

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24500378
 研究課題名(和文) 脊髄小脳失調症 型における複合体タンパク質プロテオーム解析による分子病態の解明

 研究課題名(英文) Study of molecular pathology using proteome analyses for protein complexes in Spinocerebellar ataxia type 1

 研究代表者
 田川 一彦 (Kazuhiko, Tagawa)

 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

 研究者番号：80245795

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症 型(SCA1)の原因遺伝子はアタキシン - 1 (Atxn1)である。Atxn1複合体のプロテオーム解析は成功しなかったが、Atxn1の相互作用タンパク質と複合体の機能について報告する。
 (1) VCPはAtxn1と相互作用し、変異型はDNA損傷を増加させた。(2) ハエのin vivoスクリーニングをSCA1モデルハエで行い、RPA1が病態ネットワークのハブ遺伝子であり、実際に変異Atxn1との相互作用を認めた。(3) 変異Atxn1と結合するHMGB1の補充療法は運動機能障害と寿命を回復させた。新規分子メカニズムとしてHMGB1によるミトコンドリアDNA損傷修復を示した。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) is one of nine polyglutamine diseases. Ataxin-1 (Atxn1) is a causative gene for SCA1. In order to understand functions of atxn1 complex, we set up proteome analyses. We identified and quantified proteins and constructed a pathogenic networks using system biology. However, we have not succeeded to analyze atxn1-complex. In this study, we described the interacting protein to atxn1 and functions of Atxn1-complex.
 (1) VCP interacts to normal and mutant atxn1. Mutant Atxn1 finally caused the increase of DNA damage. (2) We performed a systematic in vivo screen of fly library in SCA1 fly models. Using systems biology analyses, RPA1 was located at the hub position. Atxn1 actually interacted With RPA1. (3) Mutant Atxn1 binds HMGB1. We established that complementation with HMGB1 ameliorates motor dysfunction and prolongs lifespan in SCA1 model mice. We identified mitochondrial DNA damage repair by HMGB1 as a novel molecular basis.

研究分野：分子神経病理学

キーワード：ポリグルタミン病 脊髄小脳失調症1型 アタキシン - 1 タンパク質相互作用 タンパク質複合体

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は原因遺伝子産物がもつ繰り返しポリグルタミン鎖領域の異常な伸張を原因とする遺伝性の神経変性疾患である。この変異ポリグルタミンタンパク質がニューロンにおいて多様な細胞機能に障害を引き起こし、変性を導き、神経変性疾患の症状に至ることが知られている[1,2]。ポリグルタミン病である脊髄小脳失調症1型(SCA1)はアタキシン-1 (Atxn1)タンパク質を原因遺伝子産物とし、Atxn1がもつポリグルタミン鎖領域の異常伸張を原因とするが、その病因については不明な点が多い。正常Atxn1は核タンパク質としてnuclear bodyに局在し、スプライシング因子と結合しスプライシングに関与する事が示唆されている[3]。一方で、変異Atxn1はよりサイズの大きな核内封入体に局在し、この核内封入体はユビキチン抗体陽性であり変異Atxn1をはじめとしたタンパク質群が凝集あるいは蓄積している。Nuclear bodyと核内封入体は形態的に類似しているが、両者の生化学的あるいは動的平衡の差異については、本質的な理解が得られていない。変異ポリグルタミンタンパク質による早期の「変調」を解析し、ニューロンが変性に至らない対処をすることが変性疾患治療に直結する。Nuclear bodyから核内封入体への変化は早期病変の主要な要素と考えられる。

これまでに我々のグループはトランスクリプトーム、プロテオーム、インタラクトームといったオミックス解析の手法を用いて、変異ポリグルタミンタンパク質によるニューロンの障害を抑制する候補遺伝子としてHMGB1/2, Ku70, YAP C, Hsp70, Omiを報告してきた。トランスクリプトーム解析ではmRNA発現量[4]、プロテオーム解析では核タンパク質の量[5]、といったそれぞれの量的変化より標的タンパク質を選び、疾患モデル系においてそのタンパク質のニューロンへの機能障害抑制効果を検証してきた。私が主導し報告したトランスクリプトーム解析においては[4]、変異Atxn1の発現により発現量が変化した遺伝子としてMaxerを同定した。また、ポリグルタミン病であるハンチントン病の原因遺伝子産物であるハンチントンの変異型をラット小脳初代培養ニューロンに発現させると、Hsp70の発現が著しく亢進され、小脳ニューロンにおける細胞死への耐性を示した。このように変異ポリグルタミンタンパク質が他の遺伝子の発現を変化させることを報告しており、核内封入体で変異Atxn1が形成する複合体タンパク質が遺伝子発現を発症前後で変化させ、ニューロンの機能障害や変性を導いている可能性は大いにあると考えている。

本研究計画では早期の『変調』としてニューロンの機能障害の原因となるタンパク質の変化を解析するため、発症前後のSCA1疾患モデルマウスを用いる。さらに、複合体を形成しているタンパク質のみを対象とする網羅的解析であることが最大の特徴である。最初の標的は、正常Atxn1がnuclear body内で形成する複合体タンパク質と、変異Atxn1が核内封入体で形成する複合体を分画、同定、定量する。次の標的は、細胞分画したそれぞれの高分子画分における複合体タンパク質を網羅的に解析し、変異Atxn1-複合体に影響される複合体構成成分タンパク質を分画、同定、定量する。解析には先端技術として定量的ショットガン・プロテオーム解析法やMRM(多重反応モニタリング)法を活用し目的を達成する。

本研究計画で得られる標的タンパク質の知見は、治療法開発において発症前あるいは発症初期の分子作用点となりうる可能性が高いと考えている。本研究はポリグルタミン病の分子病態メカニズムに新しい知見を与え、治療法と予防法の開発に貢献し、神経変性疾患全体に貢献することが最終的な目標である。

<参考文献>

1. Hands, S. L. & Wyttenbach, A. Acta Neuropathol. 120, 419-437 (2010).
2. Scholfield, J. & Wood, M. J. Trends Genet. 26, 29-38 (2010).
3. Lim J. et al. Nature. 452, 713-718 (2008).
4. Tagawa, K. et al. J. Neurosci. 27, 868-880 (2007).
5. Qi, et al. Nature Cell Biol (2007)

2. 研究の目的

ポリグルタミン病であるSCA1は原因遺伝子産物Atxn1におけるポリグルタミン鎖の異常伸張を原因としているが、その分子病態はまだ不明な点が多い。我々はオミックス研究よりこの病態を抑制する標的タンパク質を同定し、ポリグルタミン病モデル系を用いてその病態の改善を報告してきた。本研究計画では、Atxn1が形成する複合体さらに高分子複合体タンパク質を網羅的にプロテオーム解析を行い、神経変性に至る前のニューロンの機能障害に関わる複合体タンパク質を同定および定量し、SCA1病態への効果を疾患モデル系を用いて検証する。

3. 研究の方法

SCA1モデルマウスにおいて、発症前後をそれぞれ野生型と比較し、早期におけるニューロンの機能障害の病態分子機構を解析する。複合体タンパク質に注目し、細胞の各局在別に定量的ショットガン・プロテオーム解析を

行い、標的タンパク質を定量的に同定する。この手法を用いて、Atxn1 複合体の解析とその他の複合体の網羅的なプロテオーム解析を行う。得られた結果より、ウエスタンブロット法、ELISA 法、MRM 法等で標的タンパク質の量的変化を検証する。さらに、生化学的、免疫組織化学的、遺伝学的、システムバイオロジック的な手法を用いて、スクリーニングあるいは所属グループの過去の報告に基づき相互作用するタンパク質の解析を行った。次に、マウスモデル系における補充療法による回復実験を行った。

4. 研究成果

Atxn1 複合体の定量的ショットガンプロテオーム解析を基盤として Atxn1 複合体形成タンパク質を同定する計画であったが、この手法により結果が得られなかった。しかしながら平行して行っていた関連研究より、Atxn1 に相互作用する分子の知見が得られたのでその点について報告する。また、既に報告していた Atxn1 の病態に関連のある HMGB1 について、新たな SCA1 病態分子メカニズムと治療法について知見を得たのでその点も報告する。

(1) 本研究の技術基盤となるプロテオーム解析については、別の研究課題の推進とともにその手法を確立した。ショットガンプロテオーム解析について、ウエット部分のルーチンワーク化と、その後のスーパーコンピューターを用いたドライの解析法を行い報告した[1]。ルーチンワーク化すること成功したので、5種類のモデルマウス(それぞれの野生型を含め計8種類)、3時系列、3個体数以上で行い、95%を超える信頼度で約2000種類のリン酸化ペプチドと700種類以上のリン酸化タンパク質を同定と比較定量した。このビックデータについてはスーパーコンピューターを用いることで、有意に変化のある特定のタンパク質のリン酸化部位をスクリーニングし、各種データベースを重ね合わせることで病態ネットワークを構築した。今後の課題は、より生理的(細胞あるいはその小器官内)条件下でサンプル調製を行い再現性よく2次元あるいは3次元 LC/MSを行うことで本研究の当初目的が達せられると考えている。

(2) ポリグルタミン病において共通する分子病態メカニズムを理解するために、ポリグルタミン鎖に結合するタンパク質として所属グループが同定した VCP に注目した。Atxn1、アタキシン-7、アンドロジェン受容体、ハンチンチンという4種類のポリグルタミン病タンパク質に対して VCP の相互作用を検討したところ、正常型、変異型共に相互作用し、加えてポリグルタミン鎖が異常伸長した変異型により強く相互作用することが明らかとなった。VCP は細胞質、核、ミトコンドリア

アにおいてそれぞれの役割がある多機能タンパク質として知られている。変異ポリグルタミンタンパク質により VCP の核におけるダイナミズムが減少することにより DNA 損傷の蓄積が亢進することが示された。本研究よりポリグルタミン病に共通する分子病態メカニズムの一端が明らかとなった。今後はこの共通メカニズムの上流分子メカニズムを解析すると共に、さらに上流にある疾患特異的な分子メカニズムへ解析を広げていきたい。[2]

(3) 疾患モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的とシステムバイオロジー解析を組み合わせ、SCA1 病態における DNA 損傷修復に重要な役割を持つタンパク質として RAP1 と Chk1 を報告した。SCA1 モデルショウジョウバエと DNA 修復関連遺伝子ショウジョウバエライブラリーを用いた遺伝学的手法により、SCA1 病態を改善あるいは増悪させる遺伝子をスクリーニングした。タンパク質-タンパク質相互作用、パスウェイ、さらに文献的なデータを重ね合わせ、病態ネットワークを構築し、RAP1 と Chk1 が中心的な役割を果たしている事を推察した。免疫沈降法により、RAP1 と Atxn1 の相互作用を示し、加えて変異 Atxn1 に相互作用が強いことをウエットデータとして示した。RAP1 と Chk1 について SCA1 特異的な病態分子メカニズムであるかを検討し、RAP1 と Chk1 の疾患特異的なメカニズムなのか疾患共通メカニズムなのかを明らかにしたい。[3]

(4) 培養神経細胞に変異 Atxn1 を過剰に発現させ正常型の場合と比較し、量に変化があるタンパク質を2次元電気泳動法によりプロテオーム解析し、HMGB1 が SCA1 病態において減少していることを報告した[4]。SCA1 モデルマウスにおける病態は、HMGB1 トランスジェニックマウスとの掛け合わせることで HMGB1 を補充したマウスにおいて改善され、特に寿命に関しては約30%の延長が観察された。加えて、SCA1 モデルマウス小脳に AAV ベクターを用いることで HMGB1 の補充療法を行ったところ、SCA1 病態は改善され寿命の延長も見られた。HMGB1 は DNA と結合してその構造を変化させることで転写と DNA 損傷修復に重要な役割を担っていることが知られている。一方、細胞の損傷等により HMGB1 が細胞外に放出されると DAMPs として炎症を引き起こすことも知られている。また細胞質での機能も報告があったことより、SCA1 モデルマウス小脳において細胞分画して HMGB1 の細胞内動体を検討したところ、ミトコンドリアに存在し、SCA1 モデルマウスで減少していることが明らかとなった。さらに、SCA1 モデルマウスではミトコンドリアの機能が低下し、ミトコンドリア DNA の損傷が亢進していた。さらに、HMGB1 の補充により、核において DNA 損傷の蓄積が減少しているのと同時に、

ミトコンドリアにおいても DNA 損傷の蓄積が減少していた。以上より、SCA1 モデルマウスは核のみではなくミトコンドリアでも DNA 損傷の蓄積が亢進し、HMGB1 の補充によりいずれも改善された。今後は共同研究の幅を広げ、ヒトに治療への応用が可能かを検討したい。[5]

SCA1 の病態分子メカニズムについては、疾患特異的であるか共通であるかが興味のある点である。この点に関しては個々の分子の研究に加え、病態に関わる分子をネットワークとして解析する必要がある。1 分子だけで病態を理解しようとするのではなく、病態ネットワークを構築し、同定し、さらに検証していくことが、今後の病態メカニズムを理解する研究としては重要であり、必須であると考えている。

<引用文献>

1. Tagawa K et al. *Hum Mol Genet* (2015)
2. Fujita K et al. *Nature Commun* (2013)
3. Barclay SS et al. *Hum Mol Genet* (2014)
4. Qi ML et al. *Nature Cell Biol* (2007)
5. Ito H et al. *EMBO Mol Med* (2015)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

(* : co-first author)

*Tagawa, K., *Homma, H., *Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., and Okazawa, H.

Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet* 査読有り 24 (2015) 540-558. doi: 10.1093/hmg/ddu475.

*Ito, H., *Fujita, K., *Tagawa, K., Chen, X., Homma, H., Sasabe, T., Shimizu, J., Shimizu, S., Tamura, T., Muramatsu, S., and Okazawa, H. HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med* 査読有り 7 (2015) 78-101. doi:

10.15252/emmm.201404392.

Barclay, S. S., Tamura, T., Ito, H., Fujita, K., Tagawa, K., Shimamura, T., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Imoto, S., Miyano, S., and Okazawa, H. Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. *Hum Mol Genet* 査読有り 23 (2014)

1345-1364. doi: 10.1093/hmg/ddt524.

Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Sone, M., Yoshida, C., Katsuno, M., Eishi, Y., Murata, M., Taylor, J. P., Wanker, E. E., Kono, K., Tashiro, S., Sobue, G., La Spada, A. R., and Okazawa, H. A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. *Nat Commun* 査読有り 4 (2013) 1816. doi: 10.1038/ncomms2828.

[学会発表](計16件)

田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 「脊髄小脳失調症1型の分子病態コアネットワークの解明」 第37回日本分子生物学会年会(ポスター)、2014.11.25-27(発表日 11/26)、パシフィコ横浜(横浜)

田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 「情報科学を用いた神経変性疾患の病態解明」 第37回日本神経科学大会(ポスター)、2014.9.11-13(発表日 9/13)、パシフィコ横浜(横浜)

藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日

加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」 第 37 回日本神経科学大会 (ポスター) 2014.9.11-13 (発表日 9/12)、パシフィコ横浜 (横浜)

田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 「脊髄小脳失調症 1 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析」 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会 (口演) 2014.6.5-7 (発表日 6/6)、学術総合センター (東京)

藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会 (口演) 2014.6.5-7 (発表日 6/6)、学術総合センター (東京)

田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 「脊髄小脳失調症 1 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析」 第 55 回日本神経学会学術大会 (口演) 2014.5.21-24 (発表日 5/23)、福岡国際会議場

藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 「TERA/VCP/p97 の DNA 修復機能不全は

複数の神経変性疾患に關与する」 第 55 回日本神経学会学術大会 (ポスター)、2014.5.21-24 (発表日 5/23)、福岡国際会議場(福岡)

藤田慶大、中村蓉子、岡努、伊藤日加瑠、田村拓也、田川一彦、笹邊俊和、勝田明寿香、本木和美、塩飽裕紀、曾根雅紀、吉田千里、岡澤均 「複数のポリグルタミン病における TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」 第 36 回日本分子生物学会年会(ポスター) 2013.12.3-6(発表日 12/4)、神戸ポートアイランド(神戸)

藤田慶大、中村蓉子、岡努、伊藤日加瑠、田村拓也、田川一彦、岡澤均 「TERA/VCP/p97 の DNA 修復機能不全は複数の神経変性疾患に關与する」 第 32 回日本認知症学会学術集会 (ポスター) 2013.11.8-10 (発表日 11/9)、キッセイ文化ホール・松本市総合体育館(松本)

伊藤 日加瑠、田川 一彦、岡澤 均 「HMGB1 as a therapeutic molecule candidate for spinocerebellar ataxia type1 (SCA1).」 第 36 回日本神経科学大会(口演)、国立京都国際会館、2013.6.20-23 (発表日 6/21)

田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶太、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 「Causative pathway underlying in spinocerebellar ataxia type 1」(ポスター) 第 36 回日本神経科学大会(口演)、国立京都国際会館、2013.6.20-23 (発表日 6/20)

伊藤 日加瑠、田川 一彦、岡澤 均 第 5 4 回日本神経学会学術大会「HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウス治療への試み」 (口演) 東京国

際フォーラム、2013.5.29-6.1 (発表日
5/30)

田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶太、
伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、
田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、
井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均 第54
回日本神経学会学術大会「脊髄小脳変性
症1型におけるDNA損傷修復遺伝子の
効果; in vivo screeningによる解析」
(ポスター) 東京国際フォーラム、
2013.5.29-6.1 (発表日 5/30)

伊藤 日加瑠、田川 一彦、岡澤 均
第54回日本神経病理学会総会学術研
究会「HMGB1を用いた脊髄小脳失調症1
型モデルマウス治療の試み」(口演) タ
ワーホール船堀、2013.4.24-26 (発表日
4/26)

Sam S. Barclay、田村 拓也、伊藤 日加
瑠、島村 徹平、勝田 明寿香、曾根 雅
紀、塩飽 裕紀、田川 一彦、井元 清哉、
宮野 悟、岡澤 均「脊髄小脳変性症1型
におけるDNA損傷修復遺伝子の効果：in
vivoスクリーニング」第35回日本神経
科学大会 名古屋国際会議場 名古屋
2012.9.18-21 (ポスター)

田村 拓也、曾根 雅紀、岩坪 威、田川 一
彦、Erich Wanker、岡澤 均「DNA修復
タンパク質・Ku70はハンチントン病の神
経変性を抑制する」 第53回日本神経
学会学術大会 東京国際フォーラム 東
京 2012.5.25 (ポスター)

〔図書〕(計1件)

田川一彦、岡澤均. 羊土社、実験医学, 30「ハ
ンチントン病のバイオマーカー研究」
(2012) 2572-2576

6. 研究組織

(1)研究代表者

田川 一彦 (TAGAWA, Kazuhiko)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所
・准教授

研究者番号：80245795