

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19500266

研究課題名（和文） 神経変性疾患遺伝子 DRPLA の転写調節因子としての解析

研究課題名（英文） Analysis of Neurodegenerative gene product, DRPLA protein.

研究代表者

伊達 英俊 (DATE HIDETOSHI)

東京大学 医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30401037

研究成果の概要（和文）：歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（以下 DRPLA）は、ミオクロオス発作、痴呆、協調運動の障害、不随意運動を主徴とする日本人に好発する常染色体優性遺伝病である。疾患遺伝子産物である DRPLA protein の生理的機能はいまだ不明である。本疾患の治療法を開発する目的で DRPLA protein 定常発現細胞株を作成し、DRPLA protein の生理的機能の解析を実施した。

研究成果の概要（英文）：Dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA; MIM125370) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by unstable expansion of a CAG trinucleotide repeat in exon 5 which codes for a polyglutamine stretch. Nowadays, there is no treatment ways for DRPLA patient, because DRPLA protein fuction remains unclear. To develop for the therapy for DRPLA, we examined DRPLA protein biochemical function deeply.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：分子・神経細胞科学、ポリグルタミン病、天然変性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（以下 DRPLA）は、ミオクロオス発作、痴呆、協調運動の障害、不随意運動を主徴とする日本人に好発する常染色体優性遺伝病である。

本疾患の名前は病理学的に脳基底核である歯状核、赤核、淡蒼球、ルイ体に神経細胞

の変性を認めることに由来し、その遺伝的原因が12番染色体上の DRPLA 遺伝子の異常であることが判明した。遺伝子の異常は、この遺伝子の蛋白翻訳領域内の CAG 繰り返し領域が異常に伸長しているトリプレットリピートの一つであること、すなわち異常に長いポリグルタミンを含む遺伝子産物をつく

ってしまうことが病因であることが明らかにされた(正常型:6リピートから35リピート、異常型:48リピートから88リピート)。一方、ポリグルタミンの異常伸長鎖タンパク質の解析では、転写活性因子と結合しその活性を抑制する報告がある。現在では、ポリグルタミン病は転写抑制による細胞障害が、病態機序の上で重要であると考えられている。この背景から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤をもちいた治療研究が行われているが、すべてのポリグルタミン病に有効となるような結果にはなっていない。DRPLA モデル動物にもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた治療研究が行われているが、効果的な治療薬の発見には未だ至っていない。そのため DRPLA の効果的な治療法開発には DRPLA タンパクの生理的機能の解析が必須といえる。

2. 研究の目的

DRPLA 遺伝子の異常は、この遺伝子の蛋白翻訳領域内の CAG 繰り返し領域が異常に伸長しているトリプレットリピートの一つであること、すなわち異常に長いポリグルタミンを含む遺伝子産物をつくり核内に凝集体を形成する事が病因であるが、いまだに野生型 DRPLA の生理的機能は不明であり、伸長ポリグルタミン鎖が核内に凝集体形成する機序も不明である。一方で、DRPLA protein はアミノ酸配列解析より、全長アミノ酸残基の半分以上が特定構造をとらない変性領域を有するタンパク質である。つまり、このタンパク質の性格から DRPLA protein は特定の構造を細胞内で形成しない。核内で安定化し凝集体を形成するためには、それを誘導するような因子が必要であることが推察される。先行研究では、ETO/MTG8 と培養細胞で共発現させると DRPLA protein が安定化し、核マトリクスに局在することが報告されている。本研究では、DRPLA protein を安定化するのには ETO/MTG8 のみなのか? DRPLA protein 内にあるポリグルタミン鎖の長さにより ETO/MTG8 の反応性が異なり、疾患の発症機序が説明できるか? また逆に、DRPLA protein の不安定性を維持すること(安定化を阻害)で DRPLA の発症(DRPLA protein の核内凝集体形成)を制御できるか? について疾患遺伝子産物を研究することを目的とする。

3. 研究の方法

Invitrogen 社の TReX Flp-In 293 細胞を元に DRPLA protein の定常発現株を作成した。N 末に GFP を付加した DRPLA 遺伝子が培養細胞のゲノムに 1 コピー挿入されている。培養液にテトラサイクリンを加えることで発現誘導が開始する。また、正常なポリグルタミン鎖 19 リピートの株と変異型 88 リピートの株の 2 種を作成した。この定常発現株は Q19 リピート、Q88 リピートと共に核にびまん性

に局在し、核内封入体は形成しない。作成した定常発現株に既報の転写抑制因子群をトランスフェクションし、GFP-DRPLA protein の細胞内局在、生化学的変化を詳細に調べた。

4. 研究成果

既報では、ETO/MTG8 を培養細胞に共発現させると、DRPLA protein および ETO/MTG8 は核内に dot 状の局在変化を示す。また、DRPLA protein は生化学的な分画法では核マトリクス分画に存在し、ETO/MTG8 の共発現では、DRPLA protein はより、核マトリクス分画に存在するように変化し同様の局在変化を確認した。ETO/MTG8 は DRPLA protein と核マトリクスで機能していることが推察され、既報と同様の結果を得た。

作成した定常発現株に ETO/MTG8 をトランスフェクションした場合も既報と同様に、びまん性局在から dot 状の局在に変化する。ETO/MTG8 と同様の局在変化、生化学的変化を起こす因子を探索する目的で、ETO/MTG8 関連の遺伝子を DRPLA 定常発現株にトランスフェクションした。そのうちヒストン脱アセチル化酵素が ETO/MTG8 以上の変化をもたらすデータが得られた。顕微鏡下において、ヒストン脱アセチル化酵素が導入された細胞は核に DRPLA protein の凝集体様の集積が見られ、共局在をしめした。また、免疫沈降法により、DRPLA protein とヒストン脱アセチル化酵素が複合体を形成している事を確認した。また、核マトリクスへの分画移動がみられ、その効果は ETO/MTG8 以上であった。

タンパク質を回収する際、1%NP-40 の Lysis Buffer で上清を回収し、2%SDS の Lysis Buffer でペレットを可溶化する。DRPLA 定常発現株の場合、通常、1%NP-40 分画、2%SDS 分画ともに同様の濃度のバンドが検出されるが、ヒストン脱アセチル化酵素をトランスフェクションした場合、著しく 2%SDS 分画に局在するように変化する。つまり、ヒストン脱アセチル化酵素によって DRPLA protein が不溶性タンパク質に変化する性質があることが示された。この現象は、ヒストン脱アセチル化酵素の濃度依存的であることが示された。先行研究で、Full-length の DRPLA の培養細胞発現で核内に凝集体を形成させた報告はなく、本研究が初めての報告である。また、細胞内局在だけでなく、不溶性タンパク質への生化学的変化を示した研究も本研究が初めてである。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素による DRPLA protein の不溶化はポリグルタミン鎖の長さには依存しないことが確認された。このことは、疾患発症させるにはポリグルタミン鎖だけではなく、その他の修飾が必要であることを示唆している。このことをさらに調べるためには、細胞種を変えた追加実験が必要であると考えられる。また、DRPLA の C 末を 100 アミノ酸ごとに短くした

コンストラクトを作成。ヒストン脱アセチル化酵素と共発現させ、DRPLA protein の不溶性を見たところ、C 末を 20%短くしただけで不溶性にならないことから、DRPLA protein の不溶性には C 末が必要であることが判明した。DRPLA protein を凝集体させるのに必要な修飾があるとすると、C 末に修飾部位が存在することが予測される。さらに、DRPLA protein が構造をとりやすいか否かを予測するソフトでは全長アミノ酸の 70%が特定の構造をとらないタンパク質であることが判明した。このタンパク質は結合相手と会合してはじめて構造をとるのが特徴であり、ETO/MTG8 との共発現により、びまん性局在から dot 状の核内局在への変化はその特徴の一つであるといえる。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素との共発現でも細胞内局在が変わり、かつ生化学的性質も不溶性タンパク質に変化する。

タンパク質内にあるポリグルタミン鎖自体も特定の構造をとらない残基である。本疾患はそのポリグルタミンの異常伸長により発症する疾患である。つまり、構造をとらない領域がさらに伸びることが原因で発症する。構造をとらない領域が異常伸長することがどうして核内に凝集体を形成するのかは本研究データでは不十分であり、今後の詳細検討が必要と考えられる。

現在までに、DRPLA に関する研究で全長 cDNA を発現させて核内に凝集体を形成させた報告は今までになかった。本研究では、定常発現株を作成し、結合タンパク質をトランスフェクションさせることで、核内凝集体を形成させ、さらに不溶性タンパク質へと生化学的変化を起こす現象を発見した。しかし、この現象は、タンパク質内のポリグルタミン鎖の長さに依存しない。同様のポリグルタミン鎖の異常伸長によって発症する脊髄小脳変性症 1 型も凝集体形成のメインスイッチは C 末のリン酸化であることが判明している。DRPLA も脊髄小脳変性症 1 型同様に凝集体を形成させるのに必要なタンパク質内修飾が予測された。今後は DRPLA がリン酸化等の修飾を受けているかどうかの検討を行うと共にその修飾場所、そしてどのタンパク質によって修飾されているかを同定することが必要であると考えられる。また、その修飾阻害が核内凝集体形成阻害につながるかどうかを検討し、有効な治療法開発へとつなげるのが急務である。

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 3 件)

1. Takahashi T, Tada M, Igarashi S, Koyama A, Date H, Yokoseki A, Shiga A, Yoshida Y, Tsuji S,

Nishizawa M, Onodera O. Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with damaged 3'-phosphate and 3'-phosphoglycolate ends. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(11):3797-809. (査読あり)

2. Iwata A, Nagashima Y, Matsumoto L, Suzuki T, Yamanaka T, Date H, Deoka K, Nukina N, Tsuji S. Intranuclear degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem.* 2009 Apr 10;284(15):9796-803. (査読あり)
3. Yoko Fukuda, Yasuo Nakahara, Hidetoshi Date, Yuji Takahashi, Jun Goto, Akinori Miyashita, Ryozo Kuwano, Hiroki Adachi, Eiji Nakamura and Shoji Tsuji. SNP HiTLink: a high-throughput linkage analysis system employing dense SNP data. *BMC Bioinformatics* 2009, 10:121(査読あり)
4. Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, Goto J, Fukuda Y, Date H, Iwata A, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T, Tsuji S. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2009 May;66(5):571-6. (査読あり)
5. Jun Shimizu, Yuki Hatanaka, Michiko Hasegawa, Atsushi Iwata, Izumi Sugimoto, Hidetoshi Date, Jun Goto, Teruo Shimizu, Masami Takatsu, Yasuhisa Sakurai, Hirofumi Nakase, Yoshikazu Uesaka, Hideji Hashida, Tadashi Komiya, and Shoji Tsuji. IFN γ /A-1b may severely exacerbate Japanese optico-spinal MS in neuromyelitis optica spectrum. *NEUROLOGY*(in press) (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

伊達 英俊 DRPLA 治療薬探索を目指した Cell-based high throughput screening. 日本神経学会 2010 年 5 月 20 日 東京国際フォーラム (東京)

[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

伊達 英俊 (DATE HIDETOSHI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30401037

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし