

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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班 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

（順天堂大学大学院医学研究科、理化学研究所視床発生研究チーム）

共同研究者 黒澤 大、松本 弦（理化学研究所視床発生研究チーム）

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。我々は一昨年度選択的オートファジーの制御因子として p62 の S403 のリン酸化を報告した。本年度は p62 の欠損および Atg5 の欠損がポリグルタミン病マウスの寿命、病理に及ぼす影響を検討した。ポリグルタミン病モデルマウスの寿命においては p62 欠損によってポリグルタミン伸長依存性に寿命の延長を認めた。その原因として細胞質における選択的オートファジーの障害が凝集を促進し、核移行を阻害し、核内での毒性が減少したためと考えられた。Atg5 の欠損によっては同様に細胞質凝集増加を認めたが、寿命は短縮した。これはオートファジー全般の障害による病態悪化のためと考えられた。

A. 研究目的

我々がすでにポリグルタミン封入体と結合していることを報告している 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、p62 による選択的オートファジー制御メカニズムの解析を行い、一昨年度 p62 S403 のリン酸化が選択的オートファジーを促進することを報告した(Matsumoto et al. Mol Cell 2011)。本年度は p62 のノックアウトの影響をポリグルタミン病モデルマウスを用いて検討した。その結果モデルマウスの寿命に paradoxical に良い影響を認めたため、そのメカニズムを

Atg5 のノックアウトの影響や、細胞レベルでの p62 欠損の影響を検討することで明らかにした。

B. 研究方法

1) p62 ノックアウトマウス(Komatsu et al Cell 2007)とハンチントン病モデルマウス R6/2,HD190QG (Kotliarova J Neurochem 2005),また HD190QG からリポートの縮小を起こしたものを選択して確立した HD120QG を掛け合わせ、それぞれのモデルマウスで p62 ノックアウトの影響を寿命、病理学的に検討した。
2) これらの遺伝子改変マウスのトランスクリプトーム解析を行った。

3) オートファジー全般を阻害したときの影響を見るため、Atg5 のノックアウトマウスと R6/2 の掛け合わせを行い、その寿命、病理への影響を検討した。

4) p62KO の MEF 細胞に対し、核外移行シグナル、核内移行シグナルをつけた HD106-NES-RFP, HD106-NLS-RFP を発現し、さらに P62 を発現したときの影響を検討した。

(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

1) R6/2 は 120-133 CAG repeats であるが、p62 のノックアウトによって寿命は 26%延長した。また HD190QG (190 repeats) とこれからリピートの縮小したラインである HD120QG における p62 のノックアウトの影響は前者が 44%、後者が 27%の寿命延長の影響が認められ、これらのマウスでも p62 のノックアウトは寿命の延長を認め、その効果はリピートの長い方で強い傾向が認められた。これらの p62 をノックアウトしたマウスでは細胞質の封入体の増加を認め、核内封入体の減少を認めた。

2) この「改善」傾向の影響が遺伝子発現においても認められるかどうかを検討するため、R6/2 マウスの p62 ノックアウトの影響をトランスクリプトーム解析を行って検討した。遺伝子発現への p62 自体の影響は極めて少なかった。一方伸長ポリグルタミンの発現による遺伝子発現への影響は大きく、p62 ノックアウトによ

って、その数はあまり変わりなかった。よく知られている伸長ポリグルタミン発現によって変化する遺伝子について定量 PCR によって発現を検討したが、これらの遺伝子発現にはあまりはっきりした改善を認めなかった。

3) 選択的オートファジー阻害によって細胞質封入体の増加、核内封入体の減少が認められる原因が細胞質のオートファジー阻害によることを確認するため、R6/2 において Atg5 をノックアウトした。このマウスにおいても細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少した。しかしながら寿命においては Atg5 ノックアウトによって短縮傾向を認めた。

4) p62 ノックアウトの MEF 細胞に対し、HD106-NES-RFP, HD106-NLS-RFP を発現すると、それぞれ細胞質封入体、核内封入体を形成したが、これに p62 を発現すると、HD106-NES-RFP においてのみ、封入体形成に差を認めた。

D. 考察

ポリグルタミン病モデルマウスにおいてオートファジー分解系を阻害した影響を p62 ノックアウト、Atg5 ノックアウトによって検討した。どちらの条件においても核内封入体は減少し、細胞質封入体が増加したことは、オートファジー分解系が細胞質で機能するため、これらのマウスでは細胞質での異常タンパク質の分解が阻害され、細胞質での凝集を促進し、核内移行が減少したと考えられる。このことは p62 ノックアウト MEF 細胞を用いた実験結果によっても支持され、核外移行シグナルを持ったポリグルタミン発現

のみ、凝集体形成に大きな影響を受けている。P62 ノックアウトによって paradoxical な病態改善をみたことは選択的オートファジーにおいては阻害される分子種が限られているため、病態増悪よりも、核内封入体減少による改善の影響が強く出たものと考えられる。一方 Atg5 のノックアウトでは全般的なオートファジー阻害のため増悪因子が増加したものと考えられる。

遺伝子発現異常はポリグルタミン病病態の特徴であるが、p62 のノックアウトによって大きな改善は認められなかった。この点で寿命延長は認められたものの病態改善は不完全であり、核内封入体は減少したとはいえ、感受性のある遺伝子の変化は少なかったことから、病態自体は完全には抑制されていないものと考えられた。

E. 結論

異常伸長ポリグルタミン含有タンパク質の細胞質における凝集促進が核内封入体の減少をもたらし、病態一部改善をもたらすことができる。

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) Maheshwari M, Bhutani S, Das A, Mukherjee R, Sharma A, Kino Y, Nukina N & Jana NR: Dexamethasone induces heat shock response and slows down disease progression in

mouse and fly models of Huntington's disease. Hum Mol Genet (2014)

- 2) Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Akimoto K, Hirose T, Ohno S, Hattori N, Nukina N: Loss of aPKC λ in Differentiated Neurons Disrupts the Polarity Complex but Does Not Induce Obvious Neuronal Loss or Disorientation in Mouse Brains. PLoS One 2013; 8: e84036
- 3) Furukawa Y, Nukina N: Functional diversity of protein fibrillar aggregates from physiology to RNA granules to neurodegenerative diseases. Biochim Biophys Acta 2013; 1832: 1271-8
- 4) 貫名信行: 【神経変性疾患-研究と診療の進歩】 神経変性疾患の病態機序の解明 Proteinopathy からみた神経変性疾患の病態機序. 医学のあゆみ 2013; 247: 395-9
- 5) 松本弦, 貫名信行: Basic Neuroscience 生化学(分子生物学) p62 リン酸化とオートファジー. Annual Review 神経 2013; 2013: 29-36

2. 学会発表

- 1) 貫名信行: 老化関連疾患における異常タンパク質除去機構の解明. 文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「高次神経機能障害の発症メカニズム解明と新規治療法の開発」第1回公開シンポジウム in 京都(同志社大学京田辺キャンパス) (2013/10/05)

- 2) 紀嘉浩 , 貫名信行: 神経疾患におけるタンパク質・RNA 凝集体の意義.
Protein/RNA aggregation in neurological disorders.
Neuro2013(第36回日本神経科学大会)
in 京都(国立京都国際会館)
(2013/06/20-23)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

オートファジー制御と凝集体

