

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390236

研究課題名（和文） 核酸品質管理機構の破綻による神経変性機序の解明

研究課題名（英文） Impairment of quality control system for nucleic acids and neurodegenerative disorders.

研究代表者

小野寺 理（ONODERA OSAMU）

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：20303167

研究成果の概要（和文）：私たちは本邦で最も多い劣性遺伝性脊髄小脳変性症である AOA1/EAOH の原因遺伝子 APTX を単離し、その機能を解析してきました。DNA は自然に損傷し、その維持のためには絶えず修復する必要があります。損傷した DNA の断端は修飾をうけるため、このままでは修復にとって障害となります。私たちは APTX がこの損傷した断端を修復する活性を持つことを明らかにしました。この事により、本症の病態を明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：

We have been identified the causative gene, aprataxin (APTX), for early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia, also known as ataxia-oculomotor apraxia type 1. DNA single-strand breaks (SSBs) are discontinuities in strands of a DNA duplex. SSBs are usually accompanied by modified or damaged 5'- and 3'-ends at the break site. Because these modified or damaged ends are not suitable for DNA ligation, they need to be restored to conventional ends prior to subsequent repair processes. APTX restores these modifying ends. The loss of function of APTX results in the accumulation of SSBs, consequently leading to neuronal cell dysfunction and death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症，DNA 損傷修復

1. 研究開始当初の背景

神経内科学において神経変性疾患の解明は重要な課題である。申請者は分子生物学的

法を用い、一貫して神経変性疾患の臨床と研究に従事し、脊髄小脳変性症（DRPLA, SCA3/MJD, EAOH/AOA1）、アル

ツハイマー病の、疾患遺伝子、疾患感受性遺伝子の単離を行ってきた。また変性疾患の病態機序について、ポリグルタミン病において、異常蛋白の凝集機序、転写障害機序に関する研究を行ってきた。さらに近年は EAOH/AOA1 の原因遺伝子であるアプラタキシンの研究から、神経細胞における核酸品質管理の研究を進めてきた。

神経変性機序には、神経細胞の特殊性が大きく関わっていることは明白である。神経細胞は、他の細胞に比して、極めて長寿（非分裂細胞）である。もともと細胞にとって、分裂は細胞内の不要蛋白質の除去や、損傷を受けた核酸の修復の面で有益な機構であった。体細胞では損傷を受けた核酸の修復は、細胞分裂時の核酸の複製時に試みられ、修復できない細胞は apoptosis により除去されるというシステムが構築されている。この除去を免れた一群が際限ない増殖を繰り返し癌化すると考えられる。一方、神経細胞は、分裂能を捨てることにより、獲得した能力を長期に維持する能力（記憶）を持ち得た。しかし、同時に、分裂能を失ったことにより、細胞内環境の維持において、多くの不利益を持つこととなった。分裂できないため、細胞内に蓄積する、折りたたみ不全蛋白質を希釈することができない。また、核酸の複製時に行われる DNA 修復機構を利用することができないため、DNA 障害が蓄積しやすい。さらに大量のエネルギーを産生するため活性酸素種による酸化ストレスを受けやすく、DNA や蛋白質の障害がおきやすい環境下にある。これらの処理、修復のために、神経細胞では、他の細胞とは異なる細胞内環境維持機構を有していると考えた。神経変性を考えるうえで、この神経細胞特異的な細胞内環境維持機構の解明が重要であると考えに至った。

細胞内環境維持機構は、蛋白質の品質管理機構が、近年注目されてきた。本機構の重要性は言うまでもないが、われわれはアプラタキシンの研究から、核酸の品質管理機構、という別の視点から神経変性機序を解明することを目的とした。

国際的にも、神経変性機序の研究は、コンフォメーション病、さらに蛋白質の品質管理機構の面から精力的に進められてきた。また一方、酸化ストレスを中心とする病態機序、さらにそれによる核酸障害による機序も同様に注目されてきた。神経変性疾患の多くが、加齢に伴って引き起こされることを考えると、この蛋白質や核酸の品質管理の障害により、時間と共に障害が蓄積するという仮説は大変興味深い。蛋白質の品質管理機構の破綻による神経変性疾患としては、アルツハイマー病や、ポリグルタミン病など、病理学的に特定の封入体が認められる疾患があげられ、多くの先行研究がある。一方核酸の品質管理

機構に関しては、主として、癌研究分野で体細胞レベルでの研究が、先行している。しかし、近年、神経細胞特異的に変性を引き起こす核酸品質管理機構異常による疾患の報告が相次ぎ、神経系での核酸品質管理機構が注目されるに至った

2. 研究の目的

神経変性における病態機序として DNA 損傷の蓄積を示唆する所見が集まってきている。しかし、本当に *in vivo* で神経細胞の DNA に損傷の蓄積がおこっているのか？また何故、DNA 修復機構の障害による疾患で細胞特異性があるのか？さらに DNA 損傷の蓄積がどのような機序で、神経細胞死を引き起こすのか？という命題について、我々は何ら答えられていない。本研究では、これらについて、EAOH/AOA1 の病態解析からアプローチし明らかとする。神経組織における最大の DNA 障害物質である酸化ストレスによる影響を見るため、アプラタキシン欠損マウスにて酸化ストレス誘導薬剤負荷による DNA 損傷を検討する。

3. 研究の方法

我々は全長アプラタキシン蛋白を用いた *in vitro* での解析により、アプラタキシンの機能解析を行う。また、この機構が、神経細胞でも保たれているのか、複数の DNA 障害励起条件下（bleomycin, camptothecin, 過酸化水素, 電離放射線等）による DNA 損傷修復の程度を comet assay により定量化し比較検討する。すでに我々は comet assay を用い、過酸化水素刺激下で、アプラタキシン欠損マウス初代培養小脳顆粒細胞において DNA 損傷修復が障害されている結果を得ている。この結果から、アプラタキシン欠損により神経細胞で DNA 修復障害がおこっていると考えている。DNA 損傷修復におけるアプラタキシンの必要性を、さらに検証するため、この実験を種々の薬剤負荷で比較検討し、再現性を確認する。さらに、アプラタキシン欠損神経細胞に、野生型アプラタキシン、変異型アプラタキシンを導入発現させ、DNA 損傷修復能の回復の有無を検討する。DNA 障害の検討方法としては comet assay を用いる。また組織化学的手法でも検討を加える。非特異的 DNA 損傷を示す TUNEL assay、一本鎖特異的 DNA 損傷を示す Klenow assay, Apostatin assay を行い、comet assay との相関。さらに定量 PCR 法による DNA 損傷の定量化結果との相関を検討し、各々の方法の DNA 損傷の定量性につき検討を加える。定量 PCR 法による DNA 損傷の定量的解析法は、2004 年 Lu T らにより報告された方法を応用する (Nature 429; 883-891 2004)。まず、アプラタキシンモデルマウスの細胞を種々の DNA 損傷誘導条件下で培養する。その細胞から、非酸化ストレス下で抽出

した DNA を、プロモーター領域特異的 (DNA 損傷を受けやすい GC 含有量の多い領域) な PCR プライマーにより増幅する。損傷 DNA は有効に増幅されないため、定量的 PCR 法により、サンプル中の正常 DNA 量を解析することが可能となる。

4. 研究成果

野生型, および疾患関連ミスセンス変異型, 疾患非関連ミスセンス変異型 APTX の組換えタンパク質を作成し, 3' 末端にリン酸基または PG 基の付加した 20mer のオリゴヌクレオチドを基質として用いて, 3' phosphatase 活性や 3' phosphoglycolate (PG) removal 活性を検討した。

APTX は, 損傷 3' 断片に関しては 3' phosphatase 活性, および 3' PG removal 活性を示し, かつ損傷 5' 断片に関しては AheI らの報告のように, 切断部 5' -末端の adenosine monophosphate (AMP) 残基の除去活性を示した。一方, 疾患関連ミスセンス変異型 APTX である P206L および V263G は, とともに 3' phosphatase 活性, 3' PG removal 活性, 5-AMP removal 活性を示さなかった。一方, 疾患非関連 APTX ミスセンス変異体 H260A は, 5-AMP removal 活性は示さないが, 3' phosphatase 活性や 3' PG removal 活性を示した。

細胞内局在に関しては, 全長型 APTX は核, 特に核小体に強い局在を示した。核小体を構成する fibrillar center (FC), dense fibrillar component (DFC), granular component (GC) の構造物のうち, 全長型 APTX は FC と GC に局在した。一方, 7 種類の既知の疾患関連変異体については, GC 局在の著明な減少を認めた。

