、HSF1 および Hsp70 の発現を指標にストレス応答の閾値が高い細胞を探索した。この細胞に分子シャペロン誘導薬として geldanamycin (GA) を前処理し、24 時間経過後、酸化ストレスを与え、さらに 24 時間後の細胞の生存活性を測定した。

C. 研究結果

Hsp70 発現誘導の閾値が高い神経系培養細胞を同定した。この細胞を GA により前処理すると、酸化ストレスに対して著明な細胞

保護作用を示した。また、この細胞において、GA は Hsp70 だけでなく Hsp25 の発現も誘導しなかった。

D. 考察

分子シャペロン誘導薬の一種である Hsp90 阻害剤は、様々な神経変性疾患モデル動物においてその症状を回復させることが報告されている。今回我々は、Hsp70 および Hsp25 の発現誘導の閾値が高い神経系培養細胞においても、Hsp90 阻害剤が酸化ストレス耐性を誘導するという結果を得た。Hsp90 阻害剤の作用については 2 つの機序が想定されており、一つ目は HSF1 の活性化による Hsp70 などの HSP の誘導によるもので、二つ目は球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) 遺伝子産物などの毒性を持つ Hsp90 クライアントタンパク質の分解促進によるものである。今回我々が用いた細胞では GA による Hsp70 および Hsp25 の発現誘導が認められず、毒性を持つ Hsp90 クライアントタンパク質も用いていない。以上より、GA による酸化ストレス耐性の誘導作用は、既知の 2 つの機序によらない、新たな作用機序によるものと考えられる。

E. 結論

分子シャペロン誘導薬の細胞保護作用について新たな作用機序の存在が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Noda, M., Kariura, Y., Pannasch, U., Nishikawa, K., Wang, L., Seike, T., Ifuku, M., Kosai, Y., Wang, B., Nolte, C., Aoki, S., Kettenmann, H. Wada, K.

Neuroprotective role of bradykinin due to the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J. Neurochem.* (2007) 101, 397-410

Tanabe, K., Gamo, K., Aoki, S., Wada, K., Kiyama, H.

Melanocortin receptor 4 is induced in nerve-injured motor and sensory neurons of mouse.

J. Neurochem. (2007) 101, 1145-1152

Setsuie, R. Wada, K.

The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases.

Neurochem. Int. (2007) 52, 105-111, Review.

Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K.

Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem.* (2007) 15, 6810-6818

Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K.

Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells.

Eur. J. Pharmacol. (2007) 573, 20-28

Ifuku, M., Färber, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Miyamoto, T., Nolte, C., Merrino, V.F., Kita, S., Iwamoto, T., Komuro, I., Wang, B., Cheung, G., Ishikawa, E., Ooboshi, H., Bader, M., Wada, K., Kettenmann, H., Noda, M.

Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca²⁺ influx via reverse-mode

activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J. Neurosci.* (2007) 27, 13065-13073

Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. Wada, K.

Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene.

Eur. J. Neurosci., in press

2. 学会発表

和田圭司、青木俊介：マウス神経系前駆細胞における GPCR の機能解析。神経組織の成長・再生・移植研究会第22回学術集会、岡山、5. 26, 2007

Noda M, Wang B, Ishikawa E, Ooboshi H, Kido M, A, Wada K: Up-regulation of KCNQ channels in activated microglia. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. San Diego, California, U.S.A., 11. 5, 2007

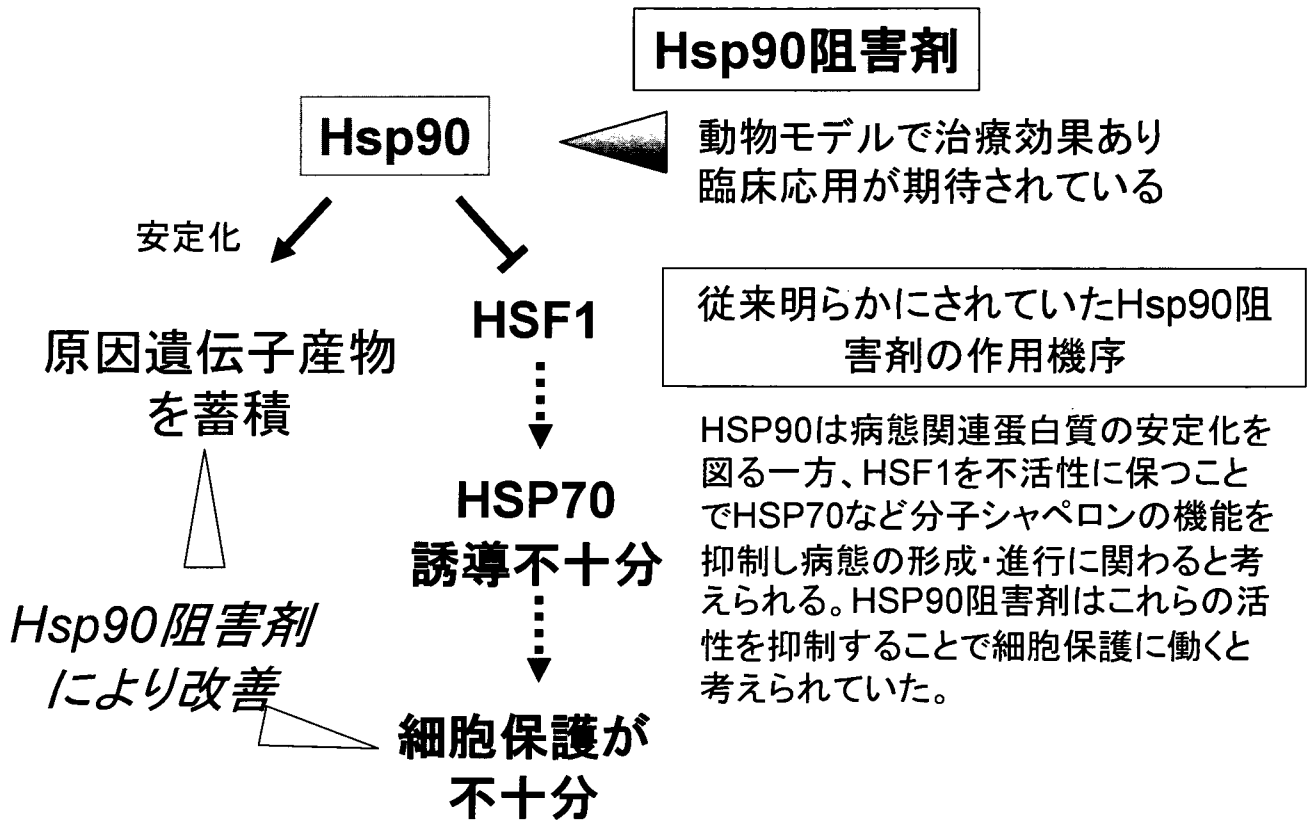
Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by in silico drug screening. Neuro 2007. Yokohama, 9. 10, 2007

Kimiwada T, Sakurai M, Ohashi H, Aoki S, Tominaga T, Wada K: Clock genes regulate neurogenic transcription factors and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells. Neuro2007. Yokohama, 9. 11, 2007

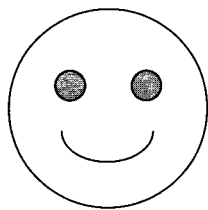
Naito S, Ikeda S, Shimizu H, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Fujiwara S, Suzuki J, Wada K: Small-angle neutron scattering (SANS) and dynamic light scattering (DLS) analyses of the initial aggregation process of tau by oxidative stress. Neuro2007. Yokohama. 9. 11, 2007

Nishimoto M, Furuta A, Wada K: The functional regulatory mechanism in reactive astrocytes via VIP/VPAC2 system. Neuro2007. Yokohama, 9. 12, 2007

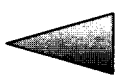
Hsp90阻害剤の新たな作用を発見



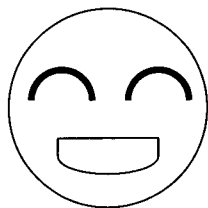
今回の発見



HSP70の発現誘導
閾値が低い細胞



Hsp90阻害剤



HSP70の発現に依存しない
HSP90阻害剤の細胞保護
作用を発見

従来見出されていた作用機序
とは異なる。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

運動失調症に関する調査研究班

Amiloride derivative によるポリグルタミン病モデルマウスの治療とその作用機序

分担研究者 貫名 信行
(独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム)
研究協力者 Hon-kit Wong, 黒沢大, Peter O. Bauer, 鷲頭知花, 町田陽子, 戸崎麻子
(独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム)
研究要旨

Amiloride derivative はポリグルタミン病において ubiquitin-proteasome system (UPS) の活性化を介して凝集体形成の抑制を引き起こすことが示された。この作用はマウスレベルでも確認されたため proteasome 分解系が薬剤によって制御可能性があることが示され、今後の発症予防のための proteasome 活性制御の可能性が出てきた。

A. 研究目的

CAG リピート病はハンチントン病や遺伝性脊髄小脳失調症の多くを含む疾患群であり、病因遺伝子の CAG リピートの伸長とその翻訳産物である伸長ポリグルタミンがその病態に強く関わっていると想定され、ポリグルタミン病とも呼ばれる。ポリグルタミン病の治療は球脊髄性筋萎縮症を除くとまだ効果的なものが少ない。そこで我々は我々の伸長ポリグルタミン-GFP 発現 Neuro2a 細胞を用いて薬物の効果を判定する系を確立し、神経細胞保護作用のある薬剤の凝集体形成抑制効果を判定した。この過程で Amiloride およびその derivative に凝集体形成抑制効果を認めたため、細胞レベル、マウスレベルでその効果を評価し、その標的分子を検討した。

