

の結果神経細胞内に封入体を形成して最終的に神経変性を引き起こすと考えられている。

我々は、蛋白質ミスフォールディングに対する内在性防御機構である Hsp40、Hsp70 などの分子シャペロンに着目し、その治療効果を検討してきた。最近、Hsp40 を発現するアデノ随伴ウイルス 5 型ベクター AAV5-Hsp40 を用いてハンチントン病モデルマウス R6/2 に対する遺伝子治療を行ったところ、驚くべきことに、ウイルス感染細胞のみならず、非感染細胞においても治療効果を発揮することを見出した。この結果と、別の分子シャペロンである Hsp70 の細胞外への分泌が報告されていることを併せて、我々は Hsp40 などの分子シャペロンが細胞内に留まらず、細胞外環境を経て周辺細胞に対する non-cell autonomous な生理活性を発揮して、個体レベルでの蛋白質恒常性（プロテオスターシス）維持に寄与する可能性を考えた。本研究では培養細胞モデルを用いてこの仮説の検証を行い、そのメカニズムを解明することを目的とした。

B. & C. & D. 研究方法、結果および考察

①Hsp40 は経時的に細胞外に分泌される

Neuro2A 細胞に Hsp40 あるいは Hsp70 を強制発現させ、その培養液上清を回収・濃縮してウェスタンブロットを行ったところ、Hsp70 のみならず Hsp40 も検出され、その量は経時的に増加することを見出した。この時に有意な細胞死は生じていないこと、また内在性 Hsp40 の細胞外分泌も確認している。細胞外への Hsp40 分泌量は、低温条件下では顕著に減少するが、ER-Golgi 間輸送の阻害剤である brefeldin A による影響を認めなかったことから、Hsp40 は通常の古典的分泌経路とは異なる機序により細胞外に分泌されている可能性が示唆された。

②Hsp40 の細胞外分泌はエクソソーム経路を介する

Hsp40 の分泌経路を検討するために、Neuro2A 細胞に細胞内カルシウム濃度を上昇させる thapsigargin、monensin、ionomycin などの薬剤を添加したところ、Hsp40 の細胞外分泌は有意に増加し、またエンドソームからリソソームへの成熟を阻害する bafilomycin A や chloroquine などの薬剤によっても増加することから、MVB (multi-vesicular body) を経由したエクソソーム分泌経路の関与が疑われた。実際に、培養液上清から超遠心分画により精製したエクソソーム画分のウェスタンブロットにて Hsp40 が検出され、また電子顕微鏡観察から 50-100 nm 程度の小胞内に Hsp40 が内包されていることを見出した。

③Hsp40 のエクソソーム分泌には J ドメインが必要である

Hsp40 のエクソソーム分泌における Hsp40 内各機能ドメインの役割を明らかにするために、Hsp70 との会合に関わる N 末端の J ドメイン、C 末端ドメイン、その間の G/F リッチドメインのそれぞれの機能ドメインを欠失した Hsp40 変異体を作製し、細胞外分泌を検討した。その結果、J ドメインを欠失した Hsp40 変異体では細胞外分泌が認められなくなることから、Hsp40 の細胞外分泌には J ドメインが必要であると考えられた。

④Hsp40 含有エクソソームは細胞内に取り込まれる

一般的にエクソソームはエンドサイトーシスにて細胞内に取り込まれることが知られているが、Hsp40 の細胞内取り込みを確認するために、Hsp40-EYFP を発現させた Neuro2A 細胞の培養液上清から精製したエクソソーム画分を、別の Neuro2A 細胞の培養液中に添加し

た。その結果、確かに Hsp40-EYFP は細胞内に取り込まれ、そのシグナルはエンドソーム様の分布を示した。

⑤ エクソソーム分泌を介して細胞間伝播した Hsp40 はポリグルタミン封入体を抑制する

Hsp40 のエクソソーム分泌の PolyQ 病病態における意義を明らかにするために、Hsp40 を発現する、あるいは Hsp40 に対する siRNA を導入した Neuro2A 細胞の培養液上清から精製したエクソソーム画分を、別の Q81-EGFP を発現する Neuro2A 細胞の培養液中に添加した。その結果、無処理の Neuro2A 細胞由来エクソソーム画分に比べて、Hsp40 発現 Neuro2A 細胞由来エクソソーム画分では Q81-EGFP 封入体の有意な抑制を認め、Hsp40 siRNA を導入した Neuro2A 細胞由来エクソソーム画分では Q81-EGFP 封入体抑制効果の有意な減少を認めた。

(倫理面への配慮)

本研究では直接ヒトを対象とした研究は行っていない。

E. 結論

以上の結果から、従来細胞内で働くと考えられていた Hsp40 はエクソソーム経路を介して細胞外に分泌されることが見出され、さらに PolyQ 病モデルに対する non-cell autonomous な治療効果を発揮することが明らかになった。最近、Morimoto らがミスフォールド蛋白質の蓄積に対する個体レベルでのストレス応答が液性因子を介した non-cell autonomous な様式で生じることを報告したが、本研究から、そのメカニズムの根底に分子シャペロンのエクソソーム分泌が関与する可能性が示唆され、さらには分子シャペロンの細胞間伝播が個体レベルでのプロテオスタシス維持に寄与することが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Popiel HA, Burke JR, Strittmatter WJ, Oishi S, Fujii N, Toda T, Wada K, *Nagai Y: The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases. *J Amino Acids*, 2011: 265084 (2011)
- 2) Sun H, Satake W, Zhang C, Nagai Y, Tian Y, Fu S, Yu J, Qian Y, Qian Y, Chu J, Toda T: Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet*, 2011; 56 (4): 330-334
- 3) Konya C, Hatanaka Y, Fujiwara Y, Uchida K, Nagai Y, Wada K, Kabuta T: Parkinson's disease-associated mutations in α -synuclein and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. *Neurochem Int*, 2011; 59 (2): 251-258
- 4) 永井義隆, 藤掛伸宏: ショウジョウバエモデルから解明された TDP-43 プロテインパチーの分子病態. *Dementia Japan*, 2011; 25(2): 129-136
- 5) 永井義隆, 貫名信行: QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解. *臨床神経学*, 2011; 51 (11): 1108-1110

2. 学会発表

- 1) Nagai Y, Takeuchi T, Popiel HA, Wada K: Molecular mechanism of novel unconventional secretion of Hsp40 to

function extracellularly. 6th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders, June, 2011, Barga, Italy

