

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08154

研究課題名(和文) 細胞死抑制の鍵分子としてHAP1に注目した老化と脳領域特異的神経変性の関連解明

研究課題名(英文) Neuronal HAP1 functions as a key molecule of intrinsic neuroprotectants in aging and neuropathological conditions

研究代表者

藤永 竜太郎 (FUJINAGA, Ryutaro)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30335723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ハンチントン病関連タンパク質HAP1は神経細胞質封入体stigmoid body(STB)のコア分子である。本研究で、プロテアソーム阻害剤(PI)によりHAP1がSTB形成から顆粒網状構造へと発現形態を変化させることが分かった。PIはHAP1とミトコンドリアタンパク質VDAC1との結合を増強した。顆粒網状構造HAP1はミトコンドリアチトクロムC漏出やカスパーゼ3活性化を減弱し、PI誘導性アポトーシスを抑制した。HAP-KOマウスのPI誘導性アポトーシスは亢進していた。つまり、老化脳にも観察されるプロテアソーム活性低下状態において、HAP1が内在性の神経保護因子である可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) is a core component of the stigmoid body (STB). In this study, we found that subcellular HAP1 morphology was changed from STB formation into cytoplasmic reticulo-granular structure surrounding mitochondria after treatment of proteasome inhibitor (PI) in HAP1-transfected cells. The drug also induced interaction of HAP1 and mitochondrial porin protein VDAC1 on mitochondria. PI-induced apoptosis was shown to be clearly suppressed by over-expression of HAP1 with cytoplasmic reticulo-granular structure in terms of reduction of cytoplasmic cytochrome C release and caspase-3 activation. Rather, PI-induced apoptosis was enhanced in CRISPR-Cas9-mediated Hap1-knock out mice established here. These results indicated that HAP1 is an intrinsic neuroprotectant particularly in proteasome-activity-reduced condition, which is closely related to aged conditions in the brain.

研究分野：神経解剖学

キーワード：アポトーシス 老化 ミトコンドリア ハンチントン病 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

種々のストレス、老化やそれに伴う細胞死の進行は非常に関連が深いことが知られている。脳では遺伝的背景や細胞ストレスが原因となり、加えて老化の進行とともに領域特異的な細胞死・神経変性が引き起こされることが示されているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。

私達はこれまでに、脳内 huntingtin-associated protein 1(HAP1)の発現パターンがハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症や脊髄小脳変性症3型の領域特異的神経細胞死を説明するモデルになることを報告してきた(Fujinaga et al., J Comp Neurol, 2004; Takeshita, Fujinaga et al., Hum Mol Genet, 2006; Takeshita, Fujinaga et al., NeuroReport, 2011; Fujinaga et al., Exp Cell Res, 2011)。

HAP1は、一般的に神経変性の起こりやすい大脳皮質、大脳基底核、海馬、視床、脳幹運動核、小脳、脊髄前角には非常に弱いまたはほとんど発現が認められず、それ以外の変性の起こりにくい視床下部や扁桃体領域などの領域に広くかつ特異的に高発現していることを報告している(Fujinaga et al., J Comp Neurol, 2004; Fujinaga et al., Histochem Cell Biol, 2009)。この事実から、私達は一つの仮説として、HAP1はハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症や脊髄小脳変性症3型のようなポリグルタミン病特異的ではなく、普遍的な意味で神経細胞の生存維持(安定化)に重要な役割をしている可能性を考えた。さらに、私達は、HAP1が神経細胞質内に見出される非膜系オルガネラである stigmoid body (STB) のコア蛋白質であることも報告してきた(Fujinaga et al., Histochem Cell Biol, 2007, 2009)。最近になり、プロテアソーム活性が低下するとHAP1細胞内局在が顕著に変化することを見出した。近年、プロテアソーム活性の低下は老化

による細胞死促進の鍵イベントであることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では培養細胞とゲノム編集技術により作製したHAP1ノックアウトマウスを用いて、種々のストレス、特にプロテアソーム活性低下がHAP1の発現形態に与える影響と細胞死に対するHAP1の抑制効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

種々のストレス、特にプロテアソーム活性低下が引き起こすHAP1の細胞内発現形態変化のメカニズムとHAP1の細胞死に対する抑制効果について、培養細胞とノックアウトマウスを用いて解析した。細胞は、CELLution社から購入した視床下部不死化細胞株を用いた。内因性HAP1は検出されなかった。方法として、invitroの実験では、蛍光顕微鏡解析、共焦点レーザー顕微鏡解析、サブセルラーフラクショネーション、タイムラプスイメージング、免疫沈降法、ウエスタンブロットを用いた。Hap1ノックアウトマウスはゲノム編集技術(CRISPR-Cas9システム)により作出した。薬剤(プロテアソーム阻害剤)は頸部皮下にインジェクションし、アポトーシスはウエスタンブロットにより評価した。

4. 研究成果

ハンチントン病関連タンパク質(huntingtin-associated protein 1:HAP1)をトランスフェクションしたマウス由来視床下部不死化細胞株を用いて、種々のストレス処理を行った(熱ショック、小胞体ストレス、酸化ストレス、プロテアソーム阻害など)。その結果、プロテアソーム阻害によりHAP1の細胞内発現形態が顕著に変化することが再確認された。この現象はnon-tagged HAP1とGFP-HAP1両者に観察され、GFPタグの影響

が無い事が確認された。GFP-HAP1 導入細胞を用いてタイムラプスイメージング解析を行った。通常、HAP1 は細胞質内で STB を形成するが、プロテアソーム阻害剤存在下では STB 形成ではなく、核周囲を中心に顆粒網状に発現する様子が観察された。さらに、既に形成された STB が顆粒網状形態に変化するのではなく、新たに翻訳された HAP1 分子が顆粒網状に発現することが分かった。また、プロテアソーム阻害剤存在下での細胞内オルガネラとの関係を免疫染色とタイムラプスにより詳細に解析した。小胞体、リソソーム、エンドソーム、ゴルジ体などとの明らかな形態学的関連は見出せなかったが、顆粒網状形態はミトコンドリアに近接配置していることが明らかになった。顕微鏡観察に加えて、サブセルラーフラクショネーションにおいても HAP1 タンパク質が細胞質フラクションからミトコンドリアフラクションに移動していることが示された。HAP1 がプロテアソーム阻害剤が誘導する細胞死にどのように影響を与えるか調べる目的で、まず、コントロール実験として視床下部不死化細胞株をプロテアソーム阻害剤で処理しアポトーシスの誘導を解析した。その結果、阻害剤濃度、処理時間依存的にアポトーシスが進行することが分かった。次に、HAP1 過剰発現がプロテアソーム阻害剤誘導性のアポトーシスに抑制効果を持つか調べるために、GFP-HAP1 過剰発現細胞と GFP 過剰発現細胞のアポトーシスを検出した。GFP を過剰発現させたコントロール視床下部不死化細胞株に比べ、GFP-HAP1 を過剰発現させた視床下部不死化細胞株ではプロテアソーム阻害剤誘導性の断片化 PARP の量や活性化型カスパーゼ 3 の量が減少していた。つまり、HAP1 はプロテアソーム阻害剤誘導性アポトーシスに対して抑制的に機能していることが分かった。熱ショック、小胞体ストレス、酸化ストレスもアポトーシスを誘導したが、これらに対する

HAP1 のアポトーシス抑制効果は見出されなかった。つまり、HAP1 がプロテアソーム阻害剤存在下で STB 形成から顆粒網状形態に発現形態を変化させ、ミトコンドリアに近接配置することがアポトーシス抑制に重要であることが示唆された。ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導のきっかけとなるチトクロム C はミトコンドリアポリンから細胞質へ放出されることから、HAP1 とポリンのコア分子である VDAC1 との相互作用を共免疫沈降で解析した。プロテアソーム阻害剤未処理のコントロール群では HAP1 と VDAC1 の関連は見出されなかったが、阻害剤処理を行うと HAP1 は VDAC と強く相互作用していることが明らかにされた。実際に細胞質チトクロム C の量をウエスタンブロットで解析すると、HAP1 過剰発現細胞においてプロテアソーム阻害剤が誘導するチトクロム C リリースが減少していた。

ゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9 システム) により、Hap1 ノックアウトマウスの作出を行った。Hap1 ヘテロマウスには顕著な表現形は見出されなかった。Hap1 ヘテロマウスの交配により、Hap1-null を作出すると、このマウスはほぼ出生 24 時間以内に死亡することが判明した。出生当日の Hap1 ノックアウトマウス脳のニッスル染色の観察では、野生型マウスと比べて顕著な形態異常等は見出されなかった。また、体重、体温等も野生型のそれらと比べて顕著な変化などは見出されなかった。今回は、早期死亡の原因は明らかにすることができなかった。培養細胞を用いた実験から Hap1-null のマウス脳ではプロテアソーム阻害剤依存的なアポトーシスが亢進することが予想された。そこで出生当日に頸部皮下に阻害剤をインジェクションし、カスパーゼ 3 の活性化をウエスタンブロットにより定量した。その結果、野生型マウスと比較して HAP1-null マウスではカスパーゼ 3 の活性化が顕著であることが分かった。

以上の結果から、次のようモデルが考えられた。HAP1 は脳内でプロテアソーム活性低下状態（老化）が引き起こされると、ミトコンドリアポリリン VDAC1 との親和性を上昇させることにより、その発現形態を STB 形成から顆粒網状構造誘導にスイッチする。ミトコンドリアに近接配置された HAP1 はミトコンドリアから細胞質へのチトクロム C リリースを抑制し、結果としてカスパーゼの活性化及びアポトーシスを抑制していると考えられた。これは、HAP1 の神経保護作用として新たなメカニズムを提供するものであると考えられた。

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 2 件)

1. Islam MN, Takeshita Y, Yanai A, Imagawa A, Jahan MR, Wroblewski G, Nemoto J, Fujinaga R, Shinoda K.

Immunohistochemical analysis of huntingtin-associated protein 1 in adult rat spinal cord and its regional relationship with androgen receptor.

Neuroscience. 2017 Jan 6;340:201-217. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.053

2. Jahan MR, Kokubu K, Islam MN, Matsuo C, Yanai A, Wroblewski G, Fujinaga R, Shinoda K.

Species differences in androgen receptor expression in the medial preoptic and anterior hypothalamic areas of adult male and female rodents.

Neuroscience. 2015 Jan 22;284:943-61. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.003

〔学会発表〕(計 8 件)

1. HAP1 immunoreactive cells migrating along the peripheral pathway of the primary olfactory system in the pre-and neonatal mice.

Kosei Yonezawa, Md. Nabiul Islam, Akie Yanai, Ryutaro Fujinaga, Koh Shinoda

第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
長崎大学 2017, 3/28-30

2. Characterization of HAP1-immunoreactive cells in the rat spinal cord with special emphasis on its regional relationship with AR.

Md. Nabiul Islam, Yukio Takeshita, Akie Yanai, Amami Imagawa, Mir Rubayet Jahan, Kosei Yonezawa, Ryutaro Fujinaga, Koh Shinoda

第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
長崎大学 2017, 3/28-30

3. HAP1 による中心体関連物質 PCM1 及び huntingtin の形態制御

柳井章江、藤永竜太郎、石田眞子、Md Nabiul Islam、篠田 晃

第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
長崎大学 2017, 3/28-30

4. 細胞ストレス負荷による HAP1 の細胞内発現形態変化と細胞死抑制効果～特にプロテアソーム活性低下との関連～

藤永竜太郎、柳井章江、原田佳代子、MD. N. ISLAM、篠田晃

第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会
長崎大学 2017, 3/28-30

5. Altered androgen receptor expression and intrinsic excitability of the hippocampal CA pyramidal neurons in androgen-manipulated male rats.

Md. Nabiul Islam, Yuya Sakimoto, Akie Yanai, Ryutaro Fujinaga, Dai Mitsushima, Koh Shinoda 第59回日本神経化学会大会 福岡県福岡市 2016, 9/8-10

6. Characterization of two novel HAP1-immunoreactive structures in the retrosplenial-retrohippocampal area in rat.

Wroblewski G, Islam Md N, Fujinaga R, Matsuo C, Jahan M R, Yanai A, Shinoda K 第121回 日本解剖学会総会・全国学術集会 福島県郡山市 2016.3/27-29

7. Characterization of the HAP1-immunoreactive cells in the subiculum and retrohippocampal formation in rat.

Wroblewski G, Islam MN, Fujinaga R, Jahan MR, Matsuo C, Nemoto J, Tanaka K, Ishii K, Yanai A, Shinoda K 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SFN) Chicago, IL, USA 2015, 10/17-21

8. Expression of huntingtin-associated protein 1-immunoreactive stigmoid body and its morphological relationship with androgen receptor in the spinal cord of adult rat.

Islam MN, Fujinaga R, Takeshita Y, Yanai A, Jahan MR and Shinoda K The 58th Annual Meeting of the Japanese society for Neurochemistry 2015, 9/11-13

〔図書〕(計 0件)

〔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 0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

藤永 竜太郎 (FUJINAGA, Ryutaro)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 30335723

(2)研究分担者

篠田 晃 (SHINODA, Koh)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40192108

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし