

平成22年 5月28日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17025044

研究課題名（和文）

神経変性における蛋白凝集機構の解析

研究課題名（英文）

Study on the mechanism of aggregate formation in neurodegeneration

研究代表者

貫名 信行 (Nukina Nobuyuki)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10134595

研究成果の概要（和文）：

「神経変性における蛋白凝集機構の解析」というテーマのもと凝集体形成とそのポリグルタミン病病態への影響に関わる因子を凝集体結合蛋白質の同定を通して明らかにした。また凝集体形成を制御する薬剤の標的分子などを明らかにすることで形成・分解に関与する分子を同定することができた。この方向のアプローチは今後の治療開発にとって重要である。さらに新たに異常蛋白質を特異的に分解する遺伝子治療を開発することができ、その病態改善効果から、異常蛋白質の凝集の病態における重要性を明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：

We have been working about the aggregate formation and its effect on the neurodegeneration of polyglutamine diseases in this project, mainly focusing on the identification of the aggregate interacting proteins and of the target molecules for drugs modulating aggregate formation. We could find several molecules, which modulate aggregate formation or its degradation. Our approach is important for developing new therapies in future. Furthermore, we could develop a new gene therapy, in which abnormal disease protein could be specifically degraded. The effect of this treatment in vivo itself revealed the pathological significance of aggregates in the disease process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	25,000,000	0	25,000,000
2006年度	22,500,000	0	22,500,000
2007年度	22,500,000	0	22,500,000
2008年度	32,500,000	0	32,500,000
2009年度	22,500,000	0	22,500,000
総計	125,000,000	0	125,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：分子神経病理学、神経変性疾患、ポリグルタミン病、凝集体結合蛋白質、シャペロン、プロテアソーム

## 1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は多くは常染色体優性

遺伝であり、遺伝子産物が直接病態に関与すると考えられる。そこでこのような病態の解析として、

最も上流のポリグルタミンを含む蛋白質の構造異常の解析を行ってきた。その結果ポリグルタミン鎖を含む蛋白質はアミロイド繊維と非繊維性凝集体の二つの構造体を形成することがわかった。非繊維性凝集体はポリグルタミン部分を露出しており、ポリグルタミン結合蛋白質をリクルートする構造的基盤と考えられた (Tanaka M et al J Biol Chem 2001,2003)。

ポリグルタミン病においてはその核内封入体が転写因子などと重要な因子をリクルートし、細胞機能を障害するという仮説がある。そこで我々は細胞モデルから凝集体を精製し、その結合蛋白質を同定した。結合蛋白質としてシャペロン、プロテアソーム関連蛋白質、ユビキチン結合蛋白質、等を同定した (Misui J Neurosci 2002, Doi H et al FEBS Lett2004, Nagaoka U et al J Neurochem 2004)。この方法により同定された、その他の凝集体結合蛋白質についてさらに解析をくわえた。

また我々はすでに確立している細胞内に GFP 融合蛋白質としてポリグルタミンを含む蛋白質を発現する系を用いて、変性蛋白質の構造変化を特異的に認識する分子の凝集体形成における機能、あるいはその下流の機能異常への影響を明らかにすることを目指した。またこのような凝集体形成を制御する諸因子を薬剤や shRNA ライブラリースクリーニングを通して同定することにより、凝集体形成の病態における意義を明らかにしようとした。

## 2. 研究の目的

CAG リピート病はその病因遺伝子に CAG のリピートを含み、リピートの伸長を認める一群の神経疾患である。CAG リピートが病因遺伝子の翻訳領域に存在するため CAG リピートから翻訳されたポリグルタミンが病態に強くかかわっていると想定され、ポリグルタミン病とも呼ばれ、ハンチントン病 (HD)、球脊髄性筋萎縮症、遺伝性脊髄小脳失調症の一部が含まれる。ポリグルタミン病の神経細胞の核にはポリグルタミン (polyQ) からなる封入体が存在することが確認され、これらの封入体と神経細胞変性の関連が注目されている。本研究では伸長したポリグルタミンの挿入による構造異常を認識する因子を網羅的に探索することにより細胞内に出現するミスフォールドした蛋白質の構造状態を認識するシステムとその抑制機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### a) 凝集体結合蛋白質の同定とその病態における意義

伸長したポリグルタミン鎖をもつハンチン Htt の N 端 (tNHtt) と EGFP の融合タ

ンパク質、さらに核移行シグナルを付加したタンパク質を発現し、細胞質および核内に凝集体を形成する HD モデル細胞を Neuro2a で作成した。これらの細胞から凝集体を部分精製し、その構成成分を、質量分析法を用いて解析した (Misui J Neurosci 2002, Doi H et al FEBS Lett2004)。同定した凝集体結合蛋白質の病態における意義について検討した。

### b) ポリグルタミン凝集体形成の制御メカニズムの解明

b-1) ショウジョウバエ中枢神経由来の細胞に N-terminal truncated huntingtin fused to EGFP with an expanded (62Q) polyglutamine repeat を誘導的に発現する系を作成した。この細胞は pQ 蛋白質発現により、EGFP 陽性の凝集体を形成した。この細胞にショウジョウバエ RNAi ライブラリーを用いて RNAi を導入し、凝集体形成を ArrayScan によってスクリーニングする系を確立した。7200 遺伝子 (ショウジョウバエ遺伝子の約半数で主に既知の遺伝子が含まれている) をスクリーニングした。

b-2) 我々は上記の研究と同様に前述のマウス Neuro2a 細胞モデルをもちいて凝集体形成をアッセイする系を確立し、それによって Amiloride derivative, Rho kinase 阻害剤が凝集体形成を抑制することを見いだした。そこでこの作用機序を検討した。

b-3) またシャペロン介在性オートファジーを利用して凝集体形成を抑制できることを見出し、遺伝子治療としてマウスレベルでの効果を確認した。

## 4. 研究成果

### a) 凝集体結合蛋白質の同定とその病態における意義

シャペロン、ユビキチン-プロテアソーム系の構成蛋白質など、既知の凝集体結合蛋白質 AIPs に加えて、Ubiquilin1, 2, Tollip などのユビキチン結合蛋白質を同定した (Doi H et al FEBS Lett2004)。さらに凝集体結合蛋白質の解析を進め、RNA 結合蛋白質 TLS を同定した。TLS はハンチントン病モデルマウス脳において核内封入体と共局在を示し、ポリグルタミン発現細胞に発現すると凝集体と共局在した。In vitro で GST-tNHtt (18, 42, 62Q) とは結合せず、凝集体を形成すると結合することが示された。さらに Thioflavin T assay によって TLS 存在下で polyQ 凝集をみると、その凝集形成速度が遅くなり、siRNA によって細胞における発現を抑制すると凝集体が増大した。この結果から TLS は核内封入体の形成に関与していることが示唆された (Doi et al J Biol Chem 2008)。その後 (FUS/) TLS は家族性筋萎縮性側索硬化症の一型 ALS6 の遺伝子であることが報告され、ポリグルタミン病と ALS6 の病態に共通の機序のある可能性が出てきている。

さらに Htt 凝集体に含まれる蛋白質の一つとして TLS 同様 RNA 結合蛋白質である TIA-1 を同定し、TIA-1 が Htt 凝集体に取り込まれるメカニズムとして、ポリグルタミン線維による TIA-1 の線維化

促進を見いだした。TIA-1 は RNA 結合を行う N 末端領域とグルタミン (Q) / アスパラギン (N) に富んだ C 末端領域 (TIA-1C) からなるが、培養細胞を用いた実験から、polyQ 凝集体との共局在には TIA-1C が必須であることを明らかにした。そこで、試験管内において TIA-1C 存在下で polyQ を凝集させると、polyQ 線維内に TIA-1C が取り込まれていることを免疫電顕により確認した。さらに、TIA-1C のみでもアミロイド様線維を形成することから、polyQ と TIA-1C は線維として相互作用する可能性が考えられた。線維の形成は「核形成」と「伸長」の二段階からなるが、ある蛋白質の線維が別の蛋白質の線維化の核として働くことがある (cross-seeding)。そこで、polyQ に TIA-1C の線維を加えたが、polyQ の線維化に大きな速度論的变化はなかった。しかし、TIA-1C に polyQ 線維を加えると TIA-1C の線維化が促進されることが分かった。細胞内においても、polyQ 凝集体が核となり TIA-1 が凝集体に巻き込まれる様子を生細胞観察により捉えることができ、HD モデルマウスにおいても、変異 Htt が凝集した後に TIA-1 が SDS 不溶性になることを確認できた。また、TIA-1 は Htt 凝集体に巻き込まれることでその生理的機能が低下することを明らかにできた (Furukawa Y et al J Neurosci 2009)。Cross-seeding メカニズムはポリグルタミン病においては多様なシステムの変化を引き起こすメカニズムの一つとして、また神経変性疾患全般の異常蛋白質蓄積において種 (シード) となる実際に蓄積している蛋白質以外のものが存在する可能性を示すものとして重要である。

AIPs に同定された転写因子には既報のもの (CBP, Sp1, TAFII130) は見出されず、シャペロンタンパク質 HSP70 を含め、多数の遺伝子の発現調節に関わる NF-Y のサブユニット (NF-YA) が同定された。NF-YA は、HD モデルマウス脳の前角質や線条体において、変異ハンチンチン凝集体と共局在した。さらに、HD モデルマウス脳においては、NF-Y の HSP70 プロモーター結合活性が低下していること、同時に、HSP70 mRNA の発現が減少していることも見出した。さらに、初代培養神経細胞を用いた解析から、NF-Y の HSP70 プロモーター結合が、HSP70 の遺伝子発現に重要であることも明らかとした。これらの結果より、変異ハンチンチン凝集体は NF-YA と結合して NF-Y の活性を抑制することにより、HSP70 の発現を減少させていることが示唆された (Yamanaka T et al EMBO J 2008)。

さらに転写因子異常の網羅的探索のために、HD モデルマウス R6/2 において DNA 結合能の変化している転写因子を網羅的に検討した。この方法により、NF-YA の異常を確認するとともに POU ドメイン転写因子 Brn2 の異常を見出した。Brn2 は視床下部のニューロ

ンの分化、機能に関係しており、ヘテロノックアウトマウスでは視床下部のバズプレッシン、オキシトシンが低下していることが報告されている。HD モデルマウスでは視床下部のこれらの神経ペプチド発現細胞に凝集体ができ、Brn2 の機能が阻害されるが、Brn2 が発現している皮質ニューロンなどではこの転写因子に機能的に関連し、ポリグルタミン凝集体に結合しない Brn1 が代償的に増加していることが確認され、ポリグルタミンによって引き起こされる病態の部位特異性が、ニューロン側の特性にも依存していることが示された (Yamanaka T et al Hum Mol Genet 2010)。

さらにこのようなポリグルタミン病における転写異常を in vivo において解析を進めるため、初期に変化する遺伝子について検討を行った。HD モデルマウスの GeneChip による網羅的遺伝子発現の検討の結果、線条体特異的に遺伝子発現減少をみる遺伝子を同定し、これが sodium channel beta4 subunit であることを報告した (Oyama F et al J Neurochem 2006)。Beta4 subunit は線条体投射ニューロンに発現しており、その部位特異的転写異常のメカニズムの解明を進めている。

b) ポリグルタミン凝集体形成の制御メカニズムの解明

b-1) 7200 遺伝子 (ショウジョウバエ遺伝子の約半数で主に既知の遺伝子が含まれている) をスクリーニングし、404 の制御遺伝子 (抑制ないし促進) の候補を同定した。これらの多くはほ乳類のオースログを持つものであった。これらの候補遺伝子を in vivo モデルを用いるなどして絞り込んだところ、核移行に関連する遺伝子、核酸代謝に関連する遺伝子、シグナル伝達に関連する遺伝子などが同定された (Doumanis J et al PLoS One 2009)。これらの遺伝子の産物はポリグルタミン病の治療の分子標的となりうると思われる。

b-2) これらの凝集体形成抑制効果のある薬剤 (Amiloride, Rho kinase 阻害剤) の分子標的が同定できれば、その標的に向けて新たな薬剤も開発が可能であろう。そのような観点で、我々はまずこの薬剤がどこに作用して凝集体形成を起こしているか検討し、Amiloride が proteasome の分解が促進していることを見いだした。興味深いことに proteasome inhibitor をもちいても Amiloride derivative はその阻害を減弱する。そこで Amiloride の標的が直接この効果に関与しているかどうかを、標的分子である、ASIC, NCX, NHE について RNAi による発現抑制を行って調べたが、ASIC, NCX のみ凝集体抑制効果を見いだした。ASIC はアチドーシスに伴い活性化され、Ca 透過性を介して細胞毒性を持つといわれる。ASIC のノックダウンや、ASIC のブロッカーである Amiloride に凝集体抑制効果が認められたことは、未だ解明されていない凝集体抑制機構が存在することが示唆され、それは ASIC に関連した proteasome 活性化カスケードであることが示唆された (Wong HK et al Hum Mol Genet 2008)。

同様にすでに凝集体形成抑制効果が報告されていた Rho kinase 阻害剤についてその分子標的を解

析した。Rho kinase 阻害剤 Y-27632 に抗ポリグルタミン凝集作用があることが報告されていたが、この作用機序は明らかではなかった。我々はこの阻害剤が ROCK1, 2 を介してプロテアソームとオートファジー系を活性化することによりポリグルタミンの分解を促進し、凝集を抑制していることを見出した (Bauer PO et al J Biol Chem 2009)。

b-3) シャペロン介在性オートファジー (CMA) という分解系により huntingtin N 末断片 (Nhtt) が分解されうるかについて、Nhtt に Hsc70 結合モチーフ (Hsc70bm) のペプチドを導入してその分解をみた。Nhtt は Hsc70bm が存在するとライソゾームにおける分解が促進したことから、CMA によって伸長ポリグルタミンが分解されることが示された。そこで伸長ポリグルタミンと結合するペプチド QBP1 (Q) と Hsc70bm からなるペプチド (HQ) が伸長ポリグルタミンのライソゾームにおける分解を促進するかどうかについて検討した。この効果について Hsc70, Lamp2a に対する shRNA の影響を検討した。Neuro2a 細胞において HQ は Nhtt をライソゾームに移動させ、分解を促進した。Hsc70 および Lamp2a を発現抑制するとこの効果は消失した。このことは分解促進が CMA によるものであることを示唆する。さらに RFP と融合した HQ および Q を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を線条体に導入して、その影響を RFP のみの場合と比較検討した。AAV によって、ハンチントンモデルマウス R6/2 の線条体に R/Q, Q/HQ, R/HQ の組み合わせでそれぞれを発現した。この発現により、Q に比べて HQ でより強く、Nhtt の発現量、凝集体が減少し、核内封入体も減少した。Rotarod test, clasping score, life span においてもその凝集体減少効果に応じた改善を認めた。この結果から以下の点が確認された。HQ を発現することにより CMA を利用して異常蛋白質の分解を促進することが可能である。凝集抑制的に働く Q のみの効果より、HQ の効果が増強することから、凝集抑制のみでなく、分解を促進することの重要性が確認された。原理的には異常蛋白質と結合する Intrabody 等に Hsc70bm を融合することでその標的分子の分解を促進することが可能であると期待でき、他の疾患にも応用可能性がある。本研究によって異常伸長ポリグルタミンを減少することにより、病態を改善できることを直接示すことができた (Bauer PO et al Nat Biotech 2010)。

##### 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 41 件)  
(全て査読有)

1. Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y. & Nukina, N. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotechnol.* **28**, 256-263 (2010).
2. Yamanaka, T., Tosaki, A., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Furukawa, Y., Yamada, M. & Nukina, N. Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* (2010) in press.
3. Doumanis, J., Wada, K., Kino, Y., Moore, A.W. & Nukina, N. RNAi screening in Drosophila cells identifies new modifiers of mutant huntingtin aggregation. *PLoS One* **4**, e7275 (2009).
4. Furukawa, Y., Kaneko, K., Matsumoto, G., Kurosawa, M. & Nukina, N. Cross-seeding fibrillation of Q/N-rich proteins offers new pathomechanism of polyglutamine diseases. *J. Neurosci.* **29**, 5153-5162 (2009).
5. Bauer, P.O., Wong, H.K., Oyama, F., Goswami, A., Okuno, M., Kino, Y., Miyazaki, H. & Nukina, N. Inhibition of rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *J. Biol. Chem.* **284**, 13153-13164 (2009).
6. Wong, H.K., Bauer, P.O., Kurosawa, M., Goswami, A., Washizu, C., Machida, Y., Tosaki, A., Yamada, M., Knopfel, T., Nakamura, T. & Nukina, N. Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3223-3235 (2008).
7. Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H. & Nukina, N. Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. *EMBO J.* **27**, 827-839 (2008).
8. Doi, H., Okamura, K., Bauer, P.O., Furukawa, Y., Shimizu, H., Kurosawa, M., Machida, Y., Miyazaki, H., Mitsui, K., Kuroiwa, Y. & Nukina, N. RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 6489-6500 (2008).
9. Oyama, F., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Becquet, C., Machida, Y., Kaneko, K., Uchikawa, C., Suzuki, T., Kurosawa, M., Ikeda, T., Tamaoka, A., Sakurai, T. & Nukina, N. Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurochem.* **98**, 518-529 (2006).

[学会発表] (計 49 件)

1. Nukina, N., Bauer, P. O., Wong, H. K., Goswami, A., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Yamada, M. & Matsumoto, G. Amelioration of the pathological processes related to Huntington disease by targeting the mutant huntingtin to chaperone-mediated autophagy. *38<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2008)*, Washington, USA (November 15-19, 2008).

2. Nukina, N., Doi, H., Yamanaka, T., Kino, Y. & Furukawa, Y. Identification of aggregate interacting proteins in the polyglutamine diseases. [Program Number: 219.5] *36<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2006)*, Atlanta, USA (October 14-18, 2006).

[その他]

ホームページ:

<[http://www.brain.riken.jp/jp/n\\_nukina.html](http://www.brain.riken.jp/jp/n_nukina.html)>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

貫名 信行 (Nukina Nobuyuki)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10134595

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者