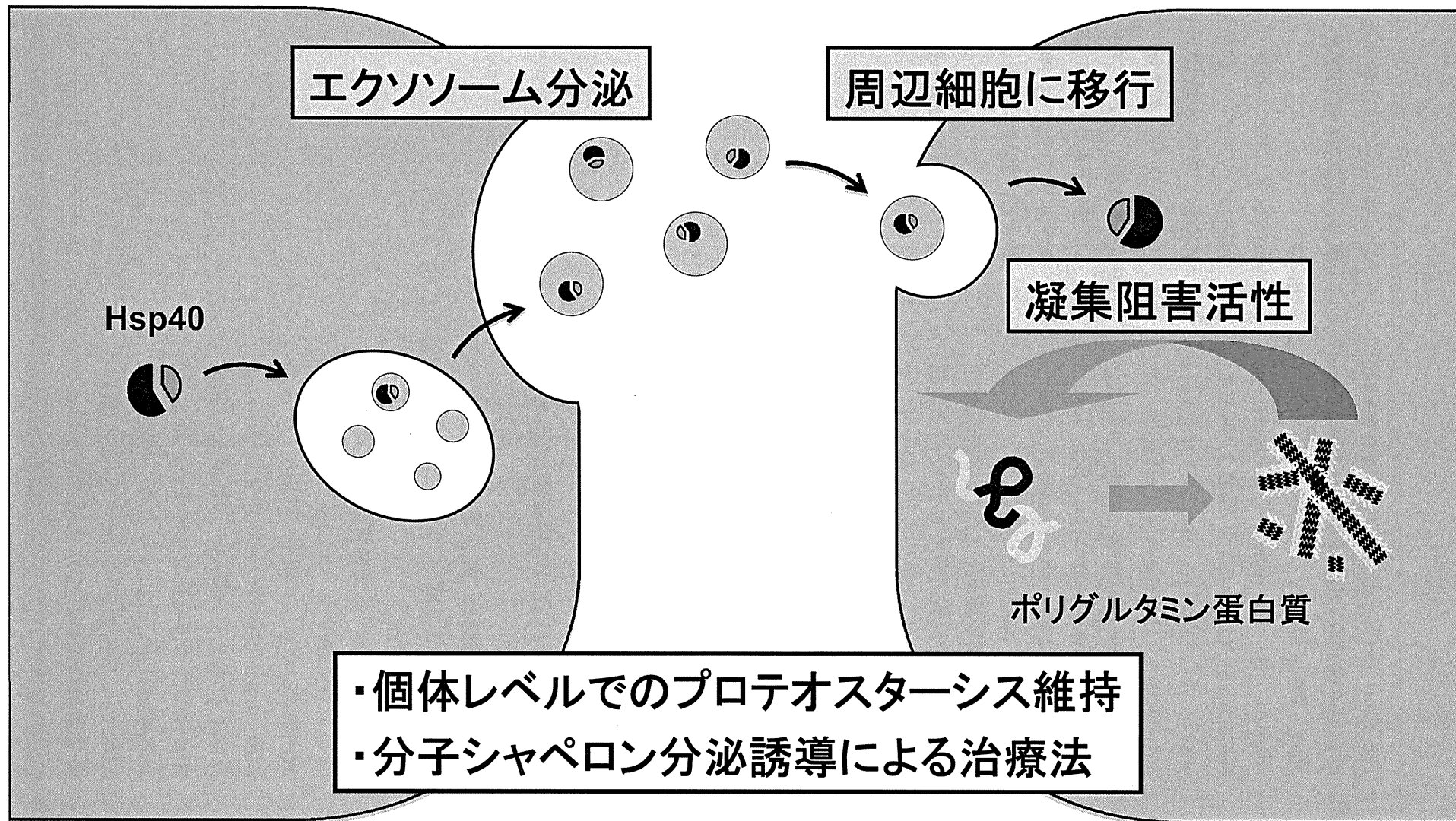
- 2) Popiel HA, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Muramatsu S, Toda T, Wada K, Nagai Y: Hsp40 exerts non-cell autonomous therapeutic effects on polyglutamine disease mice via its unconventional secretion. 6th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders, June, 2011, Barga, Italy
- 3) 永井義隆：異常凝集病と病態. 平成 23 年度大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質異常凝集の原理と制御」, 2011 年 4 月, 大阪
- 4) 永井義隆, 貫名信行: QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解. 第 52 回日本神経学会, 2011 年 5 月, 名古屋
- 5) ポピエル明子, 藤田寛美, 山本和弘, 武内敏秀, 村松慎一, 戸田達史, 和田圭司, 永井義隆:凝集阻害分子の遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスに対する治療効果. 第 52 回日本神経学会, 2011 年 5 月, 名古屋
- 6) 藤掛伸宏, 斉藤勇二, 横関明男, 小野寺理, 和田圭司, 永井義隆: TDP-43 を発現する ALS モデルショウジョウバエにおけるオートファジー系蛋白質分解の関与. 第 52 回日本神経学会, 2011 年 5 月, 名古屋
- 7) 武内敏秀, ポピエル明子, 和田圭司, 永井義隆: Hsp40 は新規の細胞外分泌機序によりポリグルタミン病モデルに対して細胞非自律的な治療効果を発揮する. 第 34 回日本神経科学会, 2011 年 9 月, 横浜
- 8) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 和田圭司, 永井義隆: 高栄養負荷は神経変性疾患モデルショウ

ジョウバエにおける神経変性を増悪する. 第 34 回日本神経科学会, 2011 年 9 月, 横浜

- 9) 武内敏秀, ポピエル明子, 和田圭司, 永井義隆: エクソソームを介した Hsp40 の細胞外分泌. 第 6 回臨床ストレス応答学会, 2011 年 11 月, 名古屋
- 10) 永井義隆: ショウジョウバエモデルを用いた神経変性疾患の病態治療研究～ALS モデルを中心に～. 神経疾患のモデル動物研究会, 2012 年 1 月, 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Hsp40はエクソソーム分泌を介してポリグルタミン病モデルに対するnon-cell autonomousな治療効果を発揮する



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究
分担研究報告

ヒト疾患脳におけるポリグルタミン病重合体の検出

研究分担者 小野寺 理

(新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 分子神経疾患資源解析学)

共同研究者 高橋 俊昭 (新潟大学脳研究所 神経内科)

石平 悠 (新潟大学脳研究所 神経内科)

徳永 純 (新潟大学脳研究所 神経内科)

堅田 慎一 (新潟大学脳研究所 神経内科)

他田 真理 (新潟大学脳研究所 神経内科)

他田 正義

(新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 分子神経疾患資源解析学)

佐藤 俊哉 (新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野)

柿田 明美

(新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 脳疾患標本資源解析学)

高橋 均 (新潟大学脳研究所病態神経科学部門 病理学)

西澤 正豊 (新潟大学脳研究所 神経内科)

研究要旨

ポリグルタミン病研究において、培養細胞を用いた検討では、増大したポリグルタミン鎖の重合体に細胞傷害性が推察されている。しかしながら、組織レベルでの重合体の検出の報告はきわめて乏しい。本研究では、ヒト疾患脳組織におけるポリグルタミン病重合体の検出を目指し、病態への関与を検討した。歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)のヒト剖検脳組織サンプル(大脳皮質、淡蒼球、被殻、小脳歯状核)をSemi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis法により、ポリグルタミン鎖重合体の検出を試みた。この結果、DRPLA剖検脳組織において特異的な高分子のスミア状のポリグルタミン重合体を検出し得た。症例間には重合体蓄積の程度に差がみられ、蓄積が顕著であった組織部位では、神経変性所見がより高度であった。

ヒト疾患脳においても重合体は神経変性に関連した蓄積を示し、病態・治療研究においてきわめて重要な知見と考えられた。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の分子病態仮説として、増大したポリグルタミン鎖が conformational

change を介し自己重合(二量体-オリゴマー形成)過程に細胞障害性が推察されている。興味深いことに、神経傷害性とポリグルタミン鎖の

発現量とは、必ずしも相関しない。このことは、ポリグルタミン鎖の発現自体が、神経障害性に必要十分なのではなく、構造変化や重合化、蛋白修飾などの翻訳後の変化の必要性を示唆するものである。しかしながら、重合体の毒性研究は主に培養細胞系を用いた検証であり、*in vivo*系での検出の困難さから、疾患組織レベルでの検証報告はきわめて乏しい。本研究では、ヒト疾患脳組織における重合体の検出を目指し、病態への関与を検討した。

B. 研究方法

新潟大学脳研究所病理学分野の病理献体から提供を受けたDRPLA症例6例および対照9例（アルツハイマー病2例、パーキンソン病2例、他に非変性疾患4名）の脳組織凍結標本の大脳皮質、被殻、淡蒼球、小脳歯状核を検討した。各組織標本にRIPA bufferを加え、超音波破砕法(native sample)にて弱変性状態で蛋白抽出した。1% アガロースゲル(0.01% SDS 加)で電気泳動(Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis)し、Western blot 法にて重合体をスメアバンドとして検出した。重合体蓄積は神経特異マーカのNeurofilament-Lにより補正を行ない定量化し、症例間および組織部位ごとの重合体蓄積の程度を比較検討した。定量解析により、解剖部位毎のポリグルタミン鎖重合体の蓄積の差異を検証し、神経変性の局在性と重合体蓄積との関連を病理学的評価もあわせて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で対象とヒト由来試料は匿名化を行い、個人のプライバシーについて十分に保護をおこなった。

C. 研究結果

① DRPLA 患者由来サンプルにおいて重合体を表す高分子のスメアバンドを検出した(図1)。大脳皮質では5例中2例、被殻では4例中2例、淡蒼球では3例中1例、小脳歯状核では5例中1例で重合体の蓄積を認めた。一方で、神経変性疾患以外の対照患者(Alzheimer 病、Parkinson 病)由来サンプルでは、いずれの解剖部位においても重合体の蓄積を認めなかった。

② DRPLA 症例間における神経細胞障害の程度について病理組織 HE 標本をもとに比較した。

重合体の蓄積が顕著であったDRPLA症例#3の淡蒼球では、蓄積を認めなかったDRPLA症例#1と比較して、神経細胞脱落と細胞体萎縮等の変性所見がより高度であった(図2)。

③ 伸長ポリグルタミン鎖重合体の蓄積量と臨床パラメータ(グルタミン伸長数、死亡時年齢、罹病期間、脳重量)との相関を解剖部位別に検討した。大脳皮質における重合体の蓄積量とグルタミン伸長数($R^2 = 0.957$, $p < 0.01$)、小脳歯状核における重合体の蓄積量と罹病期間($R^2 = 0.979$, $p < 0.01$)との間に有意な正の相関を認めた(図3)。

D. 考察

患者脳組織から伸長ポリグルタミン鎖重合体を検出し、重合体蓄積と神経障害性との関連を検討した。伸長ポリグルタミン鎖重合体は、疾患特異的に蓄積し、病理検討においても重合体蓄積と神経変性の程度に関連を認めた。本研究の成果は、従来、*in vitro*実験系で推察されてきた重合体の存在とその病態への関わりを、ヒト疾患脳において証明し得た点で重要である。本研究から、ポリグルタミン鎖の重合過程を阻害する薬剤は、有効な分子標的治療となることが提言される。

E. 結論

DRPLA ヒト剖検脳組織における重合体の存在を証明した。ポリグルタミン鎖重合体がヒト疾患脳においても神経障害性の要因であることの証明は、病態・治療研究においてきわめて重要な知見と考えられる。症例間によるポリグルタミン重合体蓄積には差違があり、罹病期間、ポリグルタミン伸長、封入体形成の程度などの因子と重合体蓄積との関連の考察が今後の課題となる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

上記報告内容について論文作成中である。

2. 学会発表

- 1) 高橋俊昭, 小野寺 理, 西澤 正豊ほか: ヒト疾患脳におけるポリグルタミン病重合体の検出. 第52回日本神経学会学術大会, 2011年5月18日, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

出願・登録なし

図 1

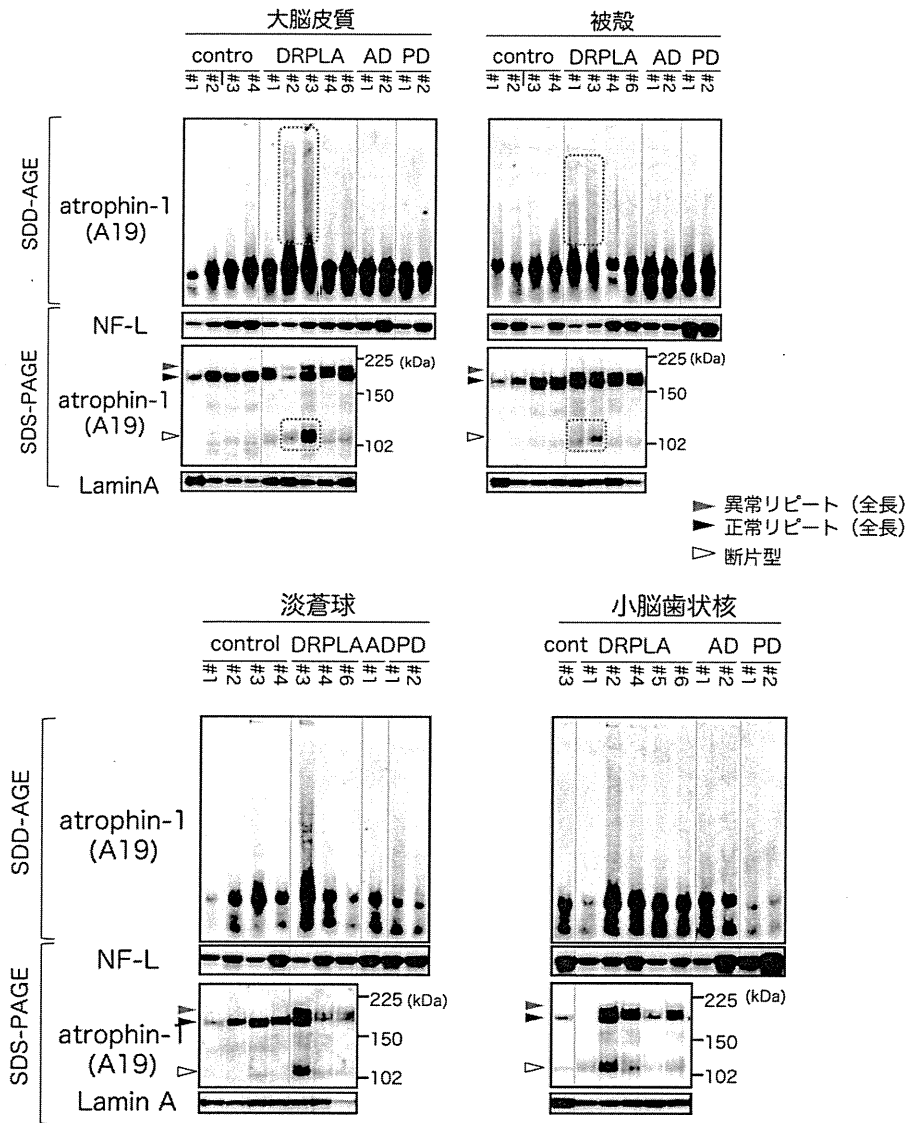
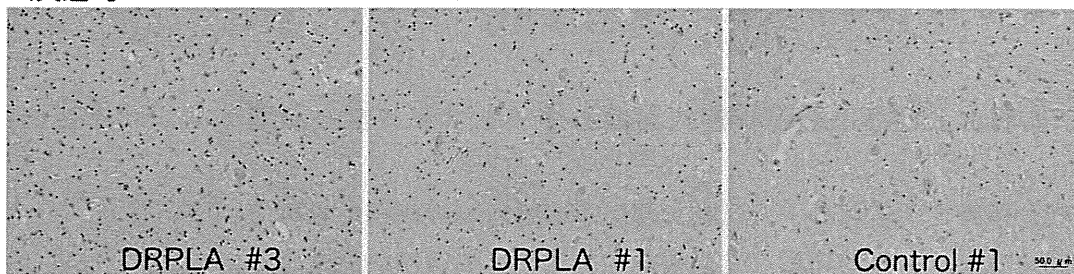


図 2

淡蒼球



小脳歯状核

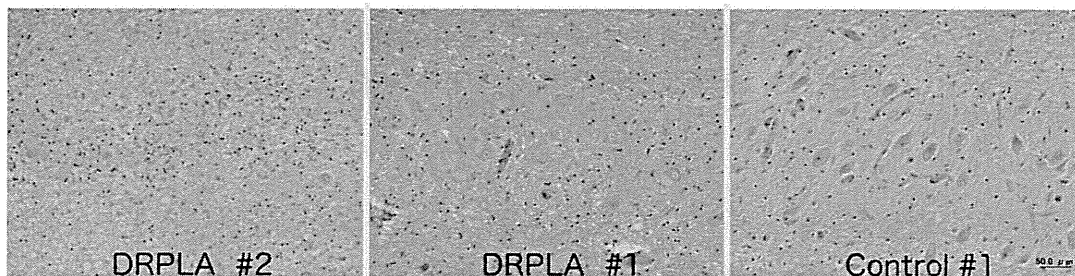
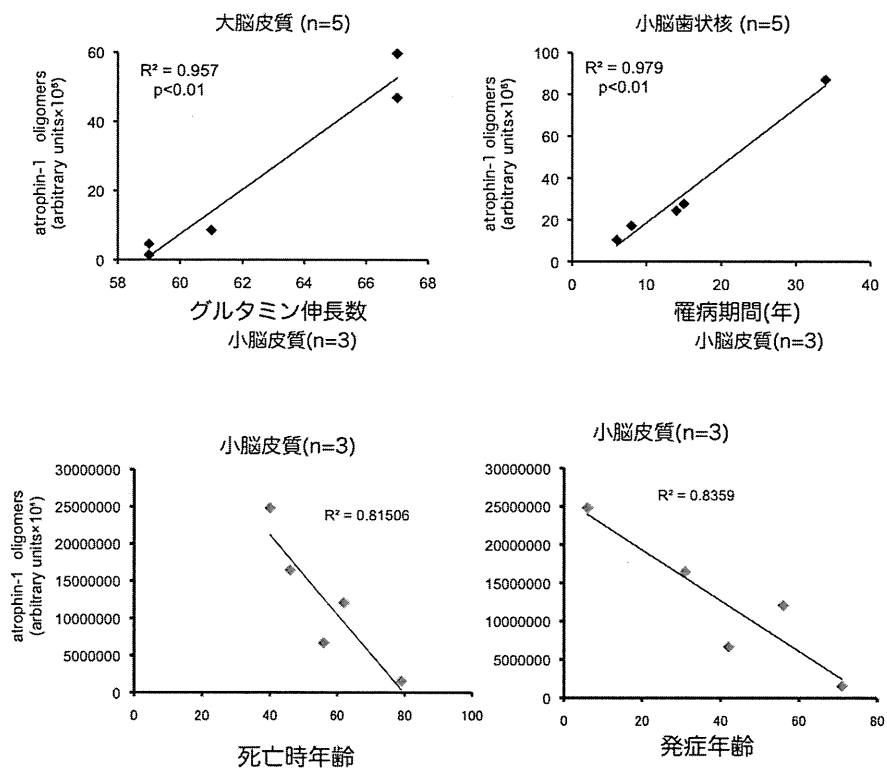


図 3



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究
分担研究報告

レビー小体病および多系統萎縮症におけるオートファゴソーム関連タンパク質の変化

研究分担者 若林孝一 (弘前大学医学研究科脳神経病理学講座)
共同研究者 丹治邦和 (弘前大学医学研究科脳神経病理学講座)
森 文秋 (弘前大学医学研究科脳神経病理学講座)
柿田明美 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター)
高橋 均 (新潟大学脳研究所病理学分野)

研究要旨

オートファジーは細胞内分解システムの一つであり、ヒトではオートファゴソーム膜の形成に Atg8 ホモログ (LC3、GABARAP、GABARAPL1、GATE-16) が必須である。今回、これらのタンパク質に着目し、レビー小体病 (LBD) と多系統萎縮症 (MSA) 剖検脳の病理学および生化学的検討を行った。これらのタンパク質は正常対照では神経細胞の胞体に局在していた。一方、LBD ではレビー小体に陽性所見を認め、MSA ではグリア封入体が LC3 強陽性を示した。凍結組織を用いた定量解析の結果、LBD の側頭葉皮質では GABARAP/GABARAPL1 が正常対照と比較し有意に減少していた。MSA の小脳でも LC3、GABARAP/GABARAPL1 および GATE-16 が有意に減少していた。LBD および MSA では、オートファゴソーム膜の形成に異常が生じている可能性が示唆される。

A. 研究目的

オートファジーはオートファゴソーム膜の形成に始まり、細胞にとって有害な分子や不必要となった小器官を取り囲んだ後、リソソームと融合し膜内の物質を分解する現象である。オートファジーの機能不全マウスではユビキチン陽性封入体を伴う神経変性をきたし、運動失調から死に到る。また、ヒトではオートファゴソーム膜の形成に Atg8 ホモログ (LC3、GABARAP、GABARAPL1、GATE-16) が必須である。そこで今回、これらのタンパク質に着目し、レビー小体病 (LBD) および多系統萎縮症 (MSA) 剖検脳の病理学および生化学的検討を行った。

B. 研究方法

LBD 10 例 (Braak PD stage 4-6)、MSA 5 例、正常対照 5 例の前頭葉、側頭葉、基底核、中脳、橋、延髄および小脳のホルマリン固定パラフィン切片を用い、オートファゴソーム関連タンパク質 (LC3、GABARAP、GABARAPL1、GATE-16) に対する抗体を用い免疫組織化学的検討を行った。GABARAP と GABARAPL1 は相同性が高く、今回用いた抗体は両者を認識するため以下 GABARAP/L1 と記載する。

Western blot 解析には、LBD 5 例の側頭葉皮質、MSA 5 例の小脳皮質、正常対照 5 例の側頭葉皮質と小脳皮質を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した剖検脳組織は、研究に用いることに関し文書により家族の同意が得られたものである。また、新潟大学脳研究所からの剖検脳組織は、書類による審査を経て譲渡されたものであり、倫理上問題はない。

C. 研究結果

正常対照脳では LC3、GABARAP/L1、GATE-16 ともに神経細胞の胞体がびまん性に淡く染色された。一方、LBD では脳幹型および皮質型レビー小体が LC3、GABARAP/L1、GATE-16 陽性であった。連続切片を用いた検討では、皮質型レビー小体の 40%、15%、32%がそれぞれ LC3、GABARAP/L1、GATE-16 陽性であった。MSA では、ほとんどのグリア細胞質内封入体 (GCI) が LC3 強陽性、一方、GABARAP/L1 は陰性、GATE-16 は弱陽性であった。

凍結組織を用いたタンパク質定量解析の結果、LBD の大脳皮質では GABARAP/L1 が正常対照と比較し有意に減少していた ($p < 0.05$)。MSA の小脳では、成熟型 LC3、GABARAP/L1 および GATE-16 のタンパク質量が正常対照と比較し有意に減少していた。一方、膜結合型 LC3 および GABARAP/L1 のタンパク質量は MSA では有意に増加していた ($p < 0.05$)。

D. 考察

ヒト培養細胞を用いた検討では、LC3 はオートファゴソーム膜形成の前半部分に関与しており、一方、GABARAP/L1 および GATE-16 はオートファゴソーム膜形成の後半部分を担っていることが報告されている。

今回の免疫組織化学の結果から、LBD および MSA では神経細胞内 (レビー小体) およびグリア細胞内封入体 (GCI) の形成あるいは分解に

オートファジーが関与していることが示唆された。一方、LBD および MSA で認められる封入体は細胞体の多くを占めるものであり、封入体の形成がオートファジーの機能に影響を及ぼしている可能性も否定できない。

さらに、MSA の小脳皮質では膜結合型 LC3 および GABARAP/L1 量が有意に増加していた。膜結合型 Atg8 ホモログはオートファゴソームの数と正の相関を示すことが知られている。これらの所見から、MSA ではオートファゴソーム数が増加している可能性が示唆される。一方、成熟型 LC3、GABARAP/L1 および GATE-16 のタンパク質量は MSA の小脳において減少しており、LBD の大脳皮質でも GABARAP/L1 が正常対照と比較し有意に減少していた。これらの結果から、MSA および LBD では、オートファゴソーム膜の形成に異常が生じている可能性が示唆される。特に MSA においては異常なオートファゴソーム数が増加しており、結果的にオートファジーの機能を抑制している可能性がある。

E. 結論

LBD および MSA では封入体形成にオートファジーが関与していること、特に、MSA ではオートファジーの機能が障害されている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Alteration of autophagosomal protein (LC3, GABARAP/GABARAPL1 and GATE-16) in Lewy

body disease. Neurobiol Dis, 2011; 43:
690-697

- 2) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Hattori M,
Hoshikawa Y, Kono C, Yasui K, Yokoi S,
Hasegawa Y, Kamitani T, Yoshida M,
Wakabayashi K: Ubiquitin-related
proteins in neuronal and glial
intranuclear inclusions in intranuclear
inclusion body disease. Pathol Int,
in press

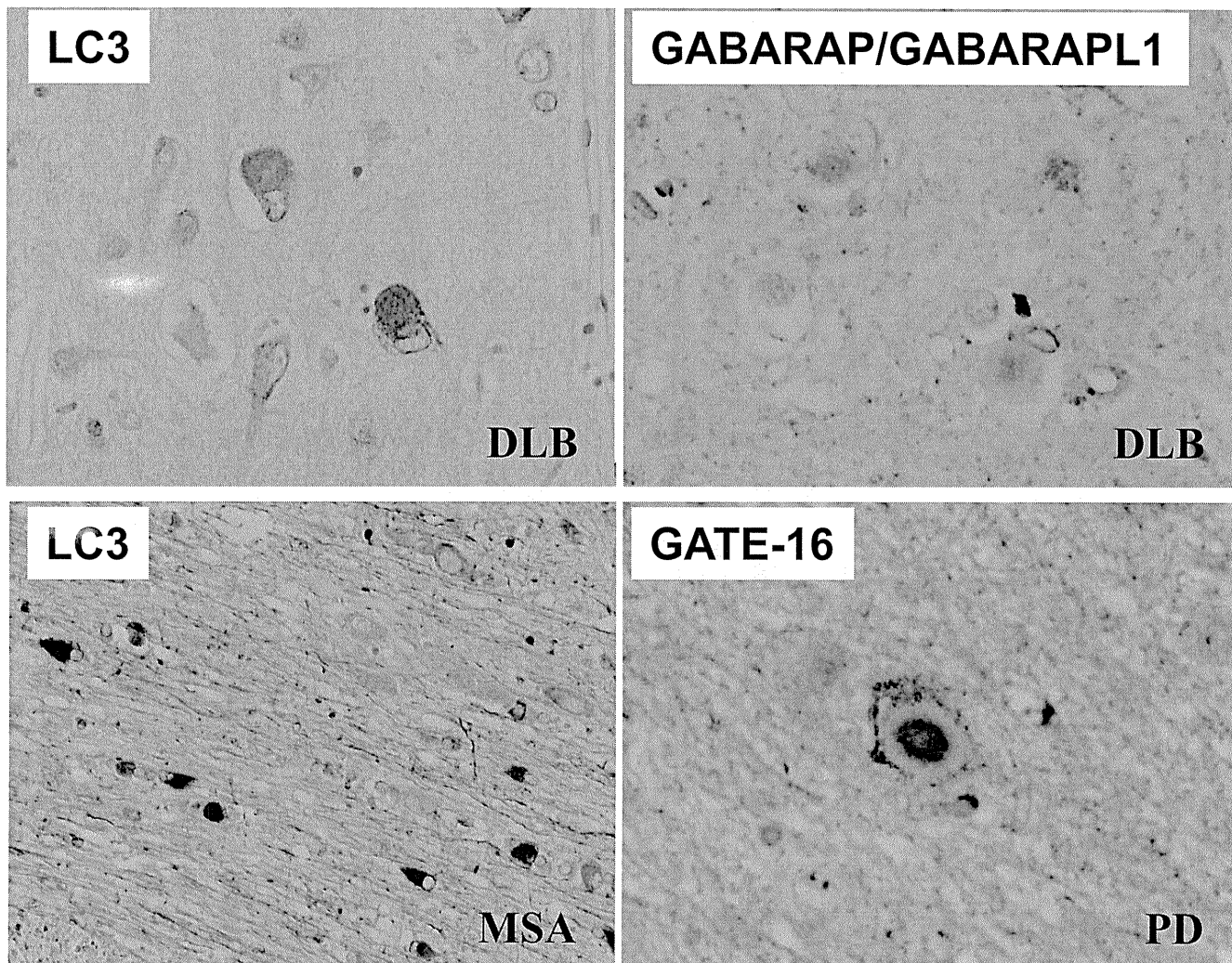
2. 学会発表

- 1) Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H,
Wakabayashi K: Autophagosomal proteins
in alpha-synucleinopathy. 2nd Asian
Congress of Neuropathology, 2011.10.4-6,
Beijin
- 2) 三木康生, 森 文秋, 丹治邦和, 柿田明美,
高橋 均, 若林孝一: ヒストン脱アセチル
化酵素 6 の蓄積はレビー小体およびグリア
細胞質内封入体に特異的である. 第52回日
本神経学会学術大会, 2011年5月18-20日,
名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

該当なし。

オートファゴソーム関連蛋白はPD、DLBおよびMSA において病理学的・生化学的に変動している



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究
分担研究報告

異常タンパク質蓄積をオートファジーによって制御するための標的探索

研究分担者 貫名 信行 (独) 理化学研究所 構造神経病理研究チーム)
共同研究者 松本 弦 (独) 理化学研究所 構造神経病理研究チーム)
和田 浩司 (同上)、奥野弥佐子 (同上)、黒澤大 (同上)

研究要旨

ポリグルタミン病の病態制御には異常伸長ポリグルタミン産物の量を減少させることが必要である。そのために我々は分解系に注目し、選択的オートファジーを亢進することにより、異常ポリグルタミンの分解を促進できないかと考えている。我々は選択的オートファジーの制御分子である p62 に関して、その S403 のリン酸化により、ユビキチン化タンパク質との結合を増し、その分解が亢進することを見出した。さらに異常ポリグルタミン凝集もこのリン酸化によって減少することから p62 のリン酸化が異常タンパク質凝集制御の分子標的となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の病態は、病因遺伝子の CAG リピートの伸長に基づくその遺伝子産物のポリグルタミンの伸長と凝集、核内封入体の形成、神経細胞変性、神経細胞死の過程が考えられており、それぞれの段階で病態の進展を阻止することで、発症の予防や疾患の進展を抑制できると考えられる。われわれはシャペロン介在性オートファジー(CMA)を用いて伸長ポリグルタミン特異的に分解を促進する方法を開発し報告した(Bauer et al Nat Biotech 2010)。この結果によって異常タンパク質の分解を促進することの病態改善に対する意義が明らかになったが、さらに分解を制御するための標的探索をめざした。本研究では昨年度に続き我々がすでにポリグルタミン封入体と結合している p62(Nagaoka et al J Neurochem 2004)について、最近この分子が選

択的オートファジーの制御分子と考えられていることから、本分子による選択的オートファジーの制御メカニズムの解析を行った。

B. 研究方法

細胞をプロテアソーム阻害剤処理した際に p62 の電気泳動上の移動度が変化することから、翻訳後修飾の存在を想定し、プロテアソーム阻害剤処理した Neuro2a 細胞から p62 を精製し、質量分析により、翻訳後修飾を同定した。これによって翻訳後修飾であるリン酸化の部位を同定、このリン酸化部位に対する抗体を作成した。作成した抗体により、プロテアソーム処理や、オートファジー処理によるリン酸化 p62 の変化を検討した。オートファジーによる分解に関連すると同定したリン酸化部位 S403 に対する変異体 S403E, S403A について sequestosome 形成に対する影響を検討した (以上昨年度)。

