

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19591002

研究課題名 (和文) 神経変性疾患原因蛋白の核内輸送と発症機序解明

研究課題名 (英文) Clarification of the link between nuclear import of neurodegenerative disease-causing proteins and the pathomechanisms

研究代表者

平野 牧人 (HIRANO MAKITO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 50347548

研究成果の概要：本研究の目的は種々の神経変性疾患原因蛋白の核内輸送に関して、運動ニューロン病様 Triple A 症候群 (AAAS) の原因である核膜孔蛋白アラジンに依存性であるかを検討し、本疾患で障害を受けやすい古典的な核局在シグナル (NLS) 以外の輸送シグナル同定と輸送機序の解明である。本研究により小脳失調原因蛋白アプラタキシンのみ AAAS の輸送障害を受け、他の原因蛋白は障害を受けないことが判明した。また、核内輸送障害を受けない DNA 修復蛋白である XRCC1 において、輸送障害を改善するために重要なのは、古典的 NLS (239-266 残基) の下流 267-276 残基であることを同定した。この部位を含む新規 NLS (239-276 残基) 38 アミノ酸配列を minimum essential sequence of stretched nuclear localization signal (mstNLS) と名付けた。mstNLS を融合すると、輸送障害を受けていた小脳失調原因蛋白アプラタキシンは AAAS 患者細胞の核内に効率よく輸送された。さらに、mstNLS は酸化ストレス下の正常細胞においても、強力な核局在シグナルとなることが証明された。以上から本研究成果は、AAAS の病態機序改善のみならず、核内輸送研究に貢献しうると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学

キーワード： 臨床神経分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

神経疾患には少なくとも一部には共通する病態機序が存在する事が推定されているが、それを解明する横断的研究は少なかった。

核—細胞質間輸送は生命維持に必須の機構であり、神経疾患においてもハンチントン

病や優性遺伝小脳失調症の原因となるポリグルタミン蛋白は核内に移行する事で毒性を発揮する。しかし、その輸送機序の詳細は不明である。また、種々の神経変性疾患原因蛋白は細胞質、核内、ER など細胞内局在が異なるが、少なくとも一部分は核内に存在する

事が報告されている。私たちのこれまでの研究で、運動ニューロン病様 Triple A 症候群 (AAAS) の原因である核膜孔蛋白アラジン変異により、核蛋白である DNA ligase I と小脳失調症の原因蛋白でもあるアプラタキシンの核内輸送障害が生じることを示してきた。しかし、その他の神経変性疾患の原因蛋白の核内輸送に関しては、アラジンの関与は不明であり、また、アプラタキシンなどの蛋白がなぜ、核内輸送障害を受けるかも明らかでなかった。

2. 研究の目的

種々の神経疾患原因蛋白の核内輸送に関して、運動ニューロン病様 Triple A 症候群 (AAAS) の原因である核膜孔蛋白アラジンに依存性であるかを検討し、本疾患で障害を受けやすい古典的な核局在シグナル (NLS) 以外の輸送シグナル同定と輸送機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

神経疾患原因蛋白をアラジンを基準として分類するために、運動ニューロン病の原因となる SMN1, SOD1 および小脳失調の原因となる XPA, ATM, ataxin 1、アプラタキシン、さらにパーキンソン病の原因蛋白パーキンの GFP 蛋白を AAAS 患者と対照線維芽細胞に発現させ、その核内輸送を検討した。次に、AAAS 患者細胞において、輸送障害を受けない XRCC1 蛋白における、古典的 NLS 以外の輸送シグナルを種々の truncation mutant の GFP 融合タンパクを作製して検索した。さらに、同定したシグナルを種々の蛋白に融合させ、その核内輸送能力、細胞障害抑制の効果を検討した。また、核内輸送に関わる他分子の検索として、アプラタキシンの核内輸送を変化させる蛋白をアプラタキシンと共発現させる事で、検索した。

4. 研究成果

神経変性疾患原因蛋白のうち AAAS 患者細胞で核内集積低下を認めたのはアプラタキシンのみであった。他の蛋白 (SMN1, SOD1, XPA, ATM, ataxin 1、パーキン) は対照との差がなく、アラジン非依存性の核内輸送に関連すると考えられる。また、DNA 修復蛋白では、DNA ligase I が核内輸送障害を受けたが、他の修復蛋白 (XRCC1, CAF1) では障害を認めなかった。

XRCC1 蛋白における、古典的 NLS 以外の輸送シグナル検索の結果、古典的 NLS (239-266 残基) の下流 267-276 残基が重要である事が判明した。この部位を含む、新規同定した NLS (239-276 残基) を minimum essential sequence of stretched nuclear localization signal (mstNLS) と名付けた。mstNLS を融合すると、輸送障害を受けていたアプラタキシ

や DNA ligase I は AAAS 患者細胞の核内に効率よく輸送された (Biochem Biophys Res Commun 2008;374: 631-634)。また、正常細胞であっても、酸化ストレス下においては、アプラタキシンの核内輸送が障害されるが、mstNLS はその状況下においても効率よく核内輸送を行えた。また、mstNLS を融合したアプラタキシンおよび DNA ligase I を患者細胞に発現させると、酸化ストレスへの抵抗性を獲得した (図 1)。以上から、mstNLS は患者細胞の核内輸送障害を改善するのみならず、酸化ストレス下の正常細胞においても、強力な核局在シグナルとなる事が証明された。

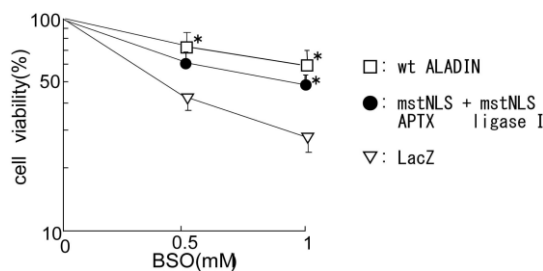


図 1. AAAS 患者細胞の L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) による酸化ストレス関連細胞死と mstNLS 融合アプラタキシン (APT-X) と DNA ligase I による細胞死抑制。陰性コントロール (LacZ) を発現した患者細胞は BSO の濃度依存性に細胞死を起こす。一方、mstNLS-APTX+mstNLS-ligase I 導入は、有意に細胞死を抑制する。しかし、陽性コントロールである野生型 (wt) ALADIN 導入ほどの改善はないことから、未知の蛋白輸送障害が残存している可能性が示唆される。

アプラタキシンに作用し核内輸送を障害する蛋白を新規に同定した。この蛋白は酸化ストレス時に特に強く核内輸送阻害を行なうことが判明した (論文投稿中)。mstNLS 蛋白融合はこの阻害作用も抑制した。

また、筋萎縮性側索硬化症原因蛋白 SOD1 は変異蛋白が核内に移行しない事により、核内の酸化ストレスへの対応が不十分になり細胞死が生じると最近報告された (Hum Mol Genet 2007 16:1604) が、本研究で mstNLS を融合した SOD1 が核内に移行し、酸化ストレスによる細胞死を予防する事を証明した。さらに、SOD1 は C 端の欠失により、蛋白は細胞質に蓄積 (核内からは減少) するが、トランスジェニックマウスモデルにおいて、これまでで、最短である T116X 蛋白発現によっても、SOD1 は細胞質に蓄積し、発症することを証明した (Hum Mol Genet 2008;17: 2310)。今後、T116X 蛋白に mstNLS を融合する事で、細胞死が抑制されるかを検討する。

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 14 件)

1. 平野牧人, 森 俊雄, 上野 聡. 総説 神経疾患と塩基除去修復 放射線生物研究 査読有. 2009 印刷中
2. Tonomura Y, Hirano M, Shimada K, Asai H, Ikeda M, Kataoka H, Tanaka I, Konishi N, Ueno S. Treatable fluctuating mental impairment in a patient with Bardet-Biedl syndrome. **Clin Neurol Neurosurg**, 査読有, 111, 102-104, 2009.
3. Asai H, Hirano M, Furiya Y, Udaka F, Morikawa M, Kanbayashi T, Shimizu T, Ueno S. Cerebrospinal fluid-orexin levels and sleep attacks in four patients with Parkinson's disease. **Clin Neurol Neurosurg**, 査読有, 111, 341-344, 2009.
4. Deng H-X, Jiang H, Fu R, Zhai H, Shi Y, Liu E, Hirano M, C. Dal Canto M, Siddique T. Molecular dissection of ALS-associated toxicity of SOD1 in transgenic mice using an exon-fusion approach. **Hum Mol Genet**, 査読有, 17, 2310-2319, 2008.
5. Nishiwaki T, Kobayashi N, Iwamoto T, Yamamoto A, Sugiura S, Liu YC, Sarasin A, Okahashi Y, Hirano M, Ueno S, Mori T. Comparative study of nucleotide excision repair defects between XPD-mutated fibroblasts derived from trichothiodystrophy and xeroderma pigmentosum patients. **DNA Repair (Amst)**, 査読有, 7, 1990-1998, 2008.
6. Kiriya T, Hirano M, Asai H, Ikeda M, Furiya Y, Ueno S. Restoration of nuclear-import failure caused by triple A syndrome and oxidative stress. **Biochem Biophys Res Commun**, 査読有, 374, 631-634, 2008.
7. Yanase M, Kataoka H, Kawahara M, Hirabayashi H, Yamanaka T, Hirano M, Ueno S. Fixed epiglottis associated with subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 査読有, 79, 332-333, 2008.
8. Furiya Y, Hirano M, Kusunoki S, Ueda M, Sugie K, Nishiwaki T, Ueno S. Complete recovery of an aged patient with Guillain-Barre syndrome associated with multiple IgM anti-ganglioside antibodies. **Muscle Nerve**, 査読有, 38, 1630-1633, 2008.
9. Furiya Y, Hirano M, Nomura M, Asai H, Kiriya T, Ueno S. Peripheral neuropathy in chromosome16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 査読有, 78, 1009-1011, 2007.
10. Hirano M, Asai H, Kiriya T, Furiya Y, Iwamoto T, Nishiwaki T, Yamamoto A, Mori T, Ueno S. Short half-lives of ataxia-associated aprataxin proteins in neuronal cells. **Neurosci Lett**, 査読有, 419, 184-187, 2007.
11. Taoka T, Kin T, Nakagawa H, Hirano M, Sakamoto M, Wada T, Takayama K, Wuttikul C, Iwasaki S, Ueno S, Kichikawa K. Diffusivity and diffusion anisotropy of cerebellar peduncles in cases of spinocerebellar degenerative disease. **Neuroimage**, 査読有, 2007, 37, 387-393.
12. Kiriya T, Tanizawa E, Hirano M, Shinkai T, Asai H, Furiya Y, Ueno S. SPECT revealed cortical dysfunction in a patient who had genetically definite megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. **Clin Neurol Neurosurg**, 査読有, 109, 526-530, 2007.
13. Kajitani M, Yagura H, Kawahara M, Hirano M, Ueno S, Fujimoto K, Sakaki T, Taoka T, Nakagawa H, Kichikawa K. Treatable fluctuating Parkinsonism and dementia in a patient with a dural arteriovenous fistula. **Mov Disord**, 査読有, 22, 437-439, 2007.
14. Asai H, Hirano M, Udaka F, Shimada K, Oda M, Kubori T, Nishinaka K, Tsujimura T, Izumi Y, Konishi N, Matsumoto S, Kameyama M, Ueno S. Sympathetic disturbances increase risk of sudden cardiac arrest in sporadic ALS. **J Neurol Sci**, 査読有, 254, 78-83, 2007.

[学会発表] (計 8 件)

1. Hirano M 他 9 名. In vivo DNA damage accumulation in aprataxin-related ataxia. 134th Annual meeting of American Neurological Association. 2008 年 9 月 23 日 Salt Lake City, USA
2. 平野牧人 他 8 名. 眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳失調症における DNA 損傷の蓄積. 第 49 回日本神経学会総会. 2008 年 5 月 16 日, 横浜
3. 平野牧人 他 7 名. 酸化的 DNA 損傷修復系への小脳失調原因蛋白アプラタキシンの機能的関与. 第 48 回放射線影響学会. 2008 年 11 月 20 日, 小倉
4. Furiya Y, Hirano M 他 5 名 A Japanese family with triple A syndrome caused by a novel mutation in the ALADIN gene. 5th

Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience. 2007 年 10 月 7 日 Kyoto, Japan

5. Asai H, Hirano M 他 5 名 ALADINI482S causes hypersensitivity to oxidative stress by selective failure of DNA repair protein import in triple A syndrome. Neuroscience 2007 2007 年 11 月 5 日 San Diego, USA
6. Hirano M 他 5 名. Mutant ALADIN responsible for triple A syndrome impairs nuclear import of aprataxin, a DNA repair protein causative for ataxia. Neuro2007 (日本神経化学会総会). 2007 年 9 月 10 日, 横浜
7. 浅井宏英、平野牧人 他 3 名. 新たな ALADIN 遺伝子変異を伴う Triple A 症候群における、小脳失調原因蛋白 aprataxin の核内輸送障害. 第 48 回日本神経学会総会. 2007 年 5 月 18 日, 名古屋
8. 平野牧人 他 4 名. 小脳失調原因蛋白 aprataxin 導入による Triple A 症候群のストレス起因性細胞死の抑制. 第 48 回日本神経学会総会. 2007 年 5 月 18 日, 名古屋

[図書] (計 2 件)

1. 平野牧人 他 42 名. 創元社, 医療の最先端
—奈良医大からの発信—, 2008 年, 208 ページ(44-48 ページ)
2. 平野牧人 他 101 名. ケアマネジメント用語辞典, ミネルヴァ書房, 2007 年, 545 ページ(2, 214 語中 121 語)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 牧人 (HIRANO MAKITO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50347548

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし