

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。

C. 研究結果

【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ード解析では、#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ティ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 ($p < 0.01$)。

【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】

A. 残存運動ニューロン数との関連

遺伝子発現変化をきたした運動ニューロンの割合を ALS20 例において検討したところ、残存運動ニューロンの 80% 以上で発現が変化している ALS 例数が *dynactin1* では 20 例全例、*EGR3*、*ACATN* では 14 例であったのに対して、*KIAA0231*、*DR5*、*CCNC* では各々 9 例、5 例、0 例であった。また、残存ニューロンが減少するとともに遺伝子発現変化を生じる運動ニューロンの割合は増加するが、特に *dynactin1* では運動ニューロン数が保たれている段階からすでにほとんどのニューロンで遺伝子発現が低下していた。

B. ニューロフィラメント H(NFH) 蓄積との関連

ALS では神経変性に従い NFH の蓄積が生じることが知られている。遺伝子発現の定量化による検討を加えると、*ACATN*、*KIAA0231*、*DR5*、*CCNC* では NFH が蓄積するに従い次第に発現レベルが上昇するという相関を認めた。一方、*dynactin1* や *EGR3* では、コントロールと変わらないような NFH の density の細胞においてもすでに発現レベルが低下していた。

これらの結果より、特に *dynactin1* は神経変性の初期より発現変化を来していると考えられた。

【培養細胞における *dynactin-1* ノックダウンの効果】

SH-SY5Y cells における siRNA 法による *dynactin1* ノックダウンの結果、72-96 時間後の発現を、タンパク質レベルにおいてコントロール群の 30-40% にまで抑制するシステムを構築した。MTT assay, PI staining の結果、*dynactin1* ノックダウンにより神経細胞の突起の退縮化と、時間依存性に細胞死が生じることを確認した。

【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のものとして、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。

D. 考察

【Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療】

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。

Dorfin は特異的に変異 SOD1 を認識し、ユビ

キチンプロテアソーム系によりこれを分解するが、この特異性は変異 SOD1 に起因する ALS の治療にとって長所となる。しかし、平均生存期間の延長が約 10 日間ということであるように必ずしも劇的な効果とは言い難い。Dorfin は *in vivo* においては、その発現レベルは厳密に調節されているが、 β アクチンプロモーターの下に外部から強制的に過剰発現させた Dorfin は、短い半減期により直ちに分解されてしまうと考えられる。この点において、Dorfin-CHIP キメラ蛋白のような Dorfin の E3 活性を持ち、より長い半減期を持つ蛋白の応用が治療法開発の上で重要であると考えられた。

【dynactin-1 と ALS の病態】

我々の目標は、孤発性 ALS の病態をシミュレートする優れた動物モデルを作成し、病態解明、治療法開発に繋げることである。本研究の最も重要な意義は、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を再現したことである。

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。

現在我々は、dynactin-1 KD により誘発される細胞周期異常のメカニズムの解明、およびその是正による治療法開発を進めるとともに、Cre-LoxP システムによる dynactin-1 コンディショナルノックアウトマウスの作成により、疾患モデルの線虫からマウスへの展開を図っている。

E. 結論

ALS 研究において重要な役割を果たしてきて

いる変異 SOD1 マウスモデルにおいて、E3 ユビキチンリガーゼ Dofin の有意な治療効果を示すことができた。一方、新たな孤発性 ALS モデルの開発に取り組み、孤発性 ALS 患者脊髄運動ニューロンの遺伝子プロファイリングにより同定した dynactin-1 のノックダウン線虫が、同じく患者で見られる cyclin C の遺伝子発現をシミュレートし、孤発性 ALS の重要な病態を反映する疾患モデルとして機能することを明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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
- 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
- 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
- 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 an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet*. 18: 898-910, 2009
- Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 276: 163-169, 2009
- 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
- Yamamoto M, Tanaka F, Tatsumi H, Sobue G. A strategy for developing effective amyotrophic lateral sclerosis pharmacotherapy: from clinical trials to novel pharmacotherapeutic strategies. *Expert Opin Pharmacother*. 9: 1845-1857, 2008
- Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Adachi H, Sobue G. Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases. *Curr Mol Med*. 8: 221-234, 2008
- 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
- 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.

11. 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.
12. 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.

2. 学会発表

1. Tanaka F, Jiang YM, Yamamoto M, Huang Z, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
2. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Modulation of Hsp90 function: A molecular targeted therapy for neurodegenerative disorders. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
3. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Jiang YM, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Reversible disruption of retrograde axonal transport in spinal and bulbar muscular atrophy. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.
4. 田中章景、黄哲、蔣月梅、松尾幸治、和座雅浩、山本正彦、道勇学、祖父江元。

孤発性 ALS 疾患モデルの開発：dynactin1 ノックダウン細胞の解析。第 48 回日本神経学会総会 名古屋 2007 年 5 月

5. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

球脊髄性筋萎縮症の病態解明と分子標的治療法の開発

研究分担者 勝野 雅央 名古屋大学高等研究院 特任講師

研究要旨 球脊髄性筋萎縮症(SBMA)モデルマウスにおける神経変性の病態を解析するとともに、分子シャペロンやユビキチン-プロテアソーム系の機能を介した治療法についてマウスモデルを用いて解析した。Hsp70/Hsp90 結合蛋白質である CHIP (C terminus of Hsc70 (heat shock cognate protein 70)-interacting protein) の高発現マウスと SBMA トランスジェニックマウスを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成したところ、脊髄および骨格筋において変異 AR の凝集体およびモノマーの分解が亢進した。マウスの神経症状および寿命は CHIP の高発現により著しく改善し、その効果は CHIP をヘテロで高発現した場合よりもホモで発現させたマウスにおいてより強く認められた。SBMA モデルマウスに Hsp90 阻害剤である 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) を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 患者に対するリュープロレリン酢酸塩の有効性と安全性を第 II 相臨床試験において検討したところ、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 CK の有意な低下、陰囊皮膚における IC2 (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。

A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は成人男性に発症する下位運動ニューロン疾患で、緩徐進行性の四肢筋力低下・筋萎縮と球麻痺を主症状とする。その原因はアンドロゲン受容体 (AR) 第 1 エクソン内の CAG リピートの異常延長であり、ハンチントン病や脊髄小脳失調症などのポリグルタミン病と共通した分子病態を有すると考えられている。ポリグルタミン病の病態の中心は、病因蛋白質が神経細胞内に異常凝集することであり、その制御が治療の鍵を握っていると考えられている。異常な蛋白質を細胞から除去するメカニズムとして、分子シャペロンとユビキチン-プロテアソーム系が知られているが、

これらの蛋白質の品質管理機構を強化することで、ポリグルタミン病をはじめとする神経変性疾患の病態を抑止できる可能性があると考えられる。そこで我々は、分子シャペロンとユビキチン-プロテアソーム系の機能調節による SBMA の治療法開発について、強制発現マウスなどを用い、検討した。とくに Hsp70/Hsp90 結合蛋白質である CHIP (C terminus of Hsc70 (heat shock cognate protein 70)-interacting protein) と、プロテアソームを介した異常蛋白質の分解促進作用を有する Hsp90 阻害剤に注目し、マウスにおける効果を解析した。

また、これまで我々は、テストステロン依存性に変異アンドロゲン受容体が核内集積する

ことが、本疾患における神経変性の病態の根幹であることを明らかにしてきた。強力なテストステロン分泌抑制作用を有する黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アナログであるリュープロレリン酢酸塩を SBMA のモデルマウスに投与すると神経症状と病理所見が著しく改善することから、本剤は SBMA の治療薬として有望と考えられることから、本研究では患者を対象としたリュープロレリン酢酸塩のプラセボ対照比較試験 (第 II 相臨床試験) を行い、本剤の有効性と安全性を検討した。

B. 研究方法

CHIP 高発現による SBMA の治療

サイトメガロウイルスエンハンサーおよびチキン β アクチンプロモーター下でCHIPおよびmycタグを発現するトランスジェニックマウスを作成し、SBMAトランスジェニックマウスとの交配を行った。運動機能解析 (ロータロッド、ケージアクティビティー、歩幅など)、病理学的解析および生化学的解析を行った。

SBMA マウスに対する 17-DMAG の効果

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、17-DMAG を隔日で 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。運動機能はロータロッドなどによる行動解析により評価し、病理学的解析は抗ポリグルタミン抗体 (1C2) を用いた免疫組織化学などにより行った。

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が可能な 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。

(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

CHIP 高発現による SBMA の治療

CHIP を高発現した AR-97Q マウス脊髄を用いて免疫沈降を行ったところ、CHIP と変異 AR および Hsp70 が共存していることが示された。CHIP を高発現した AR-97Q マウスの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ト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。AR-24Q ではセルロースアセテート膜にプロットされる AR 凝集体は認められず、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 CHIP により影響を受けなかった。AR-97Q および AR-24Q のいずれにおいても、CHIP の発現により AR の mRNA レベルには変化が認められなかったことから、CHIP による AR の減少は蛋白質分解の亢進によるものと考えられた。また、CHIP 高発現による分子シャペロンの発現量の変化についても脊髄および骨格筋において解析したが、Hsp70、Hsp90、Hsp40 の発現量に変化は認められなかった。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シスの減弱が示唆された。

SBMA マウスに対する 17-DMAG の効果

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^{66V}) 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 は 17-AAG と同様に AR と p23 の結合を阻害し、変異 A のプロテアソームにおける分解を選択的に促進した。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

ック蛋白質の発現誘導が認められた。病理学的には 17-DMAG により変異 AR の核内集積が抑制され、脊髄における反応性グリオ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。

SBMA に対するリユ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 患者に対するリユ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ユ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ユ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。

D. 考察

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は、ポリグルタミン病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の治療法開発において重要な生体防御

機構であり、その機能を調整することができれば、神経変性の根本的治療法開発に向けて大きく前進できるものと考えられる。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遺伝子の過剰発現や薬物治療が、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。以上より、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。

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阻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、リュ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、リュ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。

E. 結論

今回の検討により、分子シャペロンやユビキチン-プロテアソーム系の機能を調整することで、SBMA モデルマウスにおける神経変性が抑制されることが示された。また、テストステロンの分泌を阻害することにより、SBMA 患者においても変異アンドロゲン受容体の核内凝集が阻害され、神経障害の進行が抑制される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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].
- 5) 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.
- 6) Suzuki K, **Katsuno M**, Banno H, Sobue G. Pathogenesis-targeting Therapeutics for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA). *Neuropathology* [in press].
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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
 - 10) 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.
 - 11) **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
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Koike H, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, **Katsuno M**, Tanaka F, Watanabe H, Doyu M, Yoshikawa H, Sobue G. Nonmyelinating Schwann cell involvement with well-preserved unmyelinated axons in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66: 1027-1036, 2007.
 - 15) **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.
 - 16) Oki Y, Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, **Katsuno M**, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Shiraishi M, Yazaki S, Nokura K, Yamamoto H, Sobue G. Ataxic vs painful form of paraneoplastic neuropathy. *Neurology* 69: 564-572, 2007.
 - 17) 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(38): 28087-28095, 2007.
 - 18) Kawagashira Y, Watanabe H, Oki Y, Iijima M, Koike H, Hattori N, **Katsuno M**, Tanaka F, Sobue G. Intravenous immunoglobulin therapy markedly ameliorates muscle weakness and severe pain in proximal diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 78(8): 899-901, 2007.
 - 19) 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.
 - 20) 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.

- 21) 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.

2. 学会発表

1. 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.
2. 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, Nov 3-7, 2007.
3. 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.
4. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

研究分担者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・所長代行

研究要旨

運動ニューロンの恒常性監視機構を蛋白質代謝の動態に着目して研究すると共に、その破綻の結果として発症する神経変性疾患の原因を解明し、その治療法の開発を目指した。我々はこれまでとくにニューロン死に密接に関係することが示唆されている蛋白質の品質管理に関わるユビキチンリガーゼ(E3)である SCF^{Fbs1} (N-結合型糖蛋白質の糖鎖を識別してユビキチン化するユニークな E3) の研究を進めてきた。SCF^{Fbs1} は小胞体関連分解 (ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation) に関与する E3 として発見したが、その基質識別サブユニット Fbs1 はニューロンに特異的に発現している。本研究では、この SCF^{Fbs1} の構造と機能について構造生物学的研究を行った。その結果 SCF^{Fbs1} 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。また SCF^{Fbs1} 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。

分子シャペロン依存的 E3 である CHIP の機能解析においては、その KO マウスが神経変性疾患様の症状を示した。さらにこれまで CHIP のパートナーシャペロンとしては、Hsp90 と Hsp70 が知られているが、その Hsp70 に対する Co シャペロンとしてニューロンに特異的に発現している Hsj-1 を発見した。

また我々は、プロテアソームの分子集合に係わる因子として Proteasome Assembling Chaperone (PAC) 1-4 を発見した。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ところ、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るという reeler、yotari マウスに酷似した様態を示すことが明らかとなった。現在、プロテアソームのレベル低下が様々なニューロンに及ぼす影響についての詳細に解析中である。

A. 研究目的

生物は遺伝子変異や環境汚染などによりしばしば蛋白質レベルでストレスを感受し恒常性の破綻をきたす。とくに運動ニューロンのような非分裂細胞がストレスを過剰に感受すると、ニューロンは死滅し、この状態が長く持続すると、ほとんどのニューロンが脱落し神経変性に陥る。

近年、運動ニューロン疾患を含む様々な神経変性疾患の発症機構として、神経細胞内の蛋白質の品質管理機構(分子論的に言うと蛋白質の立体構造が正常であるか、異常であるかを識別して、損傷蛋白質を選択的に分解して除去する機構)の破綻が有力な説として登場し、国内外で注目されている。ニューロ

ンが細胞内のストレスを感知するときのセンサーとして作用する機構は、多面的である。その代表例として昨今注目を浴びているオルガネラが小胞体 (ER: endoplasmic reticulum) である。

蛋白質の選択的分解の中心的役割を果たすプロテアソームは、ユビキチン鎖を認識することで蛋白質分解を行っている。この分解の高い基質特異性を担うのがユビキチンリガーゼであり、ヒトでは数百種類のもが存在する。その中で最も良く研究されているファミリーの一つが SCF 型ユビキチンリガーゼ (骨格分子 Cullin1、標的識別サブユニットで唯一の変異因子 F-box 蛋白質、F-box 蛋白質と Cullin1 のアダプター分子 Skp1、

ユビキチン結合酵素と結合する Rbx1 から構成されるヘテロ 4 量体) である。ヒトでは約 70 種類の F-box 蛋白質が存在するが、その中のひとつ Fbs1 は糖蛋白質の N 結合型糖鎖を認識するものである。SCF^{Fbs1} (ホモログとして SCF^{Fbs2} が存在する) は蛋白質の品質管理機構の一環である小胞体関連分解 (ERAD: ER-associated degradation) に関わるユビキチンリガーゼと考えられている。すなわち、膜蛋白質や分泌蛋白質などの細胞外蛋白質は小胞体において立体構造が形成されるが、正しい立体構造をとれなかったものや余剰サブユニットは細胞質へ逆行輸送されそこでプロテアソームにより分解を受ける。細胞外蛋白質は翻訳と共役して小胞体で N 結合型糖鎖の一種である高マンノース型糖鎖が付加されるが、SCF^{Fbs1} は細胞質において高マンノース型糖鎖を認識することで異常蛋白質を見分けユビキチン化し分解に導くものと考えられる。

一方、Fbs1 は成体の脳に特異的に強く発現が認められる蛋白質である。本年度は、その意義を検討した。その結果、Fbs1 が発現している脳において Fbs1 の存在様式を調べたところ、大部分の Fbs1 は Fbs1 単独もしくは Skp1 との 2 量体として存在していることを見出した。従って、Fbs1 はこれまで考えられてきた小胞体関連分解におけるユビキチンリガーゼとしての機能よりもむしろ、神経変性疾患などで見られる凝集体の形成を阻害する分子シャペロン機能がある可能性が示唆された。

また本研究では、プロテアソームの形成に必要な因子である Proteasome Assembling Chaperone (PAC) の発現量を調節することにより、細胞内のプロテアソームの量を制限することが可能なマウスを作出することを目指した。作出した PAC1 遺伝子を条件的に不能にするマウスを用いて、中枢神経系細胞の機能におけるプロテアソームの役割の解明を行った。

B. 研究方法

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^{Fbs1} 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)、野生型アレル・変異型アレル・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レ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^{Fbs1} 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。

全身 PAC1 欠損マウスの作製

最初に Flip-FRT & cre-lox システムを利用した条件付き PAC1 欠損マウスを作出した。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 欠損マウスを作出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、形態学的な手法とプロテアソームの解析を中心とした生化学的な手法を駆使して行った。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主として培養細胞およびマウスを用いた基礎的研究およびリコンビナントタンパク質を用いた生化学的・構造生物学的研究である。従って、これらの実験の実施には、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

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 のインビボにおける機能を解析するために、Hsj-1 欠損させたマウスを作製した。Hsj-1 ノックアウトマウスは見かけ上正常に誕生し、生後 1 年を過ぎても、表現型として顕著な異常は観察されなかった。

SCF^{Fbs1} 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 α 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 α リングに β 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 β 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 β サブユニット側から α リングに結合しているため、 β 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 α リングの複合体モデル作出により、Dmp1-Dmp2 が $\alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$ とともに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 α 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³⁾。

哺乳類 20S プロテアソームの触媒機能を司る β リングの形成経路

β 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 β 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 β 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、 β サブユニットの α リングに対する結合は決まった順序で行われており、 α 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 α 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 α 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⁴⁾。

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出し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 (論文作成中)。

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 週齢の脳、小脳の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画し 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 (論文作成中)。

D. 考察

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。最近、Fbs1 のノックアウトマウスが作製され難聴となることが報告された。Fbs1 はモルモットの蝸牛の皮質に多く存在する蛋白質 OCP1 のホモログであり、マウスでも Fbs1 は蝸牛の皮質に高発現しており、Fbs1 が無くなることで皮質の変性が見られる。興味深いことに皮質の Fbs1 の発現がなくなることで、Skp1 も著しく減少する。しかし、一方で脳における異常は報告されず Skp1 の減少もみられない。Fbs1 が神経細胞において標的とする蛋白質が、広範な糖蛋白質であるのかそれとも特定なものがあるのか、また、Fbs1 の本来の機能の解析をさらに進めていきたい。

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

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。

また、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。

本研究において、細胞の種類、時期によってプロテアソームもしくはユビキチン-プロテアソームシステムへの依存性が変化することが示唆されたことで、個体におけるプロテアソームの役割を今後解釈していく際に重要な知見が得られたのではないかと考えている。

E. 結論

ERAD に関与する糖鎖識別ユビキチンリガーゼとして発見したニューロン特異的な SCF^{Fbs1} の機能解析を分子レベルで行った。そして Fbs1 とキトビオース (蛋白質の Asp 残基に結合する GlcNAc-GlcNAc 糖) の結合や RNaseB が結合した SCF^{Fbs1} の X 線結晶解析による立体構造解析に成功し、原子レベルで標的 (糖蛋白質) の識別機構を解明した。さらにニューロン特異的な Fbs1 が SCF^{Fbs1} リガーゼとしての役割以外に糖蛋白質のための分子シャペロンとしてサイトゾルで機能していることを初めて見出した。以上より、運動ニューロンの変性機構を解明するための有益な情報を得ることができると期待できる。

PAC1 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り、シャペロン

依存性のプロテアソームの形成がマウスの個体発生に重要であることが初めて明らかになった。次に神経幹細胞で発現している Nestin のプロモーター制御下で PAC1 を欠損させたマウスを作出し、ニューロンの挙動を解析した。中枢神経系特異的 PAC1 欠損マウスは、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 週で死亡した。形態学的にみると大脳皮質や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。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381-1385.
- (2) Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Natsume, T., Kasahara, M., Tanaka, K., and Murata, S. (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* 24, 977-984.
- (3) Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K. (2007) A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. *J Biol Chem*. 282, 7137-7144.
- (4) Mizushima, T., Yoshida, Y., Kumanomidou, T., Hasegawa, Y., Suzuki, A., Yamane, T., and Tanaka, K. (2007) Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCF^{Fbs1} ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 5777-5781.
- (5) Komatsu M., Wang QJ., Holstein GR., Friedrich VL., Iwata JI., Kominami E., Chait BT., Tanaka K., Yue Z. (2007) 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
- (6) 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., and Tanaka, K. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.

- (7) Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W.G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J. L., Withoff, S., Green, D. R. (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450, 1253-1257
- (8) Koike, M., Shibata, M., Tadokoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., and Uchiyama, Y. (2008) Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury. *Am. J. Pathol.* 172, 454-469.
- (9) 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., and Tanaka, K. (2008) Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15, 228 - 236.
- (10) Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., Kato, K., Tanaka, K., and Murata, S. (2008) Dissecting b-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* 27, 2204-2213.
- (11) Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Rev Mol Cell Biol* 10, 104-115.
- (12) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys Biol Sci.* 85, 12-36.

2. 学会発表

Keiji Tanaka : Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems] . January 12-13, 2006, Osaka, Japan.
Keiji Tanaka : Ablation of autophagy causes neurodegeneration . The Movement Disorder

- Society's (MDS) 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (November 1, 2006), Kyoto.
- Keiji Tanaka, Yuko Hirano, and Shigeo Murata: Multiple Chaperones Assist the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes. The Fourth NIBB-EMBL Symposium "Biology of Protein Conjugation: Structure and Function". Okazaki Conference Center, Aichi, Japan (October 3-5, 2006), Okazaki.
- Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Eiki Kominami: Selective autophagy suppresses the formation of ubiquitin-positive aggregates, 4th International Symposium of Autophagy, October 1-4, 2006 Shizuoka, Japan.
- Noriyuki Matsuda, Toshiaki Kitami, Toshiaki Suzuki, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori and Keiji Tanaka: Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. World Parkinson Congress February 22-26, 2006 Washington DC (Convention center), USA.
- Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil, Shun-ichiro Iemura, Tooru Natsume, Keiji Tanaka; Molecular assembly of mammalian 20S proteasomes; 20th IUBMB; June 23 2006 Kyoto.
- Yuko Hirano, Klavs B Hendil, Keiji Tanaka, Shigeo Murata: Molecular Mechanism of assembly of mammalian 20S proteasomes. American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting, December 9-13, 2006, San Diego, USA.
- Yasushi Saeki, Akio Toh-e, Keiji Tanaka: The 26S proteasome can recognize and degrade lysine 63-linked polyubiquitinated Sic1^{IPY}. FASEB Summer Research Conference on Ubiquitin and Cellular Regulation- July 22-27, 2006 Vermont, USA.
- Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu: Protein Quality Control by Constitutive Autophagy. The Ubiquitin Family (CSHS Symposium): Quality Control. April 25 - 29, 2007, New York, USA.
- Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu: Pathophysiology of Constitutive Autophagy. The 20th Naito Conference / Innate Immunity in Medicine and Biology [III] (October 10 - 12, 2007) 湘南国際村センター、神奈川県
- Keiji Tanaka and Shigeo Murata: Discovery of thymus-specific proteasomes "thymoproteasomes" that regulate the development of CD8⁺T cells. COE INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2007 Inamori / Yamauchi Hall, Kyoto University. Friday, June 1st - 2nd 2007, Kyoto, Japan
- Keiji Tanaka, and Shigeo Murata: Regulation of Thymic Selection by the Thymus-specific Proteasome "Thymoproteasome" EMBO CONFERENCE / Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation September 22nd to 26th, 2007, Riva Del Garda, Italy
- Keiji Tanaka: Discovery of Thymoproteasomes - Implication for Thymic Selection - 2007 Korea-Japan Joint Symposium in Seoul (September 5th) Seoul, Korea
- Keiji Tanaka: Discovery of Thymus-specific Proteasomes "Thymoproteasome" that regulate the Development of CD8⁺ T Cells. International Symposium on Protein Modification and Degradation in Beijing, SPMDB 2007 (Beijing Friendship Hotel, Nov. 4-7, 2007) Beijing, China
- 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。 July 10, 2008 (東京フォーラム) 東京。
- 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: 静岡県沼津市淡島ホテル (平成20年8月9日) 静岡
- Keiji Tanaka: The Novel Thymoproteasome Regulates Development of CD8⁺ T Cells. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference (Symposium on the ubiquitin-proteasome system) Peace and Friendship Stadium, June 30, 2008, Athens, Greece.
- Keiji Tanaka: Unexpected encounter with immunity during my proteasome study. Japan-German Immunology Seminar 2008: Immune Regulation in Health and Disease. (November 3-6, 2008) Fukuoka, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授
 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
 勝野 雅央 名古屋大学高等研究院 特任講師

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Sobue G.	Pathogenesis-targeting Therapeutics for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA).	Neuropathology	in press		
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		
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		
Katsuno M, Adachi H, Sobue G.	Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol.	Nat. Med.	15	253-254	2009
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
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

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
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
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
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
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
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