

Aberrant Interaction between Mutant UCH-L1 and LAMP-2A

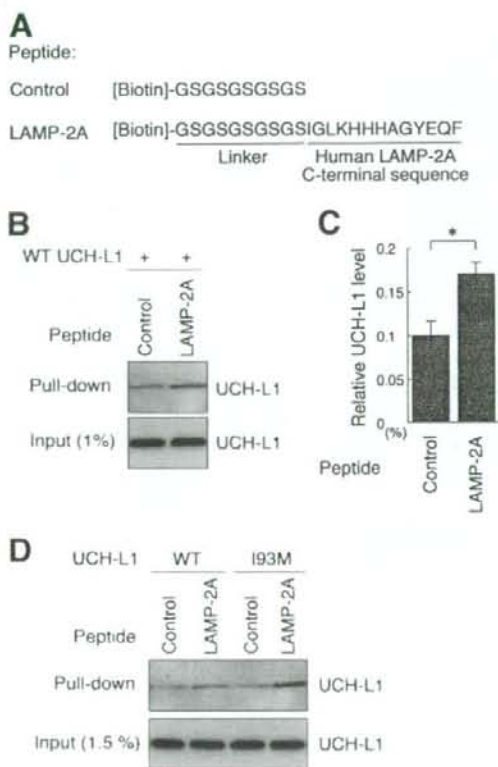


FIGURE 4. Direct interaction between UCH-L1 and the cytosolic region of LAMP-2A. A, an amino acid sequence of UCH-L1 and biotin-conjugated peptides is shown. B and C, 10 μ g of recombinant UCH-L1 and 2 nmol of peptides (control or LAMP-2A peptide) were mixed, and a pull-down assay was performed using streptavidin beads. Precipitates were analyzed by immunoblotting (B). The levels of UCH-L1 relative to input were quantified by densitometry. Mean values are shown with S.E. ($n = 3$). *, $p < 0.05$. D, 10 μ g of UCH-L1 (wild-type or I93M) and 2 nmol of peptides (control or LAMP-2A peptide) were mixed, and a pull-down assay was performed.

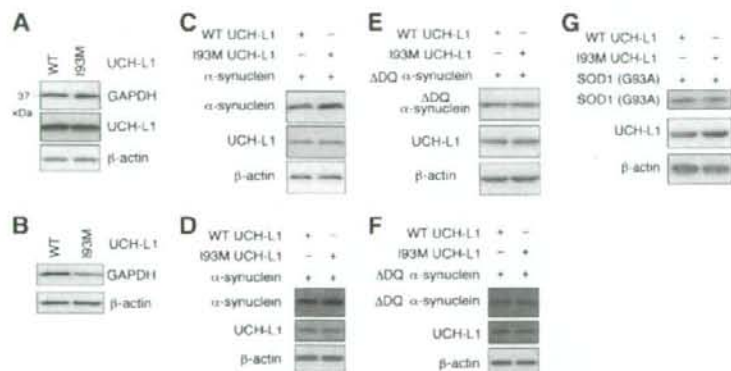


FIGURE 5. Effects of the I93M mutation of UCH-L1 on CMA and α -synuclein levels. A and B, COS-7 cells were transfected with the indicated constructs. Forty-eight h after transfection, whole-cell lysates (A) and a lysosomal fraction (B) were prepared and analyzed by immunoblotting. C–G, COS-7 cells (C, E, and G) or IMR-90 cells (D and F) were transfected with the indicated constructs. Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting. Accumulation of α -synuclein^{WT} in cells transfected with UCH-L1^{I93M} was observed in COS-7 (C), IMR-90 (D), and SH-SY5Y cells (data not shown). The assays were performed at least three times; representative results are shown. SOD1, Cu,Zn-superoxide dismutase 1.

associated mutant proteins in the pathogenesis of PD have remained largely unclear. Although it was reported that UCH-L1 polyubiquitinates monoubiquitinated α -synuclein in a cell-free system (20), the relationship between UCH-L1 and non-ubiquitinated α -synuclein in the pathogenesis of PD has also remained unknown.

In the present study, we have shown that familial PD-associated UCH-L1^{I93M} abnormally interacts with LAMP-2A, Hsc70, and Hsp90 and causes an increase in the amounts of α -synuclein and GAPDH, which are CMA substrates, in cultured cells. The increase can be explained by an inhibition of CMA by an aberrant interaction between UCH-L1^{I93M} and CMA machinery because the GAPDH level in the lysosomal fraction was decreased in cells expressing UCH-L1^{I93M} (Fig. 5B), and the I93M mutation in UCH-L1 does not affect the levels of α -synuclein ^{Δ DQ}, which is not degraded by CMA (Fig. 5, E and F). These findings suggest that an increase in the amount of α -synuclein protein by inhibition of CMA via the interaction between UCH-L1^{I93M} and CMA machinery underlies one of the causes of familial PD associated with mutant UCH-L1. It is also possible that increases in the amount of other CMA substrates, such as GAPDH, are involved in the pathogenesis of PD. Taken together with a report that pathogenic mutant A30P and A53T α -synuclein exhibit an enhanced interaction with LAMP-2A compared with α -synuclein^{WT} (24), our results indicate that UCH-L1^{I93M} and mutant A30P and A53T α -synuclein share aberrant biochemical properties with respect to their interactions with LAMP-2A. These observations further support the idea that the I93M mutation in UCH-L1 contributes to the pathogenesis of PD.

We revealed that the R63A, E174A, D176A, or H185A substitution in UCH-L1 increases the levels of interactions of UCH-L1 with LAMP-2, Hsc70, and Hsp90 (Fig. 3), suggesting that the surface region containing Arg⁶³ and His¹⁸⁵ in UCH-L1 (35) is involved in its interaction with LAMP-2, Hsc70, and Hsp90. We have previously reported that the R63A or H185A substitution in UCH-L1 enhances the interaction of UCH-L1 with tubulin (13). These results suggest that tubulin, LAMP-2A, Hsc70, and Hsp90 interact with the same region in UCH-L1. Arg⁶³ and His¹⁸⁵ are distinct from Asp³⁰, which is one of the ubiquitin-binding sites (21, 38), and from Cys⁹⁰ (13), which is a catalytic center cysteine residue. We have shown that D30K or C90S mutation in UCH-L1 does not alter its interactions with tubulin (13) and LAMP-2 (Fig. 1C). Thus, the interactions of UCH-L1 with tubulin and LAMP-2 are independent of the monoubiquitin-binding and hydrolase activity of UCH-L1.

It is known that the majority of PD cases occur sporadically and that oxidative/carbonyl stresses are

elevated in PD brains (17, 39). In the brains of sporadic PD patients, UCH-L1 is a major target of carbonyl formation (17). We previously reported that carbonyl-modified UCH-L1 and UCH-L1^{I93M} share biochemical properties: both of these UCH-L1 variants display increased insolubility, elevated interactions with multiple proteins including tubulin, and decreased interaction with monoubiquitin compared with UCH-L1^{WT} (13). We have also shown that both carbonyl-modified UCH-L1 and UCH-L1^{I93M} abnormally promote tubulin polymerization (13). Our previous studies using circular dichroism suggest that both of these UCH-L1 variants display decreased α -helix and increased β -sheet content (13, 22, 40). Thus, both carbonyl modification and the I93M mutation in UCH-L1 may alter its conformation, resulting in changes in the biochemical and functional properties of UCH-L1. It is an interesting issue whether carbonyl-modified UCH-L1 can also inhibit CMA. Other than tubulin, LAMP-2A, Hsc70, and Hsp90, UCH-L1 interacts with multiple proteins (13). These other interactors may also be involved in the mechanism of UCH-L1-mediated PD and are currently under investigation. It is also possible that the interaction of Hsc70 or Hsp90 with UCH-L1 plays roles other than in the CMA pathway.

α -Synuclein and UCH-L1 have been reported to be expressed abundantly in dopaminergic neurons in the human brain (41). Thus, UCH-L1^{I93M} is possibly overproduced in dopaminergic neurons in familial PD, leading to an accumulation of α -synuclein and the selective loss of dopaminergic neurons. In conclusion, familial PD-associated mutant UCH-L1^{I93M} physically interacts with LAMP-2A, Hsc70, and Hsp90 and causes an increase in the amount of α -synuclein in cells. We propose that aberrant interaction of mutant UCH-L1 with CMA machinery, at least in part, underlies the pathogenesis of familial PD associated with UCH-L1^{I93M}.

Acknowledgments—We thank Dr. Yasuyuki Suzuki (National Institute of Neuroscience) and Dr. Rieko Setsuie (National Institute of Neuroscience) for scientific comments and Takeshi Mitsui (National Institute of Neuroscience) for technical assistance.

REFERENCES

- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., and Nussbaum, R. L. (1997) *Science* **276**, 2045–2047
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L., and Riess, O. (1998) *Nat. Genet.* **18**, 106–108
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Ates, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D. G., and de Yébenes, J. G. (2004) *Ann. Neurol.* **55**, 164–173
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Leveque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Dufebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., and Destee, A. (2004) *Lancet* **364**, 1167–1169
- Ibanez, P., Bonnet, A. M., Debargues, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Durr, A., and Brice, A. (2004) *Lancet* **364**, 1169–1171
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blacato, J., Hardy, J., and Gwinn-Hardy, K. (2003) *Science* **302**, 841
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997) *Nature* **388**, 839–840
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6469–6473
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D., and Polymeropoulos, M. H. (1998) *Nature* **395**, 451–452
- Setsuie, R., and Wada, K. (2007) *Neurochem. Int.* **51**, 105–111
- Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., and Wood, N. W. (2004) *Cell Tissue Res.* **318**, 189–194
- Setsuie, R., Wang, Y. L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y. J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., and Wada, K. (2007) *Neurochem. Int.* **50**, 119–129
- Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., and Wada, K. (2008) *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1482–1496
- Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R. J., and Wilkinson, K. D. (1990) *J. Pathol.* **161**, 153–160
- Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M. C., Gasser, T., Kruger, R., Hattori, N., Mellick, G. D., Quattrone, A., Satoh, J., Toda, T., Wang, J., Ioannidis, J. P., de Andrade, M., and Rocca, W. A. (2004) *Ann. Neurol.* **55**, 512–521
- Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., Casas, J. P., Ahmadi, K. R., Lynch, T., Gandhi, S., Muqit, M. M., Foltynie, T., Barker, R., Bhatia, K. P., Quinn, N. P., Lees, A. J., Gibson, J. M., Holton, J. L., Revesz, T., Goldstein, D. B., and Wood, N. W. (2006) *Ann. Neurol.* **59**, 627–633
- Choi, J., Levey, A. I., Weintraub, S. T., Rees, H. D., Gearing, M., Chin, L. S., and Li, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 13256–13264
- Wilkinson, K. D., Lee, K. M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J. M., and Pohl, J. (1989) *Science* **246**, 670–673
- Larsen, C. N., Krantz, B. A., and Wilkinson, K. D. (1998) *Biochemistry* **37**, 3358–3368
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. A., Liu, Z., and Lansbury, P. T., Jr. (2002) *Cell* **111**, 209–218
- Osaka, H., Wang, Y. L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y. J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S., and Wada, K. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1945–1958
- Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y. L., Hara, Y., Hirokawa, T., Manago, Y., Amano, T., Noda, M., Aoki, S., and Wada, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 176–183
- Saigoh, K., Wang, Y. L., Suh, J. G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., and Wada, K. (1999) *Nat. Genet.* **23**, 47–51
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., and Sulzer, D. (2004) *Science* **305**, 1292–1295
- Cuervo, A. M. (2004) *Trends Cell Biol.* **14**, 70–77
- Agarraberes, F. A., and Dice, J. F. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 2491–2499
- Finn, P. F., and Dice, J. F. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 25864–25870
- Kabuta, T., Suzuki, Y., and Wada, K. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 30524–30533
- Pertoft, H., Warmegard, B., and Hook, M. (1978) *Biochem. J.* **174**, 309–317
- Kabuta, T., Hakuno, F., Asano, T., and Takahashi, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 6846–6851
- Eskelinen, E. L., Cuervo, A. M., Taylor, M. R., Nishino, I., Blum, J. S., Dice, J. F., Sandoval, I. V., Lippincott-Schwartz, J., August, J. T., and Safiq, P. (2005) *Traffic* **6**, 1058–1061
- Dice, J. F. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 305–309
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008) *Cell* **132**, 27–42
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., and Rubinsztein, D. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25009–25013
- Das, C., Hoang, Q. Q., Kreinbring, C. A., Luchansky, S. J., Meray, R. K., Ray, S. S., Lansbury, P. T., Ringe, D., and Petsko, G. A. (2006) *Proc. Natl. Acad.*

Aberrant Interaction between Mutant UCH-L1 and LAMP-2A

- Sci. U. S. A.* **103**, 4675–4680
36. Majeski, A. E., and Dice, J. F. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2435–2444
37. Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., and Iwatsubo, T. (1998) *Am. J. Pathol.* **152**, 879–884
38. Johnston, S. C., Riddle, S. M., Cohen, R. E., and Hill, C. P. (1999) *EMBO J.* **18**, 3877–3887
39. Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (2003) *J. Clin. Investig.* **111**, 163–169
40. Naito, S., Mochizuki, H., Yasuda, T., Mizuno, Y., Furusaka, M., Ikeda, S., Adachi, T., Shimizu, H. M., Suzuki, J., Fujiwara, S., Okada, T., Nishikawa, K., Aoki, S., and Wada, K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 717–725
41. Solano, S. M., Miller, D. W., Augood, S. J., Young, A. B., and Penney, J. B., Jr. (2000) *Ann. Neurol.* **47**, 201–210

Article Addendum

Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease

Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy

Tomohiro Kabuta and Keiji Wada

Department of Degenerative Neurological Diseases; National Institute of Neuroscience; National Center of Neurology and Psychiatry; Kodaira, Tokyo, Japan

Abbreviations: UCH-L1, ubiquitin C-terminal hydrolase L1; PD, Parkinson's disease; CMA, chaperone-mediated autophagy; WT, wild-type; LAMP-2, lysosome-associated membrane protein type 2; Hsc70, heat shock cognate protein 70; Hsp90, heat shock protein 90; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HAE, 4-hydroxy-2-alkenals; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal

Key words: ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), Parkinson's disease, LAMP-2, chaperone-mediated autophagy, α -synuclein

Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is expressed abundantly in neurons and has been reported to be a major target of oxidative/carbonyl damage associated with sporadic Parkinson's disease (PD). The I93M mutation in UCH-L1 is also associated with familial PD. We recently reported that UCH-L1 physically interacts with LAMP-2A, the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy (CMA), and Hsc70 and Hsp90, both of which can function as components of the CMA pathway. We found that the levels of these interactions were aberrantly increased by the I93M mutation, and that expression of I93M UCH-L1 in cells induced the CMA inhibition-associated increase in the amount of α -synuclein, a risk factor for PD. The interactions of UCH-L1 with LAMP-2A, Hsc70 and Hsp90 were also abnormally enhanced by carbonyl modification of UCH-L1. We propose that aberrant interactions of UCH-L1 variants with CMA machinery, at least partly, underlie the pathogenesis of I93M UCH-L1-associated PD, and possibly of sporadic PD. Our findings may provide novel insights into the links between familial and sporadic PD.

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative movement disorder. It is characterized by progressive cell loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. A missense mutation in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) gene, leading to an I93M substitution at the amino acid residue level, has been reported in a German family with dominantly inherited PD.¹ We have previously shown that I93M UCH-L1-transgenic mice exhibit progressive cell loss of

dopaminergic neurons.² Compared with wild-type (WT) UCH-L1, I93M UCH-L1 displays increased insolubility and levels of interactions with other proteins in mammalian cells, features that are characteristic of several neurodegenerative disease-linked mutants.³ These findings suggest that the I93M mutation in UCH-L1 is a causative mutation for PD. Although the binding of I93M UCH-L1 to monoubiquitin as well as the hydrolase activity of I93M UCH-L1 are decreased compared with those of WT UCH-L1,^{1,3,4} mice deficient in UCH-L1 do not display obvious dopaminergic cell loss.^{5,6} Thus, the main cause of I93M UCH-L1-associated PD may not be a loss of UCH-L1 function but an acquired toxicity of I93M UCH-L1. Our previous studies suggest that aberrantly enhanced physical interactions between I93M UCH-L1 and multiple proteins, including tubulin, underlie the toxic functions of I93M UCH-L1 (Fig. 1).³

Several missense mutations in the α -synuclein gene are also linked to dominant-inherited PD.⁷⁻⁹ α -Synuclein is thought to be a major component of cytoplasmic inclusions called Lewy bodies in the brains of patients with sporadic PD.^{10,11} Increases in the levels of α -synuclein could constitute a cause of PD, since duplication and triplication of the α -synuclein gene cause familial PD or parkinsonism.¹²⁻¹⁴ α -Synuclein is degraded at least partly by chaperone-mediated autophagy (CMA).¹⁵

To elucidate the molecular relationship between α -synuclein and UCH-L1 in the pathogenesis of PD, we sought to identify novel UCH-L1-interacting proteins. We found that UCH-L1 interacts with lysosome-associated membrane protein type 2A (LAMP-2A), heat shock cognate protein 70 (Hsc70) and heat shock protein 90 (Hsp90),¹⁶ all of which are components of the CMA pathway.¹⁷ These interactions were enhanced by the I93M mutation in UCH-L1.¹⁶ Expression of I93M UCH-L1 in cells induced the increase in the amount of α -synuclein and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),¹⁶ both of which are substrates of CMA,¹⁵ but had almost no effects on the amount of ADQ α -synuclein,¹⁶ which lacks the CMA recognition motif.¹⁵ Based on these results, we propose that the aberrant interaction of I93M UCH-L1 with CMA machinery causes the accumulation of α -synuclein and GAPDH by inhibiting CMA. Besides its role in glycolysis, GAPDH is known to initiate a cell-death cascade.¹⁸ Thus, it is possible that the increases in

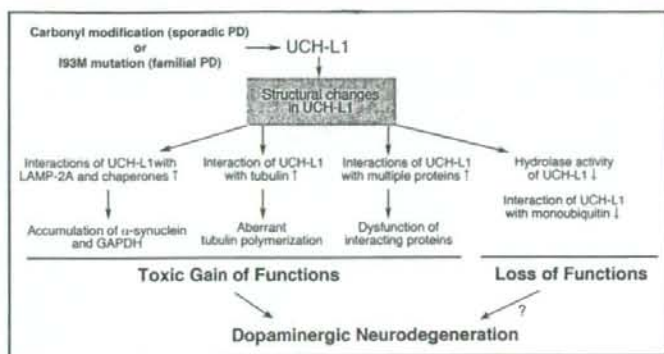
Correspondence to: Tomohiro Kabuta or Keiji Wada; Department of Degenerative Neurological Diseases; National Institute of Neuroscience; National Center of Neurology and Psychiatry; 4-1-1 Ogawahigashi; Kodaira, Tokyo 187-8502 Japan; Tel.: +81.42.346.1715; Fax: +81.42.346.1745; Email: kabuta@ncnp.go.jp or wada@ncnp.go.jp

Submitted: 07/03/08; Revised: 07/08/08; Accepted: 07/08/08

Previously published online as an Autophagy E-publication: www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/6560

Addendum to: Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 2008; Epub ahead of print.

