

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23111002

研究課題名（和文）タンパク分解系障害による脳内環境変調と神経変性メカニズム

研究課題名（英文）Disturbance of brain environment by impairment of proteolysis leading to neurodegeneration

研究代表者

高橋 良輔（Takahashi, Ryosuke）

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90216771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 165,200,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は筋委縮性側索硬化症（ALS）へのたんぱく分解障害の関与を探った。運動ニューロン特異的に26Sプロテアソームを欠損させたマウスでは臨床的にも病理学的にもヒトのALSにきわめて類似した病像を示した。対照的に運動ニューロン特異的にオートファジーを欠損させたマウスでは細胞死は観察されず、運動機能障害も認められなかった。以上より、ALSの病因にプロテアソーム障害が関与する可能性が強く示唆された。また、リソソーム病であるゴーシェ病の病因遺伝子GBA変異がパーキンソン病のリスク遺伝子であることからメダカのゴーシェ病モデルを作成したところ、行動異常と脳内に神経炎症およびシヌクレイン凝集体蓄積を認めた。

研究成果の概要（英文）：We show that impairment of the ubiquitin-proteasome system, but not the autophagy-lysosome system in motor neurons replicates ALS in mice. Conditional knock-out mice of the proteasome subunit Rpt3 in a motor neuron-specific manner (Rpt3-CKO) showed locomotor dysfunction and typical ALS cytopathology. On the other hand, motor neuron-specific knock-out of Atg7 (Atg7-CKO), only resulted in no TDP-43 or FUS pathologies or motor dysfunction was observed. These results strongly suggest that proteasomes, but not autophagy, fundamentally govern the development of ALS. Recent genetic studies have revealed that GBA mutations confer a strong risk for sporadic Parkinson's disease (PD). To investigate how GBA mutations cause PD, we generated GBA knockout medaka that are deficient in glucocerebrosidase activity. Pathological findings represented lysosomal abnormalities in neurons and alpha-synuclein accumulation in axonal swellings, linking GBA mutation and pathogenesis of PD

研究分野：神経内科学

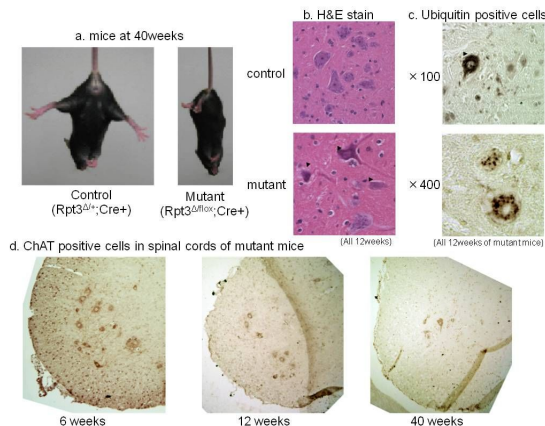
キーワード：ALS Proteasome Autophagy Medaka Gaucher disease GBA Lysosome Alpha-synuclein

1. 研究開始当初の背景

遺伝性神経変性疾患の主要なものはその責任遺伝子が同定され、解析が進んだ結果、原因遺伝子産物のタンパク質の構造が変異により異常化し蓄積するコンフォメーション病であることが明らかになってきた。一方家族性疾患の変異遺伝子産物である  $\alpha$ -シヌクレイン、タウ、TDP-43 などが、孤発性疾患にも共通して蓄積することが判明し、遺伝性疾患と孤発性の疾患で共通する病因の存在が強く疑われるようになった。タンパク質の分解障害仮説は孤発性神経変性疾患の有力な病態仮説である。

2. 研究の目的

我々はこれまでに家族性パーキンソン病 AR-JP の病因遺伝子 Parkin がユビキチンリガーゼであることを見出し、Parkin の欠損によるタンパク質分解システムの破綻が異常膜タンパク質の蓄積を介して小胞体ストレスを惹起し、AR-JP を発症させるとの証拠を得た (J Biol Chem 1999, Cell 2001, Neuron 2003, Hum Mol Genet 2007, J Neurochem 2008)。また遺伝性 ALS の原因遺伝子である変異 SOD1 タンパク質がプロテアソーム分解能を低下させる性質があることを明らかにした (J Neurochem 2002, 2004)。本研究では運動ニューロンにおけるユビキチンプロテアソーム系 (UPS) の破綻をタンパク質分解障害仮説に基づく孤発性 ALS のモデルとみなし、異常タンパク質の神経細胞内蓄積が如何にして脳内環境に変調を来し、神経変性至るのか、その分子基盤を明らかにする。また我々は、核内に存在する TDP-43 が病的構造に転化する構造背景を明らかにすることを目標とする。そのために、TDP-43 の重要な機能ドメインであり、これまでに NMR 用いたや結晶解析によって立体構造が判明している RNA 認識モチーフに着目して、NMR や質量解析、さらには病原構造特異認識モノクローナル抗体の作製を通じて分子構造病態を解明し、病原構造の診断や分子標的治療への道筋を作り、さらに病原型



Rpt3-KO マウス。a.運動障害, b.前角細胞の減少, c.ユビキチン化封入体 d.進行性運動ニューロン死(Tashiro, JBC, 2012) 図 1

TDP-43 の分解系に関わる分子の同定を目指す。

パーキンソン病研究については、そのリスク遺伝子として同定されたグルコセレブロシダーゼ (GBA) 遺伝子の機能不全が脊椎動物においてパーキンソン病を再現しうるかを検証した。対象動物としてジーンターゲットイングと解析が容易なメダカを用いた。

3. 研究の方法

1) Cre-lox システムによって、26S プロテアソームの Rpt3 サブユニットを運動ニューロン特異的にノックアウトすることができる floxed Rpt3 マウスを作製し、進行性に運動機能障害を生じる運動ニューロン病マウスモデルの樹立に成功した (図 1)。このマウスを病理学的、行動学的に詳細に解析した。

さらに UPS 機能不全によって誘発される運動ニューロン内の有害事象を明らかにするため、脊髄運動ニューロンの遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイで検討した。

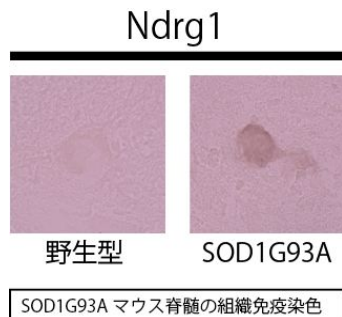
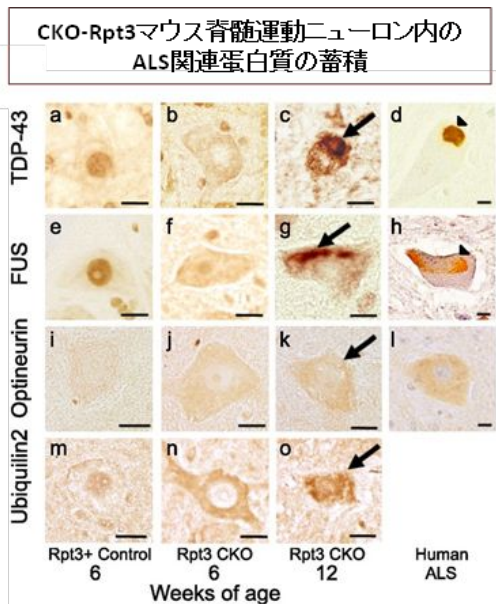
2) ミスフォールド型 TDP-43 において分子外に露出するアミノ酸を、過去の結晶解析を用いた論文の結果より E246/D247 と類推し、モノクローナル抗体を作成した。さらに RRM1 組み換え蛋白質を安定同位体を用いて作出し、高圧力 NMR 解析をしたミスフォールディングに関わる局所構造の同定を試みた。さらに組み換え TDP-43 蛋白質と in vitro ubiquitination を組み合わせ、TDP-43 のユビキチンリガーゼを質量解析によって同定した。

3) Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) 法にて GBA 欠失メダカを作製し、表現型を解析した。また、Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) にて  $\alpha$ -syn 欠失メダカを作製し、GBA 欠失メダカと交配し表現型を解析した。

4. 研究成果

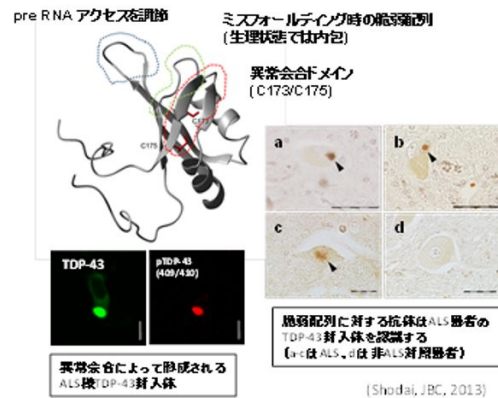
1) タンパク分解障害と ALS における運動ニューロン変性の関与を明らかにするために作製した、VaChT-Cre-Rpt3 KO マウス (Rpt3-CKO マウス) の行動病理解析を更に詳細に進めた結果、ALS 患者で出現する多くの封入体の出現に加え、進行性の四肢筋萎縮と筋力低下を呈し、ミクログリアやアストロサイトの病巣への集積、運動ニューロン死を伴う等 ALS と類似した表現型を示すことが判明した。興味深いことに、Cre の発現が終了する 5 週目以降、少なくとも 20 週にわたって神経変性が進行しており、一旦変性した運動ニューロンから放出される毒性因子の作用によって細胞死が完結し、またその死細胞から放出される因子によって変性が拡大することが示唆された。一方細胞内の主要な

タンパク質分解系であるオートファジーを運動ニューロン特異的にノックアウトさせたマウスを作製し、表現型解析を行ったところ、ユビキチン化封入体やP62等のオートファジー関連タンパク質の蓄積を認めたものの、運動麻痺や運動ニューロン変性は全く認めず、ALS病態にはプロテアソームを介したタンパク質分解が直接的に関与することを、動物を用いて初めて証明し、新たな孤発性ALSのモデルマウスを確立した。(図)



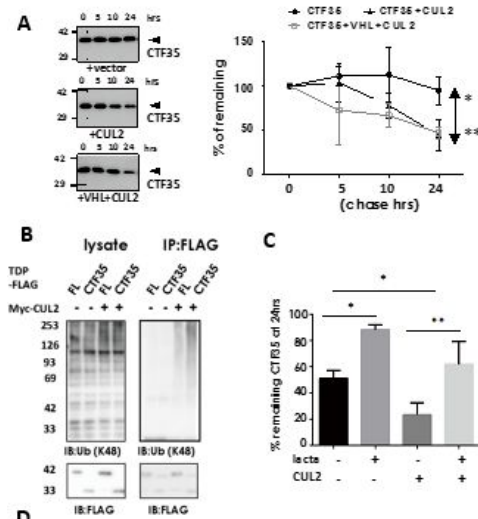
また、東北大学・青木教授との共同研究で骨格で特異的にプロテアソームを欠損するマウスを作成し、運動ニューロン同様にTDP-43が筋肉に蓄積する封入体筋炎様の表現型を得ている(Kitajima Y, et al. J Cell Sci, 2014)。

2) TDP-43のRNA結合ドメイン(RRM1, RRM2)の構造解析により、病原構造に至る責任ドメインを明らかにし、RNA結合ドメインの特定のアミノ酸に対するモノクローナル抗体の開発に成功した。さらにRRM1ドメインの特定のシート構造がストレス下のTDP-43の異常会合に寄与することを明らかにし、RRM1ドメインの異常会合がTDP-43プロテオパチーの多くの細胞病理学的再現することから、TDP-43病原性獲得の分子基盤である可能性を指摘しin vitroの新たなALSのモデルを確立した。(図)

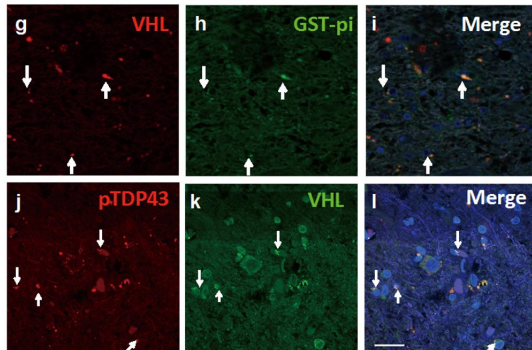


(左)TDP-43のRRM1における異常会合部位とシステイン残基修飾による病原性封入体の再現。(右)RRM2の二量体会合に対するモノクローナル抗体によるALS患者TDP-43封入体の染色。

さらに我々はTDP-43のユビキチンリガーゼの候補としてCUL2複合体を同定した。(図)



CUL2複合体の基質認識蛋白質である von Hippel-Lindau 蛋白質 (VHL) は、ミスフォールドしたTDP-43を認識すること、さらに異常切断断片をユビキチン化し、プロテアソームで分解することを証明した。またVHLがオリゴデンドロサイトのTDP-43封入体形成に関わっていることを発見した(図, Uchida Sci Rep 2016)。



Pulse-chaseアッセイ: CUL2はCTF35の分解(A)、ユビキチン化(B)を促進し、プロテアソーム阻害薬はそれを抑制する(C)。D. ALS患者脊髄のVHLはオリゴデンドロサイト(GST-pi)に存在しpTDP43と共局在する。

3) TILLING 法にて作出した GBA 欠失メダカの表現型解析を行った。GBA 欠失マウスは出生間もなく致命的となり解析が困難であるのに対し、GBA 欠失メダカは月単位で生存し、病態の観察が可能であった。GBA 欠失メダカは 2 ヶ月齢で行動異常を示し、5 ヶ月齢までに死亡した。メダカを用いた研究では、利用可能な抗体が乏しいことが問題となるが、メダカ  $\alpha$ -syn に対する抗体を作製し、免疫染色にて脳内に  $\alpha$ -syn が蓄積することを見出した(図)。

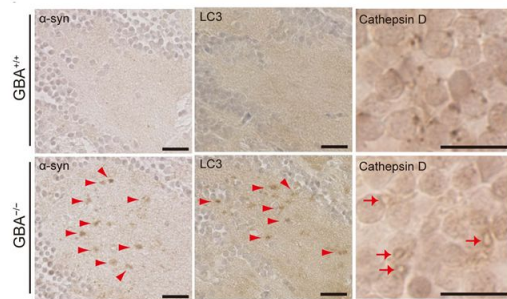


図.  $GBA^{+/+}$ メダカ脳免疫染色像。

また、オートファゴソームとリソソームを検出可能な抗体を発見し、これらの異常を免疫組織学的・生化学的に観察した(図)。

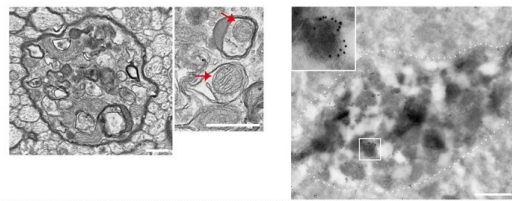


図. (左)  $GBA^{+/+}$ メダカ脳電顕像。軸索の腫脹と内部にオートファゴソームの蓄積を認める。オートファゴソーム内部に時にミトコンドリアを認める。(右)  $GBA^{-/-}$ メダカ  $\alpha$ -syn 免疫電顕像。軸索腫脹部に一致してメダカ  $\alpha$ -syn の蓄積を認める。

これらは、透過型電顕による解析で、リソソーム内に異常構造物が蓄積し、軸索にオートファゴソームが蓄積している所見と矛盾しなかった(図)。

また、メダカ  $\alpha$ -syn 抗体を用いた免疫電顕を行ったところ、オートファゴソームが蓄積した軸索に一致して  $\alpha$ -syn が蓄積していることが確認できた(図2)。この所見に関しても、LC3 抗体とメダカ  $\alpha$ -syn 抗体を用いた蛍光二重染色にて、オートファゴソームと  $\alpha$ -syn の蓄積部位が一致することが確認できた。さらに、免疫組織染色と in situ ハイブリダイゼーションにて非選択的な神経細胞死とミクログリアの増生を見出した。次に、 $\alpha$ -syn 欠失( $\alpha$ -syn<sup>-/-</sup>)メダカを TALENs にて作製した。同変異メダカは翻訳開始部位の直後に 11 塩基欠失を持ち、フレームシフト変異によって  $\alpha$ -syn を欠失している。この変異メダカを GBA 変異メダカと交配し、GBA/ $\alpha$ -syn 二重欠失メダカを解析したが、生存期間、神経細胞脱落の程度は変化せず、本モデルにおける  $\alpha$ -syn 蓄積の病態への関与は確認できなかった(図5)。一因として、GBA 欠失メダカにおいてはゴーシェ病としての表現型が強く、 $\alpha$ -syn 蓄積毒性が確認しにくくなっている可能性を考えた。GBA 欠失メダカと GBA/ $\alpha$ -syn 二重欠失メダカを解析した成果は論文として発表した(Uemura N, et al. PLoS Genetics 2015)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

1. Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto Y, Takahashi R, Ito H. (2012) An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology*. 77:1993-5. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31823a0cf c. Epub 2011 Nov 16.
2. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H.(2012) Drug Screening for ALS Using

- Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med.* 4:145ra104. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005697.
3. Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, Tanaka K, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Ito H, Takahashi R. (2012) Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem.* 287:42984-94. DOI: 10.1074/jbc.M112.417600. Epub 2012 Oct 24.
  4. Wada T, Goparaju SK, Tooi N, Inoue H, Takahashi R, Nakatsuji N, Aiba K. (2012) Amyotrophic lateral sclerosis model derived from human embryonic stem cells overexpressing mutant superoxide dismutase 1. *Stem Cells Transl Med.* 1(5):396-402. DOI: 10.5966/sctm.2011-0061. Epub 2012 May 8.
  5. Shodai A<sup>1</sup>, Ido A, Fujiwara N, Ayaki T, Morimura T, Oono M, Uchida T, Takahashi R, Ito H, Urushitani M. (2012) Conserved acidic amino acid residues in a second RNA recognition motif regulate assembly and function of TDP-43. *PLoS One.* 7(12):e52776. DOI: 10.1371/journal.pone.0052776. Epub 2012 Dec 26.
  6. Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M. (2013) Aberrant assembly of RNA-recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) *J Biol Chem.* 288:14886-14905. DOI:10.1074/jbc.M113.451849
  7. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. (2013) "Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration." *Brain.* 136:1371-82. DOI: 10.1093/brain/awt029.
  8. Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, Takahashi R. (2013) Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway. *J Neurochem.* 126:699-704. DOI: 10.1111/jnc.12326. Epub 2013 Jun 17. PMID:23721573
  9. Oono M, Okado-Matsumoto A, Shodai A, Ido A, Ohta Y, Abe K, Ayaki T, Ito H, Takahashi R, Taniguchi N, Urushitani M. (2013) Transglutaminase 2 accelerates neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis through interaction with misfolded superoxide dismutase 1. *J Neurochem.* DOI: 10.1111/jnc.12441. [Epub ahead of print] PMID:24032595 [PubMed - as supplied by publisher]
  10. Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, Takao K, Komine O, Endo F, Miyakawa T, Misawa H, Takahashi R, Kinoshita M, Yamanaka K. (2014) SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Mol Brain.* 7:62. DOI: 10.1186/s13041-014-0062-1.
  11. Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H. (2014) Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice. *Stem Cell Reports.* 2014 Aug 12;3(2):242-9. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.05.017. Epub 2014 Jun 26.

12. Matsui H, Uemura N, Yamakado H, Takeda S, Takahashi R.(2014) Exploring the pathogenetic mechanisms underlying Parkinson's disease in medaka fish. *J Parkinsons Dis.* 4(2):301-10. DOI: 10.3233/JPD-130289.
13. Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, Urushitani M, Nagatomi R, Takahashi R, Aoki M.(2014) Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci.* 2014 Dec 15;127(Pt 24):5204-17. doi: 10.1242/jcs.150961. Epub 2014 Nov 6.
14. Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H, Takahashi R (2015) Viable neuronopathic Gaucher disease model in Medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. *PLoS Genet.*, 2015 Apr 2;11(4):e1005065. doi: 10.1371/journal.pgen.1005065. eCollection 2015 Apr
15. Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T, Shodai A, Kaji S, Morimura T, Banno Y, Nishitsuji K, Sakashita N, Maki T, Yamashita H, Ito H, Takahashi R, Urushitan M. (2016) CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Sci Rep.* 2016 Jan 11;6:19118.

〔学会発表〕(計 40 件)

〔図書〕(計 1 件)

高橋良輔、漆谷真、山中宏二、樋口真人(編) 脳内環境 維持機構と破綻がもたらす疾患研究 (全 220 頁)。遺伝子医学 MOOK, メディカルドゥ、2014 年 11 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋良輔 (Takahashi Ryosuke)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：9 0 2 1 6 7 7 1

(2) 研究分担者

漆谷 真 (Urushitani Makoto)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：6 0 3 3 2 3 2 6

(3) 連携研究者