

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700331

研究課題名 (和文) ハンチンチンタンパク質の核外輸送の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanism behind the nuclear export of huntingtin proteins

研究代表者

松本 弦 (MATSUMOTO GEN)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員

研究者番号：50415303

研究成果の概要：

ハンチンチンタンパク質 (htt) のアミノ末端の 17 アミノ酸残基からなるペプチドを CFP または YFP の蛍光タンパク質のカルボニル末端に結合させた融合タンパク質 (CFP/YFP-N17) が蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を起こし、核外移行することから、このアミノ末端配列だけで二量体を形成し、核外移行シグナル (NES) として働くことを確認した。このペプチドは両親媒性のヘリックス構造をとることが、その配列より予測されるため、2 アミノ酸ずつアラニンに置換して、核外移行に重要な残基を決定した。その結果、疎水性のロイシンやフェニルアラニンをアラニン置換した場合に、核外移行が妨げられ、FRET も起こらなくなった。しかしながら、親水性残基のグルタミン酸やリジン残基をアラニンに置換した場合には核外移行は影響されなかった。このことは、両親媒性のヘリックスの疎水性部分で二量体を形成し、親水性の残基が露出していることを示している。さらに、3 つあるリジン残基をアラニンに置換した変異体において FRET が検出された。これらの結果より、7 番めのロイシンから 11 番目のフェニルアラニンまでが中心となって二量体を形成し、NES として働いていると考えられる。YFP-N17 を発現させた細胞を一般的な核外移行阻害剤であるレプトマイシン B で処理するとその核外移行が阻害された。このことは、htt の NES が一般的な CRM1/Exportin1 により認識され核外移行されていることを示している。この結果は、CRM1 は htt-N17 のアルファヘリックスの疎水的な領域に結合することから、CRM1 に認識された htt 分子は二量体を形成していないことを同時に示唆しており、htt が二量体をポリグルタミン部分以外ですることによりのような意味があるのかは、今後の検討課題となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	0	1,700,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変成疾患、ハンチントン病、核外移行シグナル、FRET

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の一つであるハンチントン病は、ポリグルタミン鎖が伸長した変異ハンチンチンタンパク質(htt)による線条体神経細胞の核内凝集体が病理学的特徴とされており、その凝集体形成が神経細胞死と相関していることなどから、凝集体自身が毒性を持ち神経細胞死を引き起こしているのではないかと考えられてきた。しかしながら、最近ではhttの凝集体の形成は毒性のある変異タンパク質から細胞体を守るための防御機構であり、細胞毒性はhttの凝集体自身よりはむしろ可溶性の変性httタンパク質にあるという説も提唱されてきている。伸長ポリグルタミン鎖をもつ変異httは、TATA-結合タンパク質(TBP)や、CREB結合タンパク質(CBP)などのポリグルタミン鎖をもつ転写因子や、グルタミンを多く含むような転写因子、p53のようにポリグルタミンを持たない転写因子などと直接結合することが示されており、変異httに核移行シグナル(NLS)をつけたhttがより強い神経細胞毒性をもつなどが知られている。ポリグルタミンタンパク質の細胞毒性のメカニズムとして、伸長したポリグルタミン鎖が核内の転写因子と異常な相互作用や結合をすることでその転写活性を阻害するというモデルが広く支持されている。しかしながら、変性httが転写因子の機能を阻害するためには、httタンパク質は核内に存在しなくてはならないが、httを培養細胞に発現した場合、httは核内ではなく細胞質に局在し、細胞質に凝集体を形成する。これに反して、モデルマウスやハンチントン病患者の脳組織では、httタンパク質は核内に蓄積し、凝集体を形成する。なぜ、実験モデ

ルによりhttタンパク質が異なる細胞内局在を示すのかという問題は、httの毒性を考える上で非常に重要なものである。httの核外移行に関しては、タンパク質の核外移行に関与すると考えられているTprがhttのN末端に結合し核外移行を行い、伸長したポリグルタミンがTprとhttとの結合を阻害するという報告がある。しかしながら、培養細胞では、そのような効果はきわめて限局的であり、変異httの過剰発現は核外移行に影響を与えないだけでなく、核内凝集体の形成を促進しない。httの核内への移行経路は未知の部分が多く、もし核内への侵入が防げるとしたら、それは大きな治療戦略のターゲットとなる。そのため、httの核外移行経路の確定は急務である。

2. 研究の目的

httの核外移行経路を特定し、その経路経路上のどこがポリグルタミンの伸長により影響を受けるのかについて、分子レベルで明らかにする。そして、なぜ、その核外移行シグナルがモデルマウスでは機能しなくなるのかという問題に対する解決の糸口を探る。

3. 研究の方法

(1) 核外移行経路の同定

httの最初の17アミノ酸(N17)がhttの核外移行シグナルとして働いていることは既に報告されている。N17がどのような分子メカニズムで核外移行シグナルとして機能しているのかを調べるため、YFPのN末端またはC末端に融合させたキメラタンパク質を複製し、その局在を調べる。コントロールとして、一般的なNES配列をつけたものも作成する。httのN17に対して、アラニンスキヤニ

ングを行い、核外移行に必須な残基を同定する。

(2) htt の二量体形成と核外移行

htt は N17 領域で二量体を形成する。この二量体は N17 を YFP と CFP に融合させたキメラタンパク質どうしが蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を起こすため、細胞内で観察できる。変異体どうしの二量体形成 (FRET) と細胞内局在を同時に顕微鏡下でモニターすることにより、二量体形成と核外移行の関係を探る。

(3) 変異 N17-htt の細胞内局在を変化させる原因の検討

N17 の翻訳後修飾 (SUMO 化など) と内部翻訳開始などにより、N17 が変化する可能性を検討する。SUMO 化は SUMO の過剰発現だけでは効率が悪いいため、効率よく SUMO を htt につけるために、SUMO E2 である Ubc9 を htt に融合すると、htt には SUMO 化されうるリジンが N17 領域にしかないため、N17 を効率よく SUMO 化できる。このコンストラクトを作成し、凝集体の形成とその局在を顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

(1) 核外移行経路の同定

N17 ペプチド (MATLEKLMKAFESLKSF) は htt をもつほ乳類の間で完全に保存されている。このペプチドを蛍光タンパク質に融合させると、蛍光タンパク質の N 末端と C 末端に関わらず、核外移行シグナルとして働いた。

この核外移行シグナルが一般的な CRM1/Exportin1 によるものであるかどうか調べるため、CRM1 の特異的阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) で細胞を処理すると、YFP-N17 タンパク質が核内でも観察された。また、htt タンパク質においても LMB 処理に

より核外移行が阻害されることも確認した。従って、これらの結果から、N17 は一般的な NES (Nuclear Export Signal) であることが明らかとなった。

(2) htt の二量体形成と核外移行

変異 htt の毒性は凝集体ではなく、可溶性のオリゴマーであるとする説が支配的になりつつあるが、もし変異 htt 間でオリゴマーが形成されるのであれば、htt-YFP と htt-CFP がオリゴマーを形成したとすると、この 2 つの蛍光タンパク質は物理的に近くにいるはずである。したがって、蛍光タンパク質の位置を帰ることにより FRET が観察できるのではないかと考えた。YFP または CFP を htt の N 末端または C 末端に融合し、種々の組み合わせで FRET を測定したところ、両方 htt の N 末端に結合したときのみ、FRET が観察された。しかしながら、この FRET のシグナルは htt のポリグルタミンの長さに依存しておらず、正常の長さのものでも起こったことから、オリゴマー形成によるものではないと結論づけられた。どの部分で結合しているのか確認するため、N17 とそれ以外の部分に分けて、蛍光タンパク質と融合させ、細胞内で FRET を観察すると、Y/CFP-N17 の組み合わせで FRET を起こした。このことは、N17 のみで二量体以上の構造を細胞内で行っていることを示唆する。二量体形成に必須の残基を特定するために、アラニンスキャニングを行った。その結果、L3, L7, F11, L14 をアラニンに置換すると FRET が起こらなくなった。親水性の残基をかえても FRET は起こった。従って、N17 は両親媒性のアルファヘリックスを作っているとすると、疎水的反面で二量体を形成していると考えられる。興味深いことに、FRET が起こらない変異 N17 の組み合わせでは、核外移行も阻害されること、FRET が起こる条件では核外移行の阻害は起こらない

こともわかった。つまり、二量体形成と核外移行には相関があることになる。また、二量体形成に重要な疎水的アミノ酸残基の位置は一般的NESのコンセンサス配列と一致した。このことから、N17はNESであると考えられる。一般によく知られているNESであるRevタンパク質のNESやMEKタンパク質のNESをYFP/CFPに融合させても、FRETは起こらないことから、二量化はhttのN17で特異的に起こると考えられる。NESを認識するCRM1とN17は同じ領域を認識するため、CRM1とhttの間で競合がおこることが考えられ、もし、httの結合がCRM1に勝てば、核内に入り込むことができるかもしれない。また、N17を

(3) 変異N17-httの細胞内局在を変化させる原因の検討

N17の翻訳後修飾の一つであるSUMO化が、httの核への移行に関与しているという報告がある。しかしながら、SUMO化の効率はあまり良くなく、発現させるN17の大部分はSUMO化されない。そこで、N17に特異的にSUMOを導入するために、Y/CFP-htt-ubc9融合タンパク質を作成した。Ubc9のSUMO結合部位に変異を入れたものをコントロールとした。このキメラタンパク質を細胞に発現させると、核内凝集体が確認できた。このような、核内凝集体は、変異ubc9との融合タンパク質ではほとんどみられないことから、SUMO化により、核外移行シグナルが阻害されたか、またはSUMOがhttを核内に移行させたか、どちらかの可能性が考えられる。また、内部翻訳開始により8番目のMetから翻訳が始まった場合、N17はNESとして昨日できず、二量体も形成しない。そこで、M8の前に一塩基挿入しフレームをずらした変異htt-YFPを作成した。正規のMetから翻訳が始まると、YFPは翻訳されないが、内部のM8から翻訳

がはじまると、htt-YFPが翻訳される。このコンストラクトを細胞に形質導入すると、予想以上に多くのYFPが発現していることがわかった。これらの結果は、N17の内部のMet8から翻訳が開始されたhttができるとすると、そのhttはNESをもたないため、核内に拡散していく。SUMO化も核内への移行に関与しており、核内ではユビキチン化されてプロテアソームで壊されるまでは、安定に存在できるので、凝集体を作りやすくなるのではないかと推測される。これらの可能性については、今後更なる検証が必要である。

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1件)

1. Furukawa Y, Kaneko K, Matsumoto G, Kurosawa M, Nukina N. (2009) Cross-seeding fibrillation of Q/N-rich proteins offers new pathomechanism of polyglutamine diseases. *J Neurosci.*, **29**, 5153-62. (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 弦 (MATSUMOTO GEN)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員
研究者番号：50415303