

201110016A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬と
その有効成分の同定

(H22-創薬総合-一般-009)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 垣 塚 彰

平成24(2012)年5月

I. 総括研究報告

目 次

I. 総括研究報告-----	1
アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその 有効成分の同定 垣塚 彰	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	1 3
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	1 7

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）
総括研究報告書

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその有効成分の同定
研究代表者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科教授

研究要旨

本研究では、昨年度同定した γ セクレターゼの阻害活性を有する漢方薬エキス 啤酒花と雷公籐の内、雷公籐に含まれる γ セクレターゼの阻害成分を精製し、その分子量と構造を決定した。また、昨年度作製した家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を発現させるトランスジェニックマウスの解析を行った。本マウスは、生後 9 ヶ月頃で、Morris 水迷路試験で記憶・学習能力の有意な低下が観察された。生後 16 ヶ月で脳の病理像を解析したところ、大脳皮質、視床下部、脳内の血管壁に顕著なアミロイドの沈着を認めた。以上の結果から、本マウスは新たなアルツハイマー病モデル動物として薬物の治療効果の判定等に活用できると考えられた。

A. 研究目的

超高齢化社会に突入しつつある我が国では、アルツハイマー病に代表される認知症を患う患者の急激な増加が予想される。しかしながら、現在、有効な治療法が無いため、患者のみならず患者の家族を救う手段が無い。今十分な対応策を講じなければ、来るべき医療費と人的負担の膨大な増加は、我が国の存亡をも左右しかねない事態になる。一方、この状況は多くの先進国にも当てはまり、アルツハイマー病に対する有効な治療法の開発は、先進国に共通する重要課題である。特に世界でもっとも顕著な高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、この分野の研究の推進ほど、緊急かつ重要な科学政策は無いとさえいえる。

アルツハイマー病の病因の最も上

流に位置すると考えられているのが老人斑の主要構成成分である $A\beta$ の産生である。 $A\beta$ は、その前駆体蛋白質である APP (amyloid precursor protein) の膜貫通近傍部分から β セクレターゼと γ セクレターゼの2つの蛋白質プロセシング酵素の働きで切り出される。遺伝性アルツハイマー病では、ほとんどの症例で $A\beta$ (特に $A\beta_{42}$) の産生亢進が観察され、アルツハイマー病の発症には、 γ セクレターゼによる $A\beta$ の APP からの切り出しが律速段階であると想定されている。

従来、 γ セクレターゼ活性は、 $A\beta$ の C-末を認識する抗体を用いた ELISA 法によって産生された $A\beta$ 量を定量し、その量から推測する方法しかなかった。しかし、ELISA 法は非常にコストが高いため、 γ セクレターゼ

阻害物質のスクリーニングを行うには莫大な費用が必要であった。我々は、このコスト高という問題を解決するために、安価に γ セクレターゼ活性を評価するアッセイ系を構築した。このアッセイ系では、APPのC-末部位に非哺乳類の転写因子を融合した蛋白質を培養細胞に発現させた。 γ セクレターゼによってこの融合蛋白質が切断を受けるとC-末部位の転写因子が核内移行する。そこで、この転写因子に応答して、ルシフェラーゼを発現するレポーターを用いることで、この転写因子の転写活性をモニターし、 γ セクレターゼ活性の強さを評価するというアッセイ系である。このアッセイ系によって、 γ セクレターゼ活性の評価を高価なELISA法を用いることなく、安価なルシフェラーゼ活性の測定で行えるようになった。

アルツハイマー病に対する薬物治療・予防においては、かなりの長期間に渡って薬物投与を行う必要が想定される。したがって、いかに副作用の少ない治療薬を提供できるかが極めて重要となる。このような少ない副作用という点で、我々は漢方薬に代表される植物エキスに注目した。漢方薬は数百年から千年を超えてヒトに使われており、大幅に摂取量を間違わない限り安全であることが実証されている。

我々は、昨年度、漢方薬の原料になっている植物エキス約1,600種類に対し、上記のアッセイ系を用い、細胞が持つ γ セクレターゼ活性に対する阻害活性の評価を行った。その結果、啤

酒花（ヒシユカ）と雷公籐（ライコウトウ）に明らかな γ セクレターゼの阻害活性を認めた。本研究は、昨年度に同定したA β の産生を阻害する活性をもつ漢方薬エキスのうち、雷公籐に含まれる有効成分を精製し、構造決定を行うこと、さらに、昨年度に作製したアルツハイマー病原因遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスの解析を行い、本マウスが新たなアルツハイマー病のモデルとしての性質を満たしているかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. γ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方薬成分の精製と構造決定

昨年度の啤酒花からの γ セクレターゼの阻害活性の主成分の精製に準じて、本年度は雷公籐から γ セクレターゼの阻害活性の主成分の精製を行った。まず、Bligh Dyer法でだまかに脂溶性分画と水溶性分画に分け、各分画に対して我々が開発したレポーターアッセイを行い、A β の産生を阻害する活性を持つ分画の同定を行った。その結果、 γ セクレターゼ阻害活性は脂溶性分画にあることが判明した。次にこの脂溶性分画を、5CN-MSという順相カラムによるHPLC、5C18-AR-IIという逆相カラムを用いたHPLCで分画し、各分画に対して同様にレポーターアッセイを行い、A β の産生を阻害する活性を持つ分画の同定を行った。さらに、 γ セクレターゼの阻害活性が存在する分画をXterraという逆相カラムを用いた

HPLC で分画することで、 γ セクレターゼの阻害活性をほぼシングルピークに精製した。精製物に γ セクレターゼ活性の阻害活性があることは、ELISA 法で確認した。

上記の精製を繰り返し行い、最終精製物を約 13 mg 得た。質量解析で、この物質の分子量を決定し、また、NMR で構造決定をおこなった（京都大学薬学研究科竹本教授、塚野助教の協力による）。

2. アルツハイマー病原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製

γ セクレターゼの抑制活性を示す漢方薬エキスが実際に *in vivo* でアルツハイマー病の抑制効果があるかどうかを確認するためには、動物での検証が不可欠である。これまでに、幾つかのアルツハイマー病モデルマウスの報告があり、その内のいくつかは市販されていたり、また、MTA を交わすことで入手が可能である。しかしながら、これらのマウスは非常に高価であったり、交配によって増やすことが禁じられていたり、さらには、薬物開発に利用することの制限があり、いずれのマウスも非常に使い勝手が悪い。我々はこれまでに幾つかのトランスジェニックマウスを作製した実績があるので、脳の神経細胞に特異的に発現させることを目的に、神経特異的エノラーゼ(NSE : neuron-specific enolase) 遺伝子のプロモーターを用い、家族性アルツハイマー病の原因となる変異 APP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を行った。この

AD マウス同士で掛けあわせ、トランスジーンをホモに持つ雌雄を得、それらをさらに掛けあわせることで、トランスジーンがホモの状態ですべての維持を行った(以下、APP マウス)。これら APP マウスに対し、定期的に Morris 水迷路試験等の行動・学習試験を行った。また、生後 16 ヶ月以降で脳組織でのアミロイドの沈着を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験：京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。具体的には、実験を行う研究者、大学院生は、全員京都大学の「動物実験講習会」を受講し、京都大学内で動物実験を行うために必要な教育受講を終えたのちに実験を行った。その他の実験に関しては、倫理的な問題に関わる実験は含まれていない。

トランスジェニックマウスの作製は、「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」に基づいて行った。

C. 研究結果

1. γ セクレターゼ阻害活性を持つ雷公藤成分の精製と構造決定

まず、雷公藤を Bligh Dyer 法により水溶性、脂溶性の 2 層に分離した後、レポーターアッセイによりエキス中の γ セクレターゼ阻害活性が脂溶性分画に移行していることを確認した。続いて、この脂溶性分画を 5CN-MS 順相カラムにより、エタノール：ヘキサン = 2 : 98 の溶媒からスタートし、毎分 1% ずつメタノール濃度を上昇させる

プロトコールで HPLC を実施した。結果、17 分近傍の分画に活性成分が溶出していることを確認した。

次に、この順相 HPLC で得た 17 分の分画を 5C18-AR-II カラムにより逆相 HPLC を行うことでさらに分離した。アセトニトリル：水=60：40 からスタートし、30 分でアセトニトリル濃度を 100% に上昇させるプロトコールで行った。結果、13 分近傍の分画に活性成分が溶出していることを確認した。

さらに、この逆相 HPLC で得た 13 分の分画を Xterra カラムにより逆相 HPLC を行うことでさらに分離した。アセトニトリル：水=60：40 からスタートし、毎分 1% ずつアセトニトリル濃度を上昇させるプロトコールで HPLC を実施した。結果、9 分の分画に活性成分が溶出していることを確認した。

一連の実験を繰り返し行い、約 50 g の雷公藤から、最終的に 13 mg の極めて純度の高い化合物を得た。質量分析によりこの化合物の分子量は 632 であり、核磁気共鳴 (NMR) により、構造を $C_{32}H_{40}O_{13}$ と決定した。

2. アルツハイマー病原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの解析

昨年度に作製した、神経特異的エノラーゼ (neuron-specific enolase: NSE) 遺伝子のプロモーターの支配下に家族性アルツハイマー病で同定された London 変異 (V717F) をもつ APP を発現させたトランスジェニックマウスの解析を行った。まず、トランスジェンを持つマウスを掛け合わせホモマ

ウスを得た。次に、これらホモマウスをさらに掛けあわせることで、トランスジェンをホモに持つ状態で系統維持を行った (APP マウス)。

この APP マウスに対し、記憶・行動試験を行った。マウスの不安行動を観察するオープンフィールド試験では、6 ヶ月齢において、野生型マウスと APP マウスで不安行動に差は認められなかった。しかし、その後、月例を重ねるにつけて、野生型マウスでは中央部分への滞在時間が減少し、不安が亢進していることを示したが、APP マウスでは、逆に中央部分への滞在時間が有意に延長し、不安を感じる度合いが減少していることが推測された。

生後 6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月で行ったローターロッド試験では、野生型マウスと APP マウスで有意な差は認められず、両者の運動能力に差は無いことが示唆された。

記憶・学習能力を測定する Morris 水迷路試験では、生後 6 ヶ月において、水面下のプラットフォームにたどり着くまでの時間に野生型マウスと APP マウスの間に差が見え始め、9 ヶ月齢では APP マウスで、有意に遅延した。一方、水面下のプラットフォームの位置を記憶しているかどうかを検証するプローブテストで、9 ヶ月齢において、野生型マウスと APP マウスの間で、有意な差を認めた。

生後 16 ヶ月以降に脳を組織学的に解析したところ、APP マウスの大脳皮質、視床下部、脳内の血管の周辺に顕著なアミロイドの沈着を認めた。しかしながら、同月齢の野生型マウスに比

して、海馬に於いてはアミロイドの沈着に明確な差は認めなかった。

D. 考察

今後著しい患者数の増大が予測されるアルツハイマー病に対して、有効な薬剤を用意することは極めて重要な課題である。家族性アルツハイマー病の研究から、これまでに同定されたほぼ全ての原因遺伝子の変異によって A β (特に A β 42)の産生亢進が引き起こされていることが示され、孤発性のアルツハイマー病においても A β の産生抑制が有効な治療戦略になるであろうと推測されている。

AB は、その前駆体蛋白質である APP の膜貫通近傍部分から B セクレターゼと γ セクレターゼの2つの蛋白質プロセシング酵素の働きで切り出されるが、A β (特に A β 42) の産生抑制には C-末部位の切り出しを担う γ セクレターゼの活性抑制が極めて重要であると推測されている。

長期に渡る治療が想定されるアルツハイマー病の治療薬には、副作用が少なく安全であることが極めて重要である。我々はこれまでに安全性が確立している漢方薬に注目し、漢方薬の原料となっている約 1,600 種類の植物エキスをスクリーニングし、啤酒花と雷公籐に γ セクレターゼの活性を阻害する成分が含まれることを見いだした。

雷公籐とはタイワンクロヅルの根を加工した生薬で、中国では、慢性間接リウマチ等の炎症性疾患の治療に用いられている。この結果を受け、米

国で活動性のリウマチ患者 121 人を 2 群に分け、1 日 180 mg の雷公籐と 1 日 2 g の免疫調節薬のサラゾスルファピリジンを投与し、24 週後の症状の改善度が比較された。関節の疼痛、腫脹の改善は、雷公籐の方が勝っていたが、両者とも約 9 割の患者に悪心、嘔吐、下痢、腹痛などの有害作用が観察されている。したがって、雷公籐の長期投与は、副作用の点で難しいかもしれない。しかしながら、我々の保有する雷公籐は、培養細胞に対しては、100 μ g/ml といったかなりの高濃度でも細胞毒性を示しておらず、同じ雷公籐でも個々のエキスで毒性には大きな差があるのかもしれない。

一方、雷公籐より精製した γ セクレターゼの阻害活性成分は、脂溶性ではあるが分子量が 632 少し大きく、脳内への移行性に問題が生じる可能性が考えられる。

我々が作製した神経細胞特異的に London 変異 (V717F) をもつ APP を発現させたトランスジェニックマウス (APP マウス) は、加齢と共に不安行動の減少と記憶・学習能力の低下を認め、大脳皮質、視床下部、脳血管周辺にアミロイドの沈着を観察した。これらの結果から、本 APP マウスは新規のアルツハイマー病のモデル動物として、薬物の治療効果の判定等に活用できると考えられる。

E. 結論

我々が開発した、 γ セクレターゼの活性を簡便に評価するアッセイ系を用いて同定した γ セクレターゼの阻

害活性を持つ漢方薬エキスの内、雷公籐の γ セクレターゼの活性阻害成分を精製し、質量解析とNMRによってその構造を決定した。一方、昨年度に作製した家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、加齢に伴った記憶・学習能力の低下と大脳皮質、視床下部、脳内の血管に顕著なアミロイドの沈着を認め、新たなアルツハイマー病のモデル動物として活用できることが明らかになった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takeshita, Y., Fujinaga, R., Kokubu, K., Islam, M.N., Jahan, M.R., Yanai, A., Kakizuka, A., & Shinoda, K. Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain. **Neuroreport**. 22: 232-238, 2011.

Nakano, N., Ohashi-Ikeda, H., Hangai, M., Muraoka, Y., Toda, Y., Kakizuka, A., & Yoshimura, N. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 52:8754-8762, 2011.

Ohyama, K., Yasuda, K., Onga, K., Kakizuka, A., & Mori, N. Spatio-

temporal expression pattern of the NatB complex, Nat5/Mdm20 in the developing mouse brain: implications for cooperative versus non-cooperative actions of Mdm20 and Nat5. **Gene Expr Patterns**. 12:36-45, 2012.

Muraoka, Y., Ohashi-Ikeda, H., Nakano, N., Hangai, M., Toda, Y., Okamoto-Furuta, K., Kohda, H., Kondo, M., Terasaki, H., Kakizuka, A., & Yoshimura N. Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. **PLoS ONE** 7: e36135, 2012.

2. 学会発表

(招待講演)

垣塚 彰「癌ってどういうもの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学（京都）平成23年5月6日

垣塚 彰「細胞内 ATP の制御機構」第13回京都大学生命科学研究科シンポジウム 芝蘭会館（京都）平成23年7月8日

垣塚 彰「神経変性疾患およびストレス応答におけるVCPの役割」第20回日本Cell Death学会 東京大学薬学講堂（東京）平成23年7月30日

垣塚 彰「神経変性疾患発症におけるVCP蛋白質の役割」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部（金沢）平成23年9月1日

垣塚 彰「VCP が関わる異常蛋白質に対するストレス応答機構と ATP 制御機構」第 84 回日本生化学会大会シンポジウム(2S2a) ストレスシグナル研究の最前線 京都国際会議場 (京都) 平成 23 年 9 月 22 日

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学 (東京) 平成 23 年 10 月 18 日

Akira Kakizuka “Roles of VCP in abnormal phospholipid metabolisms in polyglutamine disease models.” 9th International conference on AAA proteins. Kumamoto City International Center (Japan) November 10, 2011.

Akira Kakizuka “Roles of VCP in polyglutamine diseases.” Asian Aging Core for Longevity (AACL)-Nagasaki Symposium Asian Aging 2011: Japan-Korea Joint Conference on Brain Aging and Neurodegeneration (Molecular Perspectives and Regional Bridging). Nagasaki University (Japan) November 21, 2011.

Akira Kakizuka “Roles of VCP in human neurodegenerative disorders.” Kyoto University day in Nanjing. Nanjing University (China) December 2, 2011.

Akira Kakizuka “Roles of VCP in neurodegenerative disorders.” The 10th NTU-Japan International mini-symposium on Molecular and Cell

biology & promotion of Academic Exchange and Collaborations for NTU-Japan. Taiwan National University (Taiwan) January 8, 2012.

(一般発表:口頭)

中野紀子、池田華子、村岡勇貴、板谷正紀、垣塚彰、吉村長久「HRA、OCT 同時撮影による GLAST 欠損マウス網膜神経節細胞障害の経時変化」第 115 回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム (東京) 平成 23 年 5 月 13 日

今村博臣、中野雅裕、永井健治、野地博行、垣塚彰「ミトコンドリア ATP 濃度は細胞質 ATP 濃度とは半独立に制御されている」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都) 平成 23 年 9 月 22 日

Sachi Tsujikawa, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki, Akira Kakizuka “Involvement of MAG11 and *c-fos* in schizophrenia like behavioral abnormality.” 第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都) 平成 23 年 9 月 23 日

福士順平、一戸勇弦、加藤悠、垣塚彰「ポリグルタミン発現に伴うリノール酸含有リン脂質の低下」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都) 平成 23 年 9 月 23 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能

解析」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館(京都)平成 23 年 9 月 24 日

田中喬、長嶋一昭、稲垣暢也、野地博行、垣塚彰、今村博臣「ATP バイオセンサー(GO-ATeam)を用いた膵島 β 細胞のライブイメージング」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学(京都)平成 23 年 12 月 21 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能解析」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学(京都)平成 23 年 12 月 21 日

Norio Sasaoka, Megumi Sakamoto, Shoko Kanemori, & Akira Kakizuka “Identification of plant extracts with anti-Alzheimer’s disease activities.” The 10th NTU-Japan International mini-symposium on Molecular and Cell biology & promotion of Academic Exchange and Collaborations for NTU-Japan. Taiwan National University (Taiwan) January 8, 2012.

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima, Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura “Simultaneous ATP and Ca^{2+} imaging of a single insulin-secreting islet cell.” The 10th NTU-Japan International mini-symposium on Molecular and Cell biology & promotion of Academic

Exchange and Collaborations for NTU-Japan. Taiwan National University (Taiwan) January 8, 2012.

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima, Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura “Simultaneous ATP and Ca^{2+} imaging of a single insulin-secreting islet cell.” The 10th International Student Seminar Kyoto University (Kyoto) March 5-8, 2012.

(一般発表:ポスター)

今村博臣、中野雅裕、永井健治、野地博行、垣塚彰「ミトコンドリア ATP 濃度は細胞質 ATP 濃度とは半独立に制御されている」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館(京都)平成 23 年 9 月 23 日

福士順平、一戸勇弦、加藤悠、垣塚彰「ポリグルタミン発現に伴うリノール酸含有リン脂質の低下」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館(京都)平成 23 年 9 月 23 日

Sachi Tsujikawa, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki, Akira Kakizuka “Involvement of MAG11 and *c-fos* in schizophrenia like behavioral abnormality.”第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館(京都)平成 23 年 9 月 23 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能

解析」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館（京都）平成 23 年 9 月 24 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能解析」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学（京都）平成 23 年 12 月 21 日

坂本修一郎、野地博行、垣塚彰、今村博臣「Pannexin 1 は細胞内 ATP レベルを制御することでアポトーシスの進行に重要な役割を果たす」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学（京都）平成 23 年 12 月 21 日

Norio Sasaoka, Megumi Sakamoto, Shoko Kanemori, Akira Kakizuka “Identification of plant extracts with anti-Alzheimer’s disease activities” The 10th NTU-Japan international mini-symposium on molecular and cell biology Taiwan University (Taiwan), Taiwan January 8, 2012

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima, Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura “Simultaneous ATP and Ca²⁺ imaging of a single insulin-secreting islet cell” The 10th NTU-Japan international mini-symposium on molecular and cell biology National Taiwan University (Taiwan), Taiwan January 8, 2012

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima, Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura “Simultaneous ATP and Ca²⁺ imaging of a single insulin-secreting islet cell” The 10th International Student Seminar Kyoto University (Japan), March 5, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

発明の名称：「抗癌剤の副作用を軽減させる薬剤・方法」、河合裕子、垣塚彰、堀清次、他 2 名。国立大学法人京都大学、他 1 社 出願日：平成 23 年 4 月 28 日 特願 2011-102330

発明の名称：「ナフタレン誘導体」 発明者：垣塚彰、堀清次、首藤敏之、淵上智弘。出願人：国立大学法人京都大学、ダイトーケミックス株式会社。出願日：平成 23 年 7 月 28 日、PCT 出願 (PCT/JP2011/067320)

発明の名称：「アルツハイマー病予防薬のスクリーニング法と同定物」、垣塚彰、笹岡紀男、兼森祥子、坂本めぐみ 竹本佳司、塚野千尋。出願人：国立大学法人京都大学 出願日：平成 23 年 9 月 1 日 特願 2011-19043

発明の名称：「眼疾患処置薬」、発明者：垣塚彰、堀清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、首藤敏之、淵上智弘。出願人：国立大学法人京都大学、ダイトーケミックス株式会社。出願日：平

成 23 年 9 月 30 日、PCT 出願 (PCT/JP2011/073160)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Takeshita, Y., Fujinaga, R., Kokubu, K., Islam, M.N., Jahan, M.R., Yanai, A., <u>Kakizuka, A.</u> , Shinoda, K.	Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain.	Neuroreport.	22	232-238	2011
Nakano, N., Ohashi-Ikeda H., Hangai, M., Muraoka, Y., Toda, Y., <u>Kakizuka, A.</u> , Yoshimura, N.	Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	52	8754-8762	2011
Ohyama, K., Yasuda, K., Onga, K., <u>Kakizuka, A.</u> , Mori, N.	Spatio-temporal expression pattern of the NatB complex, Nat5/Mdm20 in the developing mouse brain: implications for co-operative versus non-co-operative actions of Mdm20 and Nat5.	Gene Expr Patterns.	12	36-45	2012
Muraoka, Y., Ohashi-Ikeda, H., Nakano, N., Hangai, M., Toda, Y., Okamoto-Furuta, K., Kohda, H., Kondo, M., Terasaki, H., <u>Kakizuka, A.</u> , Yoshimura N.	Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography.	PLoS ONE	7	e36135	2012

III. 研究成果の刊行物・別刷

Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain

Yukio Takeshita^{a,b}, Ryutaro Fujinaga^a, Keiji Kokubu^a, Md. Nabiul Islam^a, Mir Rubayet Jahan^a, Akie Yanai^a, Akira Kakizuka^c and Koh Shinoda^a

Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) is an essential component of the stigmoid body (STB) and known as a possible neuroprotective interactor with causative proteins for Huntington's disease, spinal and bulbar muscular atrophy, spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17), and Joubert syndrome. To clarify what other causative molecules HAP1/STB could interact with, we cloned normal causative genes for several neural disorders from human brain RNA library and evaluated their subcellular interaction with HAP1/STB by immunocytochemistry and immunoprecipitation after cotransfection into Neuro2a cells. The results clearly showed that HAP1/STB interacts with the normal ataxin-3 through Josephin domain and polyglutamine-expanded mutants derived from SCA3 as well. The findings suggest that HAP1/STB could modify the physiological function of normal ataxin-3 and pathogenesis

of SCA3 attributable to the mutant ataxin-3. *NeuroReport* 22:232–238 © 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

NeuroReport 2011, 22:232–238

Keywords: Machado-Joseph disease, Huntington's disease, Triplet Repeat, Neurodegeneration, spinocerebellar ataxia type 3, stigmoid body

^aDepartment of Neuroscience, Yamaguchi Graduate University School of Medicine, Ube, Yamaguchi, Japan, ^bThe Japan Society for the Promotion of science, Tokyo and ^cLaboratory of Functional Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan

Correspondence to Dr Koh Shinoda, Department of Neuroscience, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan
Tel: +81 836 22 2204; fax: +81 836 22 2205;
e-mail: shinoda@yamaguchi-u.ac.jp

Received 14 December 2010 accepted 24 January 2011

Introduction

The stigmoid body (STB) was first identified as a distinct, spherical-to-ovoidal, nonmembrane-bound inclusion (0.5–3 µm in diameter) in the cytoplasm of neurons in the limbic and the hypothalamus of healthy rats [1–3]. The STB has none of the aggresomal characteristics, such as being ubiquitinated and surrounded by vimentin, indicating that the STB is a physiological entity distinct from pathological aggresome [4]. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) induces the formation of STB by its complementary DNA (cDNA) transfection into HEK293 cells [5] and it is detected in the STB of the rat brain [6]. In the mouse brain, the STB and HAP1 messenger RNA have a similar distribution [7] and the STB formation is suppressed in the brain of *Hap1* (+/–) mice [8]. This evidence has led to the suggestion that HAP1 is an essential component, hence a marker, of STBs [3].

HAP1 interacts with huntingtin in polyglutamine (polyQ)-dependent manner [9] and has a protective effect on neurons against apoptosis induced by polyQ-expanded huntingtin [7,8]. HAP1/STB also interacts with polyQ-expanded androgen receptor (AR) in polyQ-dependent manner through a ligand-binding domain, and it suppresses apoptosis induced by a polyQ-expanded AR derived from spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) [10]. In addition, HAP1/STB is associated with TATA-binding

protein [11], the polyQ-expansion of which causes spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17), and Abelson helper integration site 1 [12], mutations of which are linked to nontriplet neuropsychiatric diseases including Joubert syndrome and schizophrenia [13]. The line of data suggests that HAP1/STB could play a protective role in Huntington's disease, SBMA, SCA17, and Joubert syndrome, leading to the 'HAP1/STB protection hypothesis' that HAP1/STB expression raises the threshold of vulnerability for neurodegeneration and renders more beneficial stability to neurons with HAP1/STB than without it [7]. It remains to be determined, however, how far the hypothesis can be applied to other neural disorders.

In this study, to screen what other neural-disorder-related molecules are possibly involved in the interaction with HAP1/STBs, we cloned causative molecules in several representative neural disorders from normal human brain RNA library and evaluated their subcellular interaction with HAP1/STB in Neuro2a cells.

Methods

Plasmids and Cell culture

Plasmids used here were PCR-amplified using the primers listed in Supplementary Table 1 (Supplemental digital content 1 <http://links.lww.com/WNR/A106>). As target molecules, we choose amyloid precursor protein (APP) in Alzheimer-type dementia, α -synuclein, ubiquitin carboxy-terminal esterase L1 (UCH-L1) in Parkinson's disease, transactive

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website (www.neuroreport.com).

response DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) in amyotrophic lateral sclerosis, ataxin-1 in SCA1, ataxin-3 in SCA3, and monoamine oxidase A (MAO-A) in schizophrenia. HAP1 cDNA obtained from Full-length Human Clone Collection (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) were cloned into the *EcoRI-XhoI*-digested pcDNA3 vector (Invitrogen). The isolation of ataxin-3Q27 and ataxin-3Q79 cDNAs has been described earlier [14] and was used to reconstruct FLAG-tagged ataxin-3Q27 and ataxin-3Q79 using Gateway technology (Clontech, Mountain View, California, USA). Ataxin-3 deletion mutants were amplified from cDNA encoding ataxin-3 by PCR. The cDNAs of the other target molecules were obtained from human brain total RNA (Clontech) by reverse transcriptase-PCR and were used to construct p3 × FLAG-CMV-10 vector (SIGMA, St Louis, Missouri, USA) using Gateway technology. The plasmids cloned in this study were verified by sequencing. The mouse neuroblastoma (Neuro2a) cell culture was done as described earlier [10].

Western blot analysis, fluorescence immunocytochemistry, cell count, and statistical analysis

Western blot analysis and immunocytochemistry with rabbit anti-HAP1 polyclonal antibody (HAP1 H-300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) and mouse anti-FLAG monoclonal antibody (FLAG-M5, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) was performed as described earlier [3,10]. Image analysis, cell count, and statistical analysis was performed as described earlier [10].

Immunoprecipitation and quantitative analysis

Immunoprecipitation was performed using the FLAG Immunoprecipitation kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Quantitative analysis was performed as described earlier [10].

Results

The expression vectors of HAP1 and FLAG-tagged ataxin-1, ataxin-3Q27, α -synuclein, UCH-L1, APP, TDP-43, and MAO-A were constructed and singly transfected. Western blot analysis of these transfected cell lysates showed distinct bands corresponding to their expected molecular weights (Fig. 1a and b). Most of the cultured cells transfected with HAP1 were observed to form HAP1-immunoreactive solitary inclusions in cytoplasm (HAP1/STBs) as reported earlier [4,5,7] (see Figure 1a Supplemental digital content 2 <http://links.lww.com/WNR/A107>). Immunofluorescence cytochemistry showed that ataxin-1 or TDP-43 was localized mainly in the nucleus (see Figures 1b and f Supplemental digital content 2 <http://links.lww.com/WNR/A107>), whereas ataxin-3Q27, APP, or MAO-A was expressed mainly in the cytoplasm (Fig. 1c, see Figures 1e and g Supplemental digital content 2 <http://links.lww.com/WNR/A107>). UCH-L1 and α -synuclein showed diffused expression in

both nucleus and cytoplasm (see Figures 1c and d Supplemental digital content 2 <http://links.lww.com/WNR/A107>).

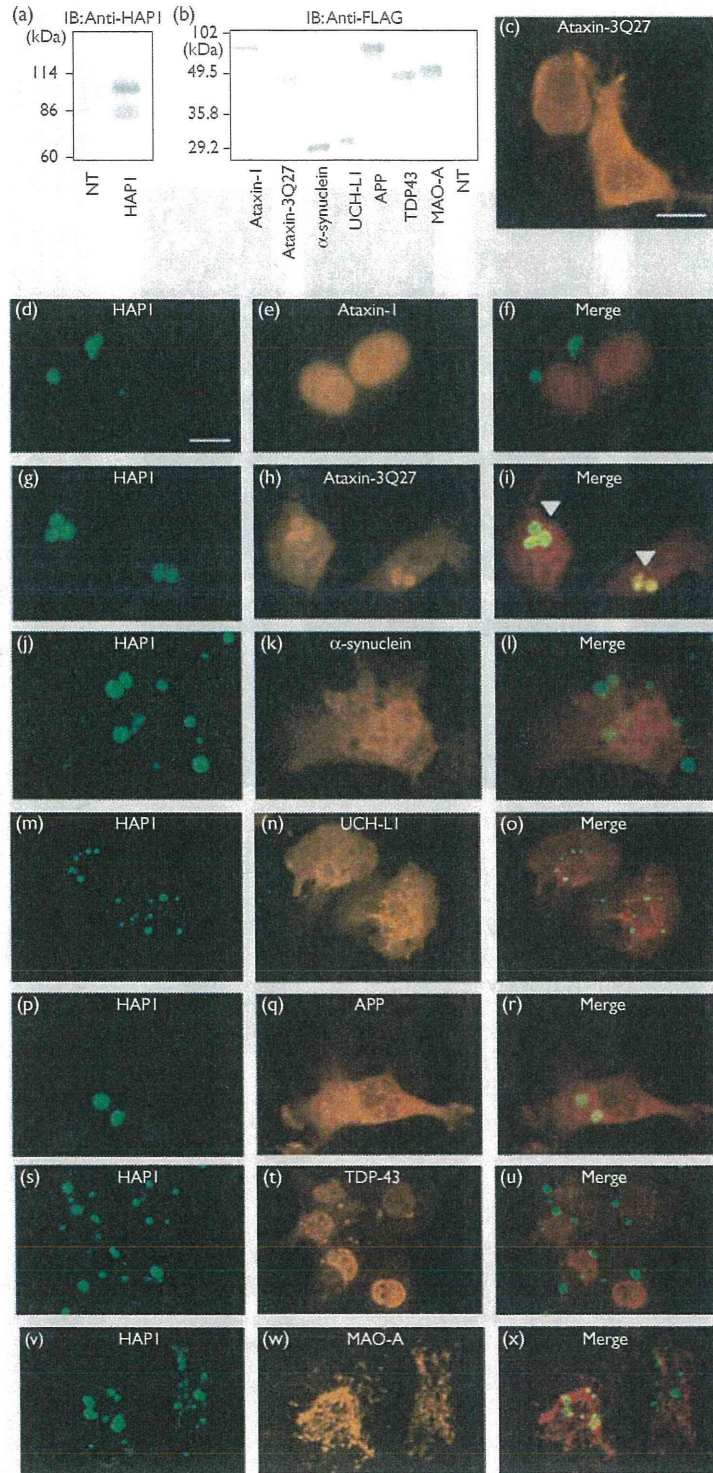
To evaluate the intracellular relationship between HAP1 and the abovementioned target molecules, the expression vectors of HAP1 and each causative molecule were cotransfected. Cotransfection of expression vectors of HAP1 and ataxin-3Q27 induced distinct cytoplasmic aggregations that were HAP1/ataxin-3 double positive (Fig. 1g-i). In contrast, the other molecules did not interact with HAP1-immunoreactive inclusions (Fig. 1d-f and j-x) and their intracellular localizations in single transfection were unchanged even after cotransfection with HAP1/STB.

To determine the region of ataxin-3 crucial for interaction with HAP1, the expression vectors of three kinds of ataxin-3-deletion mutants were created (Fig. 2a). They included cDNAs encoding Josephin domain (ATX3 1-510), ataxin-3 lacking Josephin domain (ATX3Q27 511-1083), and ataxin-3 lacking Josephin domain and ubiquitin-interacting motifs (ATX3Q27 781-1083). In western blots, cell lysates from the transfected cells showed the expected molecular weights of all these mutants (Fig. 2b). Immunofluorescence cytochemistry showed that a single transfection of ATX3Q27 511-1083 or ATX3Q27 781-1083 resulted in entirely diffused expression (Fig. 2c and d), whereas ATX3 1-510 was expressed ambiguously in nucleus and part of the cytoplasm (Fig. 2e).

Cotransfections of the expression vectors of ATX3 1-510 and HAP1 induced the formation of prominent HAP1/ATX3 1-510 double-labeled cytoplasmic aggregations (Fig. 2l-n). In contrast, cotransfection of HAP1 and ATX3Q27 511-1083 or 781-1083 did not result in HAP1 double-labeled cytoplasmic aggregations (Fig. 2f-k). Then, the coimmunoprecipitation experiment was carried out to biochemically investigate the interaction of the HAP1/STB and ataxin-3Q27 or Josephin domain (Fig. 2o and p). In cells coexpressing HAP1 and ataxin-3Q27 or ATX3 1-510, HAP1 coprecipitated with ataxin-3Q27 and ATX3 1-510. However, HAP1 did not coprecipitate with ATX3Q27 511-1083. The results clearly show that the Josephin domain itself is an essential region for association with HAP1/STB.

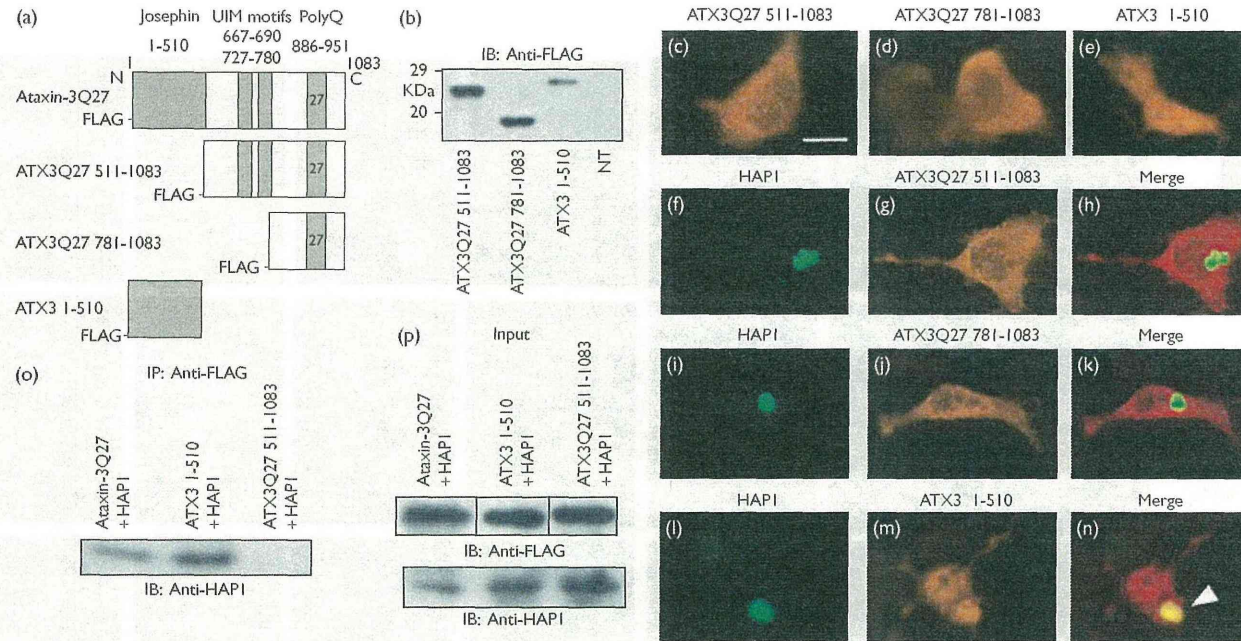
A FLAG-tagged-ataxin-3 (ataxin-3Q79) was created (Fig. 3a). In western blots, cell lysates from the transfected cells showed the expected molecular weights (Fig. 3b). Most of the cells were observed to express ataxin-3Q79 diffusely in the nuclei and cytoplasm in fluorescence microscopy (Fig. 3c). Immunofluorescence cytochemistry showed that the HAP1/ataxin-3 double-labeled cytoplasmic-aggregation (Fig. 3d-f). To clarify the difference in the frequency or strength of association with HAP1 between ataxin-3Q27 and ataxin-3Q79, the HAP1/ataxin-3 double-labeled cytoplasmic aggregation formation (HA3-CAF) ratios (HA3-CAF cell number/total cotransfected cell

Fig. 1



Cotransfection of huntingtin-associated protein 1 (HAP1) and target molecules. (a and b) Western blots for nontransfected (NT) cells and cells transfected with HAP1 (a) and FLAG-tagged target molecules including ataxin-1, ataxin-3Q27, α -synuclein, ubiquitin carboxy-terminal esterase L1 (UCH-L1), amyloid precursor protein (APP), transactive response DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43), and monoamine oxidase A (MAO-A) (b). Molecular weights (kDa) are indicated on the left side. (c) Fluorescence immunocytochemistry for ataxin-3Q27-transfected cells. (d-x) Fluorescence microscopic images of cells cotransfected with HAP1 (Alexa488: green) and target molecules (Alexa594: red). Arrowheads indicate ataxin-3Q27 was associated with HAP1/stigmoid body (f) (bar = 10 μ m).

Fig. 2



Construction of ataxin-3-deletion mutants and cotransfection of huntingtin-associated protein 1 (HAP1) and these mutants. (a) Schematic representation of ataxin-3Q27 and ataxin-3-deletion mutants. Each mutant is FLAG-tagged in the *N*-terminus. ATX3Q27 511-1083, ataxin-3-lacking Josephin domain; ATX3Q27 781-1083, ataxin-3-lacking Josephin domain and ubiquitin-interacting motifs; and ATX3 1-510, Josephin domain. (b) Western blot analysis for the lysates from cells transfected with each ataxin-3-deletion mutants. (c–e) Fluorescence microscopic images of Neuro2a cells transfected with three ataxin-3-deletion mutants. (f–n) Fluorescence photomicrographs showing subcellular interactions between HAP1 and three ataxin-3-deletion mutants. Arrowhead indicates that ATX3 1-510 is associated with HAP1/stigmoid body (n). (o and p) Coimmunoprecipitation of HAP1 with ataxin-3Q27, ATX3Q27 1-510, or ATX3Q27 511-1083. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG M2 affinity gel. Immunoprecipitated samples are analyzed by western blotting using the anti-HAP1 antibody. Inputs are the control of proteins exogenously expressed (bar = 10 μ m).