

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790868

研究課題名(和文) 神経変性疾患におけるユビキチン連結酵素MULの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ubiquitin ligase MUL in the neurodegenerative disease

研究代表者

加納 崇裕 (Kano, Takahiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20374324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患における蛋白質MULとFIP200の発現とニューロン変性の関係を検討した。過去に剖検された数種類の神経変性疾患の患者の脳皮質、小脳皮質に対して、免疫組織染色を行い、筋萎縮性側索硬化症において小脳プルキンエ細胞におけるFIP200の染色性の低下を認めた。これはオートファジーの異常によりMULの機能亢進を来している可能性が考えられるが、それを明らかにするまでには成果をあげることは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：We examined expression of protein MUL and FIP200 in the neurodegenerative disease and relations of the neuron degeneration. For cerebral cortex and the cerebellar cortex of the patients with several kinds of neurodegenerative disease held an autopsy by a past, we immunostained it and showed a decrease of the expression of FIP200 in the cerebellum Purkinje cell in amyotrophic lateral sclerosis. This might result in hyperactivity of MUL by abnormality of the autophagy, but was not able to elucidate it.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：ユビキチン オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン連結酵素 MUL は重篤な成長不全を呈する遺伝性疾患である Mulibery 小人症でその遺伝子変異が認められている蛋白質であるが、アルツハイマー病患者の脳内においてその発現量が上昇していることが報告されている。我々はこの MUL の基質蛋白質として FIP200 を同定し、この FIP200 が MUL によりユビキチン化され、その分解が促進されることを確認した¹⁾。FIP200 はオートファジーにおいて必須の蛋白質であり、多くの神経変性疾患の病態にこのオートファジーが関係している。われわれはこれまで MUL と FIP200 との親和性はオートファジーが誘導される飢餓状態で低下することを確認しており¹⁾、これより MUL が異常に亢進したオートファジーを制御することで神経細胞に保護的に働いているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

様々な神経変性疾患において変性した神経細胞内における MUL や FIP200 の発現量の変化、封入体内への蓄積を観察するとともに、オートファジー誘導状態を検討する。これによりオートファジーを介して MUL が神経変性疾患においてニューロンを保護する役割を持っていることを明らかにし、病態の解明や治療法の開発に役立てたい。

3. 研究の方法

(1) 病理検体を用いて神経変性疾患における MUL と FIP200 の発現とニューロン変性の関係の検討
北海道大学病院において過去に剖検された

筋萎縮性側索硬化症など神経変性疾患患者の脳、小脳の病理検体において、MUL や FIP200 に対する特異抗体を用い免疫組織染色を行った。ニューロンにおける MUL や FIP200 の発現とニューロンの変性状態の関係を神経変性疾患ではない脳腫瘍患者の非病変側脳検体を対照として比較検討を行った。

(2) 培養細胞系での MUL の過剰発現による細胞生存性への影響の検討

神経系の培養細胞である Neuro2A 細胞にウイルスベクターを用いて GFP タグ蛋白質を融合した LC3 を恒常的に発現する細胞を作製する。LC3 はオートファゴソーム形成の際にその膜に結合する蛋白質でオートファジー誘導のマーカーとして利用されており²⁾、これによりオートファジーを蛍光顕微鏡下で観察することが可能となる。この細胞に MUL を過剰発現やロックダウンを起こした上で、オートファジー誘導刺激を与えたときのオートファゴソーム形成に生じる変化を検討する。同様の実験を非神経である He-La 細胞で行い神経系細胞での変化や生存性の比較検討を行って、MUL による神経保護機能を評価する。

4. 研究成果

(1) 神経変性疾患として筋萎縮性側索硬化症 2 例、脊髄小脳変性症 3 型 2 例、アルツハイマー病 1 例、パーキンソン病 2 例の剖検検体を研究対象とした。それぞれの大脳皮質、小脳皮質を MUL、FIP200 に対する特異抗体でそれぞれ染色し、同時に対照脳検体(脳腫瘍患者における非病側脳)と比較した。脊髄小脳変性症 3 型、アルツハイマー病、パーキンソン病においては対照群と比較して特

に有意な差は認められなかった。またそれぞれの疾患にみられる封入体構造物への蓄積も観察されなかった。しかし、筋萎縮性側索硬化症の1例において小脳 Purkinje 細胞で FIP200 の染色性が低下しており、分解が促進されている可能性が示唆された。同時に染色した MUL は特に対照と比較して変化なく、発現量ではなく機能的な変化が生じたことが考えられた。2例のうち1例でのみ観察された所見であり、さらに検討する例数を増やす必要があるが、今回の研究期間内には検体を集めることが出来なかった。ニューロンの変性が強い一次運動野では FIP200 の染色性に変化は認められず、ニューロンの変性との関連性も見いだせていない。神経変性疾患の中で小脳変性が主体である脊髄小脳変性症3型では Purkinje 細胞における FIP200 の発現量で対照と差は認められず、ニューロンの変性と一致してみられる所見ではないようである。結果的に考察をするには検討例数が少なく結論を述べられるほどには研究をすすめられなかった。

(2) 細胞の培養実験を行う環境整備を研究期間内にすすめることができず、培養細胞の購入さえも出来なかった。LC3 ウイルス発現ベクターの作製のための時間を確保出来ず、この研究期間内に作成することは出来なかった。培養細胞系の研究は今回の研究期間内にすすめることが出来なかった。

(3) 今後の展望
本研究に十分な時間を割くことが出来ず、結論を述べられるほどに研究をすすめることが出来なかった。筋萎縮性側硬化症においてはオートファジーによる神経変性への関与

が示唆されており、さらに例数を積み重ねることで MUL や FIP200 の病態への関与を解明できると考える。

<引用文献>

- 1) 加納 崇裕、FIP200 結合性 E3 ユビキチンリガーゼ MUL によるオートファジー誘導制御の可能性、Acta medica Hokkaidonensia 査読有 85(4) ;2010 : 241-248
- 2) Klionsky DJ et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy 査読有 4(2) ;2008 :151-175

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加納 崇裕 (KANO Takahiro)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 20374324