B. 研究方法

- 1) 細胞レベルでは Htt-pQ-EGFP を発現した Neuro2a 細胞 (60Q, 150Q) をもちいて伸長ポリグルタミンに伴う凝集体形成を自動的に定量する系を ArrayScan を用いて確立した。
- 2) Amiloride とその derivative である Benzamil の凝集体形成に対する効果を検討した。
- 3) さらに細胞レベルで Benzamil の作用機序について分解過程などを検討した。
- 4) 個体レベルでは Benzamil の効果をハンチントン病モデルマウスである R6/2 によって検討した。

(倫理面への配慮)

特に配慮を必要とする動物の使用はない。

C. 研究結果

- 1) Amiloride, Benzamil は Htt-pQ-EGFP (60Q, 150Q) の凝集体形成を dose-dependent に減少させた。これらの作用は NLS をもち、核内封入体を形成する細胞においても同様であった。使用した濃度においては細胞毒性を認めず、mRNA レベルでのポリグルタミンの発現低下は認められなかった。
- 2) 蛋白レベルでは 150Q の分解が 16Q に比べ Amiloride, Benzamil によって促進されることがわかった。
- 3) そこでこの作用点が ubiquitin-proteasome 系 (UPS) の阻害抑制であることを想定して Ubi-DsRed という proteasome 分解基質をマーカーとして Benzamil の影響を判定した。MG132 処理をした細胞は Ubi-dsRED が分解されにくくなり、dsRED の蛍光が増強されるが、Benzamil は dose-dependent にその効果を減弱し、UPS 阻害抑制効果が認められた。
- 4) 伸長ポリグルタミンによる proteasome 阻害効果もこの系を用いて検討したところ、やはり Benzamil によって減弱した。
- 5) ATG5 を誘導的にノックダウンする細胞でポリグルタミン凝集体形成への Benzamil の効果を検討したが、ATG5 の

ノックダウンの影響は認められなかった。

- 6) Amiloride の標的分子である acid-sensing ion channels (ASIC), sodium and hydrogen exchanger (NHE), sodium and calcium exchanger (NCX) がこの作用に関与している可能性についてこれらの分子を RNAi によって発現抑制を行うことによって検討したところ、ASIC, NCX の抑制が、UPS に対して Benzamil と同様の効果を示した。
- 7) さらに R6/2 に Benzamil を投与したところ clasping score に効果が認められ、凝集体形成の減少を脳において認めた。

D. 考察

ポリグルタミン病の治療に向けてはポリグルタミン凝集体形成抑制効果のあるものをスクリーニングすることは、病態が強く凝集体形成を関連していることから妥当な戦略といえる。今回我々は細胞モデルをもちいて凝集体形成をアッセイする系を確立し、それによって Amiloride derivative が凝集体形成を抑制することを見いだした。これらの薬剤の分子標的が同定できれば、その標的に向けて新たな薬剤も開発が可能であろう。そのような観点で、我々はまずこの薬剤がどこに作用して凝集体形成を起こしているか検討し、proteasome の分解が促進していることを見いだした。興味深いことに proteasome inhibitor をもちいても Amiloride derivative はその阻害を減弱する。そこで Amiloride の標的が直接この効果に関与しているかどうかを、標的分子である、ASIC, NCX, NHE について RNAi による発現抑制を行って調べたが、ASIC, NCX のみ凝集体抑制効果を見いだした。ASIC はアチドーシスに伴い活性化され、Ca 透過性を介して細胞毒性を持つといわれる。ASIC のノックダウンや、ASIC のブロッカーである Amiloride に凝集体抑制効果が認められたことは、未だ解明されていない凝集体抑制機構が存在することが示唆され、それは ASIC に関連した proteasome 活性化カスケードであることが示唆される。

E. 結論

Amiloride derivative はポリグルタミン病において UPS を介して凝集体形成の抑制を引き起こす可能性が示された。臨床的に Amiloride の使用されているポリグルタミン病における病状の進行について検討する意義がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Khan, L. A., Yamanaka, T., & Nukina, N. Genetic impairment of autophagy intensifies expanded polyglutamine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) in press.

Doi, H., Okamura, K., Bauer, P.O., Furukawa, Y., Shimizu, H., Kurosawa, M., Machida, Y., Miyazaki, H., Mitsui, K., Kuroiwa, Y. & Nukina, N. RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in Huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J Biol Chem* (2007) in press.

2. 学会発表

Wong, H. K., Kurosawa, M., Bauer, P. O., Washizu, C., Machida, Y., Tosaki, A., Nakamura, T. & Nukina, N. Amiloride and its derivative ameliorate Huntington's disease pathological processes via an ubiquitin proteasome system-dependent mechanism. *37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2007)*, San Diego, USA (November 3-7, 2007).

Nukina, N., Khan L. A. & Yamanaka T. Involvement of ubiquitin proteasome system and autophagy in polyglutamine disease. *7th IBRO World Congress of Neuroscience*, Melbourne, Australia (July 12-17, 2007).

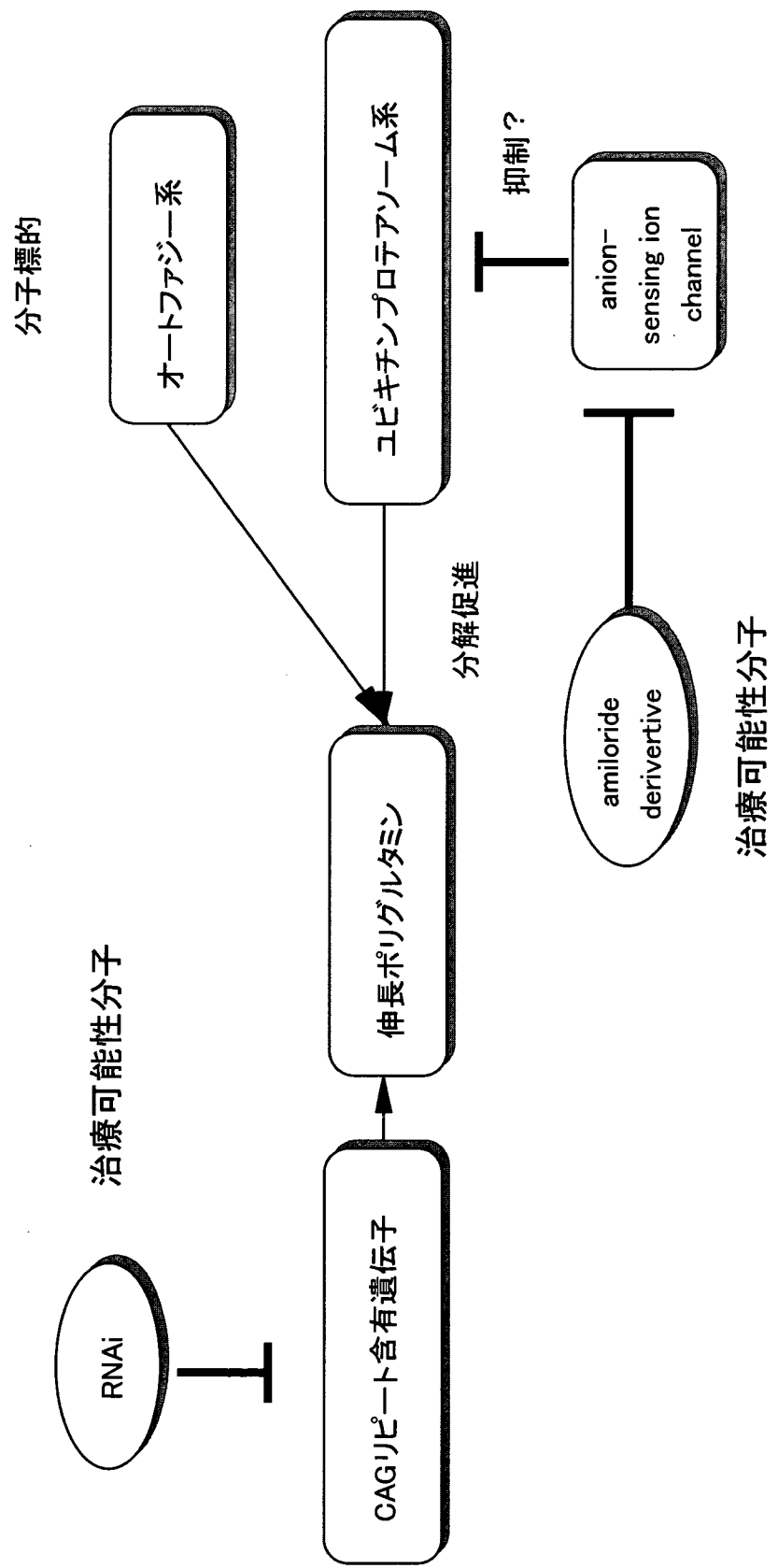
Nukina, N. Modelling and Analysing Huntington Disease in *Drosophila melanogaster*. *Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders*, Aussois, France (May 13-18, 2007).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ポリグルタミン病の治療を目的とした基礎的研究

理化学研究所脳科学総合研究センター 貫名信行



Ⅲ 研究成果の刊行に 関する一覧表