Figure 1. Possible role of UCH-L1 in PD. The I93M mutation (as occurs in familial PD associated with I93M UCH-L1) and carbonyl-modification (as occurs in sporadic PD) cause structural changes in UCH-L1. The hydrolase activity and binding affinity to monoubiquitin of these UCH-L1 proteins are decreased. The involvement of loss of UCH-L1 functions in the pathogenesis of PD is currently unclear. Abnormal UCH-L1 interacts tightly with LAMP-2A, Hsc70 and Hsp90. These abnormal UCH-L1 may inhibit CMA-dependent degradation, and cause CMA substrates including α -synuclein and GAPDH to accumulate. The increased amount of α -synuclein or GAPDH proteins possibly contributes to the neurodegeneration of dopaminergic neurons. The aberrant interactions of UCH-L1 with other proteins, including tubulin, may also contribute to neurodegeneration. †: increase compared with wild-type UCH-L1, ‡: decrease compared with wild-type UCH-L1.



the amount of α -synuclein and GAPDH are involved in the pathogenesis of PD (Fig. 1).

Although the majority of PD cases occur sporadically, the molecular mechanisms that underlie the pathology of sporadic PD are poorly understood. It is known that oxidative/carbonyl stresses are elevated in PD brains.^{19,20} In the brains of sporadic PD patients, UCH-L1 is a major target of carbonyl formation,¹⁹ which is the most widely used marker for oxidative damage to proteins. Carbonyl groups can be introduced into proteins *in vivo* mainly by reactions with 2-alkenals, 4-hydroxy-2-alkenals (HAE) or ketoaldehydes,^{21,22} which are endogenous aldehyde products formed by lipid peroxidation or glycooxidation. Protein carbonyls can also be produced by metal-catalyzed reactions with H_2O_2 *in vitro*.^{22,23} It has been suggested that 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) can accumulate in biological membranes at concentrations of over 10–100 μ M in response to oxidative stress.^{24,25} In mammalian cells, carbonyl-modified UCH-L1 can be produced by reactions with 10–100 μ M HAE or 2-alkenals, but not by 100–500 μ M ketoaldehydes or 0.1–1 mM H_2O_2 .³ Furthermore, I93M UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1 display shared aberrant properties,³ suggesting that carbonyl-modified UCH-L1 constitutes one of the causes of sporadic PD. Therefore, we tested the effects of carbonyl modification of UCH-L1 on the interaction of UCH-L1 with LAMP-2A and chaperones. We found that HNE modification of UCH-L1 promotes interactions between UCH-L1 and LAMP-2A, Hsc70 or Hsp90 (Fig. 2A). 4-hydroxy-2-hexenal or 2-propenal modification of UCH-L1 have similar effects on the interactions between UCH-L1 and LAMP-2A, Hsc70 or Hsp90 as HNE modification (data not shown). In a pull-down assay, HNE-modified UCH-L1 exhibits an abnormally increased level of interaction with the cytosolic region of LAMP-2A, compared with wild-type UCH-L1 (data not shown). Thus, I93M UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1 also exhibit common biochemical properties with respect to their interactions with LAMP-2A, Hsc70 and Hsp90. These results support the idea that carbonyl-modified UCH-L1 constitutes one of the causes of sporadic PD (Fig. 1). A coimmunoprecipitation assay using C90S, C132S and C152S UCH-L1 mutants shows less binding of C90S UCH-L1 to LAMP-2A, Hsc70 or Hsp90 than WT UCH-L1, when cells are treated with HNE (Fig. 2B and C). Thus, HNE modification of Cys-90 of UCH-L1 promotes the interactions of UCH-L1 with LAMP-2A, Hsc70 and Hsp90. These results are consistent with

our previous data showing that the HAE modification of Cys-90 of UCH-L1 promotes the interactions of UCH-L1 with multiple proteins.³

The appearance of HNE-modified proteins in nigral neurons is associated with sporadic PD.^{26,27} We have previously observed that cysteine residues in UCH-L1 are main targets for HNE-modification of UCH-L1.³ UCH-L1 is modified by 10–100 μ M HNE, whereas α -synuclein, which contains no cysteine residues, is not modified by 100 μ M HNE in mammalian cells,³ suggesting that, in mammalian cells, HNE reacts with proteins mainly via cysteine residues. It is possible that, in sporadic PD, cysteine residue-reactive carbonyl stresses such as HAE result in the accumulation of α -synuclein, not by direct modification of α -synuclein, but via reaction with UCH-L1.

In conclusion, aberrant interactions of UCH-L1 variants with multiple proteins, including CMA machinery, may underlie the pathogenesis of I93M UCH-L1-associated PD, and possibly of sporadic PD. We propose that carbonyl modification of UCH-L1 can be a therapeutic target for the treatment of sporadic PD.

References

- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harra G, Brownstein MJ, Jonnalagadda S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach FJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395:451–2.
- Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, Osaka H, Hayakawa H, Ichihara N, Li H, Furuta A, Sano Y, Sun YJ, Kwon J, Kabuta T, Yoshimi K, Aoki S, Mizuno Y, Noda M, Wada K. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int* 2007; 50:119–29.
- Kabuta T, Setsuie R, Mitsui T, Kinugawa A, Sakurai M, Aoki S, Uchida K, Wada K. Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1482–96.
- Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang YL, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K. Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:176–83.
- Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T, Wada K. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase in *gad* mice. *Nat Genet* 1999; 23:47–51.
- Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura J, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* 2003; 12:1945–58.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanasiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276:2045–7.

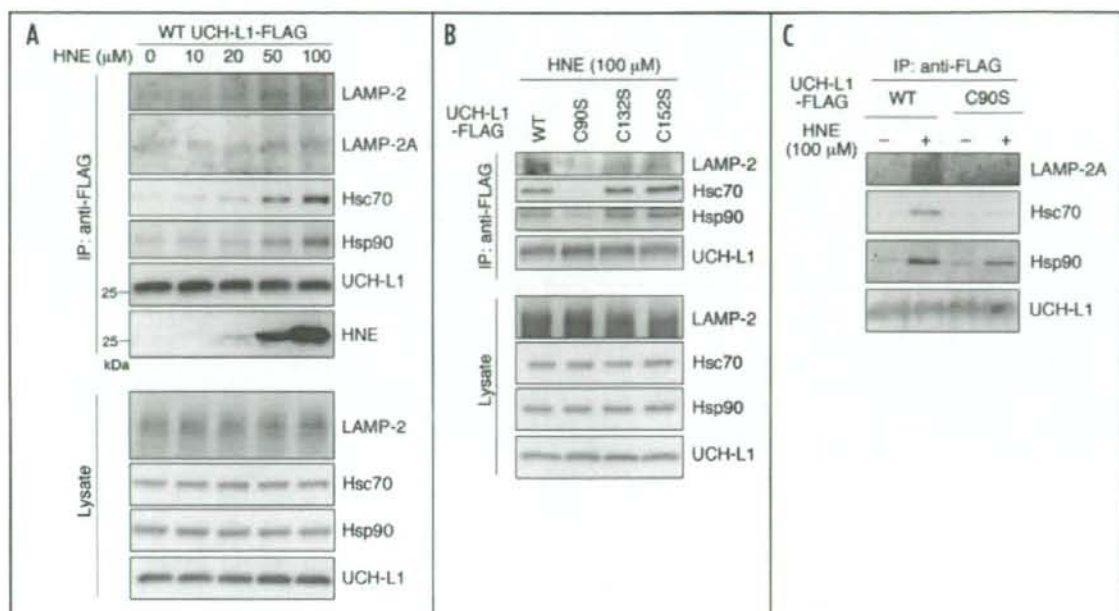


Figure 2. Effects of HNE-modification of UCH-L1 on the interactions of UCH-L1 with LAMP-2A, Hsc70 and Hsp90 (A) COS-7 cells transfected with FLAG-tagged WT UCH-L1 were treated with the indicated concentrations of HNE. Lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody, and analyzed by immunoblotting using anti-LAMP-2, LAMP-2A, Hsc70, Hsp90, HNE and FLAG antibodies. (B and C) COS-7 cells transfected with the indicated constructs were treated with or without 100 μ M HNE. Lysates were immunoprecipitated using anti-FLAG antibody, and analyzed by immunoblotting.

- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Scholz L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18:106-8.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Arates B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yébenes JG. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55:164-73.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388:839-40.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6469-73.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Leveque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel B, Farrer M, Destee A. α -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364:1167-9.
- Ibanez E, Bonnet AM, DeBarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak B, Agid Y, Durr A, Brice A. Causal relation between α -synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364:1169-71.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302:841.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305:1292-5.
- Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 2008; Epub ahead of print.
- Agarraberres FA, Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 2001; 114:2491-9.
- Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shihani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2008; 10:866-73.
- Choi J, Levey AL, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, Li L. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* 2004; 279:13256-64.
- Ichihopoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 2003; 111:163-9.
- Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1685-96.
- Uchida K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* 2003; 25:249-57.
- Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:797-821.
- Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003; 42:318-43.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:81-128.
- Yoritaka A, Harzori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2696-701.
- Castellani RJ, Perry G, Siedlak SL, Nunomura A, Shimohama S, Zhang J, Montine T, Sayre LM, Smith MA. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett* 2002; 319:25-8.

Huntington病のsiRNAによる治療研究

Study on the siRNA treatment for Huntington's disease



和田圭司

Keiji WADA

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第4部

○ポリグルタミン病に関し、RNAiを活用した先端的治療法開発が世界的にも検討されている。本稿ではポリグルタミン病のひとつであるHuntington病について、著者らの研究を含めRNAi治療開発の現状を紹介した。モデルマウスでの検討では、Huntingtin遺伝子に選択的なsiRNAはHuntington病原因遺伝子発現を特異的に抑制し、運動機能障害の進行が対照に比べ軽減するだけでなく、病理学的にも原因遺伝子産物の凝集形成を抑制することが見出されている。RNAiはHuntington病の有望な治療手段のひとつであると考えられる。



Huntington病, モデル動物, RNAi, 治療, ノックダウン

Huntington病は、1872年にアメリカのDr. George Huntingtonによりはじめて報告された神経変性疾患である¹⁾。常染色体優性遺伝形式をとり、40歳前後に発病することが多い^{2,3)}。慢性進行性で、舞踏病様不随意運動を主体とする神経症状と知的障害を主体とする精神症状が病態を形成する^{2,3)}。有病率は、欧米では人口10万人当たり4~7人と多いが、わが国では0.4人くらいと少なく人種差がある^{2,3)}。病理学的には線条体の萎縮が特徴的で、小細胞が脱落し、グリアの増生、側脳室の拡大を伴う⁴⁾。1993年にDr. James Gusellaをはじめとする研究チームが長年の努力の後に第4染色体短腕にある原因遺伝子を同定し、ハンチンチン(huntingtin)と命名した⁵⁾。Huntingtinは分子量が約350kDaの巨大な蛋白質でその機能は不明であるが、患者症例ではhuntingtin遺伝子の第一エクソンの蛋白質翻訳領域にあるCAG部分が伸長している。そのため、Huntington病はトリプレットリピート病のひとつに位置づけられている。1997年にDr. Gillian Batesらのグループにより伸長したエクソン一部分を発現するトランスジェニックマ

ウスが作成され、Huntington病に類似した病理像を呈するモデル動物であることが報告された⁶⁾。以来、このモデルマウスあるいは他グループにより開発されたモデルマウス⁷⁾などを用いた治療研究が世界的に展開されるようになり、トレハロースの有効性が見出されるなど、治療法開発に関して輝かしい成果が生みだされている⁸⁾。

他方、これまでの研究から、神経変性疾患の発症には病因関連遺伝子・蛋白質の細胞内動態変化や転写・DNA修復など核内現象の変化が大きくかわり、これまでの神経細胞死という概念だけでなく神経細胞機能不全という状態が発症を左右する重要な因子であることが示されてきている。この神経細胞機能不全は可逆的な状態にあると考えられており、原因遺伝子産物の動態制御あるいはその除去による機能不全の修復こそが、神経変性疾患の根本的治療実現に向けたひとつの扉であると考えられるようになってきている。したがって、治療法開発の方向性も従前とは異なるあらたな視点が要求されるようになってきており、これらの潮流のなかからRNAiの活用など、神経変性疾

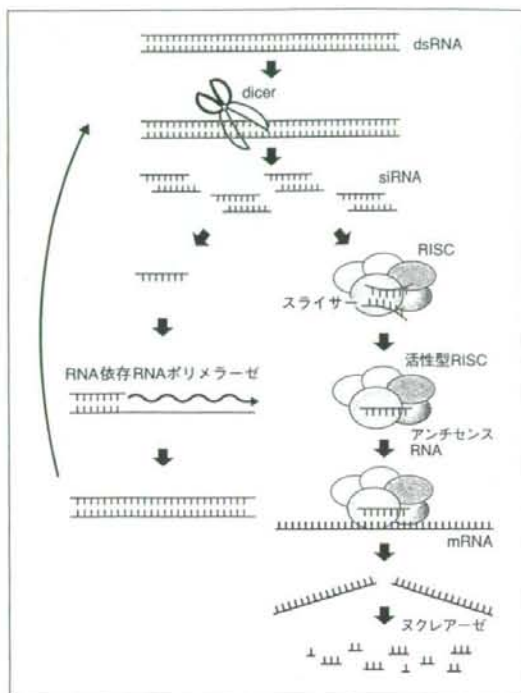


図1 RNAiの概略

患の根本的治療に迫る展開があらたに生みだされてきている。

本稿では著者らの成果も含めて、RNAiを用いたHuntington病治療研究の現状と将来を紹介する。

RNAiとは

RNA interference (RNAi) は近年発見された細胞内遺伝子発現調節現象で、二本鎖 RNA (dsRNA) によって配列特異的に mRNA が分解され、遺伝子産物である蛋白質の翻訳が阻害される機序のことである (図 1)。もともと植物で共抑制として報告された現象⁹⁾まで研究の歴史はたどられると思われるが、線虫でアンチセンス RNA による interference の研究を行っていた Dr. Andrew Fire らがはじめて dsRNA の有効性を示し RNA interference という名称を使用して以来、RNAi という言葉が今日では広く使われている^{10,11)}。Dr. Fire らの論文により、細胞内に導入された dsRNA が、一本鎖 RNA を導入した場合よりもはるかに効果的に mRNA 発現を抑制することがはじめて明確に示された。その後、dsRNA の導入が哺乳類細胞においても有

効であることが確認されたことから^{12,13)}、RNAi は医学生物学をはじめとするさまざまな分野において遺伝子機能を解析するためのツールだけでなく、あらたな治療法としていまやその研究が世界中で展開されている。

現在までの知見に基づき RNAi の機序を要約すると、図 1 に示したように細胞内に取り込まれた dsRNA は、RNase III に似た dicer とよばれる二本鎖 RNA 特異的エンドヌクレアーゼにより 20~25 塩基の小さな二本鎖 RNA (small interfering RNA: siRNA) に分解される¹⁴⁾。siRNA は、argonaute というエンドリポヌクレアーゼ活性をもつ蛋白質 (スライサー) を含む蛋白質核酸複合体である RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、解きほぐされて一本鎖 RNA になる¹⁵⁾。この一本鎖 RNA を含む RISC (活性型 RISC) は、一本鎖 RNA に対して相補的配列をもつ標的 mRNA を認識・結合し、スライサー蛋白質が標的 mRNA を結合中央部分で切断する¹⁶⁾。切断された標的 mRNA はさらにヌクレアーゼによって分解され、結果として遺伝子発現が抑制される。また、RISC と結合していない一本鎖 RNA は相補的な配列をもつ mRNA に結合し、RNA 依存的 RNA ポリメラーゼのプライマーとして作用することも見出されている。RNA 依存的 RNA ポリメラーゼにより合成された二本鎖 RNA は、dicer の基質となり siRNA が生成される。生成された siRNA は、RISC に取り込まれて標的 mRNA の切断を促すか、一本鎖に解きほぐされてふたたび RNA 依存的 RNA ポリメラーゼのプライマーとして作用する。

Huntington病治療用ツールとしての siRNAの作成(自験例)

RNAi が哺乳類細胞で有効であることが報告されて以来、RNAi 技術に関する研究が急速に進展し、siRNA の構造的特性に関する知見が多数集積した^{17,18)}。その結果、効果的な配列の設計、siRNA 発現の構築が進み、モデル動物を用いた治療実験にも応用されるようになった。哺乳類では siRNA が細胞内に存在すると RISC 以降の反応が誘導されることから、siRNA を細胞内に導入する手段として 21~23 塩基の合成二本鎖 RNA のトランス



図2 Huntington病原因遺伝子に対するsiRNA-HD エクソン1の塩基配列

フェクション, siRNA の配列を shRNA (short hairpin RNA) として発現するプラスミドベクターのトランスフェクション, あるいはウイルスベクターを用いた shRNA の導入などが使用されている。著者らは huntingtin 遺伝子エクソン一部分に対する siRNA をいくつか合成し, さらにその配列をもとに U6 プロモーターの制御下で当該配列を含む shRNA として発現するプラスミドベクターを数種作成し, 治療用ツールとしての有効性を細胞ならびに Dr. Bates らが報告したモデルマウス (R6/2 マウス⁶⁾) において検証した^{19,20)}。

Huntington病モデルのRNAiの効果

(自験例)

裸二重鎖 siRNA と 72 回の CAG リピートを含む Huntingtin 遺伝子エクソン 1 翻訳部分と GFP の融合蛋白質を HEK293 細胞あるいは Neuro2a 細胞に一過性に発現させ, huntingtin 遺伝子発現のノックダウン効果を検討したところ, siRNA-HD エクソン 1 と命名された siRNA (図 2) が濃度依存性に huntingtin 融合蛋白質の発現を特異的に抑制した¹⁹⁾。その効果は 40nM という低濃度から認められ, huntingtin 遺伝子を含まない GFP 蛋白質発現には影響を与えなかった。

そこで生後 2 日の Huntington 病モデルマウスに siRNA-HD エクソン 1 (200 ng) を含むリポフェクタミン溶液 5 μ l を注入し, 一定期間の後, 行動科学的評価と病理学的検討を行った。siRNA-HD エクソン 1 を脳内投与されたモデルマウスは, 無処置対照マウス, コントロール siRNA 投与マウスに比べ発症時期が遅れ, 体重減少が少なく生存期間は有意に延長した (図 3)²⁰⁾。尾吊り下げ試験, rotor rod 試験およびオープンフィールド試験においても行動障害の程度は対照に比べ進行が遅くなった。病理学的には神経細胞死が抑制され, 線

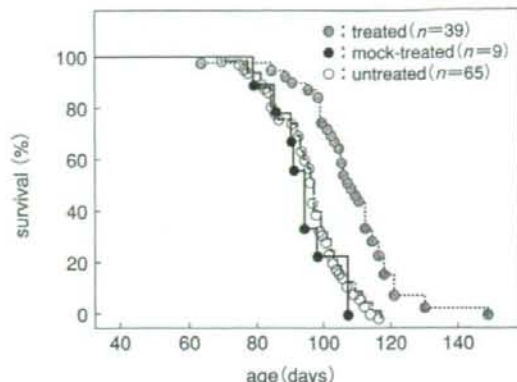


図3 Huntington病モデルマウスを用いたRNAi治療—生存曲線²⁰⁾

siRNA-HD エクソン 1 の投与を受けたモデルマウスは, 無処置マウス, コントロール siRNA 投与を受けたマウスに比べ生存が延長した。()内は使用匹数を示す。

条体での huntingtin 陽性あるいはユビキチン陽性の細胞内封入体の出現が減少した (図 4)。線条体における huntingtin mRNA レベルの抑制効果は, 注入後約 2 週間まで確認でき, 蛋白レベルでは huntingtin 凝集に対する抑制効果は 8 週齢まで確認された。発現抑制が持続的でなく短期的であっても症状の進行の抑制が可能である機序については不明であるが, 一過性の抑制が継続的な治療効果をもたらしたことは Huntington 病の治療法の実用化を考えるうえで重要な点と考えられる²⁰⁾。

ついで, siRNA-HD エクソン 1 の配列を含む shRNA 発現プラスミドを作成し, 同様に細胞レベルで Huntingtin 遺伝子に対する抑制効果を検討した。その結果, U6 プロモーター下流に標的配列に対するアンチセンス配列が最初に位置するように挿入された発現プラスミド U6-shHD-3 がもっとも効果を示した。すなわち, U6-shHD-3 は huntingtin + GFP 融合蛋白質の発現を濃度依存性に抑制し, プラスミド量において 2 ng から有効性を示した。ついで生後 2 日の Huntington 病モデルマウス R6/2 脳内に U6-shHD-3 を注入し, Huntingtin 遺伝子の発現抑制と病態の改善程度を検討したところ, U6-shHD-3 を投与した R6/2 個体はコントロールプラスミドを投与した対照群と比べ体重減少が少なく, 生存期間は有意に延長した。その効果は siRNA-HD エクソン 1 の直接投与よりも優

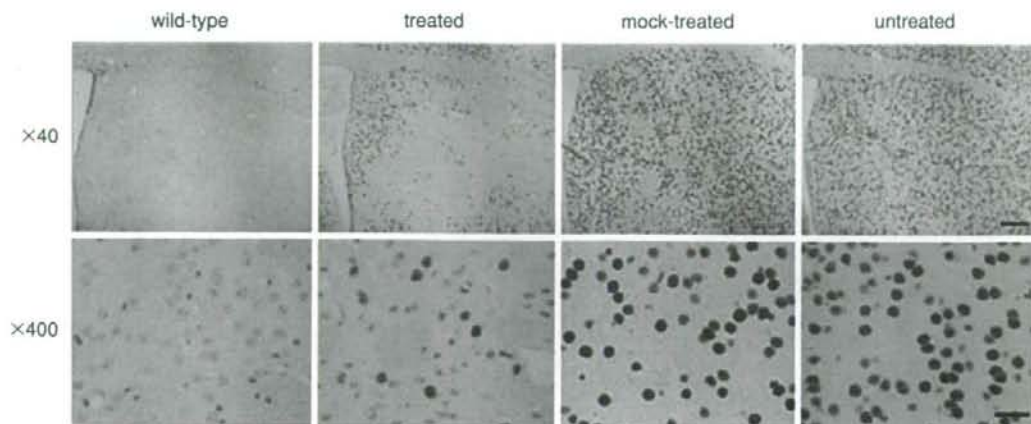


図 4 RNAi治療による細胞内huntingtin凝集体の減少

siRNA-HD エクソン 1 の投与を受けたモデルマウスは、無処置マウス、コントロール siRNA 投与を受けたマウスに比べ、細胞内 huntingtin 凝集体が減少した。野生型マウスでは凝集体形成は認められなかった。

れていた(投稿中)。

RNAiによるHuntington病治療の 現状と展望

以上の自験例の結果は RNAi がヒトの Huntington 病治療の有効な手段である可能性が高いことを示している。今回の研究では生後 2 日という早期の治療がモデルマウスで有効であることが示されたが、成体に投与した場合の治療効果についても今後検討する予定である。なお、R6/2 マウスはヒト huntingtin 遺伝子エクソン一部分の過剰発現マウスであり、また著者らが作成した siRNA はヒト huntingtin 遺伝子に選択的であるため、著者らの今回の方法では normal allele 由来の huntingtin の発現抑制が生体に及ぼす影響については検討がされていない。Huntingtin 遺伝子欠損マウスは胎性致死であるため²¹⁾、Huntingtin 遺伝子は成体にとって重要な役割を担っていると推察される。東京医大の金子博士らは、内在性 Huntingtin 遺伝子の抑制が小胞体機能に影響を及ぼす可能性を細胞で見出していることから²²⁾、今後 RNAi による治療の実用化を考えた場合、内在性 huntingtin 遺伝子の発現抑制の程度と生体機能に与える影響の関連について個体で解析することが必須であろう。また、siRNA の導入法についても継続的な検討が要求される。

著者らは AAV ベクターを用いた導入についても

その効果を解析中であるが、Dr. Beverly Davidson²³⁾、ならびに理研脳センター・貫名信行博士らのグループ²⁴⁾がそれぞれ、shRNA を発現するウイルスベクターを用いたモデル動物の治療実験について報告している。Dr. Davidson らは huntingtin 遺伝子エクソン 2 部分に対する siRNA を作成し、著者らが使用した R6/2 マウスと異なり、HD-N171-82Q マウス⁷⁾でその効果を検討した。4 週齢のマウスに U6 プロモーター制御下で shRNA を発現するように作成された AAV ベクターを投与したところ、トランスジーンであるヒト huntingtin 遺伝子の発現が抑制され、運動機能障害の進行が軽減したと報告している。成体に投与し効果があった点で貴重な報告である。貫名博士らは、独自に開発したモデルマウス²⁵⁾に対して同様に U6 プロモーター制御下で shRNA を発現する AAV ベクターを投与したところ、対照に比べて神経病理学的な進行が軽減することを見出している。病理学的に凝集体の形成が確認できる生後 12 週で投与され、効果があった点で貴重な報告である。また、貫名博士らの場合はトランスジーンである huntingtin+GFP 融合遺伝子のうち GFP 配列部分に対して作成された RNAi であり、Huntington 病のみならずポリグルタミン病全般の RNAi 治療開拓を考えるうえで重要な報告と考えられる。

おわりに

自験例を含め Huntington 病モデルマウスの病態進行抑制に関して、RNAi が有効であることが見出された。安全性の検討、投与ルートの開拓など実用化に向けて克服すべき課題はいまだ多いが、Huntington 病の根本的治療をめざすうえで、RNAi を活用した治療法開発はきわめて有望な選択肢と考えられる。

謝辞：本稿をまとめるにあたってご指導いただいた金澤一郎先生に深謝申し上げます。

文献

- 1) Huntington, G. : On chorea. *Med. Surg. Rep.*, **26** : 317-321, 1872.
- 2) Bates, G.P. : The molecular genetics of Huntington disease—a history. *Nat. Rev. Genet.*, **6** : 766-773, 2005.
- 3) 金澤一郎：ハンチントン病—臨床と病態。日本内科学会雑誌, **87** : 1647-1657, 1998.
- 4) Vonsattel, J.P. : Neuropathology of Huntington's disease. *Neurosci. News*, **3** : 45-53, 2000.
- 5) The Huntington's Disease Collaborative Research Group : A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **26** : 971-983, 1993.
- 6) Davies, S.W. et al. : Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, **90** : 537-548, 1997.
- 7) Schilling, G. et al. : Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.*, **8** : 397-407, 1999.
- 8) Tanaka, M. et al. : Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.*, **10** : 148-154, 2004.
- 9) Napoli, C. et al. : Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, **2** : 279-289, 1990.
- 10) Fire, A. et al. : Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, **113** : 503-514, 1991.
- 11) Fire, A. et al. : Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391** : 806-811, 1998.
- 12) Elbashir, S.M. et al. : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411** : 494-498, 2001.
- 13) Caplen, N.J. et al. : Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** : 9742-9747, 2001.
- 14) Elbashir, S.M. et al. : RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, **15** : 188-200, 2001.
- 15) Hammond, S.M. et al. : An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404** : 293-296, 2000.
- 16) Zamore, P.D. et al. : RNAi : double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101** : 25-33, 2000.
- 17) Elbashir, S.M. et al. : Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, **20** : 6877-6888, 2001.
- 18) Holen, T. et al. : Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Res.*, **30** : 1757-1766, 2002.
- 19) Liu, W. et al. : Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells. *Proc. Jpn. Acad.*, **79** (SerB) : 293-298, 2003.
- 20) Wang, Y.L. et al. : Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci. Res.*, **53** : 241-249, 2005.
- 21) Nasir, J. et al. : Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, **81** : 811-823, 1995.
- 22) Omi, K. et al. : siRNA-mediated inhibition of endogenous Huntington disease gene expression induces an aberrant configuration of the ER network *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338** : 1229-1235, 2005.
- 23) Harper, S.Q. et al. : RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 5820-5825, 2005.
- 24) Machida, Y. et al. : rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343** : 190-197, 2006.
- 25) Kotliarova, S. et al. : Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine-EGFP fluorescent aggregates. *J. Neurochem.*, **93** : 641-653, 2005.

* * *

脳科学の先端的研究

遺伝子から高次機能まで

編集／井原康夫 東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻神経病理学

- 「神経の発生」「神経の伝達」「神経の疾患」「高次機能」の4項目より構成され、脳の老化・大脳高次機能の問題をわかりやすく解説。
- 第一線で活躍の脳科学者の成果の概略と脳科学研究の世界的現況についての情報を紹介。



B5判・142頁・定価3,570円（本体3,400円 税5%）

CONTENTS

1章 神経の発生

1. 脳の領域化と神経分化のメカニズム
2. 神経幹細胞
3. 神経細胞の極性と軸索形成
4. 脳の発生と神経細胞の移動
—ヒトの脳はどのようにしてつくられるのであろうか—
5. 脳における匂い地図形成の分子機構

2章 神経の伝達

6. 生後発達における小脳登上線維
—Purkinje細胞シナプスの成熟—
7. 発達後期に生じるシナプス伝達物質のスイッチング
8. 発達期大脳皮質に存在するサイレントシナプスの活性化と脳由来神経栄養因子
9. 小脳シナプス回路発達の分子機構

3章 神経の疾患

10. Alzheimer病のワクチン療法の開発
11. ゲノムスキャンによる日本人のAlzheimer病危険因子同定の試み
12. Parkinson病の分子遺伝学の進歩
13. 筋萎縮性側索硬化症の研究の進歩
14. ポリグルタミン病治療の展望

4章 高次機能

15. 報酬依存性動作制御と大脳基底核
16. ヒトの高次痛覚情報系
—脳磁図を用いたヒトの痛覚認知のメカニズムの研究—
17. 辺縁系による行動制御
—扁桃核、眼窩皮質、および前部帯状回への役割—
18. 運動前野機能に関する最近の研究
19. 海馬-皮質系の記憶情報表現—実験とモデル—

●弊社の全出版物の情報はホームページでご覧いただけます。 <http://www.ishiyaku.co.jp/>



医歯薬出版株式会社 / ☎113-8612 東京都文京区本駒込1-7-10 / TEL.03-5395-7610 FAX.03-5395-7611

2006年7月作成 TP

神経・筋疾患治療へのRNAi応用*

北條 浩彦**

Key Words : mammalian RNAi, interferon response, siRNA duplex, duration of RNAi activity

I. 哺乳動物RNAiとインターフェロン応答

RNA interference (RNAi; RNA干渉) は、二本鎖RNA (dsRNA) によって誘導される配列特異的な遺伝子発現の転写後抑制現象である。この不思議な現象は、1998年、Fireらによって線虫を用いた研究から発見された¹⁾。その後、RNAiは、線虫をはじめ、ショウジョウバエ、原生動物、脊椎動物、さらに植物とさまざまな生物種で観察される保存された現象であることが明らかになった²⁻⁵⁾。そのメカニズムは、1) 細胞内に生じた長いdsRNAが、Dicerと呼ばれるRNase III酵素によって消化され、約21~25bpの短い二本鎖RNA, small interfering RNA (siRNA) 二量体となり、次に、2) RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体にそのsiRNAが取り込まれ、3) 取り込まれたsiRNAと相補的なメッセンジャーRNA (mRNA) がRISCによって特異的に切断されるという反応である。このような反応過程を経て、RNAiの配列特異的な遺伝子発現の転写後抑制が起こる。

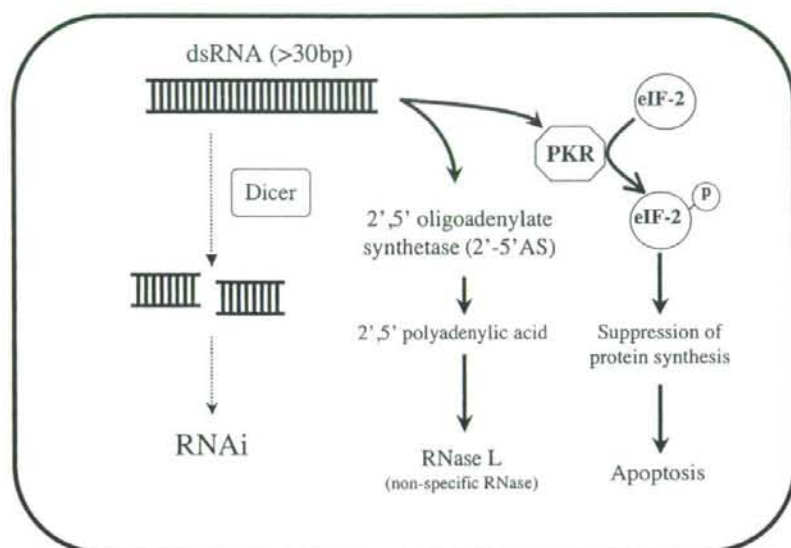
ヒトを含めた哺乳類細胞のRNAiは、当初、初期胚や未分化細胞といった限られた細胞でのみ観察される特殊な現象であると思われていた。これは、哺乳類細胞が持つもう一つの二本鎖RNAに

対する応答経路が密接に関わっている。初期胚や未分化細胞など、一部の細胞を除いた殆どの哺乳動物細胞は、30bp以上の長いdsRNAが細胞内に生じると、RNAiよりも速くインターフェロン応答(抗ウイルス反応)を引き起こし、細胞死が誘導される(Fig. 1a)。この反応には、主に二つの経路が関わっている。ひとつは、dsRNA依存的タンパク質キナーゼ(interferon-inducible, dsRNA-activated protein kinase: PKR)を活性化し、翻訳因子であるeIF2aをリン酸化して翻訳阻害を誘導する経路。もう一つは、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素(2'-5' oligoadenylate synthetase: 2-5AS)を活性化し、それによって合成されたポリアデニル酸を介して非特異的なRNase Lを活性化する経路である。これらの応答経路は、dsRNA導入後直ちに活性化されるため、Dicerを介したRNAi誘導を観察することができなかった。しかしながら、2001年、この応答経路を回避する画期的なブレイクスルーが、Tuschlらのグループによって報告された⁶⁾。彼らは、化学合成したsiRNA二量体を直接哺乳動物細胞内に導入し、細胞死を引き起こさず、RNAiだけを誘導することに成功したのである(Fig. 1b)。この方法によって、ほぼ全ての哺乳動物細胞にRNAiを誘導することが可能となり、哺乳類のRNAi研究

* Medical Application of RNA Interference to Neuronal and Muscular Diseases.

** 国立精神・神経センター神経研究所 Hirohiko Nonaka: National Institute of Neuroscience, NCNP

a Rapid responses to long dsRNAs



b Induction of RNAi by synthetic siRNA duplexes

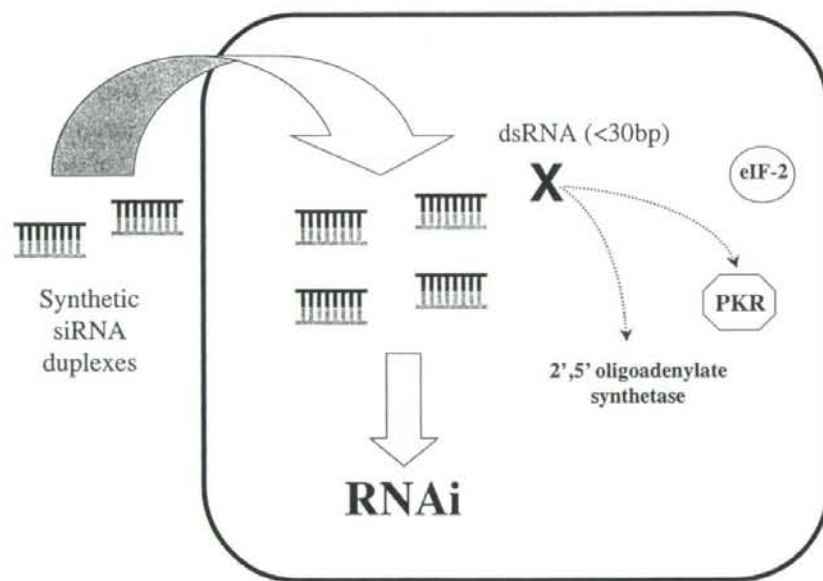


Fig. 1 Schematic drawing of interferon responses (a) and RNAi induction by synthetic siRNA duplexes (b). (a) Long double-stranded RNAs (>30bp) trigger a rapid translation inhibition involving the interferon-inducible, dsRNA-activated protein kinase, PKR, and a rapid and non-specific RNA degradation involving the sequence-non-specific RNase, RNase L, in most of mammalian cells except for some undifferentiated cells. Consequently, these rapid responses to long dsRNAs may mask the sequence-specific RNA interference (RNAi) activity. (b) Chemically synthesized siRNA duplexes (19~27bp) introduced into cells can induce sequence-specific RNAi without triggering the rapid and non-specific RNA degradation and translation inhibition.

Table 1

Disease	Target (genes) of RNAi	References
Triplet repeat diseases : Huntington's disease Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	Huntingtin SCA1	13~15 16
Parkinsonism	Tau (V337M variant)	17
Alzheimer's disease	APP (Swedish variant) Tau (V337M variant)	17, 18
Slow channel congenital myasthenic syndrome (SCCMS)	Muscle acetylcholine receptor (AChR) subunits (α S226F variant)	19
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	SOD1	20, 21

が飛躍的に発展した。現在では、合成 siRNA を用いて直接 RNAi を誘導する方法の他に、発現プラスミドを用いて細胞内で短いヘアピン型 RNA (shRNA) を発現させ、その後 Dicer によるプロセスを経て siRNA 二量体を生じさせる方法も用いられている。

II. 神経筋疾患治療に向けた 神経細胞・筋細胞での RNAi 誘導

RNAi は、その不思議なメカニズムに対する学問的な興味だけでなく、目的の遺伝子発現を簡単に、しかも強力に抑制できることから、簡便な遺伝子機能阻害方法（遺伝子ノックダウン方法）としても注目されている。特に、医療方面・創薬方面への RNAi 技術の応用に大きな期待が持たれている。

RNAi の治療方面への応用については、その作用機序から、機能獲得 (gain of function) が関わる疾患など（変異遺伝子が関連する優性の遺伝病など）に対して有効であると考えられる。そして、すでに様々な疾患に対して、RNAi を用いた疾患原因遺伝子をターゲットとするノックダウンが試みられている。特に神経筋疾患では、神経変性疾患をはじめ多くの疾患が gain of function に関連するものであり、RNAi 技術を用いた様々な治療への取り組みがなされている。Table 1 に、その一部ではあるが、神経筋疾患に関連する遺伝子をターゲットとした RNAi ノックダウンの報告をまとめた。

上記のような異常な遺伝子（機能獲得）によっ

て疾患が惹起されるものに対して、筋ジストロフィー症のような遺伝子機能の喪失 (loss of function) が原因で引き起こされる疾患もある。そのような疾患に対しては、RNAi 技術を用いた遺伝子ノックダウンによって様々なタイプの疾患モデル生物を作出することも可能であると考えられる。そして、それらのモデル生物を用いた新しい治療法や治療薬の開発に貢献できると考えられる。

さて、疾患モデル生物の作出を目的とした RNAi でも、疾患原因遺伝子をターゲットとする RNAi でも、目的とする細胞や組織で RNAi が効果的に誘導されなければならない。また、その特徴も知らなければならない。哺乳動物の RNAi は、その誘導物質である siRNA 二量体に依存した RNAi 活性があることが既に知られている⁷⁾。したがって、ターゲット遺伝子に対して効果的なノックダウンを行うためには、まず、強い RNAi 活性を誘導するポテンシャルを持った siRNA 二量体を設計しなければならない。今日では、優れたアルゴリズムを備えた予測プログラムによってそのような siRNA 二量体を設計することが可能となっている⁸⁾。

RNAi の機能面だけでなく、RNAi を誘導する細胞の特性も RNAi 誘導の重要な情報となる。筋肉組織では、RNAi に関わる Dicer の発現が他の組織に比べて低いことが既に知られている^{9,10)}。われわれはさらに、Dicer 以外にも、RISC の重要な構成タンパク質である Ago2 (eIF2C2) 遺伝子やその遺伝子ファミリーに属する eIF2C1、

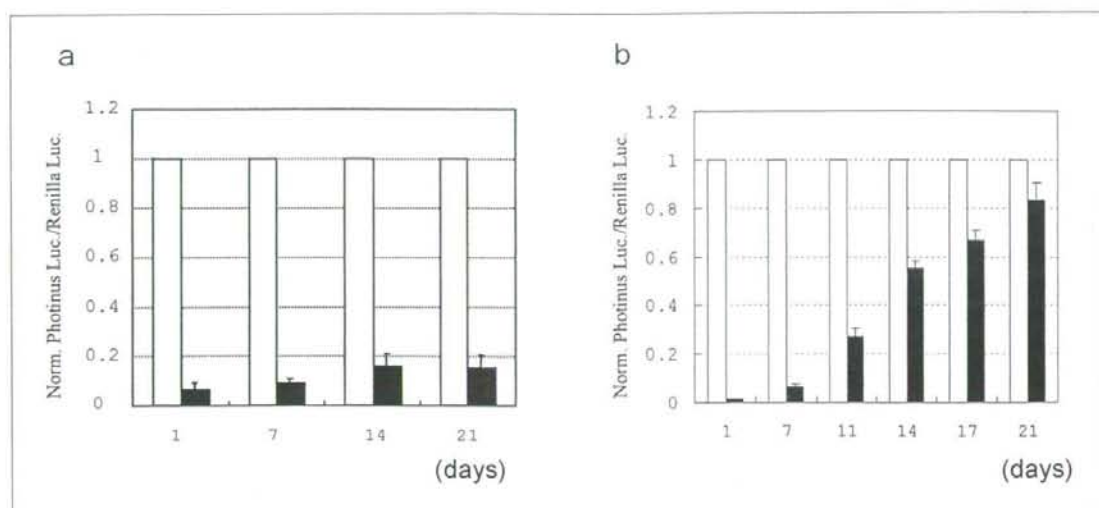


Fig. 2 Persistence of RNAi activity in mouse postmitotic neurons (a) and during myogenic differentiation of mouse C2C12 cells (b). The Photinus and Renilla luciferase genes and synthetic siRNA duplexes against the Photinus luciferase gene or a non-silencing siRNA duplex as a control were cotransfected into cells. RNAi activity was examined by a dual-luciferase assay at various days after transfection up to 3 weeks. Open and solid bars indicate the data in the presence of the non-silencing siRNA duplex and siRNA duplex conferring RNAi, respectively.

eIF2C3そしてeIF2C4遺伝子の発現も筋肉組織(細胞)で低いことを見出した。そして、そのようなRNAiに関連する遺伝子の発現が低い筋肉細胞であっても、RNAiが誘導されることを単離した筋線維細胞を用いて証明した¹¹⁾。

一方、細胞増殖の観点から見た場合、神経細胞や筋肉細胞は、最終分化を完了し、細胞分裂を停止した細胞として捉えることができる。一般的に、増殖している(細胞分裂を繰り返している)哺乳動物細胞に合成siRNA二量体を導入してRNAiを誘導した場合、そのRNAi活性は一時的で、だいたい2~4日間ぐらい強い活性が維持され、その後は、細胞分裂の回数の増加と共にRNAi活性は次第に消えてゆく。これは、siRNA導入によって細胞内に成立した活性型RISCの一細胞当たりの数が、細胞分裂に伴って減少するためと考えられている。では、神経細胞や筋肉細胞のような細胞分裂を止めた細胞ではどうであろうか? これに答えるために、われわれは、ホタル・ルシフェラーゼレポーター遺伝子とそれをターゲットとする合成siRNA二量体を使ったRNAi誘導系を用いて、哺乳動物細胞のRNAi活性の持続性について解析した。その結果、哺乳動物神経

細胞では、誘導した強いRNAi活性が少なくとも3週間にわたって持続することを見出した(Fig. 2a)¹²⁾。それに対して、筋肉細胞に分化させたマウスC2C12細胞を用いた実験では、誘導したRNAi活性は誘導後1週間ほど持続し、その後、徐々に活性を失っていった(Fig. 2b)¹¹⁾。これらの結果から、哺乳動物のRNAi活性の持続性は、細胞間や組織間で違いがあることが示された。上記でも述べたように、神経細胞・組織や筋肉細胞・組織でRNAiを応用する場合、これらの知見、すなわち、これらの細胞におけるRNAiの特徴は有用な情報になると考えられる。

III. 治療に向けたRNAi応用の課題

培養細胞を用いた*in vitro*の実験でRNAiを強く誘導するsiRNA二量体を選定できても、実際にそれらを使った個体レベルでのRNAi誘導となると更にいくつかの問題を解決しなければならない。そのような問題点を挙げてみると、1) siRNA二量体の生体内での安定性、2) siRNA二量体の目的組織・細胞へのデリバリー、3) RNAi活性の持続性などが挙げられる。これらについて、まず、siRNA二量体の生体内、特に血清内での安

定性については、siRNAの化学修飾などによってその安定性を向上させることが可能になってきている。また、長期間のRNAi活性のためには、合成siRNA二量体を使ったRNAi誘導ではなく、shRNAを発現させる発現ベクターを使ったRNAi誘導法が用いられてきている。これらのRNAi誘導法やその活性の維持については、それぞれの対象や目的にあった方法を選択することが望ましいと考える。さて、今後最も必要とされている技術は、siRNA二量体（shRNA発現ベクターも含む）の目的細胞・組織へのデリバリーである。このデリバリーシステムの確立が、*in vivo* RNAiの応用の実現に必須であり、今後この方面での発展が大いに望まれる。

謝辞：本稿執筆の機会を与えていただきました国立精神・神経センター、神経研究所、武田伸一郎長に深謝いたします。

文 献

- 1) Fire A, Xu S, Montgomery MK et al : Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 : 806-811, 1998
- 2) Vaucheret H, Beclin C, Fagard M : Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* 114 : 3083-3091, 2001
- 3) Boshier JM, Labouesse M : RNA interference : genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2 : E31-36, 2000
- 4) Sharp PA, Zamore PD : Molecular biology. RNA interference. *Science* 287 : 2431-2433, 2000
- 5) Fire A : RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15 : 358-363, 1999
- 6) Elbashir SM, Harboth J, Lendecke W et al : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 7) Hohjoh H : RNA interference (RNAi) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. *FEBS Lett* 521 : 195-199, 2002
- 8) Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K et al : siDirect : highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32 : W124-129, 2004
- 9) Matsuda S, Ichigatani Y, Okuda T et al : Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim Biophys Acta* 1490 : 163-169, 2000
- 10) Nicholson RH, Nicholson AW : Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome* 13 : 67-73, 2002
- 11) Sago N, Omi K, Tamura Y et al : RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *Biochem Biophys Res Commun* 319 : 50-57, 2004
- 12) Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H : Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett* 558 : 89-95, 2004
- 13) Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS et al : Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11 : 175-184, 2002
- 14) Harper SQ, Staber PD, He X et al : RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 5820-5825, 2005
- 15) Rodriguez-Lebron E, Denovan-Wright EM, Nash K et al : Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther* 12 : 618-633, 2005
- 16) Xia H, Mao O, Eliason SL et al : RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10 : 816-820, 2004
- 17) Miller VM, Xia H, Marrs GL et al : Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 7195-7200, 2003
- 18) Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL et al : Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference : an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 32 : 661-668, 2004
- 19) Abdelgany A, Wood M, Beeson D : Allele-specific silencing of a pathogenic mutant acetylcholine receptor subunit by RNA interference. *Hum Mol Genet* 12 : 2637-2644, 2003
- 20) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM et al : Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11 : 429-433, 2005
- 21) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC et al : Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11 : 423-428, 2005

Medical Application of RNA Interference to Neuronal and Muscular Diseases

Hirohiko HOHJOH

National Institute of Neuroscience, NCNP

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific posttranscriptional gene silencing triggered by double-stranded RNAs (dsRNAs) homologous to the silenced genes. In terms of rapid and potent induction of RNAi by exogenous dsRNAs, RNAi become a powerful reverse genetic tool for suppressing the expression of a gene of interest in various species including mammals. In mammals including human, either direct introduction of chemically synthesized 21-25 nucleotide small interfering RNA (siRNA) duplexes

into cells or generation of siRNA duplexes using short-hairpin RNA (shRNA) expression vector is often used for induction of RNAi, and its applications is expanding to various fields of science ; therapeutic application of RNAi in medical fields is particularly promising. I herein describe the potential utility of RNAi technique against neuronal and muscular diseases and properties of RNAi activities in neuron and muscle cells which could be useful for realizing such an application of RNAi.

切手・医学史
をちち

60

志賀 潔没後 50 年

1901年9月のその日は、志賀 潔(1871~1957)が86年間の生涯でもっともオーラを放した一日となった。この日、志賀はやがて師となるエールリヒに会うためにハンブルクの万国自然科学学会に出席していた。彼が赤痢菌を発見して3年後の1900年にドイツ・ボン大学教授の Walther Kruse(1864~1943)は「志賀とは異なる真性の赤痢菌を発見した」と主張していたが、この学会の細菌部会で志賀は偶然、そのクルーゼの研究発表を聴くことになった。

志賀はドイツに着いて間もないものの、学会の演説はおおむね聞き取れたという。クルーゼの発表が終わるや志賀は追加発言に立って、用意していた原稿を読み上げた。それは簡単なながらも自信に満ちたものだった。「私が日本で赤痢菌を発見したのは三年前で、其後の研究は大に進み、免疫を行い、治療血清を製して之を患者に試み、大に効果を認むるに至った。又豫防注射も、ワクチンに血清を加える方法を用いて、既に数萬人に試みた」。

散会后、志賀はクルーゼに名刺を差し出して挨拶したがクルーゼは「赤痢菌培養を持ってきたか」と尋ね、志賀が「40日間の航海に赤痢菌寒天培養が持たなかった」と答えると、嘲笑的な顔をして立ち去った。こうして志賀とクルーゼの先取権争いが起り、ついに1902年コッホの主唱で「赤痢病原調査委員会」が組織された。調査会の結論は「志賀菌とクルーゼ菌は同一」で志賀の先取権が認められたが、ドイツ学会で



・仙台市内、勾当台公園に建つ「文化勲章受賞・仙台市名譽市民」志賀 潔の胸像。



・写真付き切手(左)は仙台市北山の輪王寺。ここに、志賀 潔が生前昭和8年に建立した五輪塔「志賀家之墓」(右)がある。木碑には「赤痢菌発見者志賀 潔先生菩提」。

はなおしばらく“クルーゼ・志賀菌”の名称を用いていた。志賀は名刺に K. Shiga と書いていたので、「Kはクルーゼではないのか」とからかわれたこともあったという。

志賀は1896年12月東京帝国大学医科大学を卒業後ただちに伝染病研究所に入所し、所長北里柴三郎の命ずるまま1897年6月、流行中の赤痢の研究に取り組んだ。34名の入院患者の糞便と2例の剖検例の腸粘膜を調べた志賀はチフス菌に似た桿菌の一種に目星をつけ、動物試験を行ったが感受性の違いか成功しない。そのとき彼の目に留まったのが、前年末に Georges Widal(1862~1929)が発表していた「腸チフス患者の血清と腸チフス菌が特異的に凝集反応を起こす」という“ヴィダール反応”の論文。志賀はこれをヒントに、当の桿菌が赤痢患者の血清だけに凝集反応を起こすことを証明し病原菌と断定した。

成果はまず師の北里が私立衛生会の11月例会で報告、志賀はその年(1897)発刊になったばかりの『日本細菌学雑誌』第1号と、1898年の『Zentralblatt für Bakteriologie』誌に論文を掲載した。このため志賀の赤痢菌発見は海外では1898年のこととされているが、本来は明治30年(1897)で来年は110周年になる。

- 1) 志賀 潔：エールリッヒ傳、富山房、1943。
- 2) 志賀 潔：志賀 潔「或る細菌学者の回想」、日本図書センター、1997。

金山知新／かなやまともよし
新日本製鐵(株)人事・労政安全健康グループ

二本鎖RNAワールドの開扉

—ノーベル医学生理学賞2006に寄せて

北條浩彦 / ほうじょうひろひこ
国立精神・神経センター神経研究所

「ついに……」「やはり(そうか)」「当然!」,と10月2日のノーベル医学生理学賞の発表のニュースが流れたとき多くの人がそう思ったに違いない。スウェーデンのカロリンスカ研究所は2006年のノーベル医学生理学賞をRNA干渉(RNA interference: RNAi)を発見した米スタンフォード大学医学部のアンドリュー・ファイヤー教授と米マサチューセッツ大学医学部のクレイグ・メロー教授に贈ると発表した。1998年のRNAiの発見(彼らの論文発表¹⁾)から8年という短い期間で受賞に至ったことは、この発見がサイエンス(科学)に与えた大きな影響と貢献を物語っている。

RNAiは、二本鎖RNAによって誘導される配列特異的な遺伝子発現の転写後抑制機構である。実は、この現象自体は、1998年よりも以前にすでに知られていた、植物の“co-suppression”, 菌類の“quelling”とよばれていた現象がそれである²⁾。ファイヤー、メロー両教授の功績は、この不思議な現象が、抑制を受ける遺伝子と相同の二本鎖RNAによって誘導されることを線虫を用いた研究から発見したことにある。1998年の春、科学雑誌『ネイチャー』に掲載されたその論文を読んだとき、アンチセンス鎖のRNAよりも二本鎖RNAのほうがはるかに遺伝子発現抑制効果が高いという彼らのデータをにわかには信じられなかったことを思い出す。その当時の知識・常識では、たとえ二本鎖RNAによって(RNAiが)誘導されるにしても、その不思議な発現抑制メカニズムを理解し、そして想像することはできなかった。今日、RNAiの大筋のメカニズムは解明され、RNAiの存在は周知の事実となっている。無名の新人だったRNAiは、この短い期間でサイエンスの市民権を得て、その名前は広く人びとに知られるようになったのである。われわれが共有している概念的なものの見方や考え方が革命的に(突然)

変わることをパラダイムシフトとよぶが、今回のRNAiの発見はまさにそれであり、その後のめざましい発展と影響をみても、ファイヤー、メロー両教授の功績がノーベル賞に値することはいうまでもない。

サイエンス分野に大きなインパクトと影響を与えたRNAiについて、その発見から今日に至る発展について簡単に紹介したい。

■RNAiの発見から分子メカニズムの解明 (1999年～)

線虫でみつかった二本鎖RNAが誘導する不思議な現象、RNAi、をきっかけに、さまざまな生物でRNAiの検証が行われた。さらに、そのメカニズムについてもショウジョウバエ・線虫のRNAiを中心に精力的に解析が進められた。この不思議な現象の分子メカニズムの一端が解かれたのは、1999～2000年に報告されたショウジョウバエの胚または細胞抽出液を使った*in vitro*のRNAi反応系の確立とそれをを用いた研究成果に負うところが大きい³⁻⁵⁾。そして二本鎖RNAを消化するRNase III酵素のDicerの発見、Dicer消化によって生じる短い二本鎖RNAである、small interfering RNA (siRNA)二量体の発見、そしてRNAiの活性中心であるRNA-induced silencing complex (RISC)の発見に貢献した。これらの成果、すなわちRNAiにかかわる分子の存在とその酵素科学的反応の証明は、RNAiを単なる不思議な現象から、細胞内にたしかに存在する新規の生化学的経路として実体化させた。そして、ヒトを含む高等生物においてもRNAiの反応経路が存在する可能性を強く暗示させたのである。

■哺乳動物RNAi研究の夜明け(2001年～)

さまざまな生物種でRNAiの現象が報告され、研究が進む中、ヒトを含めた哺乳動物のRNAi研究は進んでいなかった。2000年に哺乳動物の卵母細胞と初期胚でRNAiが観察されたが、その他の細胞(とくに体細胞)については報告がなかった。これは、二本鎖RNAがかかわるもうひとつの反応経路が深くかかわっていたからである。初期胚や未分化細胞以外の哺乳動物細胞は、二本鎖RNAによって誘導される抗ウイルス反応とよばれるウイルス感染に対するディフェンス機能があ