

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22240037

研究課題名（和文） ポリグルタミン病：転写異常病態解析の新展開

研究課題名（英文） Polyglutamine diseases: investigation of transcriptional dystregulation

研究代表者

貫名 信行 (NUKINA NOBUYUKI)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10134595

研究成果の概要（和文）：ポリグルタミン病の転写異常病態に関して、NF-YA、FUS/TLS等の凝集体結合転写関連因子の病態への関与について、これらの分子のノックアウトマウスを用いて検討、また転写異常の中でも早期の変化を引き起こす、sodium channel beta4 subunitについても新たに作成したノックアウトマウスを用いてその病態への影響を解析し、特異な病理変化、病態への関与を同定した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the pathological process of transcriptional abnormality in polyglutamine diseases, we examined the knockout mice of NF-YA and FUS/TLS, which are polyglutamine aggregates-interacting proteins, and the knockout mouse of sodium channel beta4 subunit, which is early downregulated gene in Huntington disease. We found unique pathology in those mice, which may relate to polyglutamine disease pathology.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2010年度 | 16,600,000 | 4,980,000 | 21,580,000 |
| 2011年度 | 11,100,000 | 3,330,000 | 14,430,000 |
| 2012年度 | 11,100,000 | 3,330,000 | 14,430,000 |
| | | | |
| 総計 | 38,800,000 | 11,640,000 | 50,440,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：ポリグルタミン病、転写、NF-Y,TLS,sodium channel beta4 subunit

1. 研究開始当初の背景

CAGリピート病はその病因遺伝子にCAGのリピートを含み、リピートの伸長を認めるハンチントン病、遺伝性脊髄小脳失調症、球脊髄筋萎縮症などを含む一群の神経疾患である。CAGリピートが病因遺伝子の翻訳領域に存在するためCAGリピートから翻訳されたポリグルタミンが病態に強くかかわっ

ていると想定され、ポリグルタミン病とも呼ばれる。ポリグルタミン病の神経細胞の核にはユビキチン化された封入体が存在することが確認され、これらの封入体と神経細胞変性の関連が注目されている。核内封入体は伸長ポリグルタミンを含む蛋白質凝集体であり、様々な転写因子がこれに結合することにより、機能を失い、転写障害を起こすと考え

られている(Sequestration 仮説)。Shimohataらは TAFII130 が結合し、CREB 依存性転写が障害されると報告し(Shimohata et al. Nat Genet2000)、Nucifora,Dunahらはそれぞれ CBP,Sp1, TAFII130 の結合による転写障害を報告した(Nucifora et al. Science 2001, Dunah et al Science 2002)。一方これらの報告の後、封入体が TBP,CBP,SP1 などの転写因子を枯渇させないという報告(Yu et al Hum Mol Genet2002)や、CBP の結合はよりダイナミックであるという報告(Stenoien et al Nat Cell Biol2002)が見られ、さらに CRE プロモーターを持つトランスジェニックマウスでは反って CREB 依存性転写活性が亢進しているという報告(Obrietan K et al: J Neurosci 2004)もあり、矛盾が生じている。我々はポリグルタミン病モデルマウスとしてよく使用されている R6/2(ハンチンチンエキソン1トランスジェニックマウス)や我々の作成した 190QG マウス(ハンチンチンエキソン1-EGFP)トランスジェニックマウスの遺伝子発現解析を行い様々な遺伝子発現の異常を見出したが(Kotliarova et al J Neurochem2005)、初期には限られた遺伝子の発現異常しか示していないことからこの限られた遺伝子発現異常こそ伸長ポリグルタミンの影響を直接受けたものであると想定した。その限られた早期に発現異常を示す遺伝子として同定した sodium channel beta4 subunit (Oyama et al. J Neurochem 2006)は CRE 依存性の転写制御ではないことを確認しており、これまで報告されている転写因子とは異なる転写異常の機序の存在が示唆された。

一方我々は直接ポリグルタミン凝集体結合蛋白質の解析を行ってきた。ポリグルタミン発現細胞モデルから凝集体を精製し、結合蛋白質を質量分析によって同定した。その結果シャペロンやプロテアソーム関連蛋白質が同定され(Mitsui et al. J Neurosci2002)、ユビキチン結合蛋白質の存在も確認された(Doi et al. FEBS let 2004)。一方転写因子はこれまで報告されている TAFII130, CBP, Sp1 等は同定されなかった。転写因子として同定されたものは NF-YA,C であり、その解析から凝集体不溶性分画に NF-YA が移動するためにその活性も減少していることを確認した(Yamanaka et al. EMBO J 2008)。

我々の網羅的凝集体結合蛋白質同定は主要な結合蛋白質として TLS を同定した(Doi et al. JBC 2008)。TLS は FUS/TLS と呼ばれ、RNA 結合蛋白質であり、RNA の輸送などにも関与しており、またスパインの形成の制御にも関与していると報告されている。興味深い点は我々の報告の後、この分子の突然変異が家族性筋萎縮性側索硬化症 6 型(ALS6)を引き起こすことが報告されたこと

である(Vance et al Science 2009, Kwiatkowski et al. Science 2009)。TLS は転写にも関与していると報告されており、ポリグルタミン病と ALS6 の神経変性に共通するメカニズムの存在する可能性があり、詳細な検討が必要となっている。

本研究では我々が展開してきた上記の凝集体結合蛋白質研究と転写異常病態研究をさらに発展させ、ポリグルタミン病の転写異常病態研究の新たな展開を目指すものである。

2. 研究の目的

ポリグルタミン病の転写異常病態に関して、これまで報告されている転写因子の凝集体への sequestration 仮説に関しては矛盾した報告があり、解決を見ていない。本研究では当研究グループが同定した NF-YA、FUS/TLS 等の凝集体結合転写関連因子の病態への関与について、これらの分子のノックアウトマウスを用いて検討する。また転写異常の中でも早期の変化を引き起こす、sodium channel beta4 subunit についても新たに作成したノックアウトマウスを用いてその病態への影響、またその遺伝子の発現制御機構に関する検討を行う。ポリグルタミン病の転写異常に関してはまだ in vivo の解析は十分に行われておらず、本研究ではノックアウトマウスを駆使した、in vivo アプローチにより、新たな病態メカニズムの発見を目指す。

3. 研究の方法

1) NF-YA コンディショナルノックアウトマウスの作成とその解析：NF-YA が制御する分子を解明するために NF-YA ノックアウトマウスを解析する。通常のノックアウトマウスは胎生致死であるため、コンディショナルノックアウトマウスとして作成し、このマウスの病態を検討する。

2) TLS ノックアウトマウスとハンチントン病モデルマウス R6/2 や球脊髄性筋萎縮症(SBMA)モデルマウスとの掛け合わせにより、病態が増強されるかどうかをマウスの機能、行動解析、寿命などにより検討する。また掛け合わせマウスの遺伝子発現について検討し、TLS の関与する遺伝子について検討を行う。SBMA マウスとの掛け合わせで運動ニューロンの病態がより強く影響されるようであれば、ポリグルタミン病の病態においても TLS の機能喪失の病態が示唆される。

3) ハンチントン病において早期に影響を受ける sodium channel beta4 subunit のノックアウトマウスを作成した。同マウスの病態を検討する。

4. 研究成果

1) NF-YA のコンディショナルノックアウト

マウスを解析した結果、大脳皮質神経細胞におけるノックアウトによって、ユビキチン、P62 の集積を伴う神経変性を引き起こすことが判明した。その chip on chip 解析によって、NF-YA の標的遺伝子を解析したところ、小胞体関連遺伝子が多く認められることが判明した。ノックアウトに伴う神経変性においても Grp94 の減少を伴い、小胞体の形態異常が引き起こされており、成熟神経細胞において、NF-YA が重要な役割を果たしていることが判明した (投稿中)。

2) FUS/TLS のヘテロノックアウトマウスと R6/2, SBMA マウスとの掛け合わせ実験から R6/2 との掛け合わせでヘテロノックアウトにおいて、症状の増悪をみた。一方 SBMA においては著変を認めず、ポリグルタミン凝集との関連では、遺伝子産物によって影響が異なることが判明した (投稿準備中)。

3) sodium channel beta4 subunit ノックアウトマウスの解析では症状として振戦を認め、線条体中型有棘神経細胞のチャンネル機能にも異常を認めた (投稿準備中)。

以上これらのノックアウトマウスの解析から、これらの個々の因子が病態に異なる影響を与えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 26 件)

1) Nguyen, H.M., Miyazaki, H., Hoshi, N., Smith, B.J., Nukina, N., Goldin, A.L. & Chandy, K.G. Modulation of voltage-gated K⁺ channels by the sodium channel beta1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18577-82 (2012). 査読有

2) Bauer, P.O., Hudec, R., Goswami, A., Kurosawa, M., Matsumoto, G., Mikoshiba, K. & Nukina, N. ROCK-phosphorylated vimentin modifies mutant huntingtin aggregation via sequestration of IRBIT. *Mol. Neurodegener.* **7**, 43 (2012). 査読有

3) Mitomi, Y., Nomura, T., Kurosawa, M., Nukina, N. & Furukawa, Y. Post-aggregation oxidation of mutant huntingtin controls the interactions between aggregates. *J. Biol. Chem.* **287**, 34764-75 (2012). 査読有

4) Ding, F., Furukawa, Y., Nukina, N. & Dokholyan, N.V. Local unfolding of Cu, Zn superoxide dismutase monomer determines the morphology of fibrillar aggregates. *J. Mol. Biol.* **421**, 548-60 (2012). 査読有

5) Bauer, P.O., Hudec, R., Ozaki, S., Okuno, M., Ebisui, E., Mikoshiba, K. & Nukina, N. Genetic ablation and chemical inhibition of IP3R1 reduce mutant huntingtin aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 13-7 (2011). 査読有

6) Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M. & Nukina, N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates

selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol. Cell* **44**, 279-89 (2011). 査読有

7) Furukawa, Y., Kaneko, K. & Nukina, N. Molecular properties of TAR DNA binding protein-43 fragments are dependent upon its cleavage site. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1577-83 (2011). 査読有

8) Doi, H., Yoshida, K., Yasuda, T., Fukuda, M., Fukuda, Y., Morita, H., Ikeda, S., Kato, R., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Saitsu, H., Sakai, H., Miyatake, S., Shiina, M., Nukina, N., Koyano, S., Tsuji, S., Kuroiwa, Y. & Matsumoto, N. Exome Sequencing Reveals a Homozygous SYT14 Mutation in Adult-Onset, Autosomal-Recessive Spinocerebellar Ataxia with Psychomotor Retardation. *Am J Hum Genet* **89**, 320-7 (2011). 査読有

9) Furukawa, Y., Kaneko, K. & Nukina, N. Tau protein assembles into isoform- and disulfide-dependent polymorphic fibrils with distinct structural properties. *J. Biol. Chem.* **286**, 27236-46 (2011). 査読有

10) Furukawa, Y., Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K. & Nukina, N. A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. *J. Biol. Chem.* **286**, 18664-72 (2011). 査読有

11) Kino, Y., Washizu, C., Aquilanti, E., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Doi, H. & Nukina, N. Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations. *Nucleic Acids Res* **39**, 2781-98 (2011). 査読有

12) Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T. & Mikoshiba, K. Mechanism of ER Stress-Induced Brain Damage by IP(3) Receptor. *Neuron* **68**, 865-78 (2010). 査読有

13) Nishimura, Y., Yalgin, C., Akimoto, S., Doumanis, J., Sasajima, R., Nukina, N., Miyakawa, H., Moore, A.W. & Morimoto, T. Selection of behaviors and segmental coordination during larval locomotion is disrupted by nuclear polyglutamine inclusions in a new Drosophila Huntington's disease-like model. *J. Neurogenet.* **24**, 194-206 (2010). 査読有

14) Yamanaka, T. & Nukina, N. Transcription factor sequestration by polyglutamine proteins. *Methods Mol. Biol.* **648**, 215-29 (2010). 査読有

15) Li, B., Hu, Q., Wang, H., Man, N., Ren, H., Wen, L., Nukina, N., Fei, E. & Wang, G. Omi/HtrA2 is a positive regulator of autophagy that facilitates the degradation of mutant proteins involved in neurodegenerative diseases. *Cell*

Death Differ. **17**, 1773-84 (2010). 査読有

16) Furukawa, Y., Kaneko, K., Yamanaka, K. & Nukina, N. Mutation-dependent polymorphism of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **285**, 22221-31 (2010). 査読有

17) Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y. & Nukina, N. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotechnol.* **28**, 256-63 (2010). 査読有

18) Yamanaka, T., Tosaki, A., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Furukawa, Y., Yamada, M. & Nukina, N. Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2099-112 (2010). 査読有

19) Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Chen, C., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., Ranscht, B. & Isom, L.L. Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and {beta}1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2283-8 (2010). 査読有

20) Tateishi, T., Hokonohara, T., Yamasaki, R., Miura, S., Kikuchi, H., Iwaki, A., Tashiro, H., Furuya, H., Nagara, Y., Ohyagi, Y., Nukina, N., Iwaki, T., Fukumaki, Y. & Kira, J.I. Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol.* **119**, 355-364 (2010). 査読有

21) Doi, H., Koyano, S., Suzuki, Y., Nukina, N. & Kuroiwa, Y. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci. Res.* **66**, 131-3 (2010). 査読有

22) 紀嘉浩 & 貫名信行. 【in vivo 実験医学によるヒト疾患解明の最前線 生体イメージングとモデル動物を用いた研究戦略と臨床応用 疾患モデルと分子標的探索による治療薬開発】ハンチントン病の治療法開発とモデルマウスを用いた評価. *実験医学* **30**, 349-356 (2012). 査読無

23) 松本弦 & 貫名信行. 【神経筋疾患の分子標的治療開発】p62 のリン酸化と選択的オートファジー. *BIO Clinica* **27**, 916-920 (2012). 査読無

24) 貫名信行 & Bauer, P. 【Protein Kinesis を解き明かす オルガネラの世界 細胞機能の制御と遺伝病発症・ウイルス感染のメカニズム】ポリグルタミン病のシャペロン介在性オートファジーを利用した新規治療法の開発. *実験医学* **28**, 2125-2128 (2010). 査読無

25) 櫻井隆, 櫻山拓 & 貫名信行. 【SNARE

複合体-膜融合の機構】マイクロドメインス イッチング アミロイド前駆体蛋白質のマイクロドメイン依存性代謝調節とシンタキシン1. *生体の科学* **61**, 252-256 (2010). 査読無

26) 伊野部智由 & 貫名信行. 【脳神経系の情報伝達と疾患 さまざまなシグナル伝達因子の異常が引き起こす精神疾患・発達障害・神経変性疾患のメカニズム】神経疾患の細胞生物学 タンパク質分解系活性化による神経変性疾患治療. *実験医学* **28**, 788-794 (2010). 査読無

[学会発表] (計15件)

1) Nukina, N. Autophagic machinery for degrading the misfolded proteins. *The 6th International Symposium of Autophagy 2012* 61, Nago, Japan, 2012.

2) Yamanaka, T., Tosaki, A., Kurosawa, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Maity, S. & Nukina, N. Role of NF-Y transcription factor in neuronal cell maintenance and chaperone gene expression. *EMBO | EMBL Symposia 2012: Quality Control - From Molecules to Organelles*, Heiderberg, Germany, 2012.

3) Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Oma, Y., Ishiura, S. & Nukina, N. Muscleblind proteins repress aberrant protein expression derived from expanded repeats. *International Myotonic Dystrophy Consortium -8 (IDMC-8)*, Clearwater Beach, USA, 2011.

4) Nukina, N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Huntington's Disease WORLD CONGRESS 2011* 24, Melbourne, Australia, 2011.

5) Nukina, N. Enhancing the clearance of misfolded polyglutamine proteins. *2011 Gordon Research Conferences on CAG Triplet Repeat Disorders*, Lucca (Barga), Italy, 2011.

6) Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M. & Nukina, N. Phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Cold Spring Harbor Laboratory 2011 Meeting on the Ubiquitin Family*, Cold Spring Harbor, USA, 2011.

7) Kino, Y., Wahizu, C., Aquilanti, E., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Doi, H. & Nukina, N. The effects of ALS-linked mutations of FUS/TLS. *BRI International Symposium 2010 "Current Understandings and Future Directions for ALS"*, Niigata, Japan, 2010.

8) Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M. & Nukina, N. Requirement of phosphorylation of p62/SQSTM1 for autophagic degradation of polyubiquitinated proteins. *The 3rd International Symposium on Protein Community*

126, Nara, Japan, 2010.

9) 貫名信行. ポリグルタミン病の病態と治療戦略. 第3回神経科学と構造生物学の融合研究会, 大阪(大阪大学蛋白質研究所), 2012.

10) 貫名信行. 凝集体形成からみた神経変性機序. 第52回日本神経学会学術大会 178, 名古屋(名古屋国際会議場), 2011.

11) 貫名信行. Expanding world of autophagy: from molecular mechanisms to pathophysiological roles Using chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. 第33回日本分子生物学会・第83回生化学会大会合同大会 2PS12-6, 神戸(神戸ポートアイランド), 2010.

12) 貫名信行. ポリグルタミン病の治療法開発とモデルマウスを用いた評価. 第3回疾患モデルシンポジウム"精神神経疾患のモデル動物とその応用, 東京(中央大学駿河台記念会館), 2010.

13) Nukina, N. Search for neuronal circuit specific changes in polyglutamine diseases. Kick of symposium of Scientific Research on Innovative Area "Foundation of Synapse and neurocircuit Pathology", 東京(東京医科歯科大学), 2010.

14) 貫名信行. ポリグルタミン封入体結合蛋白としての FUS/TLS. 第51回日本神経学会総会 Vol. 50 臨床神経学, 東京(東京国際フォーラム), 2010.

15) Nukina, N., Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosavva, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y. & Nagai, Y. Novel gene therapy for polyglutamine diseases to selectively degrade the pathogenic protein. Japan society of Gene Therapy The 16th Annual Meeting 2010 (第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会), 宇都宮(栃木県総合文化センター), 2010.

[図書] (計1件)

1) 紀嘉浩, 黒沢大 & 貫名信行. ハンチントン病モデルマウス. 脳・神経疾患-疾患モデルの作成と利用 (ed. 三品昌美) 39-47 (エル・アイ・シー, 東京, 2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貫名 信行 (NUKINA NOBUYUKI)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 10134595

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし