

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591097

研究課題名（和文）

神経変性疾患原因蛋白の相互作用、翻訳後修飾、細胞内局在の検討と治療的応用

研究課題名（英文）

Interaction, posttranslational modification, and subcellular localization of proteins causative for neurodegenerative diseases

研究代表者 平野 牧人（HIRANO MAKITO）

近畿大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50347548

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、種々の神経変性疾患原因蛋白同士の相互作用、翻訳後修飾、細胞内局在を検討することである。翻訳後修飾はユビキチン化とリン酸化を対象とする。常染色体優性遺伝小脳失調症 14 型の原因遺伝子 protein kinase C が常染色体劣性遺伝小脳失調症の原因遺伝子アプラタキシンのリン酸化を亢進し、核内輸送を妨げ、結果として DNA 修復蛋白でもあるアプラタキシンの核内欠乏を来たすことで、DNA 損傷が蓄積し神経細胞の障害が生じることを証明した(Hum Mol Genet 2009;18:3533)。また、X 連鎖性優性遺伝の筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因蛋白として新たに ubiquilin2 を同定し、病理学的に、神経にこの蛋白およびそのほかの ALS 原因蛋白である TDP43, FUS, Optineurin などと共に家族性あるいは孤発性 ALS 患者の運動ニューロンにみられるユビキチン陽性封入体に凝集することを示した(Nature 2011;477:211)。

研究成果の概要（英文）：The objective of this work is to investigate interaction, posttranslational modification, and subcellular localization of proteins causative for neurodegenerative diseases. Posttranslational modification includes phosphorylation and ubiquitination. In this study, we found protein kinase C γ , the protein causative for autosomal dominant spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14), phosphorylated aprataxin, the protein causative for autosomal recessive ataxia. This phosphorylation inhibited the nuclear transport of aprataxin that has a DNA repair activity, resulting in its deficiency in the nucleus, accumulation of DNA damage unrepaired, and neuronal cell death (Hum Mol Genet 2009;18:3533). We identified ubiquilin2 as a novel protein causative for X-linked dominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This protein co-aggregates with TDP43, FUS, and optineurin, proteins causative for other types of ALS, in ubiquitin-positive inclusions of motor neurons of patients with familial and even sporadic ALS (Nature 2011;477:211).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：医歯薬学 内科学臨床医学 神経内科学

キーワード：翻訳後修飾、神経変性疾患、蛋白相互作用、細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代が到来し、蛋白の分解、細胞内局在、シグナル伝達などに関与する翻訳後修飾や蛋白相互作用は、今後益々注目を浴びると考えられる。しかし、50を超える神経変性疾患原因蛋白については未解明な点が多い。翻訳後修飾を担うとされるパーキンソン病原因蛋白パーキンのユビキチン化や、PINK1, LRRK2 および小脳失調症原因蛋白 protein kinase C (PKC γ)のリン酸化に関しては、病原性に直結する基質が確定していない。一方、翻訳後修飾される蛋白として、小脳失調症の原因ポリグルタミン蛋白と筋萎縮性側索硬化症原因蛋白 SOD1 のユビキチン化や、パーキンソン病関連蛋白 HtrA2 のリン酸化があるが、病態への貢献度について未だ十分解明されていない。

2. 研究の目的

種々の神経変性疾患原因蛋白同士の相互作用、翻訳後修飾、細胞内局在を検討することである。翻訳後修飾はユビキチン化とリン酸化を対象とする。

3. 研究の方法

細胞内小器官局在化シグナルを有する蛋白との結合、あるいは、翻訳後修飾(ユビキチン化やリン酸化)により、核、ER、ミトコンドリアへの局在や機能が変化する事は神経変性疾患原因蛋白以外では、よく知られている(Cell Death Differentiation 14;1350:2007; Oncogene 23;6581:2004; J Am Soc Nephrol, 19;1342:2008; Cheng et al., Carcinogenesis 2008 in press)。

神経変性疾患として代表的なパーキンソン病、運動ニューロン病、小脳失調症および類縁疾患の原因蛋白を対象とし、樹立済みの患者線維芽細胞や神経系モデル細胞でパイオアッセイを行う。ここでは核(アブラタキシン, ataxin1, TDP1, ATM, XPA [小脳失調症]; TDP43 [運動ニューロン病]; senataxin [両疾患]), ER(パーキン), ミトコンドリア (PINK1, HtrA2 [パーキンソン病]), 細胞質やその他に存在する蛋白 (SOD1, SMN1, alsin, ANG [運動ニューロン病], LRRK2, PKC γ , atrophin1) について、酸化ストレスと非ストレス下の局在を蛍光・共焦点レーザー顕微鏡で定量し、正常細胞と比較した。局在の異なる蛋白も、多くはパーキン同様、一部分ミトコンドリア・核・細胞質に存在し相互作用可能と思われる。

今回用いる患者細胞あるいは変異PKC γ を発現させた神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞は酸化ストレスにより細胞死が生じやすい。以前の研究で、アラジン変異細胞ではアブラタキ

シンの核内輸送障害が生じるが、強力な核局在シグナルmstNLSを融合したアブラタキシンは核内に移行し、細胞死は抑制された(Biochem Biophys Res Commun 374;631:2008)。そこで、上記aで局在変化がある時は、それを戻すように、(必要であれば複数個)細胞内小器官局在化シグナルを融合した蛋白を発現させて、ストレス反応(ERストレス、ミトコンドリア・核DNA損傷修復)・細胞死抑制効果を検討する。

アブラタキシンの細胞内小器官局在化シグナル周囲にあるリジン、セリン/スレオニン残基を置換することで局在変化を観察し、ユビキチン化あるいはリン酸化部位を特定する。さらにペプチドを用いた*in vitro*実験で修飾部位を確認する。リン酸化を受ける蛋白またはアブラタキシンのリン酸化ペプチドを用いて、リン酸化蛋白特異的抗体を作製する。この抗体を用いてヒト脳・脊髄を染色し、神経組織における生理的・病的リン酸化蛋白の局在を検討した。

リン酸化・脱リン酸化・脱ユビキチン化阻害による細胞死抑制効果の検討として、優性遺伝に関与し、機能亢進が推定されるPKC γ にはリン酸化阻害物質を、パーキンは脱ユビキチン化阻害薬を用いてリン酸化やユビキチン化を維持し、局在変化やストレス反応・細胞死抑制効果を検討した。

4. 研究成果

SCA14の原因遺伝子 protein kinase C が常染色体劣性遺伝小脳失調症の原因遺伝子アブラタキシンのリン酸化を亢進し、核内輸送を妨げ、結果としてDNA修復蛋白でもあるアブラタキシンの核内欠乏を来すことで、DNA損傷が蓄積し神経細胞の障害が生じることを証明した(Hum Mol Genet 2009; 18:3533)。さらに、アブラタキシンの複数のリン酸化部位をアラニン(不活性化)やグルタミン(擬似リン酸化)に置換したタンパクの局在を観察した。アブラタキシンの核内移行はリン酸化部位の不活化により促進され、擬似リン酸化により阻害されることを確認した。また、リン酸化アブラタキシンに対する特異的抗体を作製・解析した。線維芽細胞のウエスタンプロットにおいて、軽度高分子側にシフトしたバンドが観察された。リン酸化アブラタキシンに対する特異的抗体を作製・解析した。線維芽細胞のウエスタンプロットにおいて、軽度高分子側にシフトしたバンドが観察された。神経様 SH-SY5Y 細胞におけるリン酸化蛋白の局在を検討した。この結果、リン酸化蛋白は核内にも存在することが判明した。一方、正常の小脳組織における染色では、Purikinje 細胞では、主として細胞質が染色

され、一方顆粒神経細胞では核が染色された。ユビキチン E3 リガーゼである Parkin 関連パーキンソン病患者線維芽細胞において、酸化ストレス下で細胞死が誘導されること、それが DNA 損傷蓄積を伴うことを見出し報告した (Biochem Biophys Res Commun 2010;391:800)。リン酸化酵素であり、家族性パーキンソン病の原因である PINK 1 に注目した。この蛋白はミトコンドリア異常に伴う細胞障害に関して、パーキンの上流に位置するが、PINK 1 の量的変化がパーキンの量的変化と平行することをパーキンの患者細胞において発見した。

家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の UBQLN2 の同定に携わった (Nature 2011;477:211)。この遺伝子がコードする蛋白 ubiquilin2 はユビキチン様ドメインとユビキチン関連ドメインを有し、変異蛋白は、ユビキチン-プロテアソーム系の障害を生じる。この ubiquilin2 は家族性 ALS のみならず、遺伝子異常のない孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンにも凝集を生じるが、その凝集には別の ALS 原因蛋白である FUS, OPTN, TDP43, SOD1 などとも共存する。すなわち、これら原因蛋白との相互作用が推定される。実際に family 蛋白である ubiquilin1 は TDP43 蛋白の毒性を緩和することが指摘されており、今後はこういった、機能的な関連を証明する予定である。

また、蛋白分解に関する proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) が免疫性の神経筋疾患である中条病の原因遺伝子であることを発表した (Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:14914)。

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 8 件)

1. Deng, H.X., Chen, W., Hong, S.T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., Jiang, H., Hirano, M., Rampersaud, E., Jansen, G.H., Donkervoort, S., Bigio, E.H., Brooks, B.R., Ajroud, K., Sufit, R.L., Haines, J.L., Mugnaini, E., Pericak-Vance, M.A. and Siddique, T.: Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. **Nature**, 査読有, 477: 211-215, 2011. DOI: 10.1038/nature10353
2. Arima, K., Kinoshita, A., Mishima, H., Kanazawa, N., Kaneko, T., Mizushima, T., Ichinose, K., Nakamura, H., Tsujino, A., Kawakami, A., Matsunaka, M., Kasagi, S., Kawano, S., Kumagai, S., Ohmura, K., Mimori, T., Hirano, M., Ueno, S., Tanaka, K., Tanaka, M., Toyoshima, I., Sugino, H., Yamakawa, A., Niikawa, N., Furukawa, F., Murata, S., Eguchi, K., Ida, H. and Yoshiura, K.I.: Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 査読有, 108: 14914-14919, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1106015108
3. Samukawa, M., Hirano, M., Sakamoto, H., Kitada, M., Kusunoki, S. and Nakamura, Y.: Risks of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in multiple system atrophy. **Mov. Disord.**, 査読有, 26: 2572-2573, 2011. DOI: 10.1002/mds.23904
4. Hirano, M., Kokunai, Y., Nagai, A., Nakamura, Y., Saigoh, K., Kusunoki, S. and Takahashi, M.P.: A novel mutation in the calcium channel gene in a family with hypokalemic periodic paralysis. **J. Neurol. Sci.**, 査読有, 309: 9-11, 2011. DOI: doi:10.1016/j.jns.2011.07.046
5. 磯野千春, 中村雄作, 阪本 光, 平野牧人, 山田郁子: 遺伝性脊髄小脳変性症への言語聴覚療法 - 長期介入報告 - **言語聴覚研究**, 査読有, 8: 63 -65, 2011 .
6. Asai, H., Hirano, M., Kiriyama, T., Ikeda, M. and Ueno, S.: Naturally- and

- experimentally-designed restorations of the Parkin gene deficit in autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 査読有, 391: 800-805, 2010. DOI: org/10.1016/j.bbrc.2009.11.141
7. Asai, H., Hirano, M., Shimada, K., Kiriyama, T., Furiya, Y., Ikeda, M., Iwamoto, T., Mori, T., Nishinaka, K., Konishi, N., Udaka, F. and Ueno, S.: Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. **Hum. Mol. Genet.**, 査読有, 18: 3533-3543, 2009. DOI: 10.1093/hmg/ddp298
 8. Asai, H., Hirano, M., Furiya, Y., Udaka, F., Morikawa, M., Kanbayashi, T., Shimizu, T. and 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. DOI: 10.1016/j.clineuro.2008.11.007
- 〔学会発表〕(計 29 件)
シンポジウム
1. Hirano, M. 他: Oxidative stress-induced DNA damage in neurodegenerative diseases –autosomal dominant and recessive ataxia and motor neuron diseases– 1st RIRBM International Symposium Genome damage and non-cancerous diseases , 2011 , Hiroshima.
 2. 平野牧人 他: DNA 単鎖切断修復蛋白アプラタキシンと神経疾患～常染色体優性・劣性小脳失調症と AAA 症候群～日本放射線影響学会, 2009, 広島.
- 一般講演
3. Hirano, M. 他: The first nationwide survey of Bardet-Biedl syndrome in Japan. 136th Annual meeting of American Neurological Association; 2011, San Diego, USA.
 4. 平野牧人 他: SCA3 および SCA6 における嚙下障害の経過と特徴. 第 29 回日本神経治療学会, 2011, 福井.
 5. 平野牧人 他: UBQLN2 は筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子である. 第 56 回日本人類遺伝学会, 2011, 大宮.
 6. 平野牧人 他: バルデー・ビーデル症候群の全国実態調査, 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会, 2011, 京都.
 7. 平野牧人 他: 多系統萎縮症と抗利尿ホルモン不適合分泌症候群の関連. 第 52 回日本神経学会, 2011, 名古屋.
 8. 平野牧人 他: 本邦におけるバルデー・ビーデル症候群の実態. 第52回日本神経学会, 2011, 名古屋.
 9. Hirano, M. 他: The first nationwide survey of triple A syndrome in Japan. 135th Annual meeting of American Neurological Association; 2010, San Francisco, USA.
 10. Hirano, M. 他: Phenotype-Genotype Relationship of Triple A Syndrome. 135th Annual meeting of American Neurological Association; 2010, San Francisco, USA.
 11. Hirano, M. 他: The influence of antihypertensive drugs, rennin-angiotensin blockades, on cognitive decline and insulin resistance in Alzheimer's disease. 135th Annual meeting of American Neurological Association; 2010, San Francisco, USA.
 12. Hirano, M. 他: Spontaneous and Experimental Exon Skipping Restores the Parkin Gene Deficits in Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. 135th Annual meeting of American Neurological Association; 2010, San Francisco, USA.

13. Hirano, M. 他: Japanese patients with Bardet-Biedl syndrome. Neuro2010 (日本神経化学会総会), 2010, 神戸.
14. 平野牧人 他: 運動ニューロン病様 AAA 症候群の全国実態調査および臨床遺伝学的研究連 第 51 回日本神経学会総会 . 2010 年 5 月 . 東京 .
15. 平野牧人 他: Alzheimer患者における内臓脂肪面積とadipocytokinesの検討 . 第 51 回日本神経学会総会 . 2010 年 5 月 . 東京 .
16. 平野牧人 他: 常染色体劣性パーキンソニズムのparkin機能欠損に対するアンチセンス治療の検討 . 第 51 回日本神経学会総会 . 2010 年 5 月 . 東京 .
17. 平野牧人 他: 本邦におけるバルデー・ビードル症候群 人類遺伝学会第 55 回大会, 2010, 大宮 .
18. 平野牧人 他: 多系統萎縮症における抗利尿ホルモン不適合分泌症候群の合併 . 第 63 回日本自律神経学会総会, 2010, 横浜 .
19. 平野牧人 他: FUS 関連筋萎縮側索硬化症細胞の酸化ストレスに対する脆弱性と DNA 損傷の蓄積 . 第 53 回放射線影響学会, 2010, 京都 .
20. 平野牧人 他: パーキン関連パーキンソニズムにおけるエクソスキッピング誘導療法 . 第 28 回日本神経治療学会, 2010, 横浜 .
21. Hirano, M. 他: Japanese patients with triple A syndrome. 6th Congress of International Society for Autonomic Neuroscience; 2009, Sydney, Australia
22. Hirano, M. 他: Aggregate formation and activities of mutant protein kinase C gamma, a protein causative for spinocerebellar ataxia type 14. 134th Annual meeting of American Neurological Association; 2009, Baltimore, USA.
23. Hirano, M. 他: MRI abnormalities of cervical roots in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. 134th Annual meeting of American Neurological Association; 2009, Baltimore, USA.
24. Hirano, M. 他: Kinase activities of mutant protein kinase C gamma, a protein causative for spinocerebellar ataxia type 14, and neuronal cell death under oxidative stress. 134th Annual meeting of American Neurological Association; 2009, Baltimore, USA.
25. 平野牧人 他: 遺伝性脊髄小脳変性症 14 型の原因となる 変異 protein kinase C γ 活性と蛋白凝集の関連, 第 50 回日本神経学会, 2009, 仙台 .
26. 平野牧人 他: 酸化ストレス下における 遺伝性脊髄小脳変性症 14 型の原因となる 変異 protein kinase C 活性と細胞死の関連 . 第 50 回日本神経学会, 2009, 仙台 .
27. 平野牧人 他: Alzheimer 患者におけるメタボリックシンドロームと内臓脂肪面積の検討 第 50 回日本神経学会 2009, 仙台 .
28. 平野牧人 他: PMP22 遺伝子欠失を伴う 遺伝性圧脆弱性ニューパチーにおける神経根の MRI 所見 . 第 50 回日本神経学会, 2009, 仙台 .
29. 平野牧人 他: DNA 修復蛋白 XRCC1 の核局在シグナルを用いた Aprataxin と SOD1 の核内輸送 . 第 50 回日本神経学会,

2009, 仙台 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者 平野 牧人

(HIRANO MAKITO)

近畿大学・医学部附属病院・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