

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293207

研究課題名(和文) 共通分子UBQLN2を通じたポリグルタミン病・ALS/FTLDの統合的病態解明

研究課題名(英文) Integrated research of polyglutamine disease and ALS/FTLD by analysis of UBQLN2

研究代表者

田中 章景 (TANAKA, Fumiaki)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30378012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ALS/FTLD、ポリグルタミン病の神経細胞変性におけるUBQLN2の役割を解明することを目的とした。ALS/FTLDを起こす変異型UBQLN2に対し、野生型と異なる結合性を示す分子の同定を目指して、質量分析装置による解析を行った。この結果、変異型で結合性が低下しているタンパク質の一つとしてHsc71を同定した。また、Hsc71との結合はPXXドメインを持つUBQLN2に特異的な機能であることを明らかにした。さらに、Ubqln2flox/floxマウスとActb-Creマウスの交配で全細胞での、Tubb3-Creマウスとの交配で神経細胞でのノックアウトマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the role of UBQLN2 in neurodegeneration of ALS/FTLD and polyglutamine disease. Using mass spectrometry equipment we tried to identify molecules that exhibit differential binding affinity for wild-type and mutant UBQLN2 causing ALS/FTLD. As a result, Hsc71 was identified as one of the proteins showing reduced binding affinity for mutant UBQLN2. Further, we found that binding with Hsc71 depends on PXX domain of UBQLN2. In addition, we created the total and neuron-specific UBQLN2 knockout mice by mating Ubqln2 flox/flox mice with Actb-Cre mice and the Tubb3-Cre mice, respectively.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS ポリグルタミン病 UBQLN2

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンが特異的に障害され、2-5 年で呼吸筋麻痺に至る予後不良の神経変性疾患であり、その約 9 割は孤発性 (SALS) で原因不明である。一方、ポリグルタミン病は責任遺伝子タンパク質翻訳領域の CAG リピートの異常伸長に起因する遺伝性神経変性疾患で、現在までのところ 9 疾患が知られているが、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) を除いては病態抑止をめざした治療法開発の目処が得られていない。

我々はこれまでに、ポリグルタミン病が形成する核内凝集体の構成成分の解析を行い、ubiquilin1 (UBQLN1)、2 (UBQLN2) を含むユビキチン結合タンパク質、FUS/TLS を含む RNA 結合タンパク質、TET (または FET) family タンパク質 (FUS/TLS、EWS、TAF15) を同定し、これらの凝集体への結合はポリグルタミン病一般に認められる所見であることを明らかにしてきた。

驚くことに、近年、このように我々がポリグルタミン病核内凝集体の構成成分として同定した FUS/TLS や UBQLN2 をコードする遺伝子 FUS および UBQLN2 が家族性 ALS (FALS) の原因遺伝子であることが明らかになった。また、同様に EWS、TAF15 についても病理学的、遺伝学的に ALS/FTLD と関連する可能性が示され、我々が世界に先駆けて神経変性疾患への関与を指摘した TET family タンパク質や UBQLN2 の重要性が、神経変性疾患研究において一躍注目を集めるに至っている。

2. 研究の目的

我々は、FUS/TLS や ubiquilin2 (UBQLN2) が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) / 前頭側頭型認知症 (FTLD) の病因分子として報告される以前から、ポリグルタミン病核内凝集体の構成成分として世界に先駆けてこれらを同定し、神経変性疾患の病態形成における重要性を指摘してきた。ALS/FTLD とポリグルタミン病で、このように共通の分子が病態形成に係わっていることは決し

て偶然ではなく、両者に共通した病態機序があることは想像に難くない。本研究では、我々は共通分子として、ユビキチン-プロテアソーム系の構成タンパク質 UBQLN2 に着目し、ALS/FTLD とポリグルタミン病において、UBQLN2 が病態形成に果たす役割を細胞モデル、マウスモデルを駆使して明らかにし、両疾患の病態解明を統合的に推進する。さらに、これにより、神経変性疾患全般に共通する病態解明、病態抑止療法の開発へと発展させることをめざした。

3. 研究の方法

UBQLN2 の機能解析を開始するに当たり、ALS の原因として複数家系で確認されている変異を選び、変異型 UBQLN2 発現ベクターの作製を行った。一過性の過剰発現系において変異型 UBQLN2 と野生型 UBQLN2 を発現させ、プロテアソーム阻害薬、オートファジー阻害薬、ER ストレス誘導役など様々なストレスに対する反応を検討した。さらに、野生型および ALS/FTLD において報告されている変異型 UBQLN2 に対し、異なる結合性を示す分子の同定を目指して、質量分析装置を用いた網羅的・定量的解析を行った。本研究では、ALS における我々の UBQLN2 の loss of function 仮説を in vivo で証明するために、Ubqln2 の全細胞および神経細胞特異的なノックアウトマウスを作成し、機能解析、治療介入を行うことが最も重要な課題となっている。そのためにもまず loxP 配列で Ubqln2 遺伝子を挟み込む loxP -Ubqln2 マウスを作成した。

4. 研究成果

一過性の過剰発現系におけるプロテアソーム阻害薬、オートファジー阻害薬、ER ストレス誘導役など様々なストレスに対する反応に対しては、変異型 UBQLN2 と野生型 UBQLN2 の挙動に変化は明らかではなかった。次に、質量分析装置により、ALS/FTLD を起こす変異型 UBQLN2 に対し、野生型と異なる結合性を示す分子の同定

を目指すにあたり、まず野生型 UBQLN2 に結合する分子として UBXD8、TDP43、ユビキチンリガーゼ、プロテアソームサブユニット、hnRNPs など既報告のものを同定可能なことを確認した。その上で、質量分析装置を用いた網羅的・定量的解析を複数回施行することで結合性の評価を行い、UBQLN2 の ALS 変異型において特に結合性が低下しているタンパク質の一つとして Hsp70 ファミリーの一つでシャペロンとして知られている Hsc71 を同定した。HEK293T 細胞に UBQLN2 野生型、ALS 変異型、さらに PXX ドメイン欠損変異型の Halo-UBQLN を発現させて Halo resin で吸着、抗 Hsc71 抗体で western blotting を行ったところ、Hsc71 との結合は ALS 変異型および PXX ドメイン欠損変異型において低下していることが明らかとなった。このことは、Hsc71 との結合は PXX ドメインを持つ UBQLN2 に特異的な機能である可能性を示している。そして、変異によりシャペロンを介した UBQLN2 特異的な機能が障害されると考えられる。マウスについては、作成した UBQLN2 Flox マウスを維持し、Actb-Cre マウスと Ubqln2flox/flox を掛け合わせ、全細胞でのノックアウトマウスを作成した。さらに、神経細胞特異的なノックアウトを目的に、Tubb3-Cre マウスとの交配も行った。これらの表現型が出現するまでには時間を要するため、現在も解析中である。

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 12 件)

1. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S,

Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS).

Next-generation sequencing of 28

ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging* 39: 219.e1-8, 2016.

DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030
査読有

2. Takahashi K, Takei K, Tanaka F. Association of multiple sclerosis with lateral olfactory tract usher substance (LOTUS), a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration. *Clin Exp Neuroimmunol* 6: 64-69, 2015.
DOI: 10.1111/cen3.12272 査読有
3. Takahashi K, Kurihara Y, Suzuki Y, Goshima Y, Tanaka F, Takei K. Association of Cerebrospinal Fluid Levels of Lateral Olfactory Tract Usher Substance (LOTUS) With Disease Activity in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol* 72: 176-179, 2015.
DOI: 10.1001/jamaneurol.2014.3613 査読有
4. Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniguchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, Tanaka F. A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis and deep sensory impairment associated with a novel homozygous *TTC19* mutation. *J Hum Genet* 60: 187-191, 2015.
DOI: 10.1038/jhg.2015.7. 査読有
5. Nakamura H, Yamashita N, Kanamaru Y, Tachibana T, Sekino Y, Chen S, Gotoh T, Tanaka F, Goshima Y: Quantitative analysis of intraneuronal transport in human iPS neurons. *J Pharmacol Sci* 128: 170-178, 2015.
DOI: 10.1016/j.jphs.2015.06.006. 査読有
6. Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y,

- Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ikeda S, Tanaka E, Matsumoto N, Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous *DDHD2* mutation. *Sci Rep* 4: 7132, 2014. DOI: 10.1038/srep07132 査読有
7. Koyano S, Yagishita S, Kuroiwa Y, Tanaka E, Uchihara T. Neuropathological Staging of Spinocerebellar Ataxia Type 2 by Semiquantitative 1C2-Positive Neuron Typing Nuclear Translocation of Cytoplasmic 1C2 Underlies Disease Progression of Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Brain Pathol* 24: 599-606, 2014. DOI: 10.1111/bpa.12146 査読有
8. 土井 宏, 田中章景. 神経細胞変性のメカニズム「蛋白質凝集と神経変性」 *BRAIN MEDICAL* 26: 73-79, 2014 査読無
9. Sugiyama M, Takao M, Hatsuta H, Funabe S, Ito S, Obi T, Tanaka E, Kuroiwa Y, Murayama S. Increased number of astrocytes and macrophages/microglial cells in the corpus callosum in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 33: 591-599, 2013. DOI: 10.1111/neup.12027 査読有
10. Takagi S, Iguchi Y, Katsuno M, Ishigaki S, Ikenaka K, Fujioka Y, Honda D, Niwa J, Tanaka E, Watanabe H, Adachi H, Sobue G. RNP2 of RNA recognition motif 1 plays a central role in the aberrant modification of TDP-43. *PLoS One* 8: e66966, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0066966 査読有
11. Hirano K, Ohgomori T, Kobayashi K, Tanaka E, Matsumoto T, Natori T, Matsuyama Y, Uchimura K, Sakamoto K, Takeuchi H, Hirakawa A, Suzumura A, Sobue G, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K. Ablation of keratan sulfate accelerates early phase pathogenesis of ALS. *PLoS One* 8: e66969, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0066969 査読有
12. Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka E, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One* 8: e54511, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0054511 査読有
- (学会発表) (計 9 件)
1. 多田美紀子, 土井 宏, 児矢野繁, 田中章景. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における Matr3 の病理学的検討. 第 56 回日本神経病理学会総会 2015 年 6 月 3 日-2015 年 6 月 5 日 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市東区)
2. 児矢野繁, 多田美紀子, 柳下三郎, 内原俊記, 田中章景. SCA2 病変における TDP-43 細胞内局在. 第 56 回日本神経病理学会総会 2015 年 6 月 3 日-2015 年 6 月 5 日 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市東区)
3. 土井 宏, 吉田邦広, 牛山雅夫, 谷佳津子, 松本直通, 田中章景. Late-onset spastic ataxia phenotype related to a novel homozygous *DDHD2* mutation. 第 56 回日本神経学会学術大会 2015 年 5 月 20 日-2015 年 5 月 23 日 朱鷺メッセ(新潟県新潟市中央区)
4. 田中章景. RNA 病からみた認知症関連疾患 C9orf72 遺伝子変異と前頭側頭型認知症. 第 33 回日本認知症学会学術集会. 2014 年 11 月 29 日-2014 年 12 月 1 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno K, Tanaka E, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba A, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T,

Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Analysis of major amyotrophic lateral sclerosis genes in Japan. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2014年10月18日-2014年10月22日 San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)	出願状況(計0件)
6. 釘本千春, 岩橋幸子, 小林絵礼奈, 斎藤麻美, 山崎舞子, 東山雄一, 上木英人, 田中章景. ALSの呼吸機能評価における横隔膜エコーと横隔神経M波振幅の組み合わせの有用性. 第56回日本神経学会学術大会 2014年5月21日-2014年5月24日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)	取得状況(計0件)
7. 近藤直英, 勝野雅央, 足立弘明, 南山 誠, 土井英樹, 松本慎二郎, 宮崎 雄, 飯田 円, 中辻秀朗, 藤内玄規, 石垣診祐, 藤岡祐介, 渡辺宏久, 田中章景, 祖父江元. 熱ショック因子1は球脊髄性筋萎縮症の運動神経変性を抑える. 第36回日本神経科学大会 Neuro 2013 2013年6月20日-2013年6月23日 国立京都国際会館(京都府京都市左京区)	{その他} なし
8. 井口洋平, 勝野雅央, 丹羽淳一, 高木伸之介, 山中宏二, 三澤日出巳, 高橋良輔, 佐々木彰一, 田中章景, 祖父江元. 運動ニューロン特異的TDP-43ノックアウトマウスの病理学的検討. 第54回日本神経学会学術大会 2013年5月29日-2013年6月1日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)	6. 研究組織 (1)研究代表者 田中 章景(TANAKA, Fumiaki) 横浜市立大学・医学研究科・教授 研究者番号:30378012 (2)研究分担者 土井 宏(DOI, Hiroshi) 横浜市立大学・医学部・講師 研究者番号:10326035 児矢野 繁(KOYANO, Shigeru) 横浜市立大学・医学部・准教授 研究者番号:50315818 田中 健一(TANAKA, Ken-ichi) 横浜市立大学・医学部・助教 研究者番号:50722881
9. 河合香里, 池中建介, 勝野雅央, 井口洋平, 勝又 竜, 田中章景, 祖父江元. dynactin-1ノックアウトによる孤発性ALSモデルマウスの作成と病態解析. 第54回日本神経学会学術大会 2013年5月29日-2013年6月1日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)	(3)連携研究者 貫名 信行(NUKINA, Nobuyuki) 順天堂大学・医学研究科・客員教授 研究者番号:10134595

{図書}(計0件)

{産業財産権}