

200833021B

厚生労働省科学研究費補助金  
(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 20 年度 総合研究報告書  
(H18 - こころ - 一般 - 022)

研究代表者 祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目次

### I. 総合研究報告

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. ALS 新規治療法開発と孤発性 ALS 疾患モデルの開発

田中 章景 …………… 15

2. 球脊髄性筋萎縮症の病態解明と分子標的治療法の開発

勝野 雅央 …………… 21

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 …………… 27

III. 研究成果の刊行に関する一覧 …………… 35

IV. 研究成果の刊行物・別冊

# I. 総合研究報告

## 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

研究代表者：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における dynactin 1 の発現低下および逆行性軸索輸送が障害を明らかにした。Hsp70/Hsp90 結合蛋白質である CHIP (C terminus of Hsc70 (heat shock cognate protein 70)-interacting protein) の高発現により、変異アンドロゲン受容体(AR)の凝集体およびモノマーの分解が亢進し、SBMA モデルマウスの神経症状・病理所見が改善することを明らかにした。また、SBMA モデルマウスにおけるプロテアソーム活性を測定したところ、脊髄では進行期においても活性が保たれており、骨格筋では活性が亢進していた。Hsp90 阻害剤である 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および熱ショック蛋白質の発現誘導が認められ、マウスの運動機能および寿命の改善が認められた。一方、SBMA 患者に対するリユープロレリン酢酸塩の第Ⅱ相臨床試験では、48 週間のプラセボ対照比較試験ではリユープロレリン酢酸塩による血清 CK の有意な低下、陰囊皮膚における 1C2 (抗ポリグルタミン抗体) 陽性細胞数の有意な減少、および嚥下造影における食道入口部開大時間の有意な改善が認められ、その後の継続試験ではリユープロレリン酢酸塩の長期投与により運動機能スコアの悪化が有意に抑制された。

#### 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

古細菌 *Methanosarcina mazei* の PS (Mm-PS)のサブユニット  $\alpha$  と  $\beta$  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。また、E3 ユビキチンリガーゼ Dorfin のトランスジェニック (Tg) マウスと変異 SOD1 Tg マウスを交配し、*in vivo* における治療効果を検証した。その結果、ダブル Tg マウスでは変異 SOD1 の脊髄前角における沈着や運動ニューロンの神経細胞死、軸索変性が抑制され、運動能力の改善、生存期間の延長をもたらした。一方、孤発性 ALS 患者脊髄の運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルの結果に基づき、dynactin-1 の遺伝子発現低下を線虫運動ニューロンに展開し疾患モデルの開発を行った。この結果、dynactin-1 ノックダウン(KD)線虫では、患者で見られる cyclin C の発現増加と核内移行が再現されており、さらに cyclin C の核内過剰発現線虫モデルでは、dynactin-1 KD 同様に運動ニューロン障害を示す表現型が得られた。

#### 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

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。SCFFbs1 の糖鎖認識機構が X 線結晶構造解析により示され、その合理的なシステムが明らかになった。SCFFbs1 の立体構造より得られた情報から Fbs1 の分子シャペロンとしての新たな機能が判明した。プロテアソームの分子集合に係わる因子である Proteasome Assembling Chaperone 1 (PAC1)の欠損マウスを作出し、プロテアソームの量を徐々に削減した場合におけるニューロンの動態について解析した。PAC1 全身欠損マウスは早期胎生致死となったことから、シャペロン依存的なプロテアソームの分子集合機構がマウスの個体発生に必須であることが判明した。さらに中枢神経系特異的に PAC1 を欠損したマウスを作出したところ、プロテアソームの低下と並行して、平衡感覚・発育異常が見られることに加え、大脳皮質、小脳皮質において特徴的な層状構造の形成が阻害された。

## A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は成人発症の運動ニューロン疾患であり、いずれも有効性が確立された治療法はなく、予後は極めて悲観的である。両者を併せた推定患者数は 1 万人にも及び、その克服が切望されている難治性疾患の代表格である。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。とくに蛋白質の品質管理機構であるユビキチン-プロテアソーム系やオートファジーなど細胞が本来備えている防御機構や、軸索輸送・細胞周期調整といった点に興味が集まりつつある。本研究の目的は、ALS と SBMA とに共通する病態関連分子を探索し、分子メカニズムを明らかにした上で、分子標的治療法を開発することである。

## B. 研究方法

### UPS 賦活化による SBMA の病態抑止

SBMA に対するユビキチン-プロテアソーム系を介した治療法を開発すべく、SBMA マウスモデルにおけるプロテアソームのキモトリプシン様活性および 35S 標識ユビキチン化 cIAP1 による蛋白質分解活性を測定し、選択的 Hsp90 阻害剤である 17-DMAG

(17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin) を SBMA モデルマウスに経口投与し、運動機能や病理学的所見などにおける治療効果を解析した。また、Hsp70/Hsp90 結合蛋白質である CHIP (C terminus of Hsc70 (heat shock cognate protein 70)-interacting protein) の機能解析のため、SBMA トランスジェニックマウスとの交配を行い、運動機能解析や病理学的解析を行った。

### SBMA における逆行性軸索輸送

SBMA マウスモデルにおける逆行性軸索輸送について、Fluoro gold labelling および座骨神経結紮を用いて解析した。また、軸索輸送に関与するモーター蛋白質について Western blot や定量 RT-PCR などを用いて発現量を解析した。

### SBMA に対するリュープロレリン酢酸塩の第 II 相臨床試験

50 例の被験者を対象に 1 年間のプラセボ対照二重盲検試験を行った。対象は遺伝子診断で診断が確定された SBMA 患者であり、独歩もしくは杖を用いて歩行可能な 30 歳～70 歳の挙児希望のない患者とした。また、1 年間の臨床試験を終えた 49 例の被験者を対象として、希望者に 2 年間の leuprorelin 継続投与を行い、投与を行わなかった群との比較を行った。プロトコールは名古屋大学附属病院 IRB の承認を得ており、文書による同意を得た被験者を対象とした。

主要評価項目は日本版 ALSFRS-R とし、副次評価項目として陰囊皮膚の抗ポリグルタミン抗体陽性細胞数の割合、血清 CK, AST, ALT、嚥下機能指標、呼吸機能検査等を測定した。

### 古細菌プロテアソームによる ALS の治療

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 ( $\alpha$  および  $\beta$  サブユニット) をクローニングし、Neuro2a および HEK293 培養細胞に一過性に発現させ、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。また、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。

### Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療

全長ヒト Dorfin を PCR にて増幅し、chicken- $\beta$ -actin プロモーターの下流に挿入したベクターをマイクロインジェクションして Tg マウスを作成した。#513 と #526 の 2 ラインの Dorfin Tg マウスをヒト変異 SOD1 (G93A) マウスと交配したダブル Tg マウスを作成し、歩行機能 (フットプリント)、ローターロッドにおける運動機能、生存期間についての検討を行った。さらに、病理所見では脊髄前角運動ニューロン数、脊髄前根大径有髄線維密度を測定するとともに、抗 SOD1 抗体、抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学的検討、ウェスタンブロットングを行った。

### Dynactin-1 ノックダウン線虫の解析

コリン作動性運動ニューロン特異的なプ

ロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト dynactin-1 の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし変異体を作成した。コントロール群として、線虫とは無関係な *LacZ* 遺伝子を標的とした shRNA を発現させた。また、運動ニューロンの同定及び shRNA の導入の確認を容易にするために GFP を共発現させた。また、この dynactin-1 KD 線虫における cyclin C の発現量変化を調べるために、内因性の *cic-1* の mRNA レベルを whole mount in situ hybridization 法にて評価した。また、cyclin C の局在変化の検証のために、TagRFP を融合した *cic-1* (TagRFP-*cic-1*) を共発現した。さらに、cyclin C の核内移行が線虫の表現型に及ぼす影響を確認する目的で、核移行シグナル付き GFP を融合した *cic-1*(NLS-GFP-*cic-1*) を線虫に発現させた。運動機能の解析は、一定時間内の首振り回数、累積生存率をパラメーターとした。

#### CHIP と Hsj-1 の機能解析

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<sup>Fbs1</sup> リガーゼのアッセイ方法に準じて行った。遺伝子欠損 (KO) マウスの作製にあたっては、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、*SalI* 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。

#### SCF<sup>Fbs1</sup> リガーゼおよび Fbs1 の分子構造と作用機構の解明

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。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。

#### PAC1 の機能解析

最初に Flip-FRT & cre-lox システムを利用した条件付き PAC1 欠損マウスを作成した。この変異マウスと種々のプロモーター制御下 Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウス (Tg) と掛け合わせることで PAC1 欠損マウスを作成することが可能になった。今回は Cre リコンビナーゼを全身および神経幹細胞特異的に発現させ PAC1 を欠損させることで解析を行った。全身発現にはアデノウイルス EIIa プロモーター、神経幹細胞発現にはマーカー分子として知られる Nestin のプロモーターを利用したトランスジェニックマウスを用いた。その他の解析方法としては、形態学的手法とプロテオソームの解析を中心とした生化学的手法を駆使して行った。

#### (倫理面への配慮)

患者検体を用いた研究については、臨床研究に関する倫理指針を遵守して行った。また、本研究を行うに当たっては、名古屋大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て施行した。臨床試験の実施に当たっては名古屋大学医学部附属病院 IRB の承認のもと、文書による説明・同意を得た上で、被験者の自由意志およびプライバシーをそこなうことのないよう配慮した。実験動物 (マウス) については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律および動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、名古屋大学動物実験指針に基づいて安楽死や size reduction など動物の苦痛の除去・軽減に細心の注意を払いつつ実験を行った。

## C. 研究結果

### UPS 賦活化による SBMA の病態抑止

SBMA マウスの脊髄におけるプロテアソーム活性は進行期においても野生型と同程度に保持されており、骨格筋ではその活性が亢進していた。20S および 19S プロテアソームサブユニットの発現量も SBMA マウス脊髄では野生型と同程度であったが、骨格筋では発現の亢進が認められた。生体におけるユビキチン-プロテアソーム系のレポーターである変異ユビキチン (Ub<sup>667V</sup>) の高発現マウスと SBMA マウスを交配した解析においても、ユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていることが示された。17-DMAG を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および Hsp70・Hsp40 などの熱ショック蛋白質の発現誘導が認められ、反応性グリオーシスの改善が認められた。また、マウスの運動機能 (rotarod, cage activity)、体重、および寿命の有意な改善が認められた。

CHIP トランスジェニックマウスとの交配により CHIP を高発現した AR-97Q マウス脊髄および骨格筋の immunoblot では、変異 AR の凝集体 (高分子量複合体) およびモノマーの現象が認められたが、こうした効果は AR-24Q マウスでは認められなかった。AR-97Q マウスの脊髄および骨格筋を用いたフィルターラップアッセイでは、セルロースアセテート膜にプロットされる AR 凝集体およびニトロセルロース膜にプロットされる可溶性 AR モノマーの量はいずれも CHIP 高発現により減少した。CHIP を高発現した AR-97Q マウスではロータロッド、ケージアクティビティー、歩幅、体重、生存期間の有意な改善が認められ、とくにその効果は CHIP をホモで高発現するマウスにおいて強く認められた。病理学的には、脊髄前角および骨格筋のいずれにおいても抗ポリグルタミン抗体で核がびまん性に染色される細胞数が減少し、骨格筋の HE 染色では神経原性筋萎縮の所見にも改善が認められた。脊髄前角の GFAP 染色では反応性グリオーシスの減弱が示唆された。

### SBMA における逆行性軸索輸送

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。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。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。また、SBMA マウスにおける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、フルオロゴールドによりラベルされるニューロンの数にも増加が認められた。

### SBMA に対するリュープロレリン酢酸塩の第 II 相臨床試験

SBMA は緩徐進行性の疾患で、病態を反映するバイオマーカーが確立されていないため、まずサロゲートエンドポイントとなりうる臨床評価指標を探索した。とくに予後に直結する球麻痺の解析方法として嚥下造影に注目し、空間的・時間的解析による嚥下機能の定量化を検討した。その結果、食道入口部開大時間が患者の重症度と最もよく相関し、再現率の高い優れたマーカーであることが明らかとなった。そこで、運動機能スコア (ALSFRS-R) を主要評価項目、食道入口部開大時間などを副次的評価項目とする第 II 相臨床試験をデザインし、SBMA 患者に対するリュープロレリン酢酸塩の治療効果を検討した。50 例の被験者を対象に試験を行ったところ、48 週間のプラセボ対照比較試験ではリュープロレリン酢酸塩による血清テストステロンの有意な低下、血清 CK の有意な低下、陰嚢皮膚における 1C2 (抗ポリグルタミン抗体) 陽性細胞数の有意な減少、および嚥下造影における食道入口部開大時間の有意な改善が認められ、その後の継続試験ではリュープロレリン酢酸塩の長期投与 (144 週) により運動機能スコア (ALSFRS-R) の悪化が有意に抑制されることが明らかとなった。有

害事象は前立腺癌患者に対する臨床試験の成績と比べ明らかな差は乏しかった。

#### 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。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  $\beta$  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ポリグルタミン鎖を持つ異常な AR の分解のみを促進した。

#### Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療

#513 ラインの Dorfin/G93A SOD1 ダブル Tg マウスの平均生存期間は 144.9 日、G93A SOD1 マウスでは 134.4 日、一方、#526 ラインのダブル Tg マウスでは 142.2 日、対応する G93A SOD1 マウスでは 131.7 日 ( $P < 0.01$ ) と、約 10 日間の延長を認めた。さらに最大生存期間は、#513 Dorfin/G93ASOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 マウスで各々 175 日、155 日、#526 Dorfin/G93ASOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 マウスで各々 167 日、148 日と、Dorfin の過剰発現により約 20 日間の延長がみられた。

18 週齢におけるローターロッド解析では、#513 ダブル Tg マウス vs G93A SOD1 マウス

で  $160.8 \pm 34.2s$  vs  $67.8 \pm 25.5s$ 、#526 ダブル Tg マウス vs G93A SOD1 マウスで  $135.8 \pm 29.8s$  vs  $86.0 \pm 27.0s$ 、同じく 18 週齢における歩幅は #513 において  $29.9 \pm 5.8mm$  vs  $20.1 \pm 3.0mm$  ( $p < 0.05$ )、#526 で  $50.1 \pm 5.6mm$  vs  $26.0 \pm 4.5mm$  ( $p < 0.01$ ) と Dorfin 過剰発現による有意な運動機能の改善を認めた。

病理学的検討においては、#526 ラインのダブル Tg マウスの片側腰髄前角における残存神経細胞数は、G93A SOD1 Tg マウスに比して有意に保たれていた ( $P < 0.05$ )。さらに、腰髄前根の有髄神経線維のヒストグラムを解析すると、大径有髄線維の数は G93A SOD1 Tg マウスでは年齢とともに減少したが、#526 ダブル Tg マウスでは 18 週齢においても保たれていた。

Dorfin 過剰発現が、変異 SOD1 蛋白量に及ぼす影響を 18 週齢において検討したところ、#526 ダブル Tg マウスでは免疫組織化学における SOD1 陽性領域は 2.66% であり、G93ASOD1 Tg マウスの 3.45% に比し、有意に少なかった。また、ウェスタンブロットングにおける検討でも、脊髄の可溶性分画の変異 SOD1 量は有意に低下していた ( $p < 0.01$ )。

#### Dynactin-1 ノックダウン線虫の解析

孤発性 ALS 脊髄運動ニューロン特異的遺伝子プロファイリングから得られた遺伝子の中でも、有意な発現増加と細胞質から核への局在変化を来したものとして、細胞周期関連因子である cyclin C に着目した。そこで、dynactin-1 KD 線虫が、この cyclin C の発現変化をシミュレートしているかどうかを検討した。その結果、adult stage のコントロール群 (LacZ KD モデル) の運動ニューロンにおいては、cic-1 (ヒト cyclin C の相同体) の mRNA の発現は抑制されていたが、dnc-1 KD モデルでは、cic-1 の mRNA は顕著に増加していた。dnc-1 KD による cic-1 の局在変化を検証するため、TagRFP を融合した cic-1 (TagRFP-cic-1) を共発現したところ、コントロール群では TagRFP-cic-1 は核外に局在したが、dnc-1 KD モデルでは、一部の運動ニューロンにおいて、TagRFP-cic-1 の核移行が認められた。次に、cyclin C の発現増加、核内移行の意義を検証する目的で、核移行シグナル付き GFP を融合した cic-1 (NLS-GFP-cic-1) を単独で高発現させ

ると、dnc-1 KD に類似した coiler UNC の表現型と、進行性の首振り回数の低下、累積生存率の低下が認められた。

### CHIP と Hsj-1 の機能解析

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。このように 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。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。

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。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

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。

### SCF<sup>Fbs1</sup> リガーゼおよび Fbs1 の分子構造と作用機構の解明

糖鎖を識別するユビキチンリガーゼとして "SCFFbs1" を発見し、この酵素が ERAD (小胞体関連蛋白質分解) 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 SCFFbs1 複合体が N 型糖鎖依存的に糖蛋白質をポリユビキチン化するユビキチンリガーゼであることを解明した。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。また、Fbs1-Skp1 の二量体の X 線結晶構造解析に成功、SCFFbs1 全体の高次構造のモデル化も行った。さらに基質である RNase と結合した SCFFbs1 全体の立体構造解析にも成功した。この結果、SCFFbs1 のユビキチンリガーゼとしての作用機構が分子レベルで判明した。

Fbs1 が糖蛋白質の凝集体形成阻害活性を有するのかどうかを試験管内で解析したところ、Fbs1 は変性した  $\alpha$  マンノシダーゼの糖鎖に結合し凝集体形成を阻害することが判明した。この凝集体阻害活性には、糖鎖結合ドメインとともに N 末端に存在する特異な PEST ドメインが必要であった。

### 酵母 Dmp1-Dmp2 複合体の立体構造

20S プロテアソームの分子集合に関与する Dmp1-Dmp2 複合体は出芽酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーからアミノ酸アナログ感受性となる出芽酵母変異株を探索することによって同定した。その後の解析から、この複合体が直接結合する分子がプロテアソームの $\alpha 5$  サブユニットであること、さらに完成した 20S プロテアソーム複合体には Dmp1-Dmp2 複合体が含まれていないことから、この複合体が高次構造形成に関与するシャペロン因子であることを明らかにした。本年度、我々は Dmp1-Dmp2 複合体と Dmp1-Dmp2 と  $\alpha 5$  サブユニット複合体の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を決定した(名古屋市立大学・水島恒裕/加藤晃一らとの共同研究)。興味深いことに Dmp1 と Dmp2 の立体構造は一次構造上有意な相同性を示さないにもかかわらず非常によく似ていた。さらに Dmp1-Dmp2- $\alpha 5$  サブユニット複合体の立体構造解析から Dmp1-Dmp2 は  $\alpha$  リングに  $\beta$  リング側から結合し二量体の境界領域で  $\alpha 5$  サブユニットを認識しており、その結合部位は  $\beta$  サブユニットよりリングの内側に位置することも判明した。また  $\beta$  サブユニット側から  $\alpha$  リングに結合しているため、 $\beta$  リングと Dmp1-Dmp2 が共存できないことが明らかとなった。次に Dmp1-Dmp2 と  $\alpha$  リングの複合体モデル作出により、Dmp1-Dmp2 が  $\alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$  と結合面を持つプロテアソーム中間体モデルを提案した。その結果、Dmp1-Dmp2 は 20S プロテアソームの複合体構築において  $\beta 4$  が  $\alpha$  リングに結合する際にプロテアソーム中間体から解離することが示された<sup>3)</sup>。

### 哺乳類 20S プロテアソームの触媒機能を司る $\beta$ リングの形成経路

$\beta$  リングの形成機構の解析は 20S プロテアソームを構成する各々の  $\beta$  サブユニットを siRNA (small interfering RNA) によりノックダウンすることで  $\beta$  リングの形成を途中段階で阻害し、それにより生じた中間状態を解析する方法で行った。その結果、 $\beta$  サブユニットの  $\alpha$  リングに対する結合は決まった順序で行われており、 $\alpha$  リングに  $\beta 2, 3, 4, 5, 6$  の順番で結合することが明らかになった。さらに  $\beta 1$  は  $\beta 2, 3$  が結合した後であればいつでも結合できること、最後に  $\beta 7$  が結合しハーフ

プロテアソームを完成することが判明した。このプロセスにおいて、PAC1-PAC2、PAC3-PAC4 は  $\alpha$  リング形成時に結合しており、一方、Ump1 は哺乳類では酵母の場合と異なり  $\beta 2$  と同時に  $\alpha$  リングに結合することが判明した(酵母では Ump1 がハーフプロテアソームの二量体化に関与することが知られている)。PAC3-PAC4 は  $\beta 3$  の結合により解離し、Ump1 はハーフプロテアソームから 20S プロテアソームを形成する際に分解される。さらに PAC1-PAC2 は 20S プロテアソームが完成した後で分解されることが明らかになった。

### 全身 PAC1 欠損マウスの解析

PAC1 全身欠損マウスについてであるが、このマウスはヘテロ接合体の場合はほぼ外見上野生型と変わらなかった。ホモ接合体に関しては出生後の遺伝子型解析で確認することができなくなったため胎生致死であることが推察された。胎児期における異常を解析するために切片を作り形態学的な解析を試みた。その結果 E6.5、E7.5 においてメンデルの法則に従って胎児の消失が起きているものが確認できた。またそれらは E6.0 における抗 PAC1 抗体による免疫染色から PAC1 が完全に欠損した個体であることを確認できた。これらのことから PAC1 の全身欠損マウスは着床後早期の発達異常による胎生致死となることが明らかになった。

### 中枢神経系 PAC1 欠損マウスの解析

次に神経幹細胞 Nestin プロモーター制御下で PAC1 を欠損させたマウスの解析を行った。こちらもヘテロ接合体では野生型と表現系は変わらなかった。ヘテロ接合体では生後 1 週頃から発育異常、平衡感覚・歩行異常が顕著になり、生後 3 週で死亡する(咀嚼、嚥下運動機能低下による栄養摂取の障害によるものと考えられる)。3 週齢の大脳、小脳の前ホモジネートライセートをグリセロール密度勾配遠心により分離し 20S プロテアソーム、26S プロテアソームのペプチダーゼ活性を測定すると 20S プロテアソームに関してはほぼ完全に消失し、26S プロテアソームに関しては 2-3 割近くまで減少していた。形態学的にみると特に小脳における特徴的な層構造形成が顕著に阻害されていることが分かった。経時的な解析を行うと、この

PAC1 ホモ欠損マウスの小脳は外見上、出生直後から発達が進んでいないことが分かった。さらに生後に増殖・移動を繰り返し小脳の大部分を占めるようになる顆粒球の異常が原因ではないかと考え、核酸アナログである BrdU の取り込み実験を行い解析すると小脳において顆粒球前駆細胞または顆粒球の増殖する割合がホモ欠損体では極度に低下していることが観察された。またもう一つの知見としては大脳、小脳において同程度のプロテアソームのペプチダーゼ活性が低下しているにもかかわらず、3週齢ホモ欠損体の特に小脳では不特定複数のユビキチン強陽性細胞が確認された。これは2週齢以降の小脳から確認できた。

#### D. 考察

##### SBMAについて

SBMAなどの神経変性疾患の病態の根本は、異常な構造を持つ変異蛋白質が、生態の防御機構を凌駕して細胞内に蓄積することと考えられている。このため、蛋白質の品質管理機構であるユビキチン-プロテアソーム系と分子シャペロンを活性化することで変異蛋白質の毒性を軽減できれば、神経変性の病態を阻止できると予想される。今回の検討では、SBMAのモデルマウスではユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていること、およびその機能を活性化する薬物治療が、マウスの運動機能や病理所見を改善することが示された。ユビキチン-プロテアソーム系はSBMAをはじめとする神経変性疾患の治療標的として極めて重要と考えられる。

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端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ことなどから、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。

一方、我々のこれまでの検討により、テストステロンの分泌障害が変異アンドロゲン

受容体の核内凝集を強力に阻害することが明らかとなっていたが、リユープロレリン酢酸塩の第II相臨床試験においても、病因蛋白質の凝集阻害効果が示された。さらに、リユープロレリン酢酸塩の長期投与により、患者の運動機能が改善する傾向も示された。現在、この結果を第III相大規模臨床試験において検証しているところである。

##### ALSについて

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測された。

Dorfinを含むいくつかのE3ユビキチンリガーゼは、変異SOD1蛋白質を認識し減少させることがin vitroの培養細胞レベルで証明されているが、in vivoにおける検証はなされていない。我々は、今回、Dorfin/G93A SOD1ダブルTgマウスとG93A SOD1 Tgマウスの比較によりDorfin過剰発現による治療効果を検討した。この結果、Dorfinは、変異SOD1の脊髄前角における沈着や運動ニューロンの神経細胞死、軸索変性を抑制し、マウスの運動能力の改善、生存期間の延長をもたらすことが明らかとなった。

孤発性ALS患者運動ニューロンにおいて神経変性早期より認められた遺伝子発現変化であるdynactin-1の発現低下をシミュレートするdynactin-1 KD線虫において、同じく患者で認められたcyclin Cの発現上昇、核内移行という現象が再現された。また、cic-1(cyclin C)の高発現により、dnc-1 KDモデルに類似した表現型を示すことから、孤発性ALS運動ニューロンで認められた、cyclin Cの発現量増加や核移行は単なる二次的な分子変化ではなく、運動ニューロン変性の重要な分子病態の一つであることが示

唆された。

### 運動ニューロン疾患における恒常性監視機構について

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。このように 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。

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。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。

Fbs1 は通常の F-box 蛋白質とは異なり、SCF 型ユビキチンリガーゼとして存在するのは一部であり、大部分のものは Skp1 との二量体として存在する。ひとつの可能性として Fbs1-Skp1 はシャペロンとして凝集体形成を阻害するように働いていることが考え

られるが、さらなる機能の解析が必要である。Fbs1 には、様々な存在様式があり、SCF 複合体や CHIP-Fbs1 複合体として ERAD におけるユビキチンリガーゼとして機能する以外に、神経変性疾患などで見られる凝集体の形成を阻害し、オートファジーなど他の系による異常蛋白質の分解系を助ける働きもあるのではないかと考えられる。

今回の遺伝子改変 (PAC1 欠損) マウスを用いた研究によりプロテアソーム複合体の存在が生理学的に重要であることが改めて示された。全身欠損マウスの解析では胎児期の初期発達に必須であることが示唆された。また神経幹細胞特異的欠損マウスの解析においては小脳の形成障害という興味深い現象を引き起こすことを観察でき、プロテアソームの形成、活性の低下とマウスを個体とした生理学的な異常の 2 つの関係性を明確に示すことができた。しかし、今回の小脳における現象はプロモーターとして用いた Nestin の発現時期特異性、プロテアソームの活性減弱スピード、小脳の特徴的な発達過程等を複合的に考えることが必要であり、以上の要因を考慮するとプロテアソームがほかの脳組織に比して小脳の形成に選択的に関与しているとは断言できない。

### E. 結論

成人に発症する運動ニューロン疾患である SBMA と ALS に共通する分子シャペロン病態として、ユビキチン-プロテアソーム系および軸索輸送が重要であることを見出した。さらに、疾患モデルを用い、ユビキチン-プロテアソーム系の機能を調整することにより神経変性の病態を阻止できる可能性を明らかにした。

また、SBMA に対しては、神経変性疾患に対して世界的にも初となる本格的な根本的治療法 (disease-modifying therapy) のトランスレーショナルリサーチを行った。単にマウスモデルでの結果を検証したのみでなく、治療法の臨床応用においてハードルとなる評価項目や試験デザインなどについて検討を重ね、嚙下造影評価や病理学的検査などのバイオマーカーが SBMA のサロゲートエンドポイントとなりうることを示した。こうした研究成果は、今後他の神経変性疾患に対する治療研究を進める上でも極めて重要であ

ると考えられる。

また、ALS についてはこれまで変異 SOD1 など遺伝性 ALS のモデル動物を用いて病態・治療が研究されてきたが、マウスで有効であった薬剤が患者には無効であるなど、その限界が示唆されている。孤発性 ALS 患者の病態を反映するモデルの構築により、今後 ALS の病態解明と治療法開発が飛躍的に進展すると期待される。

## F. 健康危険情報

無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Sobue G. Pathogenesis-targeting Therapeutics for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA). *Neuropathology* [in press].
- 2) Banno H, Katsuno M\*, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G\*. Neuropathology and therapeutic intervention in spinal and bulbar muscular atrophy. *Int. J. Mol. Sci.* [in press]. \*corresponding authors.
- 3) Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph. Lateral Scler.* [in press].
- 4) Katsuno M\*, Adachi H, Sobue G\*. Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol. *Nat. Med.* 15: 253-254, 2009. \*corresponding authors.
- 5) Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, Sopher BL, Lin A, Fischbeck KH, Ellerby LM, Morrison RS, Taylor JP, La Spada AR. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *J. Neurosci.* 29: 1987-1997, 2009.
- 6) Morozumi S, Kawagashira Y, Iijima M, Koike H, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Intravenous immunoglobulin treatment for painful sensory neuropathy associated with Sjögren's syndrome. *J. Neurol. Sci.* 279: 57-61, 2009.
- 7) Banno H, Katsuno M\*, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G\*. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann. Neurol.* 65: 140-150, 2009. \*corresponding authors.
- 8) Watanabe H, Hirayama M, Noda A, Ito M, Atsuta N, Senda J, Kaga T, Yamada A, Katsuno M, Niwa T, Tanaka F, Sobue G. B-type natriuretic peptide and cardiovalvulopathy in Parkinson disease with dopamine agonist. *Neurology* 72: 621-626, 2009.
- 9) Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10: 104-115, 2009.
- 10) Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85: 12-36, 2009.
- 11) Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in a SBMA model mouse. *Hum. Mol. Genet.* 18: 898-910, 2009.
- 12) Takeuchi Y, Katsuno M\*, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G\*. Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve* 38: 964-971, 2008. \*corresponding authors
- 13) Iijima M, Koike H, Hattori N, Tamakoshi A, Katsuno M, Tanaka F, Yamamoto M, Arimura K, Sobue G. Prevalence and incidence rates of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the Japanese population. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79: 1040-1043, 2008.
- 14) Katsuno M\*, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G\*. Molecular Genetics and Biomarkers of Polyglutamine Diseases. *Current Mol. Med.* 8: 221-234, 2008. \*corresponding authors
- 15) Suenaga M, Kawai Y, Watanabe H, Atsuta N, Ito M, Tanaka F, Katsuno M, Fukatsu H, Naganawa S, Sobue G. Cognitive impairment in spinocerebellar ataxia type 6. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79: 496-499, 2008.
- 16) Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi

- Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* 131: 229-239, 2008.
- 17) Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K, Kameyama T, Hayashi H, Kishimoto T, Kasahara M, Kurimoto E, Sakata E, Suzuki A, Hirano Y, Murata S, Kato K, Yamane T, Tanaka K. Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 228 – 236, 2008.
  - 18) Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashiroda H, Furuyama K, Kato K, Tanaka K, Murata S. Dissecting b-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* 27: 2204-2213, 2008.
  - 19) Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y. Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury. *Am. J. Pathol.* 172, 454-469, 2008.
  - 20) Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66: 617-627, 2007.
  - 21) Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Minamiyama M, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Therapeutic strategies for spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Drug Future* 32: 907-917, 2007.
  - 22) Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. CHIP Overexpression Reduces Mutant Androgen Receptor Protein and Ameliorates Phenotypes of the Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Transgenic Mouse Model. *J. Neurosci.* 27: 5115-5126, 2007.
  - 23) Adachi H, Waza M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33: 135-151, 2007.
  - 24) Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dofin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol. Dis.* 25:331-341, 2007.
  - 25) Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J. Biol. Chem.* 282:28087-28095, 2007.
  - 26) Yoshida Y, Murakami A, Iwai K, Tanaka K. A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. *J. Biol. Chem.* 282, 7137-7144, 2007.
  - 27) Mizushima T, Yoshida Y, Kumanomidou T, Hasegawa Y, Suzuki A, Yamane T, Tanaka K. Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCFFbs1 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 5777-5781, 2007.
  - 28) Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Iwata JI, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 14489-14494, 2007.
  - 29) Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume N, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149-1163, 2007.
  - 30) Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, Green DR. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450: 1253-1257, 2007.
  - 31) Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dofin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol.*

- Dis.* 25:331-341, 2007.
- 32) Yoshida Y, Murakami A, Iwai K, Tanaka K. A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. *J. Biol. Chem.* 282: 7137-7144, 2007.
  - 33) Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, Katsuno M, Waza M, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086:1-10, 2006.
  - 34) Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J. Neurosci.* 26:12106-12117, 2006.
  - 35) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. Alleviating neurodegeneration by an anticancer agent: an Hsp90 inhibitor (17-AAG). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086:21-34, 2006.
  - 36) Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Banno H, Suzuki K, Katsuno M, Tanaka F, Tamakoshi A, Sobue G. Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. *Brain* 129: 1446-1455, 2006.
  - 37) Sugiura M, Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Clinicopathologic features of nonsystemic vasculitic neuropathy and microscopic polyangiitis-associated neuropathy: a comparative study. *J. Neurol. Sci.* 241: 31-37, 2006.
  - 38) Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 281:23842-23851, 2006.
  - 39) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J. Mol. Med.* 84:635-646, 2006.
  - 40) Katsuno M, Adachi H, Waza M, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pathogenesis, animal models and therapeutics in Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Exp. Neurol.* 200:8-18, 2006.
  - 41) Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: A pathogenic marker. *Ann. Neurol.* 59:520-526, 2006.
  - 42) Sato S, Chiba T, Sakata E, Kato K, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K. 14-3-3 $\eta$  is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J.* 25:211-221, 2006.
  - 43) Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K. Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* 281: 3204-3209, 2006.
  - 44) Sato S, Chiba T, Nishiyama S, Kakiuchi T, Tsukada H, Hatano T, Fukuda T, Yasoshima Y, Kai N, Kobayashi K, Mizuno Y, Tanaka K, Hattori N. Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. *J. Neurosci. Res.* 84: 1350-1357, 2006.
2. 学会発表
1. Adachi H, Tokui K, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka F, Sobue G. An oral Hsp90 inhibitor ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. Neuroscience 2009. Washington DC, USA, Nov 15-19, 2008.
  2. Tanaka K. Unexpected encounter with immunity during my proteasome study. Japan-German Immunology Seminar 2008 :Immune Regulation in Health and Disease. Fukuoka, Japan, Nov 3-6, 2008.
  3. Katsuno M, Kawashima M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Suga N, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Skeletal muscle involvement in spinal and bulbar muscular atrophy. The 19th International Symposium on ALS/MND. Birmingham, UK, Nov 3-5, 2008.
  4. 田中啓二. タンパク質分解と病態生理学(Proteolysis and Pathophysiology). 第2回 Diabetes Leading-edge Conference. 静岡. 2008年8月9日.
  5. 田中啓二. Protein Degradation and Neurodegenerative Diseases. Neuroscience 2008 第31回日本神経科学大会. 特別講演. 東京. 2008年7月10日.

6. Tanaka K. The Novel Thymoproteasome Regulates Development of CD8<sup>+</sup> T Cells. 33<sup>rd</sup> FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference (Symposium on the ubiquitin-proteasome system) Peace and Friendship Stadium, Athens, Greece, Jun 30, 2008.
7. 田中章景, 和座雅浩, 丹羽淳一, 祖父江元. 孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発. 第 49 回日本神経学会総会. シンポジウム. 横浜. 2008 年 5 月 16 日.
8. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Sobue G. Myocardial involvement in spinal and bulbar muscular atrophy. 18th International symposium on ALS/MND. Toronto, Canada, Dec 1-3, 2007.
9. Tanaka K. Discovery of Thymus-specific Proteasomes "Thymoproteasome" that regulate the Development of CD8<sup>+</sup> T Cells. International Symposium on Protein Modification and Degradation in Beijing, SPMD 2007. Beijing Friendship Hotel, Beijing, China, Nov 4-7, 2007.
10. Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. CHIP overexpression reduces the mutant AR protein and ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model. Neuroscience 2007. San Diego, USA, Nov 3-7, 2007.
11. Tanaka K, Komatsu M. Pathophysiology of Constitutive Autophagy. The 20th Naito Conference / Innate Immunity in Medicine and Biology [III] 湘南国際村センター. 神奈川. Oct 10 - 12, 2007.
12. Tanaka K, Murata S. Regulation of Thymic Selection by the Thymus-specific Proteasome "Thymoproteasome" EMBO CONFERENCE / Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation. Riva Del Garda, Italy, Sep 22-26, 2007.
13. Tanaka K. Discovery of Thymoproteasomes - Implication for Thymic Selection - 2007 Korea-Japan Joint Symposium in Seoul. Seoul, Korea, Sep 5, 2007.
14. Tanaka K, Murata S. Discovery of thymus-specific proteasomes "thymoproteasomes" that regulate the development of CD8<sup>+</sup>T cells. COE INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2007 Inamori / Yamauchi Hall, Kyoto University, Kyoto, Japan, Jun 1-2, 2007.
15. Tanaka K, Komatsu M. Protein Quality Control by Constitutive Autophag. The Ubiquitin Family (CSHS Symposium) : Quality Control. New York, USA, Apr 25 - 29, 2007.
16. 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. San Diego, USA, Dec 9-13, 2006.
17. Sobue G. Molecular targeted therapeutics for Spinal Bulbar Muscular Atrophy (SBMA). 1<sup>st</sup> International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov 30 - Dec 2, 2006.
18. Sobue G. Symposium Highlight: Clinical. 17<sup>th</sup> International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov 30 - Dec 2, 2006.
19. 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 30-Dec 2, 2006.
20. 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, Nov30 -Dec 2, 2006.
21. 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 30-Dec 2, 2006.
22. 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 30-Dec 2, 2006.
23. 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 30-Dec 2, 2006.

24. Sobue G. Molecular targeted therapy for spinal and bulbar muscular atrophy. 5th International Conference on Unstable Microsatellites and Human Disease. Granada, Spain, Nov 11-16, 2006.
  25. 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, Nov 11-16, 2006.
  26. Keiji Tanaka. Ablation of autophagy causes neurodegeneration. The Movement Disorder Society's (MDS) 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, Japan, Nov 1, 2006.
  27. 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.
  28. 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, Oct 3-5, 2006.
  29. Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Eiki Kominami. Selective autophagy suppresses the formation of ubiquitin-positive aggregates, 4<sup>th</sup> International Symposium of Autophagy. Shizuoka, Japan, Oct 1-4, 2006.
  30. 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, Japan, Feb 9- 10, 2006.
  31. 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, Sep 5, 2006.
  32. 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. Vermont, USA, Jul 22-27, 2006.
  33. Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil, Shun-ichiro Iemura, Tooru Natsume, Keiji Tanaka. Molecular assembly of mammalian 20S proteasomes ; 20th IUBMB ; Kyoto, Japan, Jun 23, 2006.
  34. 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, Jun 2, 2006.
  35. 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. Convention center ,Washington DC, USA, Feb 22-26, 2006.
  36. Keiji Tanaka. Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems]. Osaka, Japan, Jan 12-13, 2006.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
無し
  2. 実用新案登録  
無し
  3. その他  
無し

## II. 分担研究報告

## ALS 新規治療法開発と孤発性 ALS 疾患モデルの開発

研究分担者 田中 章景 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学准教授  
研究協力者 和座 雅浩<sup>1)</sup>、曾根 淳<sup>1)</sup>、丹羽 淳一<sup>2)</sup>、蔣 月梅<sup>1)</sup>、黄 哲<sup>1)</sup>、  
河合 香里<sup>1)</sup>、勝又 竜<sup>1)</sup>、山本 正彦<sup>3)</sup>、道勇 学<sup>4)</sup>  
<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学  
<sup>2</sup>愛知医科大学脳卒中センター  
<sup>3</sup>愛知学院大学心身科学部  
<sup>4</sup>愛知医科大学神経内科

**研究要旨** E3 ユビキチンリガーゼ Dorfin は変異 SOD1 を特異的に認識し、ユビキチンプロテアソーム系で分解し、変異 SOD1 の神経細胞毒性を抑制することが培養細胞レベルにおいて証明されている。そこで Dorfin トランスジェニック(Tg)マウスと変異 SOD1 Tg マウスの交配によるダブル Tg マウスを作成し、in vivo における治療効果を検証した。その結果、ダブル Tg マウスでは変異 SOD1 の脊髄前角における沈着や運動ニューロンの神経細胞死、軸索変性を抑制し、運動能力の改善、生存期間の延長をもたらすことが明らかとなり、Dorfin による ALS 治療の可能性を示した。一方、我々は、レーザーマイクロダイセクション法による孤発性 ALS 患者脊髄からのサンプリングによって、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、多くの ALS 病態関連分子を同定してきた。なかでも、運動ニューロンにおける dynactin1 の遺伝子発現レベルの低下は神経変性過程の上流で生じていることが明らかになった。この結果に基づき、dynactin-1 の遺伝子発現低下を線虫運動ニューロンに展開し疾患モデルの開発を行った。この結果、dynactin-1 ノックダウン(KD)線虫では、患者で見られる cyclin C の発現増加と核内移行が再現されており、さらに cyclin C の核内過剰発現線虫モデルでは、dynactin-1 KD 同様に運動ニューロン障害を示す表現型が得られた。これにより、dynactin-1 遺伝子発現レベルの低下による神経変性機序の一つとして、細胞周期の deregulation が深く関与していることが示唆された。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)研究では、約 10% を占める遺伝性 ALS の一部で原因遺伝子が同定され、特に SOD1 遺伝子の変異型を組み込んだトランスジェニック(Tg)動物の作成と解析により多くの知見が積み重ねられてきた。我々が、ALS 患者脊髄よりクローニングした新規 E3 ユビキチンリガーゼ Dorfin は、種々の変異 SOD1 を基質とし、これらをユビキチン化しプロテアソームにより分解することで、培養細胞

レベルにおいて神経細胞死を抑制する。そこで、この知見をマウスレベルに展開し、変異 SOD1 Tg マウスにおける Dorfin の治療効果を検証した。

一方、孤発性 ALS については、現在もその病因、病態には不明な点が多く、病態を反映した優れた動物モデルの作成が切望されている。これまでに、我々は孤発性 ALS 患者脊髄から運動ニューロンを単離することにより、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、

これらの発現動態を神経変性マーカーとの関係で検討してきた。この結果、神経変性過程の上流で発現変化を来している遺伝子として dynactin-1 を同定することに成功した。そして、dynactin-1 の患者脊髄運動ニューロンにおける遺伝子の発現変化（発現低下）を線虫に展開することにより、運動ニューロン障害を示唆する運動機能障害の表現型である coiler UNC と運動ニューロン変性が生じることを明らかにした。今年度は、この線虫モデルを用い、dynactin-1 発現低下による神経変性メカニズムについて、特に細胞周期関連分子である cyclin C との関係において検討を行った。

## B. 研究方法

### 【Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療】

全長ヒト Dorfin を PCR にて増幅し、chicken- $\beta$ -actin プロモーターの下流に挿入したベクターをマイクロインジェクションして Tg マウスを作成した。#513 と #526 の 2 ラインの Dorfin Tg マウスをヒト変異 SOD1 (G93A) マウスと交配したダブル Tg マウスを作成し、歩行機能（フットプリント）、ローターロッドにおける運動機能、生存期間についての検討を行った。さらに、病理所見では脊髄前角運動ニューロン数、脊髄前根大径有髄線維密度を測定するとともに、抗 SOD1 抗体、抗コヒキチン抗体を用いた免疫組織化学的検討、ウェスタンブロットングを行った。

### 【孤発性 ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける遺伝子発現解析】

我々が遺伝子発現プロファイルの結果見だし、運動ニューロン特異的な発現変化を確認した ALS 病態関連分子の発現動態を様々な病期の孤発性 ALS 20 例および正常コントロール 7 例の腰髄を用いて検討した。解析対象とした分子は、転写因子の early growth response 3 (EGR3)、軸索輸送関連の dynactin1、細胞死抑制作用があるとされる acetyl-CoA transporter (ACATN)、細胞死促進にはたらく

death receptor 5 (DR5)、および、細胞周期関連遺伝子であり、細胞死促進に働くことされる cyclin C (CCNC)、および現時点で機能不明な KIAA0231 の 6 遺伝子である。また、神経変性のマーカーとして、残存運動ニューロン数、リン酸化ニューロフィラメント II を用い、神経変性に従って上記 ALS 病態関連遺伝子の発現がどのように変化していくかを in situ hybridization または免疫染色にて検討した。この結果、特に神経変性過程初期から発現低下を来していることが明らかとなった dynactin1 について、その遺伝子変化を下記の 2 つのモデルに展開した。

### 【培養細胞における dynactin-1 ノックダウンの効果】

neuroblastoma cell 由来の SH-SY5Y 細胞において siRNA による dynactin1 ノックダウンを行い、神経細胞の形態変化、MTT アッセイおよび PI staining を行った。アポトーシス関連では DNA ladder assay、caspase3 ウェスタンブロット、Tunel 法による検討を加えた。

### 【dynactin-1 ノックダウン線虫の解析】

コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト dynactin-1 の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし変異体を作成した。コントロール群として、線虫とは無関係な LacZ 遺伝子を標的とした shRNA を発現させた。また、運動ニューロンの同定及び shRNA の導入の確認を容易にするために GFP を共発現させた。また、この dynactin-1 KD 線虫における cyclin C の発現量変化を調べるために、内因性の *cic-1* の mRNA レベルを whole mount in situ hybridization 法にて評価した。また、cyclin C の局在変化の検証のために、TagRFP を融合した *cic-1* (TagRFP-*cic-1*) を共発現した。さらに、cyclin C の核内移行が線虫の表現型に及ぼす影響を確認する目的で、