

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 神経難病における蛋白質リフォールディング・分解能検出系の構築

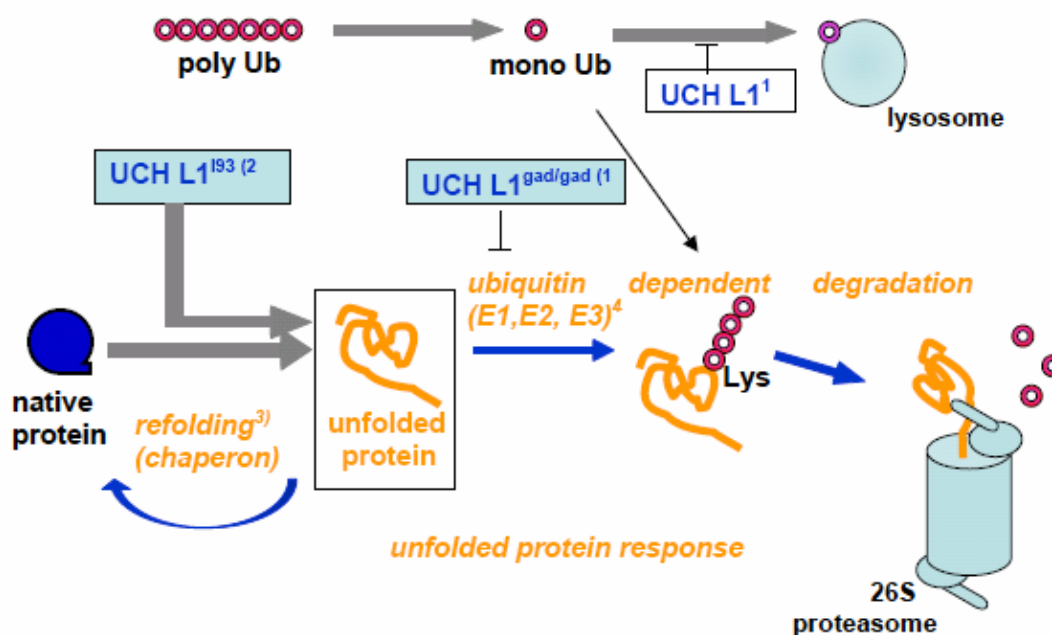
2 研究者氏名: 小坂 仁

3 研究のねらい:

生体内には正常な立体構造を保てない蛋白質(unfolded protein)が常に存在し、リフォールディングにより巻き戻されるが、それが奏効しない場合は、ATPを用いユビキチン化による選択的な蛋白質分解により凝集を防いでいる。しかし、それらの防御機構を用いてもunfolded proteinが排除できず、unfolded protein responseの果たす負荷の強い場合にはアポトーシスを誘導して個体の生命維持をはかる。本研究では、神経難病の根本治療薬開発のために、原因蛋白質のリフォールディング・分解能検出系を構築し、神経難病治療薬の探索を行う。

4 研究成果:

Fig. 1 ユビキチン化と生体防御系からみた今回の成果のまとめ

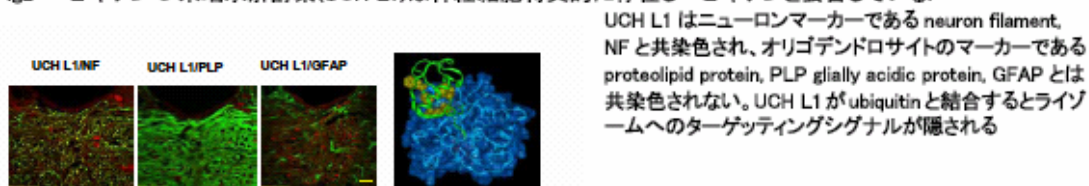


### 研究成果1: ユビキチン分解系異常マウスの確立とユビキチンシステムと神経変性の関係解明

(1) ユビキチン C 末端水解酵素の機能解析(Fig. 1<sup>1</sup>, ref. 2,3)

自然発症神経変性マウス、gracile axonal dystrophy; gad mouse のポジショナルクローニングの結果に基づき、欠損酵素であるユビキチン C 末端水解酵素; Ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH L1 の機能解析を進めた。その結果 UCH L1 は神経細胞特異的に存在し、ユビキチンと生体内で会合しユビキチンに内在するライソゾームへのターゲティングシグナルを被い、ライソゾームでのユビキチンの分解を抑制することにより神経系のユビキチン量を保ち、ユビキチン依存性蛋白質分解を保持していることを明らかにした(ref. 1)。UCH L1 が神経細胞特異的に、しかも、非常に豊富に(可溶性蛋白質の数パーセント)存在することが全長1mにも及ぶ細胞末端にユビキチンを供給し、ユビキチン分解を保つ必要のある神経細胞にとっては必要であることを示している(Fig. 2)。

Fig2 ユビキチン C 末端水解酵素(UCH L1)は神経細胞特異的に存在しユビキチンと会合している。



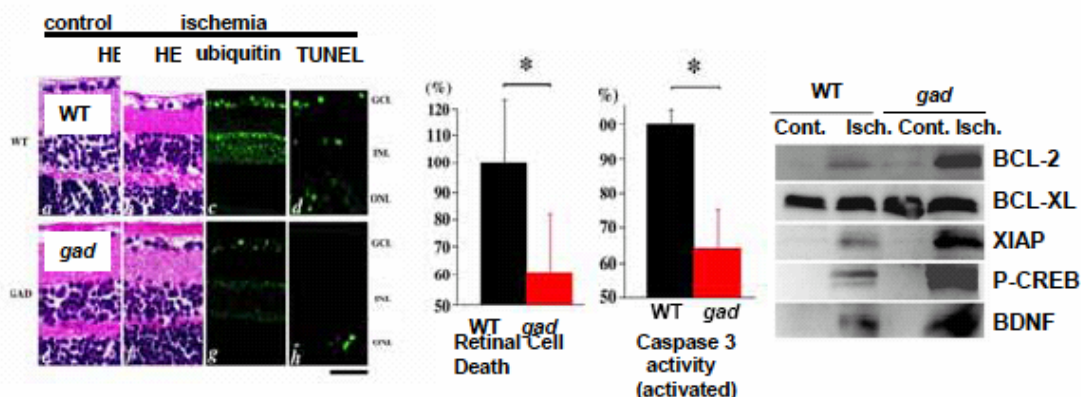
UCH L1 はニューロンマーカーである neuron filament, NF と共染色され、オリゴデンドロサイトのマーカーである proteolipid protein, PLP glially acidic protein, GFAP とは共染色されない。UCH L1 が ubiquitin と結合するとライゾームへのターゲティングシグナルが隠される

(2) ユビキチン分解系異常マウスを用いた神経系におけるユビキチンシステムと神経変性の解明

虚血により中枢神経細胞である網膜細胞はアポトーシスが誘導される。Ubiquitin 含量のすくない *gad* mouse では、有意に網膜細胞のアポトーシス誘導は少ないことがわかった。驚くべきことに *gad* mouse では BCL-2, XIAP, p-CREB, BDNF といった ant-apoptotic に働く蛋白質のユビキチン化と引き続く分解が押さえられる事実が判明した。一方、apoptotic に作用する BCL-XL はユビキチン分解で制御されないためにその量に変化はなかった(ref. 7, Fig. 3)。その他に、このマウスを用いユビキチンシステムと神経変性について明らかにした(ref. 5, 6, 9, 10)。

Fig3 虚血による網膜細胞のアポトーシス誘導とアポトーシス関連蛋白の変化

虚血による網膜細胞の脱落は正常マウスに強く起きる(左)、*gad* mouse では細胞脱落の程度も活性化型カスプーシス3の誘導も有意に低下している。Cont; control, Isch., ischemia



研究成果2; パーキンソン病のモデルマウスの樹立 (Fig. 1<sup>2</sup>)

神経変性疾患のなかでも罹患率が高いパーキンソン病は、古くからその成因と蛋白質分解系の破綻との関係が示唆されていた。1999年に優性遺伝形式をとるパーキンソン病の家系で UCH L1 の I93M の変異が報告された。この変異蛋白質がベータシート構造をとり易く、不溶化し易いことを突き止め(ref. 2)、トランスジェニックマウスを作成した。そのうちの一つのラインで、パーキンソン病の病態を反映したドパミン産生細胞が脱落し、この神経細胞が投射している線条体でのドパミンの含有量が有意に低下していた。またホモのトランスジェニックマウスでは、歩行の不安定さが認められた。以上の結果、人のパーキンソン病を再現する初めてのモデルマウスとして、特許を申請した。

研究成果3; 蛋白質の巻き戻し能を測定する系の開発と治療薬開発 (Fig. 1<sup>3</sup>)

(1) 蛍光蛋白質のリフォールディング能力測定系

生体内に備わる防御機構を可視化するため細胞導入ペプチド(塩基性に富む11個のアミノ酸)の融合蛋白質として蛍光蛋白質を精製し、denatureさせ蛍光を消失させた。次に培地に加え、細胞内に取り込まれ細胞内のシャペロン蛋白質により巻き戻され、蛍光が検出される立ち上がりを計測した。しかしながら、塩基性蛋白質を負荷した蛍光蛋白質は大量精製が非常に困難であり、

動態解析には適していないことが判明し、また、蛍光蛋白質のリフォールディングを高める薬物が疾患遺伝子産物の巻き戻しを促進する可能性は少ないのではという考察に基づき、下記の戦略に切り替えた。

(2) 疾患特異的な、蛋白質構造検出による治療薬開発

Pelizaeus-Merzbacher病(PMD)は男児に発症し、進行性の運動障害と精神運動発達退行を呈する先天性の大脳変性疾患である。この疾患は中枢神経のプロテオリポドプロテイン(*proteolipid protein; PLP*)の異常により起こる。我々は70例を超える患者の遺伝子解析により、この蛋白質のアミノ酸変異を20-30%の患者で見いだした。さらに興味深いことには、遺伝子重複がほぼ半数の原因となること、一方、この蛋白質を欠く欠失型の患者(~1%)では症状は軽いことを見だし、遺伝子変異・重複による何らかの機能の獲得が病態に関わると推測した (ref. 1)。

正常型PLPをCOS細胞に発現させたところ細胞膜を含む細胞質に均一に分布するのに対し、患者さんで見いだしたアミノ酸変異型PLP(W162L、W162R、A242V)を発現させた場合異常PLPは小胞体に集積したり、細胞質内に凝集体を形成することが判明した。局在化の変化は蛍光蛋白質との融合蛋白質; GFAP-PLP<sup>WT</sup>, GFAP-PLP<sup>W162L</sup>, GFAP-PLP<sup>W162R</sup>, GFAP-PLP<sup>A242V</sup>を発現させたところ同様の経過を示した。

また、これら蛋白質の半減期重症度に応じて短くなっていくことを見いだした。また、異常PLPを発現している細胞では小胞体ストレス時に誘導されるBiP, CHOPの発現が上昇していることから、アミノ酸変異に基づくPMDの病態は変異型PLPがその高次構造不全により小胞体でのストレスを招き、細胞死を招来しているのではないかと推測するに至った。そこでGFAP-PLP<sup>WT</sup>, GFAP-PLP<sup>W162R</sup>, GFAP-PLP<sup>A242V</sup>の安定発現株を作成し(Fig. 4)、変異型PLPの異常局在を正常型に変えるような薬物のスクリーニングを行ったところ、1つの薬剤 (化合物 X) の添加により異常局在が正常化し、半減期の延長効果を確認することができた(Fig. 5)。今後は、安定発現株を用いさらにスクリーニングを進めるとともに化合物X(あるいはその誘導体)の臨床応用を目指す。

Fig 4 変異型PLPの安定発現株

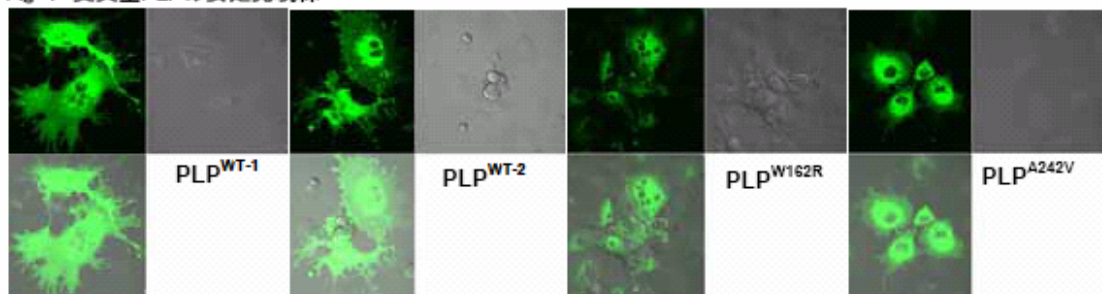
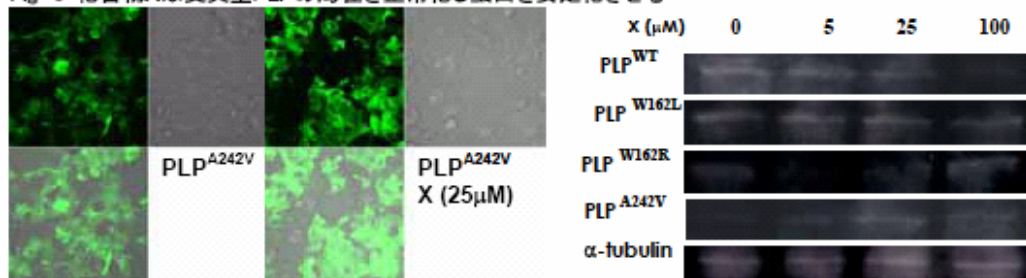


Fig 5 化合物Xは変異型PLPの局在を正常化し蛋白を安定化させる



研究成果4; 神経芽細胞腫ユビキチン分解抑制による新しい治療 (Fig. 1<sup>4</sup>)

神経芽細胞腫におけるレチノイン酸による細胞死の経路が主としてレチノイン酸アルファ受容体を介することを示した。また、この受容体がユビキチン化分解を受けることを示し、この分解系に異

常がある患者細胞株では、受容体の高発現が続くためレチノイン酸感受性が高いことを見いだした。逆に感受性が低い細胞株でもプロテオゾーム阻害剤を加えることで感受性が高まることを示した。プロテオゾーム阻害剤を従来のビタミンE治療に加えることで生存率を高め得ると考え、動物実験に着手した。また、平行してレチノイン酸アルファ受容体の分解に関わる E3, ubiquitin ligase を同定し、特異的な阻害薬の開発も目指したい。

#### 5 自己評価:

神経変性治療薬スクリーニングのプロープとして、細胞導入ペプチド融合蛋白質として蛍光蛋白質を用いた試みは途中で断念せざるを得なく、結果として、最初の提案と内容が異なってしまった。

しかしながら、大脳先天遺伝性疾患で細胞内局在を指標にして、高次構造を局在化情報に還元し、治療薬を探索する系を作成し、有望なシャペロン様物質のスクリーニングに成功した。これまでにシャペロン治療による大脳変性疾患の治療の報告はなく、この分野に先鞭をつけるものと考ええる。また神経変性疾患とユビキチンシステムとの関係を更に明らかにするとともにパーキンソン病の新しいモデルマウスの確立に成功し、今後多方面で利用されると考える。加えて神経変性のみならず、神経系腫瘍でもユビキチンシステムをターゲットとした新しい治療戦略を見いだした。以上より、実際に治療に適応可能な薬物(化合物)とモデル動物を得ることができ、難治性神経疾患の治療法を開発するという当初のもう一つの目的は達成できたと考ええる。

#### 6 研究総括の見解:

治療薬のスクリーニングのため神経変性の原因蛋白質のリフォールディングや分解を検出する系の構築を目指し、細胞導入ペプチド融合蛋白質の利用を試みる過程で、Pelizaeus - Merzbacher病の原因である変異PLP蛋白質と蛍光蛋白質GFAPとの融合蛋白質が、小胞体や細胞質に凝集体として局在することを見出している。この融合蛋白質を発現する細胞株を樹立し、凝集体の局在を解除する薬剤が、疾病の重症度に関連する短い半減期を延長することを明らかにし、薬剤探索の系として有用であることを見出している。シャペロン用物質の探索法として有用であり大脳変性疾患のシャペロン治療に道をつけるものとして評価できる成果と考える。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Inoue, K., Osaka, H., Thurston, V.C., Clarke, J.T., Yoneyama, A., Rosenbarker, L., Bird, T.D., Hodes, M.E., Shaffer, L.G. and Lupski, J.R.; Genomic rearrangements resulting in PLP1 deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females. *Am J Hum Genet.* 71, 838-53. (2002)
2. Nishikawa K, Hang Li, Kawamura R, Osaka H, Yu-Lai Wang, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K.; Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Com.* 304:176-183. (2003)
3. Osaka, H., Wang, YL., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, YJ., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S., Wada, K.; Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet,* 12: 1945-1958. (2003)
4. Bonin M, Poths S, Osaka H, Wang Y.-L., Wada K, Riess O.; Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Mol Brain Res* 126: 88-97. (2004)
5. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein J, Lynn BC, Wang Y-L, Osaka H, Wada K, Butterfield

- AD.; Proteomic analysis of brain proteins in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse, a syndrome that emanates from dysfunctional ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1, reveals oxidation of key proteins. *J Neurochem* 88: 1540-1546. (2004)
6. Wang YL, Takeda A, Osaka H, Hara Y, Furuta A, Setsuie R, Sun YJ, Kwon J, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Yoshikawa Y, Wada K; Accumulation of beta- and gamma-synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient gad mouse. *Brain Res*. 1019:1-9. (2004)
  7. Harada T, Harada C, Wang YL, Osaka H, Amanai K, Tanaka K, Takizawa S, Setsuie R, Sakurai M, Sato Y, Noda M, Wada K.; Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. *Am J Pathol* 164: 59-64. (2004)
  8. Nagai J, Yazawa T, Okudela K, Ito T, Kigasawa H, Kitamura H, Osaka H.; Retinoic acid induces cell death on neuroblastoma cell lines by inhibition of proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor. *Cancer Res* 64: 7910-7917 (2004)
  9. Manago Y, Kanahori Y, Shimada A, Sato A, Amano T, Sato-Sano Y, Setsuie R, Sakurai M, Aoki S, Wang Y-L, Osaka H, Wada K and Noda M; Potentiation of ATP-induced currents due to the activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 *J Neurochem*. (in press)
  10. Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, Osaka H, Conforti L, Arnhold S, Addicks K, Wada K, Ribchester RR, Coleman MP; The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain* (in press)

#### 特許

1. 特願 2003-303370 ユビキチンC末端水解酵素変異体導入動物。

#### 招待講演

1. Hitoshi Osaka, Yu-Lai Wang, Koji Takada, Shuichi Takizawa, Hang Li, Tae Sato, Kaori Nishikawa, Ying-Jie Sun, Mikako Sakurai, Takayuki Harada, Yoko Hara, Ichiro Kimura, Mai Noda, Kazuhiko Namikawa, Hiroshi Kiyama, Shunsuke Aoki and Keiji Wada: Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 mediates ubiquitin stability and function in neurons COE International Symposium on Recent Advances in Research for Neurodegeneration (2002.3.5)
2. 小坂仁、王玉来、佐藤野衣、節家理恵子、李航、西川香里、青木俊介、高田耕司、野田百美、和田圭司:脱ユビキチン化酵素によるユビキチン代謝制御と神経変性 S16. 神経疾患とタンパク質分解・分子シャペロン 第25回日本神経科学大会シンポジウム(2002.7.8)