今年度はさらに S403 リン酸化に伴う p62 とポリユビキチンとの結合を検討した。また S403 をリン酸化するキナーゼ候補、カゼインキナーゼ 2 (CK2) について S403 をリン酸化するかどうかを特異抗体によって検討した。さらにこの部位のリン酸化による異常ハンチンチンの凝集への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換えに該当する。独立行政法人理化学研究所の遺伝子組み換え実験計画の承認を受けた。

C. 研究結果

リン酸化部位として S24, S207, T269, S272, S282, S332, S366, S403 を同定した。このうち S403 のリン酸化がプロテアソーム阻害によって誘導され、オートファジー阻害によっても増加した。S403 リン酸化 p62 は p62 body を多く形成した。また ATG5 KO マウス脳においても蓄積が認められた。P62 body に関する FRAP (光褪色後蛍光回復法) 解析を行ったところ、S403E 変異体 (リン酸化類似体) は sequestosome において安定化していることが示唆された。また S403 リン酸化はポリユビキチンとの結合を増すことを S403E 変異体や細胞内でリン酸化された p62 によって示した。

CK2 によって p62S403 は *in vitro* でリン酸化されること、またその阻害剤が細胞内でこのリン酸化を減少することなどを見出し、CK2 が S403 のリン酸化酵素の一つであることを示した。

さらに CK2 発現や脱リン酸化酵素阻害剤によってポリグルタミン発現細胞を処理するとポリグルタミン凝集体の形成が減少することを見出し、p62S403 のリン酸化によって選択的オートファジーが促進され、異常タンパク質の分解が促進することが示された。

D. 考察

P62 は選択的オートファジーの制御分子であり、我々はポリグルタミン病の核内封入体に結合していることを報告している。今回の研究で p62 はリン酸化修飾をいくつかの部位において受けており、特に S403 のリン酸化がプロテアソーム阻害、オートファジー阻害によって増強することを示した。S403 リン酸化によって、p62 とポリユビキチン化タンパク質との結合が増強することによって、p62 を含む封入体 sequestosome は安定化し、オートファジーを促進する。このリン酸化酵素の一つは CK2 であること、さらにこの部位をリン酸化することで異常ハンチンチンの凝集が減少することから、p62S403 のリン酸化が選択的オートファジーを促進し、異常タンパク質の除去を促進することを示した。この結果は p62 がポリグルタミン病の病態制御の新たな分子標的であることを示した (Matsumoto et al Mol Cell 2011)。

E. 結論

ポリグルタミン病の病態制御を異常タンパク質分解促進によって行うために、選択的オートファジーの制御機構を明らかにし、p62S403 リン酸化がポリグルタミン病治療の分子標的となり得る可能性を示した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bauer PO, Hudec R, Ozaki S, Okuno M, Ebisui E, Mikoshiba K & Nukina N: Genetic ablation and chemical inhibition of IP3R1 reduce mutant huntingtin aggregation.

Biochem Biophys Res Commun, 2011: 416:
13-17

- 2) Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M & Nukina N: Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. Mol Cell, 2011; 44: 279-289
- 3) Doi H, Yoshida K, Yasuda T, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y & Matsumoto N: Exome Sequencing Reveals a Homozygous SYT14 Mutation in Adult-Onset, Autosomal-Recessive Spinocerebellar Ataxia with Psychomotor Retardation. Am J Hum Genet, 2011; 89: 320-327

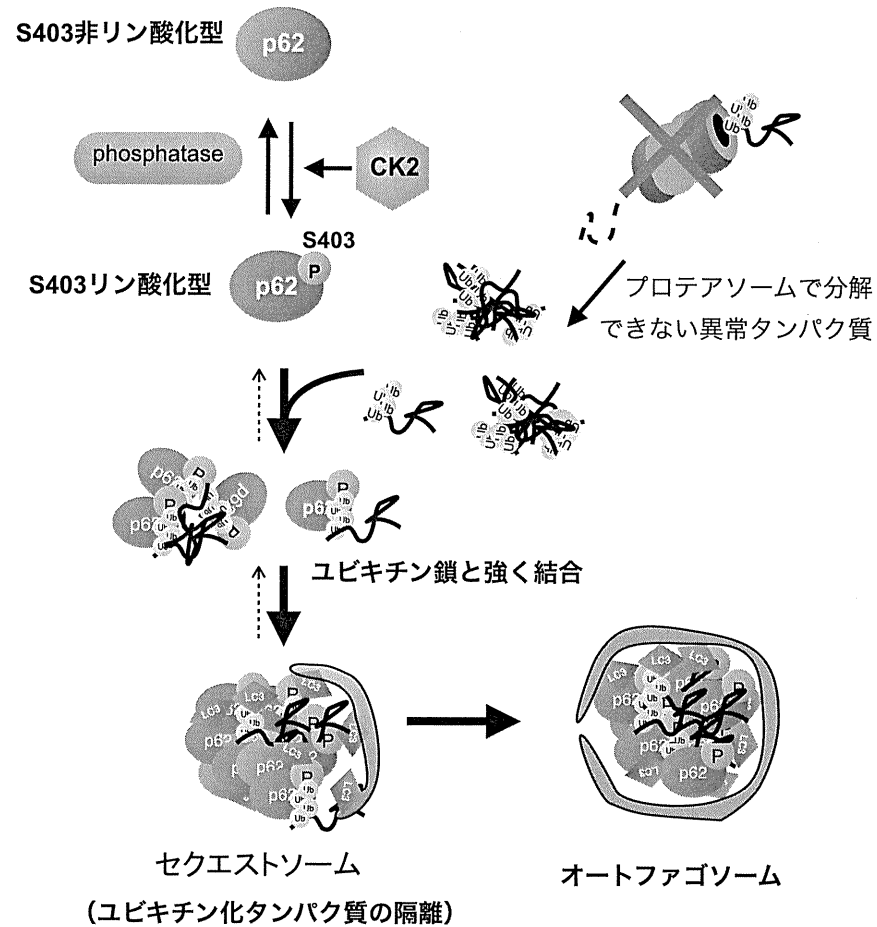
2. 学会発表

- 1) Nukina N: Enhancing the clearance of misfolded polyglutamine proteins. 2011 Gordon Research Conferences on CAG Triplet Repeat Disorders, 2011.6.5-10, Lucca (Barga), Italy.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

なし

異常タンパク質分解制御メカニズムの発見



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

分担研究報告

脊髄小脳失調症 31 型における (TGGAA)_n・(UGGAA)_n 結合蛋白の探索

研究分担者 吉田邦広 (信州大学神経難病学講座分子遺伝学部門)

共同研究者 鈴木佳代、石川えり (信州大学ヒト環境科学研究支援センター)

小柳清光 (信州大学神経難病学講座分子病理学部門)

池田修一 (信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

研究要旨

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) の分子病態を解明するために、SCA31 挿入変異の中核をなす (TGGAA)_n・(UGGAA)_n に結合する蛋白の同定を試みた。現在までに (TGGAA)_n に結合する候補蛋白として 37 kDa 強の蛋白を 6 つ、(UGGAA)_n に結合する候補蛋白として 75 kDa 弱の蛋白を 1 つ同定した。現在、これらがランダム・ヒットではない、真の (TGGAA)_n・(UGGAA)_n 結合蛋白かどうか、さらに SCA31 の分子病態にどのように関与するかを検証している。

A. 研究目的

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) は本邦に高頻度に見られる常染色体優性遺伝性の純粋小脳型失調症である。SCA31 は両方向性に転写される *BEAN*、*TK2* のイントロン内への (TGGAA)_n / (TTCCA)_n を含む挿入変異が原因とされる。その病的機序として筋強直性ジストロフィーに類似した toxic RNA gain-of-function が想定されているが、詳細は不明である。そこで SCA31 の発症機序、分子病態を明らかにする手がかりを得るため、挿入変異の中核をなす (TGGAA)_n・(UGGAA)_n に結合する蛋白の同定を試みた。

B. 研究方法

C57BL/10 マウス脳の抽出物 (600 x g、10 分の遠心にて沈渣を核画分、上清を非核画分とした) を試料として、ビオチンラベルした (TGGAA)₅DNA プローブ、(UGGAA)₅RNA プローブを

用いて South-western、North-western blot を行った。まず通常の western blot に準じて、一次元でのゲル電気泳動、ニトロセルロース膜、あるいは PVDF 膜への転写を行った。転写後の膜は 6M から順次段階的に 0.2M まで希釈した塩酸グアニジン溶液に浸して再生を行った。再生後の膜は 5%ウシ血清アルブミンでブロッキングの後、5 μg/ml の仔ウシ胸腺 DNA とともに上記のプローブと反応させた。洗浄後の検出は BrightStar®BioDetect™ Nonisotopic Detection kit (Ambion) を用いて行った。

二次元電気泳動は非核画分を用いて行った。泳動後の South-western、North-western blot は一次元電気泳動後と同一の条件で行った。蛋白染色した二次元電気泳動ゲルを現像フィルムと重ね合わせ、陽性スポットを切り出した。その後、脱色・脱水、還元・アルキル化の後にトリプシンでゲル内消化した。回収した消化液

は減圧乾固した後に nanoLC-MS/MS 解析を行った。データベース検索は Mascot (Matrix Science)、ProteinLynx (Waters) を用いた。

C. 研究結果

一次元電気泳動ゲルによる (TGGAA)₅ プローブを用いた South-western blot では、150-100 kDa、75 kDa 弱、37 kDa 強の 3 本のバンドが明瞭に見られた。一方、(UGGAA)₅ プローブを用いた North-western blot では、South-western blot で見られた 150-100 kDa、75 kDa 弱のバンドとほぼ同等のサイズのバンドが確認されたが、37 kDa 強に相当するバンドは明瞭ではなかった。また 150-100 kDa、75 kDa のバンドは核画分、非核画分いずれにも同等に見られたが、37 kDa 強のバンドは明らかに非核画分に有意に見られた。

二次元電気泳動ゲルの South- および North-western blot ではそれぞれのサイズに相応する数個のスポットが連続して数珠状に見られた。nanoLC-MS/MS 解析では各スポットに対して、数個の候補蛋白が同定された。

そのうち North-western blot で検出された 150-100 kDa のスポットは pyruvate carboxylase と同定された。同じく 75 kDa 弱のスポットから 2 つの蛋白が同定されたが、1 つは propionyl-CoA carboxylase (α subunit) と考えられた。もう 1 つは神経細胞の分化・増殖、軸索輸送など多彩な神経機能に関連する蛋白であった。また South-western blot で見られた 37 kDa 強のスポットに対応して Protein Sequence Cover > 20% の条件で 6 つの蛋白が同定された。

D. 考察

上記の pyruvate carboxylase, propionyl-CoA

carboxylase (α subunit) はいずれもミトコンドリア蛋白であり、補酵素としてビオチンを利用することからプローブにラベルしたビオチンと結合した可能性が考えられた。蛋白同定の精度を高めるために、プローブの改良 (ビオチン以外のラベル)、試料や泳動条件の検討、などが必要と思われる。併行してすでに同定された他の候補蛋白については、データベース上いずれもビオチンとの結合は知られていない。これらの蛋白については、標品を用いた核酸-蛋白結合能の再検証などにより、ランダム・ヒットの可能性を除外する必要がある。ランダム・ヒットの可能性が否定されれば、さらに実際の SCA31 患者細胞での増減や既報で示された RNA foci への共局在の有無、他の蛋白との相互作用、などを検討する予定である。

SCA31 では (TGGAA)_n (逆方向は (TTCCA)_n) の挿入変異から転写された (UGGAA)_n (逆方向は (UUCCA)_n) を含む pre-messenger RNA が核内に蓄積し、あるいは細胞質内へ移行して、何らかの蛋白と相互作用し、神経毒性を発揮する可能性がある。このような蛋白の同定は SCA31 の発症機序、分子病態の理解に重要と考えられる。

E. 結論

SCA31 の発症機序や分子病態を理解するためには、病因的な意義が大きいとされる (TGGAA)_n · (UGGAA)_n (逆方向の (TTCCA)_n · (UUCCA)_n) への結合蛋白を同定することは不可欠と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doi H, Yoshida K, Yasuda T, et al: Exome sequencing reveals a homozygous SYT14 mutation in adult-onset, autosomal - recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. Am J Hum Genet, 2011; 89: 320-327

2. 学会発表

- 1) 吉田邦広, 宮崎大吾, 日根野晃代, ら: 脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) 患者の末梢血白血球を用いた網羅的遺伝子発現解析. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日, 名古屋
- 2) 土井宏, 吉田邦広, 三宅紀子, ら: 次世代シーケンサーを用いた常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症責任遺伝子の単離研究. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 19 日, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし