

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07045

研究課題名(和文)小胞体マニピュレーションを基盤とする凝集体難病の治療戦略

研究課題名(英文)ER manipulation-based therapeutic strategies against protein aggregation diseases

研究代表者

山崎 哲男(YAMAZAKI, Tetsuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：90330208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はタンパク質凝集体の蓄積を共通の特徴とする“凝集体難病”に対する治療戦略の確立である。研究代表者が小胞体膜微小環境中にタンパク質凝集体形成阻害能を見出し、その分子実体として機能不明の小胞体膜貫通タンパク質CLN6を同定したことをふまえて展開した。研究期間内に(1)CLN6遺伝子内の変異に応じて、同分子が凝集を阻止できる基質の多様性は制限されるものの、「全か無か」式の制御は受けられないこと、(2)CLN6変異体間に機能干渉が生じ、凝集体形成阻害能が無効化され得ること、(3)CLN6尾部の動きは制限されており、この制約がCLN6変異体による機能干渉への抵抗性をもたらすこと、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が急激に進む我が国で、パーキンソン病やアルツハイマー病をはじめとする凝集体難病が社会問題化しているのは周知の事実である。しかもその根治療法の開発が滞っているのが現状である。本研究成果は凝集体難病治療に向けた標的分子とその制御に不可欠なメカニズムを提示したものであり、一連の疾患の「予防」を可能にすることが期待される。また、標的分子として同定したCLN6を原因遺伝子とする遺伝性神経変性難病の発症機構に迫るものでもあり、学術的・社会的意義が極めて高い成果といえる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to establish a therapeutic strategy for "aggregate deposition diseases" commonly characterized by the accumulation of protein aggregates. This research was developed based on our previous finding that the endoplasmic reticulum (ER) membrane microenvironment has the ability to prevent protein aggregate formation and that the ER transmembrane protein CLN6, whose function is unknown, is the molecular entity of the ER-driven anti-aggregate activity. We here show that (1) mutations in the CLN6 gene limit CLN6's anti-aggregate activity, but not in an "all-or-nothing" manner, (2) functional interference between CLN6 mutants can abrogate CLN6's anti-aggregate activity, and (3) CLN6's luminal tail would be spatially restricted, ensuring that wild-type CLN6 exert its anti-aggregate activity.

研究分野：生化学

キーワード：CLN6 NCL ER 神経セロイドリポフスチン症 小胞体 凝集体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は「通常であれば細胞質に均一に存在する低分子熱タンパク質分子 α Bクリスタリンを強制的に小胞体膜上に発現させると、高凝集性 R120G α Bクリスタリン変異体の凝集を阻止できる」ことを示し、小胞体膜を取り巻く微小環境中にタンパク質凝集体形成を阻害する能力が備わること世界に先駆けて明らかにした(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014)。これを契機として、研究代表者は「凝集体形成を未然に防ぐ」治療法を開発するために、自身が見出した小胞体膜微小環境の凝集体形成阻害能の活用を着想した。凝集体形成阻害能を人為的に制御するためには、その分子実体の同定並びに当該分子の機能発現様式の解明が不可欠となる。凝集体形成阻害能を見出した経緯からすれば、小胞体係留型 α Bクリスタリンが標的とする一連の分子中のいずれかが同阻害能の分子実体である可能性が高い。そこで、研究代表者は小胞体係留型 α Bクリスタリンに結合するタンパク質の単離し、その中の一つが小胞体膜貫通タンパク質 CLN6 (Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal, 6)であることを明らかにするとともに、同分子が高凝集性 R120G α Bクリスタリン変異体の凝集を抑制することを示した(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2017)。

CLN6 は 6 型神経セロイドリポフスチン症 (CLN6 病) の原因遺伝子である。神経セロイドリポフスチン症 (Neuronal Ceroid Lipofuscinosis; NCL) は、組織学的にはリポイド色素の蓄積を共通の特徴とする遺伝性神経変性病であり、原因遺伝子の異なる 13 タイプの疾患から成る。ライソゾーム内の封入体の存在から NCL はライソゾーム病とも称され、同オルガネラの機能不全症として捉えられている。その中の一つである CLN6 病は主たる症状として、てんかん発作、神経運動障害、視覚障害を呈する。家系間さらに言えば家系内でも病状、病気の進行にばらつきがみられるのが CLN6 病の特徴の一つである。実際、同病は発症年齢に応じて乳幼児型 (発症年齢 1-8 歳、別称 vLINCL) と成人型 (同 16-51 歳、別称 Kufs 病) の 2 亜型に大別される (Butz et al., Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.)。CLN6 は長い間機能不明のタンパク質であったため、「CLN6 遺伝子変異がどのような過程を経て CLN6 病の発症に結び付くのか？」さらには「患者間にみられる病状のばらつきはなぜ生じるのか？」といった根本的な問いに迫る手立てが無かった。

2. 研究の目的

CLN6 が凝集体形成阻害能を有していることを研究者自身で明らかにしたことをふまえて、「CLN6 が凝集体形成阻害能を発揮する分子機構はどのようなものか？」、「CLN6 病の発症ならびに同病患者間の症状のばらつきが、CLN6 の凝集体形成阻害能の喪失を反映したもののなのか？」との問いに分子レベルで回答するとともに、CLN6 ならびにその協働分子を活用した凝集体難病全般に適応可能な汎用性の高い治療スキームを確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) CLN6 が凝集体形成阻害能を発揮するために不可欠な構造基盤の整備

CLN6 病患者で見つかった一連の CLN6 変異体と C 末端に GFP タグを付けた高凝集性 R120G α B クリスタリン変異体を HeLa 細胞に共発現させ、可視化した R120G α B クリスタリン変異体の凝集度合いを基に、CLN6 の凝集体形成阻害能を支える機能ドメインを絞り込んだ。

(2) CLN6 の基質の多様性の検証

CLN6 がどのようなタンパク質の凝集を阻止できるのか？現時点で CLN6 の生理的基質は判明していないため、この疑問に直接的な回答を得ることができない。そこで 4 つの α Bクリスタリン変異体 (D109H, R120G, G154S, R157H) をモデルタンパク質として用いることで、CLN6 が標的とし得るタンパク質の多様性を検証する。上記 4 つの α Bクリスタリン変異体はいずれ

もαB crystallinopathy と称される優性遺伝性筋肉変性疾患の患者から見出され、細胞株に発現させると高度な凝集傾向を示す。また、当該患者間で症状や病状の進行に違いが報告されていることから、4つの変異体間には構造・機能的差異があり、その結果、惹起するシグナル伝達異常の質的違いが症状の相違として表出したと考えられる。そこで、これら4つのαBクリスタリン変異体それぞれに対して(1)と同様の凝集アッセイを行い、少なくとも4つの異なるタンパク質に対する CLN6 およびその変異体の凝集体形成阻害能を評価した。

(3) CLN6 変異体の組み合わせが生み出す凝集体形成阻害能の検討

CLN6 病の患者としてホモ接合体だけでなく、2つの CLN6 対立遺伝子がそれぞれ異なる変異体をコードする複合ヘテロ接合体が報告されている。そこで、CLN6 変異体ごとの凝集体形成阻害能を解析するだけでなく、複数の CLN6 変異体を複合ヘテロ接合体患者でみられる組み合わせで共発現させた場合の阻害能も併せて解析することによって、「CLN6 病は CLN6 の凝集体形成阻害能の障害に起因する」可能性を追究した。

4. 研究成果

(1) CLN6 の凝集体形成阻害能には第3ループ内 148-150 番目のアミノ酸が必要

CLN6 の 142-162 番目のアミノ酸領域中に凝集体形成阻害能に不可欠な配列が存在することが示された(図1)。これをふまえて、引き続き、同阻害能の責任領域をアラニン置換によって、絞り込んでいった。148-150 番目の Val-Arg-Glu が不可欠であることが明らかとなった(図2)。

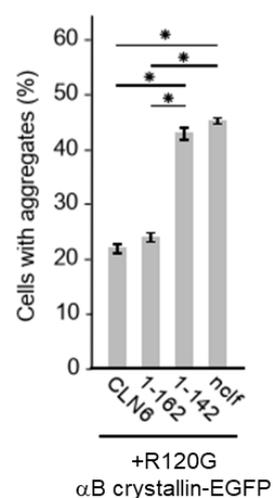
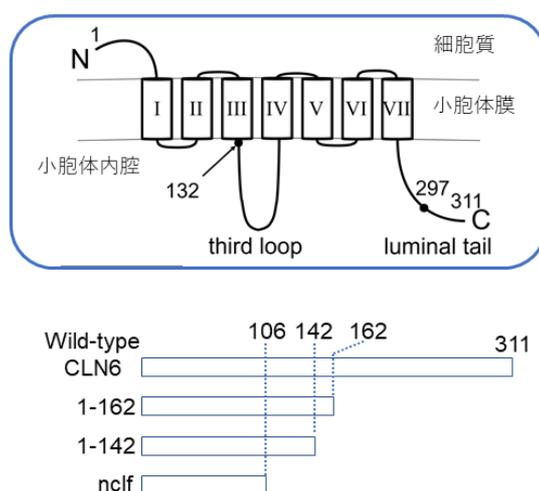


図1 CLN6の凝集体形成阻害能には第3ループ領域が必要

野生型CLN6および図示した欠失変異体それぞれをEGFPタグを付けたR120GαBクリスタリン変異体(R120GαB crystallin-EGFP)と共発現させ、R120GαB crystallin-EGFPを可視化した。取得した画像を基にして、凝集したR120GαB crystallin-EGFPを有する細胞の全EGFP陽性細胞に対する割合を計算した。

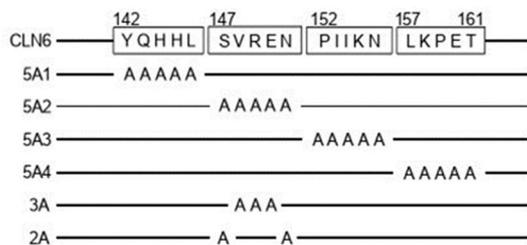
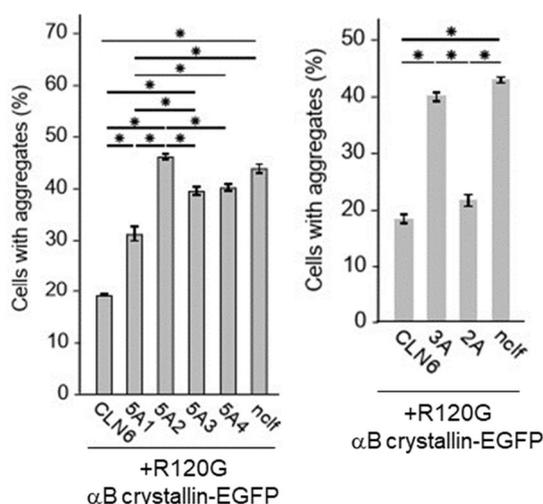


図2 CLN6の148-150番目のアミノ酸領域が凝集体形成阻害能に必要

CLN6の図示した領域をアラニン(A)に置換した変異体それぞれをEGFPタグを付けたR120GαBクリスタリン変異体(R120GαB crystallin-EGFP)と共発現させ、R120GαB crystallin-EGFPを可視化した。取得した画像を基にして、凝集したR120GαB crystallin-EGFPを有する細胞の全EGFP陽性細胞に対する割合を計算した。



(2) CLN6 遺伝子変異による凝集体形成阻害能への影響はアナログ式

148-150 番目 (Val-Arg-Glu) の中央に位置する R149 に関しては、Arg149Cys(R149C)および Arg149His(R149H)の異なる 2 種類の変異が CLN6 病患者から見つかっている。R149H 変異体が R120GαB クリスタリン変異体の凝集を阻害する一方で R149C 変異体は阻害能を發揮しなかった (図 3)。この結果は、CLN6 の凝集体形成阻害能が「どのアミノ酸が変異したのか？」だけでなく「どのアミノ酸に変異したのか？」の両側面で左右されることを意味している。引き続き、3 つの異なるαBクリスタリン変異体 (D109H, G154S, R157H) の凝集を阻害するのか否かを解析したところ、R149C 変異体は D109H αBクリスタリン変異体の凝集は阻害できなかったが、G154S ならびに R157H αBクリスタリン変異体に対しては R149H CLN6 変異体と同程度の凝集体形成阻害能を發揮した。R149C 変異が CLN6 の凝集体形成阻害能に及ぼす影響は基質ごとに異なり、阻害能を發揮し得る基質の多様性を左右するだけに留まる可能性が示唆された。

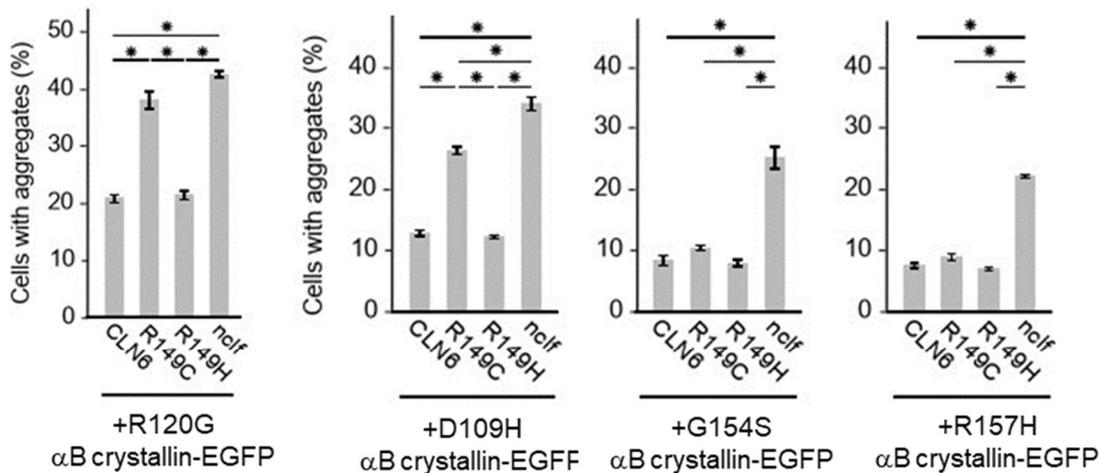


図 3 CLN6 遺伝子の変異は凝集体形成阻害能にアナログ様式で影響を与える

CLN6 の 149 番目のアルギニン (R149) の変異体 (R149C と R149H) それぞれを、EGFP タグを付けた 4 つの異なる αB クリスタリン変異体 (αB crystallin-EGFP) と共発現させ、αB crystallin-EGFP を可視化した。取得した画像を基にして、凝集した αB crystallin-EGFP を有する細胞の全 EGFP 陽性細胞に対する割合を計算した。

(3) CLN6 変異体間の機能干渉に基づく凝集体形成阻害能の無効化

複合ヘテロ型 CLN6 病患者で報告された組み合わせ (132fsX/239fsX ならびに 132fsX/P299L) で 2 つの CLN6 変異体を共発現させると、単独では凝集体形成阻害能を保持している変異体 (239fsX ならびに P299L) がこの能力を發揮できなくなった (図 4)。一方、野生型 CLN6 の阻害能は 132fsX と共発現した場合でも影響を受けなかった。したがって、上記変異体の組み合わせが引き起こした機能

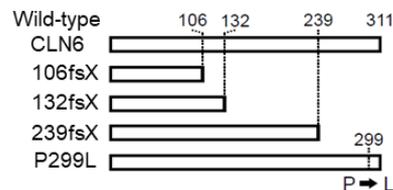
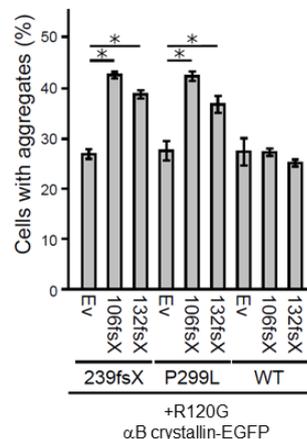


図 4 CLN6 変異体間の機能干渉に基づく凝集体形成阻害能の無効化

野生型 CLN6 および変異体の表記した組み合わせそれぞれと R120GαB crystallin-EGFP を共発現させ、R120GαB crystallin-EGFP を可視化した。取得した画像を基にして、凝集した R120GαB crystallin-EGFP を有する細胞の全 EGFP 陽性細胞に対する割合を計算した。



干渉の特異性が示唆された。

(4) CLN6 の tail 領域への空間的制約が CLN6 変異体による機能干渉への抵抗性を生む

Pro299 を含む CLN6 の 297-301 番目のアミノ酸領域には変異が集中しているうえに、タンパク質の立体構造を左右するプロリンが隣接(Pro297/Pro299)しており、遺伝学的にも構造学的にも CLN6 の機能発現に大きく寄与していることが予想された。実際、この領域をアラニンに置換すると 132fsX 変異体による阻害能抑制に感受性を呈した(図5)。しかしながら、C 末端 15 アミノ酸(=luminal tail)を除去した欠失変異体(P297X)は 132fsX 変異体と共発現しても、凝集体形成阻害能を発揮した。したがって、CLN6 の luminal tail は Pro297/Pro299 を介した空間的な制約下にあり、このことが野生型 CLN6 の 132fsX 変異体に対する抵抗性をもたらすと考えられた。

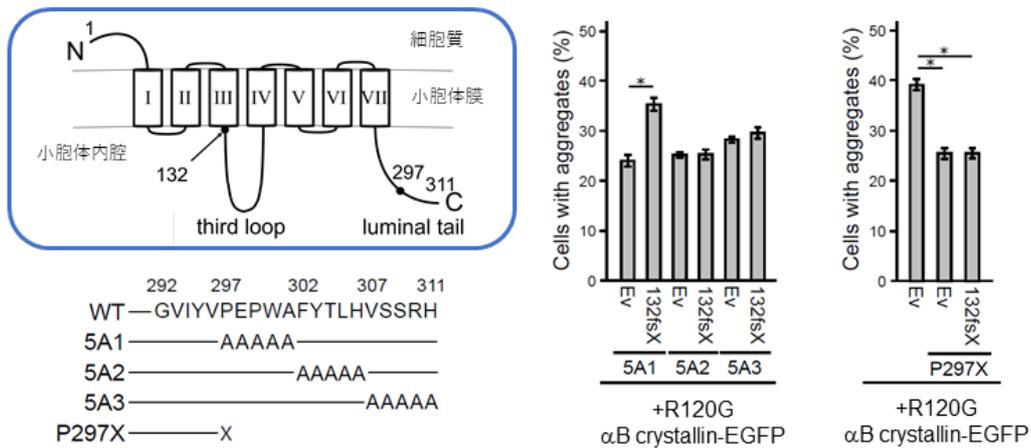


図5 CLN6が凝集体形成阻害能を発揮するためにはluminal tailへの空間的制約が必要

野生型CLN6および変異体の表記した組み合わせそれぞれとR120GαB crystallin-EGFPを共発現させ、R120GαB crystallin-EGFPを可視化した。取得した画像を基にして、凝集したR120GαB crystallin-EGFPを有する細胞の全EGFP陽性細胞に対する割合を計算した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamashita Arisa, Shiro Yuki, Hiraki Yuri, Yujiri Takatoshi, Yamazaki Tetsuo | 4. 巻 525 |
| 2. 論文標題 Implications of graded reductions in CLN6 's anti-aggregate activity for the development of the neuronal ceroid lipofuscinoses | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 883-888 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.019 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Shiro Yuki, Yamashita Arisa, Kana Watanabe, Yamazaki Tetsuo | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 CLN6's luminal tail-mediated functional interference between CLN6 mutants as a novel pathomechanism for the neuronal ceroid lipofuscinoses | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biomedical Research | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 城裕己, 山下ありさ, 平木友理, 湯尻貴俊, 山崎哲男 |
| 2. 発表標題 小胞体膜微小環境に備わる抗凝集体活性の障害がCLN6病を引き起こす |
| 3. 学会等名 稀少疾患カンファランス（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 山崎哲男 |
| 2. 発表標題 小胞体膜微小環境病としての神経セロイドリポフスチン症 |
| 3. 学会等名 稀少疾患プロジェクト オープンセミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 山下 ありさ, 平木 友理, 山崎 哲男 |
| 2. 発表標題 小胞体マニピュレーションの汎用性とその分子基盤 |
| 3. 学会等名 第17回 四国免疫フォーラム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Arisa Yamashita and Tetsuo Yamazaki |
| 2. 発表標題 ER-driven anti-aggregate activity toward pathogenic alphaB-crystallin mutants |
| 3. 学会等名 The 43rd FEBS Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 城裕己, 山崎哲男 |
| 2. 発表標題 CLN6変異による抗凝集体活性の喪失とCLN6病発症の関係 |
| 3. 学会等名 第59回日本薬学会中国四国支部学術大会 (WEB) |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--------------------------|
| 1. 発表者名 城裕己, 山崎哲男 |
| 2. 発表標題 小胞体膜を使って凝集を防ぐ |
| 3. 学会等名 第10回超異分野学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 城裕己, 山崎哲男 |
| 2. 発表標題 複合ヘテロ接合型CLN6病の原因として見出した抗凝集体活性の喪失 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuki Shiro and Tetsuo Yamazaki |
| 2. 発表標題 Differential impairment of CLN6's anti-aggregate activity as a pathogenic mechanism of CLN6 disease |
| 3. 学会等名 17th annual WORLD Symposium 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|