

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390237

研究課題名(和文) 標的結合ペプチドを応用した異常蛋白質選択的分解によるポリグルタミン病治療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for the polyglutamine diseases by selective degradation of expanded polyglutamine proteins using polyglutamine-binding peptides

研究代表者

永井 義隆 (Nagai, Yoshitaka)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号：60335354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患ポリグルタミン(PolyQ)病に対する異常伸長PolyQ蛋白質の選択的分解による治療法確立を目指して、1) ショウジョウバエモデルを用いてPolyQ病病態におけるp62の役割を検討し、p62はオートファジー系分解を介して異常伸長PolyQ蛋白質、特に高分子量オリゴマーの分解に関与し、病態に防衛的に働くことを明らかにした。2) 異常伸長PolyQ鎖結合ペプチドQBP1を応用した選択的分解法を検討し、p62-QBP1キメラ蛋白質による異常伸長PolyQ蛋白質選択的な分解誘導の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Toward developing a therapy for the polyglutamine (polyQ) neurodegenerative diseases by specific degradation of expanded polyQ proteins, 1) we showed that p62 plays an important role in the autophagic clearance of polyQ protein, especially its oligomers, resulting in protection against polyQ-induced neurodegeneration in Drosophila. 2) We further designed the p62-QBP1 chimeric protein, which consists of p62, an adaptor protein for selective autophagy and the expanded polyQ-specific binding peptide QBP1, and demonstrated its therapeutic potential for the polyQ diseases by selective degradation of expanded polyQ proteins.

研究分野：神経内科学、神経科学、分子生物学

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：神経科学 蛋白質 脳神経疾患 治療 蛋白質分解 神経変性疾患 ポリグルタミン病 分子デザイン

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン (PolyQ) 病など多くの神経変性疾患において、いずれも異常蛋白質のミスフォールディング・凝集が共通に神経変性を引き起こすと考えられている。このような異常蛋白質のミスフォールディング・凝集阻害による治療法は発症予防には有効であるが、一方で発症後からの治療介入を考えた場合、既に凝集した異常蛋白質の分解促進による治療法が有効であると考えられる。

蛋白質分解システムは、主にユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の2つの経路が知られている。凝集蛋白質の分解除去を考えた場合、基質蛋白質のアンフォールドが必要なユビキチン・プロテアソーム系分解よりも、大きな凝集体でもオートファゴソーム膜で取り囲んで分解できるオートファジー・リソソーム系分解の方が適していると考えられる。しかしながらオートファジー・リソソーム系分解は、これまで基質蛋白質の選択性がないバルク分解システムと考えられていた。

研究代表者らは、以前に異常伸長 PolyQ 鎖を特異的に認識するペプチド QBP1 を同定しており、最近理研・貫名博士との共同研究により、QBP1 を応用した異常伸長 PolyQ 蛋白質選択的な分解促進による PolyQ 病モデルマウスの治療効果を明らかにした (Bauer et al. Nature Biotechnol, 2010)。さらに連携研究者の小松博士らは、これまで非選択的と考えられていたオートファジー・リソソーム系分解において、ユビキチン化された標的蛋白質をオートファゴソームへと運ぶアダプター蛋白質として p62 を同定し、p62 を介する選択的なオートファジー経路の存在が注目されている (Komatsu et al. Cell, 2007)。

2. 研究の目的

本研究では、ミスフォールド・凝集蛋白質の分解・除去による治療法という視点から、異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合ペプチド QBP1 を応用して異常伸長 PolyQ 蛋白質の選択的な分解促進による PolyQ 病の治療法開発を目指す

3. 研究の方法

(1) PolyQ 病病態における p62 の役割の解明

PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJD-Q78 Fly あるいは Htt-Q97 Fly と、p62 の遺伝子変異体ショウジョウバエ系統 p62def Fly あるいは p62 に対する RNAi を発現するショウジョウバエ p62-RNAi Fly、オートファジー関連遺伝子 Atg12、Alfy、プロテアソームサブユニット Prosb2 に対する RNAi 発現を発現するショウジョウバエとの遺伝学的交配を行った。次世代のショウジョウバエの複眼変性に対する影響を、実体顕微鏡観察により評価した。

また、MJD-Q78 Fly における PolyQ 蛋白質

凝集体に対する影響を、3 齢幼虫の複眼原基の免疫染色により評価した。

一方、Western blot 解析により PolyQ 蛋白質の発現量に対する影響を評価した。PolyQ 蛋白質の分解に対する影響については、まず GeneSwitch システムを用いて薬剤 RU486 により MJD-Q78 蛋白質発現を誘導できるコンディショナルモデル ind-MJD-Q78 Fly を樹立した。ind-MJD-Q78 Fly の発生期から RU486 を投与して MJD-Q78 蛋白質の発現を誘導し、羽化後に RU486 を除去した後のパルスチェイス解析により MJD-Q78 蛋白質の経時的な分解を評価した。

(2) p62-QBP1 キメラ蛋白質による異常伸長 PolyQ 蛋白質選択的な分解誘導

p62 配列の中で、ユビキチン結合活性を持つ UBA ドメインを異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 (SNWKWWPGIFD) に置換したキメラ蛋白質 p62-QBP1 をデザインした。培養 HEK293 細胞にて PolyQ-GFP 蛋白質との一過性共発現実験を行い、PolyQ-GFP 蛋白質の発現量を Western blot 解析により評価した。

次に p62-QBP1 キメラ蛋白質を発現するトランスジェニックショウジョウバエ p62-QBP1 Fly を作製し、PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJD-Q78 Fly あるいは Htt-Q97 Fly との遺伝学的交配を行った。次世代のショウジョウバエの複眼変性に対する影響を、実体顕微鏡観察により評価した。

4. 研究成果

(1) PolyQ 病病態における p62 の役割の解明 p62 は PolyQ 病モデルショウジョウバエ病態に防御的に関与する

まず、PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJD-Q78 Fly における p62 の関与を明らかにするために複眼原基の免疫染色を行った。その結果、p62 は主に細胞質に局在し、細胞質内の MJD-Q78 蛋白質凝集体に共局在することを明らかにした。核内の MJD-Q78 蛋白質凝集体への共局在は認めなかった。

次に、p62 の遺伝子変異体 p62def Fly あるいは p62 に対する RNAi 発現を発現するショウジョウバエ p62-RNAi Fly と MJD-Q78 Fly との遺伝学的交配を行った。その結果、p62 の機能喪失により MJD-Q78 Fly の複眼変性が有意に増悪することを明らかにした。また別の PolyQ 病モデルショウジョウバエ Htt-Q97 Fly においても同様に複眼変性の増悪を認めた。

これらのショウジョウバエの複眼原基の免疫染色を行った結果、p62 の機能喪失により細胞質内の MJD-Q78 蛋白質凝集体が著明に増加することを明らかにした。核内凝集体も軽度の増加を示したが、細胞質内凝集体の増加の方がより顕著であった。

以上の結果から、p62 は PolyQ 病病態に防御的に働くと考えられた。

オートファジー系、プロテアソーム系蛋白質

質分解は PolyQ 病モデルショウジョウバエ病態に防御的に関与する

PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJD-Q78 Fly における、オートファジー・リソソーム系あるいはユビキチン・プロテアソーム系蛋白質分解システムの関与を明らかにするために、オートファジー関連遺伝子 Atg12、Alfy、あるいはプロテアソームサブユニット Pros82 に対する RNAi を発現するショウジョウバエとの遺伝学的交配を行った。その結果、これらの遺伝子の機能喪失により MJD-Q78 Fly の複眼変性が有意に増悪することを明らかにした。

続いて免疫染色を行った結果、Atg12 の機能喪失では p62 と同様に細胞質内の MJD-Q78 蛋白質凝集体が著明に増加していた。Pros82 の機能喪失では核内、細胞質内の凝集体共に同程度の増加を示した。

以上の結果から、オートファジー系、プロテアソーム系蛋白質分解はいずれも PolyQ 病病態に防御的に働き、p62 はオートファジー系分解と同様に細胞質内の PolyQ 凝集体の除去に関わる可能性が考えられた。

p62 はオートファジー系蛋白質分解を介して PolyQ 病モデルショウジョウバエ病態に防御的に働く

PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJD-Q78 Fly に対する p62 の防御的な役割に対して、オートファジー・リソソーム系あるいはユビキチン・プロテアソーム系蛋白質分解システムが関与するかどうかを検討した。遺伝学的交配により、PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJD-Q78 Fly に p62 に対する RNAi と両分解系関連遺伝子に対する RNAi を共に発現させた。その結果、p62 に加えて Atg12、Alfy の機能喪失では、MJD-Q78 Fly の複眼変性の相乗的な増悪効果は認めなかった。一方、p62 に加えて Pros82 機能喪失では、MJD-Q78 Fly の複眼変性は相乗的な増悪効果を示した。以上の結果から、p62 の防御的な働きにオートファジー系分解が関与する可能性が示唆された。

次に、p62 の機能喪失による MJD-Q78 蛋白質への影響を明らかにするために Western blot 解析を行った。その結果、p62 の機能喪失では、可溶性 MJD-Q78 蛋白質量には顕著な影響を認めなかった。続いて、MJD-Q78 蛋白質の分解を評価するために、薬剤 RU486 により MJD-Q78 蛋白質発現をコントロールできるコンディショナルモデル ind-MJD-Q78 Fly を用いたパルスチェイス解析を行った。その結果、p62 の機能喪失により可溶性 MJD-Q78 蛋白質の経時的な分解が有意に遅延し、さらに MJD-Q78 蛋白質の高分子量オリゴマーはむしろ蓄積傾向を示した。オートファジー関連遺伝子 Atg6 の機能喪失によっても、同様に可溶性 MJD-Q78 蛋白質の分解遅延、高分子量オリゴマーの蓄積を認めたことから、p62 はオートファジー系分解を介して、異常伸長 PolyQ

蛋白質、特に高分子量オリゴマーの分解に寄与し、PolyQ 病病態に防御的に働くと考えられた。

(2) p62-QBP1 キメラ蛋白質による異常伸長 PolyQ 蛋白質選択的な分解誘導

p62-QBP1 キメラ蛋白質のデザイン

異常伸長 PolyQ 蛋白質特異的な分解誘導を目指して、p62 の UBA ドメインを異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 に置換したキメラ蛋白質 p62-QBP1 をデザインした。

まず、培養細胞実験系にて p62-QBP1 を発現させ、異常伸長 PolyQ 蛋白質の分解促進効果を検討した。その結果、正常鎖長の Q19-GFP 蛋白質の発現量には有意な影響を認めず、異常鎖長の Q81-GFP 蛋白質のみ選択的に発現量の有意な低下を認めた。p62 や QBP1 の発現では、Q81-GFP の発現量には明らかな影響を認めなかった。

p62-QBP1 キメラ蛋白質による PolyQ 病モデルショウジョウバエ病態に対する影響

さらに p62-QBP1 キメラ蛋白質による *in vivo* での PolyQ 病病態に対する治療効果を検証するため、p62-QBP1 キメラ蛋白質を発現するトランスジェニックショウジョウバエ p62-QBP1 Fly を作製した。次いで PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJD-Q78 Fly あるいは Htt-Q97 Fly と p62-QBP1 Fly との遺伝学的交配により、p62-QBP1 が複眼変性に与える影響を検討した。その結果、p62-QBP1 発現により MJD-Q78 Fly、Htt-Q97 Fly いずれの複眼変性も軽度ながら抑制された。しかし、この治療効果が異常伸長 PolyQ 鎖蛋白質の分解促進によるものか、あるいは QBP1 自身の凝集阻害作用によるものかは断定できなかった。

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 17 件)

(以下、1-11 は査読有、12-17 は査読無)

- 1) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* (in press) DOI: 10.2174/0929867321666140217124038
- 2) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M. (2014) Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*. *Hum. Mol. Genet.* 23(13): 3467-3480 (2014) DOI: 10.1093/hmg/ddu055
- 3) Togashi K., Wakatsuki S., Furuno A., Tokunaga S., Nagai Y., Araki T. Na⁺/H⁺

- exchangers induce autophagy in neurons and inhibit polyglutamine-induced aggregate formation *PLoS One* 8(11): e81313 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0081313
- 4) Popiel H.A., Takeuchi T., Burke J.R., Strittmatter W.J., Toda T., Wada K., *Nagai Y. Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases. *Neurotherapeutics* 10(3): 440-446 (2013) DOI: 10.1007/s13311-013-0184-7
 - 5) Higashi S., Kabuta T., Nagai Y., Tsuchiya Y., Akiyama H., Wada K. TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *J. Neurochem.* 126(2): 288-300 (2013) DOI: 10.1111/jnc.12194
 - 6) Popiel H.A., Takeuchi T., Fujita H., Yamamoto K., Ito C., Yamane H., Muramatsu S., Toda T., Wada K., *Nagai Y. Hsp40 exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS One* 7(11): e51069 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0051069
 - 7) Suzuki M., Nagai Y., Wada K., Koike T. Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429(1-2): 18-23 (2012) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.107
 - 8) Sasayama H., Shimamura M., Tokuda T., Azuma Y., Yoshida T., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Nagai Y., Yamaguchi M. Knockdown of the *Drosophila* Fused in Sarcoma (FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. *PLoS One.* 7(6): e39483 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0039483
 - 9) Popiel HA, Burke JR, Strittmatter WJ, Oishi S, Fujii N, Toda T, Wada K, *Nagai Y. The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases. *J Amino Acids* 2011: 265084 (2011) DOI: 10.4061/2011/265084
 - 10) Konya C, Hatanaka Y, Fujiwara Y, Uchida K, Nagai Y, Wada K, Kabuta T. Parkinson's disease-associated mutations in α -synuclein and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. *Neurochem Int* 59 (2): 251-258 (2011) DOI: 10.1016/j.neuint.2011.05.012
 - 11) Sun H, Satake W, Zhang C, Nagai Y, Tian Y, Fu S, Yu J, Qian Y, Qian Y, Chu J, Toda T. Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* 56 (4): 330-334 (2011) DOI: 10.1038/jhg.2011.14
 - 12) 永井義隆、藤掛伸宏 . コンフォメーション病としての神経変性疾患 . *ファルマシア* 49 (9): 849-853 (2013)
 - 13) 畑中悠佑、和田圭司、永井義隆 . 認知症におけるシナプス病態 . *Dementia Japan* 27 (2): 128-135 (2013)
 - 14) 永井義隆 . 神経変性疾患病態研究のキーワード . *臨床神経学* 52 (11): 874-876 (2012)
 - 15) 藤掛伸宏、長野清一、永井義隆 . ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル . *神経内科* 76 (3): 266-274 (2012)
 - 16) 永井義隆、貫名信行 . QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解 . *臨床神経学* 51 (11): 1108-1110 (2011)
 - 17) 永井義隆、藤掛伸宏 . ショウジョウバエモデルから解明された TDP-43 プロテインパチーの分子病態 . *Dementia Japan* 25 (2): 129-136 (2011)
- 〔学会発表〕(計 44 件)
〔招待講演 11 件〕
- 1) Nagai Y. Oligomerization of TDP-43 is triggered by imbalance of microtubule-dependent transport, leading to neurodegeneration *Int Symp "New frontier of molecular neuropathology 2014"* (March 16-17, 2014, Tokyo, Japan)
 - 2) Nagai Y. Disruption of microtubule-dependent transport triggers accumulation and oligomerization of TDP-43 in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in ALS. *Niigata Neurosci Res Meeting* (Jun 3, 2013, Niigata, Japan)
 - 3) Nagai Y. Toxic protein conformational transition and amyloid fibril formation in the polyglutamine diseases. *Int Symp on Amyloidosis* (Jan 24, 2013, Tokyo, Japan)
 - 4) Nagai Y. Molecular targeted therapy against the toxic protein conformation and aggregation for the polyglutamine neurodegenerative disorders. *Max Planck Institute & NCNP Joint Symp* (Oct 3-6, 2012, Munich, Germany)
 - 5) Nagai Y., et al. Non-cell autonomous therapeutic effects of Hsp40 on polyglutamine disease models via its exosome-mediated secretion. *2nd Int Conf of Neural Cell Culture* (Jun 16, 2012, Tokyo)
 - 6) 永井義隆 . Hsp40 はエクソソーム分泌により細胞非自律的なポリグルタミン病の治療効果を発揮する . **第32回日本認知症学会学術集会** (H25.11.8-10、長野)
 - 7) 永井義隆 . 蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした神経変性疾患の治療戦略 . **第13回日本蛋白質科学会** (H25.6.12-14、鳥取)
 - 8) 永井義隆 . 微小管依存的輸送の障害によ

- り TDP-43 の細胞質蓄積が促進され、ALS モデルシヨウジヨウバエの神経変性を増悪する。第 35 回 日本神経科学会 (H24.9.18-21、名古屋)
- 9) 永井義隆. 神経変性疾患病態研究のキーワード。第 53 回 日本神経学会学術大会 (H24.5.22-25、東京)
- 10) 永井義隆、貫名信行. QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解。第 52 回 日本神経学会 (H23.5.18-20、名古屋)
- 11) 永井義隆. 異常凝集病と病態。平成 23 年度大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質異常凝集の原理と制御」 (H23.4.27-28、大阪)
- (一般発表 33 件)
- 12) Suzuki M., et al. High-nutrient diet aggravates protein misfolding-related neurodegeneration in *Drosophila*. *Int Symp "New frontier of molecular neuropathology 2014"* (March 16-17, 2014, Tokyo, Japan)
- 13) Fujikake et al. Impairment of microtubule-dependent transport of TDP-43 triggers its aggregation, leading to neurodegeneration in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. *43rd SFN Meeting* (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
- 14) Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes neurodegeneration in *Drosophila*. *43rd SFN Meeting* (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
- 15) Nagai Y., et al. Dietary restriction improves proteostasis and suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders* (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 16) Popiel H.A., et al. Identification of a polyglutamine oligomerization inhibitor with high brain permeability and safety, which exerts therapeutic effects on multiple mouse models of the polyQ diseases. *7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders* (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 17) Fujikake N., et al. Aggregation of TDP-43 is triggered by insufficiency of microtubule-dependent transport in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in *Drosophila*. *11th Int Conf on Alzheimer's & Parkinson's Dis* (Mar 6-10, 2013, Florence, Italy)
- 18) Hatanaka Y., et al. Increased dendritic spine dynamics is an early feature in a SCA1 model mouse. *2012 CSH Asia meeting: Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders* (Nov 5-9, 2012, Suzhou, China)
- 19) Suzuki M., et al. Aggravation of neurodegeneration by high-nutrient diet in *Drosophila* models of neurodegenerative

diseases. *Keystone Symp on Aging and Diseases of Aging* (Oct 22-27, 2012, Tokyo, Japan)

- 20) Takeuchi T., et al. Exosome-mediated cell-to-cell transmission of heat shock proteins contributes to the maintenance of protein homeostasis. *EMBO Symp on Quality Control* (Sept 19-22, 2012, Heidelberg, Germany)
- 21) Nagai Y., et al. Molecular mechanism of novel unconventional secretion of Hsp40 to function extracellularly. *6th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders* (Jun, 2011, Barga, Italy)
- 22) Popiel HA, et al. Hsp40 exerts non-cell autonomous therapeutic effects on polyglutamine disease mice via its unconventional secretion. *6th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders* (Jun, 2011, Barga, Italy)
- その他 22 件

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 永井義隆. ポリグルタミン鎖の伸長による SCA : <アクチュアル 脳・神経疾患の臨床> 「小脳と運動失調」(西澤正豊編、中山書店) 172-181 (2013)
- 2) 永井義隆、和田圭司. ハンチントン病. *稀少疾患・難病の診断/治療技術と製品開発* (技術情報協会) 973-979 (2012)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 義隆 (NAGAI, Yoshitaka)
(独) 国立精神・神経医療研究センター・
神経研究所疾病研究第四部・室長
研究者番号: 60335354

(3) 連携研究者

小松 雅明 (KOMATSU, Masaaki)
(財) 東京都臨床医学総合研究所・プロジェクトリーダー
研究者番号: 90356254