

研究課題別評価

1 研究課題名: RNA ポリメラーゼ II 機能障害による神経変性の研究

2 研究者氏名: 岡澤 均

研究員: 戚 美玲 (研究期間 H.15.4~H.17.3)

研究員: 野村和美 (研究期間 H.17.4~H.18.3)

3 研究のねらい:

RNA ポリメラーゼ II は細胞の最も基本的機能である転写を担う核蛋白であり、その C 末端ドメインのリン酸化/脱リン酸化を利用して種々の蛋白と結合し、転写と RNA プロセッシングを段階的に調節している。私たちが神経変性の仲介分子として同定した WW ドメイン蛋白 (PQBP-1) はこの C 末端ドメインに結合する蛋白の一つであった。疾患蛋白は PQBP-1 との結合により RNA ポリメラーゼ II に作用し、転写/RNA プロセッシングを阻害すると考えられた。この知見は、疾患蛋白が RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白群の核内分布と機能に対して広範な“時空間的影響”を与えることを示唆している。本研究では、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析等の網羅的手法を用いて、ポリグルタミン疾患蛋白による転写機能障害の全体像の解明、RNA ポリメラーゼ II 機能障害による細胞死モデルの構築を主要な目標とし、さらに得られた知見から神経変性疾患の治療の可能性を探ることとした。

4 研究成果:

本研究では 1) RNA ポリメラーゼ II 機能障害による細胞死モデル、2) ポリグルタミン変異蛋白発現神経細胞、3) PQBP1 モデルマウスの 3つの対象に対して網羅的解析を行った。これにより、各々、転写障害性細胞死の制御分子の発見、異常ポリグルタミン蛋白による転写障害の全体像解明、PQBP1 による神経変性のシグナル経路解明を目指した。以下各々の項目について成果を述べる。

(1) RNA ポリメラーゼ II 機能障害

ポリグルタミン異常蛋白は様々な転写関連分子と結合することがこれまでに報告されている。しかし結果として、総転写量が変化するか否かについてはこれまで検討されたことはなかった。そこで、私たちは培養液からの BrU の取込みで総転写量を測定する実験系を開発し、初代培養神経細胞にアデノウィルスベクターでポリグルタミン異常蛋白を発現させ、総転写量の変化を検討した。その結果、5-10%程度ながら統計学的に有意な減少がポリグルタミン異常蛋白(ハンチンチンお

よびアタキシン1)によって生じることが明らかになった(Hoshino et al., 2004)。

次に、総転写量減少が神経細胞に与える影響を検討した。RNA ポリメラーゼ II に対する RNAi は有効に働かなかったため、RNA ポリメラーゼ II の特異的阻害剤であるアルファアマニチンを用いて、神経細胞の生存を観察した結果、RNA ポリメラーゼ II 阻害は神経細胞に極めて緩慢な細胞死(半減期5日)を起こすことが明らかになった。電子顕微鏡を用いて観察すると一部の神経細胞に細胞質の空胞が生じていた。各種の細胞内小器官マーカー蛋白に対する抗体を用いて、この空胞の由来を検索した。オートファゴゾームのマーカーである LC3 は空胞と一致しなかった。最終的に局在の一致したものは小胞体マーカーである ECFP-ER であり、空胞は何らかの要因で拡張した小胞体と考えられる。一方、ネクローシスに特徴的なミトコンドリアや細胞質の膨張は見られず、また、アポトーシスに特徴的な核の分節化やクロマチンの濃縮も認められなかった。Genomic DNA の解析においても断片化は見られなかった。カスパーゼ活性化とチトクローム C のミトコンドリアからの放出も見られなかった。以上から、RNA ポリメラーゼ II 機能障害によって生じる神経細胞死は、ネクローシス、アポトーシス、オートファジーのいずれとも異なる細胞死であると考え、この細胞死をトリアド TRIAD(第3の細胞死の意味を込めて)と名付けた。

続いて、トリアドで生じる遺伝子発現変化とアポトーシスの遺伝子発現変化をマイクロアレイ(1万4千遺伝子)で解析し、両者を比較することでトリアドに特異的な分子変化を捕らえることを試みた結果、yes-associated protein (YAP)の減少を検出した。YAP は転写因子 p73 の補助因子として働き、細胞死促進遺伝子(Bax,PUMA など)の発現量を上昇させ、アポトーシスを起こすことが知られている。YAP 減少は、RNA ポリメラーゼ II 機能障害においてアポトーシスにならない理由の一つと考えられた。さらに、神経細胞には従来報告のない新規 YAP isoform が発現していることを発見した。YAPdeltaC と名付けたこの分子は、転写活性化ドメインである C 末端を欠損しており、YAP に対して dominant negative に働いて YAP-p73 を介したアポトーシスへの細胞死シグナルを抑制することを確認した。

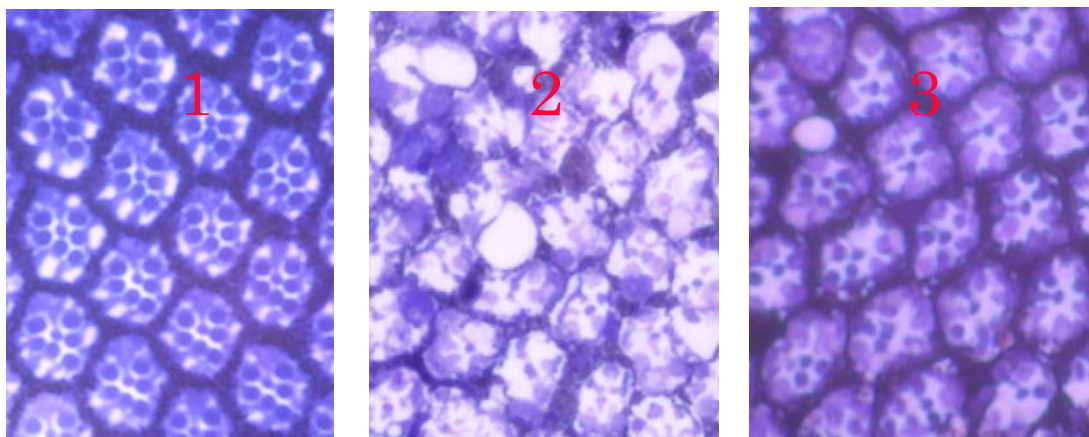


図1 ハンチントン病蛋白の神経毒性に対する YAP 新規分子の治療効果

1: 正常ハエの複眼、2: ハンチントン異常蛋白発現ハエ、3: ハンチントン異常蛋白に加えて新規 YAP (YAPdeltaC) を発現した。ハエ複眼の変性が顕著に改善している。

また、トリアドとポリグルタミン病態との関連を調べるために、YAPdeltaC, p73 のポリグルタミンモデルおよびヒト疾患脳における動態を検討した。異常ポリグルタミン蛋白を神経細胞に発現させると、p73 の活性化(リン酸化)が誘導された。同じく、ヒトのハンチントン病脳の罹患部位である線条体の神経細胞でも p73 の活性化が免疫組織学的に確認された。YAPdeltaC は活性化 p73 と同じ神経細胞に発現していることが確認できた。また、ハンチントン病ショウジョウバエモデルにおいて YAPdeltaC は複眼の神経細胞変性を抑制した(図1)。以上から、トリアドとハンチントン病神経変性は共通性を持つ可能性が示唆された(JCB in press)。

(2) ポリグルタミン変異蛋白発現

a) トランスクリプトーム解析

大脳、小脳、線条体から準備した3種類の初代培養神経細胞にハンチンチンおよびアタキシン1をアデノウィルスベクターを用いて発現させた。この6種類の組み合わせについて、正常ポリグルタミン蛋白、異常ポリグルタミン発現、モックウィルス感染の3処理を行い、RNA 抽出してマイクロアレイを行い比較検討した。これによって、遺伝子特異的な発現変化、神経細胞特異的な変化、2種の疾患遺伝子に共通した変化などを検出することを試みた。

この結果、疾患耐性の神経細胞では病態において保護因子と考えられる hsp70 の発現が上昇していることが明らかになった。hsp70 はシャペロン分子として異常ポリグルタミン蛋白の構造変換に関わり、細胞実験あるいはトランスジェニックマウスの掛け合わせから、多くの報告がポリグルタミン蛋白の毒性を緩和すると報告している。私たちの実験からは、hsp70 は小脳細胞(顆粒細胞)において異常ハンチンチンを発現した場合に正常ハンチンチン発現と比較して27倍もの発現上昇が見られるものの、他の神経細胞あるいはアタキシン1では2倍以下の変化に止まるという結果が得られた。さらに Western blot でも蛋白が約8倍に上昇することが確認できた。

続いて hsp70 の発現上昇を RNAi を用いて抑制すると小脳細胞の異常ハンチンチンへの抵抗性が失われること、大脳神経細胞に hsp70 を過剰発現すると抵抗性を獲得することを認めた。また、発現上昇のメカニズムを解析し、HSF(heat shock factor)は直接関連せず、別の抑制性転写因子が核内封入体に取り込まれることで、転写抑制解除が起きていることが判明した(投稿準備中)。Hsp70 以外にも複数の候補分子が同定されており、現在その解析を急いでいる。

b) プロテオーム解析

トランスクリプトーム解析と同様な組み合わせでウィルスベクターによる異常蛋白発現を行った。従来、核内封入体に取り込まれる蛋白については同様な解析の報告がある。しかし、核の可溶性分画のプロテオーム変化については報告がなかった。核機能障害を考える上では、この情報は必須のものと考えられた。

核可溶性分画を2次元電気泳動で展開すると約400のスポットが恒常的に認められ、これらについて、蛋白量を定量して、異常蛋白発現、正常蛋白発現、モック処理の3群で比較した。変化の起きたスポットを中心に質量解析をおこなって、約100スポットを同定した。次に、変化を疾患遺伝子／神経細胞種類で比較した。この際に、ヒト病態でのぜい弱性／抵抗性と対応した蛋白量変化を示す分子 X に着目した。この分子 X は免疫染色において、ヒト疾患脳の神経細胞の核内マトリックスで染色性が低下していること、モデルマウスでも同様であることを確認した後に、初代培養神経細胞における異常ポリグルタミン毒性に対する効果を検討した。細胞死、細胞突起伸長など複数のパラメーターに対して、ウィルスベクターによる X の補充は保護的に作用した。最後に、ショウジョウバエモデルにおいて X の発現の影響を解析した。ハンチンチン、アタキシン1両者のモデルショウジョウバエと X のトランスジェニックショウジョウバエを交配させると、複眼の神経変性は明らかに改善を示した(論文投稿中)。

以上の結果から、同定した X は新しい病態関連分子であり、今後治療に利用することができる可能性が示唆された。

(3) PQBP1 モデルマウス

PQBP1 はポリグルタミン病異常蛋白に結合する分子として私たちが発見した新規分子である(Waragai et al., Human Molecular Genetics 1999; Okazawa et al., Neuron 2002)。ポリグルタミン蛋白の核内封入体に取り込まれてその機能は stabilize するものと考えられ、実際 PQBP1 過剰発現マウスは遅発性の神経変性を示した(Okuda et al., Human Molecular Genetics 2003)。私たちはさらに、神経変性の分子経路を解析するために、PQBP1トランスジェニックマウスより変性前組織を採取して、コントロールマウスとトランスクリプトームを比較して、トランスジェニックマウスに特異的に変化する遺伝子14個を同定した。

このうち約半数はミトコンドリアによってコードされる遺伝子であり、対応して変性前の脊髄運動ニューロンでミトコンドリア蛋白の上昇が免疫組織学的に確認できた。そこで、電子顕微鏡を用いて観察すると形態異常を示すミトコンドリアが多数認められた。また、PQBP1 を神経細胞で過剰発現してミトコンドリア電位を測定すると過分極していることが明らかになった。以上から、PQBP1 過剰発現はなんらかの経路を介してミトコンドリアストレスを生じると想定された。

一方、発現が上昇する分子のなかに HDGF(HGF ではない)が認められた。これは癌細胞から単離された特異な栄養因子である。HDGF 抗体を新たに作成して免疫染色を行うと、変性前の運動

ニューロンの核での染色が顕著に上昇していた。HDGF は、初代培養運動ニューロンの生存率をあげ、突起伸長を促した。さらに、新生児ラットの顔面神経切断における顔面神経(運動ニューロン)の生存率を上昇させた。以上のことから、HDGF が新しい運動ニューロン栄養因子であることが明らかになった。また、病態上の位置付けとしては、変性前の運動ニューロンでは p53 の上昇が見られ、p53 が HDGF の上流域の配列に結合して HDGF の転写量を増加させていること、また、運動ニューロンで増加した HDGF は随液中に放出されて濃度が上昇していることを認めている。したがって、HDGF 上昇は変性病態に対して抑制的に働く一種の防御反応と考えられる(論文 revise 中)。

5 自己評価:

神経変性疾患の病態解析は、異常蛋白発現をきっかけに、正常では起きにくい(あるいは起きることのない)細胞内の反応を捉えることであり、生理現象の解析とは違った難しさがある。網羅的解析はこの問題を解決する可能性を含むものであり、さきがけ研究の支援を得て、泥沼のような変性疾患病態に正面から取り組む機会を与えて頂いたことは大変な幸せであった。RNA polymerase II を中心とした転写機能が障害された場合に如何なる細胞死が生じるかについて新しいモデルを提唱したこと、トランスクリプトーム、プロテオームの網羅的解析から新しい病態関連分子を発見したこと、は当初の目標に対応した成果と考えている。一方、網羅的解析から得られた候補分子が真に病態に関与するかを証明するには予想以上の労力と時間を必要とした。このため本研究の主要テーマについての論文発表は終了しておらず、完結したとは言いがたい。しかしながら本研究の目的は、変性疾患の理解と治療開発のためには避けて通れないことと考えており、今後も研究を継続して目標の完遂を目指したい。

また、さきがけ研究では異なる領域の研究者と交流することで視点が広がり今後の研究の推進のための貴重な財産となりました。深く感謝致します。

6 研究総括の見解:

転写を担う基本要素である核蛋白質の一つとして知られる RNA ポリメラーゼ II の機能と脳神経機能疾患とを結び付けようとする意欲的な研究である。脳神経におけるアポトーシスとの関連を追及した結果、従来とは異なる細胞死であるとの結論に達し、これをオメガプロセスと命名した。オメガプロセスの病理をショウジョウバエ、培養神経細胞等を使って追求し、ポリグルタミン病、ハンチントン病等の神経変性疾患の病態解明に迫るとともに、治療法を目指す注目すべき成果をあげつつある。こうした研究は本来、中・長期を要する課題であり、今後の展開を期待する。

7 主な論文等:

論文

1. Okuda T, Hattori H, Takeuchi S, Shimizu J, Ueda H, Palvimo JJ, Kanazawa I, Kawano H, Nakagawa M, and Okazawa H (2003) PQBP-1 transgenic mice show a late-onset motor neuron disease phenotype. *Human Molecular Genetics* 12, 711-725.
2. Busch A, Engemann S, Lurz R, Okazawa H, Lehrach H, and Wanker EE. (2003) Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* 278, 41452-41461.
3. Tagawa K, Hoshino M, Okuda T, Ueda H, Hayashi H, Engemann S, Okado H, Ichikawa M, Wanker EE and Okazawa H (2004) Distinct aggregation and cell death patterns among different types of primary neurons induced by mutant huntingtin protein *J. Neurochem.* 89, 974-987.
4. Marubuchi S, Wada Y, Okuda T, Hara Y, Qi ML, Hoshino M, Nakagawa M, Kanazawa I and Okazawa H (2005) Polyglutamine tract-binding protein-1 dysfunction induces cell death of neurons through mitochondrial stress. *J. Neurochem.* 95, 858-70.
5. Hoshino M, Qi M-I, Yoshimura N, Miyashita T, Tagawa K, Wada Y-i, Enokido Y, Marubuchi S, Harjes P, Arai N, Oyanagi K, Blandino G, Sudoi M, Rich T, Kanazawa I, Wanker EE, Saitoe M, and Okazawa H (2006) Transcriptional repression induces a slowly progressive atypical neuronal death associated with changes of YAP isoforms and p73. *J. Cell Biol.* in press.

その他 国際誌 6件

招待講演

1. Okazawa H. Atypical neuronal death by transcriptional repression. Lecture Series of Center for Neurogenetics and Neurotherapeutics, University of Washington, Seattle, USA, December 6, 2004.
2. Okazawa H. Toward understanding of nuclear responses to polyglutamine disease proteins. Max-Delbruck Center Seminar, MDC, Berlin, Germany, February 19, 2004
3. 岡澤均: 転写障害による新しい非典型的な神経細胞死 Novel atypical neuronal death induced by transcriptional repression. 第28回日本神経科学大会 シンポジウム 2005.7.28
4. 岡澤均: Expression and function of Oct-3/4 in neural stem cells. 第48回日本神経化学学会大会 シンポジウム 2005.9.29

その他 国内発表 12件

国外発表 2件

特許

1. 発明人: 岡澤 均

発明の名称: 神経疾患の予防または治療薬

機構整理番号: K052P21

特願2004-204615(PCT/JP2005/01108)

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 7 月 21 日