APTX の核小体への局在機序を明らかにするために, 数種類の断片型蛋白の局在を調べたところ, FC 局在には N 末端 FHA 領域が必要であるのに対して, GC 局在には N 末端, C 末端領域のいずれか一方では不十分で, 全長が必要であった。APTX の核小体局在を制御するパートナー蛋白を同定するため, 核内蛋白である nucleophosmin (B23), nucleolin, fibrillarin, PARP-1, XRCC1, および topoisomerase I を各々ノックダウンして, APTX の局在への影響を調べた。その結果, B23 および nucleolin をノックダウンした場合に, APTX の GC 局在が減少した。このうち, B23 は全長型 APTX によって共免疫沈降され, 一方, 断片型蛋白, および変異体では共免疫沈降されなかった。したがって, APTX の GC 局在には, B23 との結合が重要であると考えられた。さらに, APTX は C 末で二量体を形成し, これが APTX の GC への局在に重要であることを示した。一方, 疾患関連ミスセンス変異型 APTX は二量体形成能を失い, GC

への局在能を失った。疾患関連変異体の蛋白の発現量を調べたところ, 全ての変異体は, 野生型に比して蛋白量が減少していた。次に, 野生型と 2 種類の変異体の安定発現細胞株にプロテアソーム阻害剤 MG-132 を負荷すると, 野生型では発現量に有意な変化を認めなかったが, 変異体では経時的に発現量の増加を認めた。また, 蛋白合成阻害剤 CHX を負荷すると, 変異体では速やかに蛋白量が減少した。以上の結果から, 疾患関連変異体は極めて不安定であり, ユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) の分解を受けることが示された。

本邦で最も多いフレームシフト変異型 689insT に関しては, ミスセンス依存性 mRNA 分解機構 (NMD) により, mRNA の量が減少している機序を想定し, その APTX mRNA 量を 689nsT/840delT 患者組織にて検討した結果, mRNA 量が半減していることを見いだした。

APTX は DNA 3' -末端のリン酸基や 3' -PG 基などの異常修飾基を加水分解し, 除去する活性を有すること, 疾患関連変異体ではこの加水分解活性が失われることを示した。これらの結果は, APTX が損傷切断部末端のプロセッシングを行うことで, SSBR において直接的な役割を果たしていることを示唆している。全長型 APTX は核および核小体に局在し, 核小体の中では FC と GC に局在する。一方, 疾患関連変異体は, 核小体に局在しなくなり, かつ UPS による蛋白分解依存性に不安定となる。APTX の GC 局在には, C 末を介した二量体の形成と B23 への結合が重要であることを示した。ミスセンス変異型 APTX は, 二量体形成不全により, GC への局在能を失い, さらに, 蛋白の不安定性を引き起こし, 3' phosphatase 活性, 3' PG removal 活性を失うことにより発症する。

一方, 本邦で最多のフレームシフト型変異 689insT は, NMD により mRNA が減少することにより引き起こされることが示唆された。以上, 本症の疾患関連変異毎に異なる病態機序を解明することが出来た。

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 6 件)

査読有り

[Molecular mechanism for spinocerebellar ataxias] Onodera O. Rinsho Shinkeigaku. 2009 Nov;49(11):750-2. Japanese. PMID: 20030201

[Molecular mechanism for

spinocerebellar ataxias] Onodera O.
Rinsho Shinkeigaku. 2009
Jan;49(1):1-8. Review. Japanese.
PMID: 19227889

Aprataxin, causative gene product for
EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand
breaks with damaged 3'-phosphate and
3'-phosphoglycolate ends. Takahashi
T, Tada M, Igarashi S, Koyama A, Date
H, Yokoseki A, Shiga A, Yoshida Y,
Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O.
Nucleic Acids Res. 2007;35(11):3797-809.

査読無し

【癌治療・発癌・老化の鍵を握る DNA
修復経路】DNA 一本鎖切断損傷修復の
破綻による神経変性疾患 他田正義, 辻
省次, 西澤正豊, 小野寺理 細胞工学 29
巻 1 号 Page60-66(2009.12)

【脊髄小脳変性症 What's new?】劣性
遺伝性家族性 眼球運動失行と低アル
ブミン血症を伴う早期発症型脊髄小脳
失調症(EAOH/AOA1) 佐藤達哉, 他田
正義, 小野寺理 Clinical Neuroscience
27 巻 1 号 Page82-83(2009.01)

【脳神経疾患の分子病態と治療への展
開 アルツハイマー病、パーキンソン病、
発達障害、精神疾患などの発症メカニ
ズムを分子から解く】神経難病の病態ト
ピックス DNA 修復の異常と劣性遺伝
性失調症 他田正義, 横関明男, 小野寺
理 実験医学 25 巻 13 号
Page1988-1994(2007.08)

〔学会発表〕(計 8 件)

Molecular mechanism of nucleolus
localization of aprataxin, causative
protein for neurodegenerative
disorder T. SATO, A. KOYAMA, M. TADA,
S. ATSUSHI, S. IGARASHI, M. NISHIZAWA,
*O. ONODERA;
Neuroscience 2008 Washington DC Tue,
Nov 18,

Aprataxin, the Causative Gene Product
for AOA1/EAOH, Repairs Damaged
3'-ends of DNA Single Strand Breaks.
Masayoshi Tada, Akihide Koyama,
Shuichi Igarashi, Akio Yokoseki,
Tetsuya Takahashi, Atsushi Shiga,
Shoji Tsuji, Tokyo, Japan, Masatoyo
Nishizawa, Osamu Onodera, Tuesday,
May 1, 2007, 59th BOSTON AAN ANNUAL

MEETING

疾患関連変異型 APTX の蛋白不安定化機
序の解明 佐藤達哉(新潟大学学脳研究
所 神経内科), 小山哲秀, 横関明男,
他田正義, 小野寺理, 西澤正豊 2009
年 5 月 20 日 日本神経学会総会 仙台

Aprataxin は神経細胞において DNA 単鎖
切断損傷修復に関与する 他田正義,
佐藤達哉, 横関明男, 小山哲秀, 志賀
篤, 高橋哲哉, 小宅睦郎, 五十嵐修一,
佐藤俊哉, 辻省次, 西澤正豊, 小野寺
理 2008 年 5 月 15 日 日本神経学会総
会 横浜

疾患関連変異型アプラタキシンの核小
体局在障害とその機序の解明 佐藤達
哉, 小山哲秀, 横関明男, 他田正義,
小野寺理, 西澤正豊 2008 年 5 月 15 日
日本神経学会総会 横浜

EAOH の病因蛋白 aprataxin は校正機能
を有する 3'-5'exonuclease である 他
田正義, 横関明男, 高橋哲哉, 五十嵐
修一, 西澤正豊, 小野寺理 2007 年 5
月 16 日 日本神経学会総会 名古屋

EAOH/AOA1 における遺伝子変異と臨床症
状の検討 横関明男, 岩淵潔, 丸田恭
子, 西澤正豊, 小野寺理 2007 年 5 月
16 日 日本神経学会総会 名古屋

AOA1/EAOH の病態機序における核小体局
在の意義 小野寺理, 小山哲秀, 横関
明男, 他田正義, 間由希, 五十嵐修一,
西澤正豊 2007 年 5 月 16 日 日本神経学
会総会 名古屋

〔図書〕(計 2 件)

末梢神経疾患 眼球運動失行と低アルブ
ミン血症を伴う早期発症型脊髄小脳失
調症 佐藤達哉(新潟大学学脳研究所
神経内科), 他田正義, 小野寺理 Annual
Review 神経 2009 巻
Page226-232(2009.01)

Early-Onset Ataxia with Ocular Motor
Apraxia and Hypoalbuminemia/Ataxia
with Oculomotor Apraxia 1. Masayoshi
Tada, Akio Yokoseki, Tatsuya Sato,
Takao Makifuchi and Osamu Onodera
Diseases of DNA Repair. 2010 13p
Shamim I. Ahmad editor Landes
Bioscience.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research_basic_002.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 理 (ONODERA OSAMU)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：20303167

(2) 研究分担者

高橋 俊昭 (TAKAHASHI TOSHIAKI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：70377191

小澤 鉄太郎 (OZAWA TETSUTARO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：10377153

豊島 靖子 (TOYOSHIMA YASUKO)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：20334675

(3) 連携研究者

なし