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

小坂　仁

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、生体は 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。それらの防御機構を用いても unfolded protein が排除しきれず、unfolded protein response のもたらす負荷が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。

研究成果

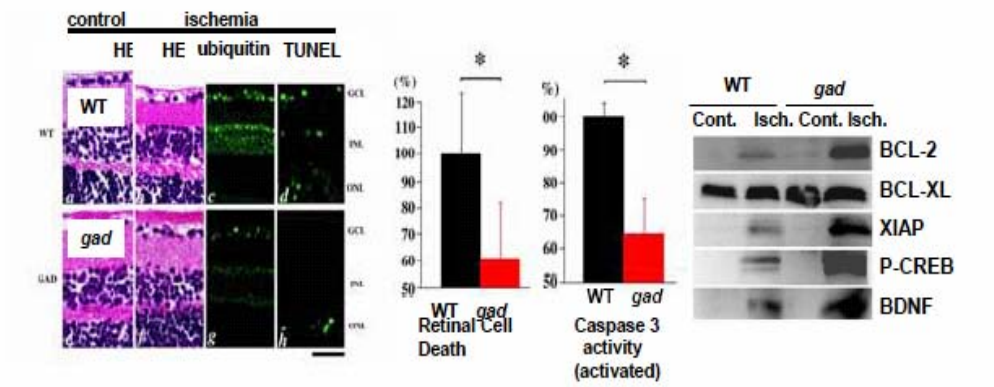
<u>研究成果１　ユビキチンシステムと神経変性の関係解明</u>

（1）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 含量のすくないユビキチン分解系異常マウス；*gad* mouse では、有意に網膜細胞のアポトーシス誘導が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、apototic 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[4)](Fig.1)。その他、このマウスを用いユビキチンシステムと神経変性につき明らかにした[1−3、4、6、7)]。

Fig. 1 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ペース3の誘導も優意に低下している。Cont.; control, Isch., ischemia



研究成果2 蛋白質の巻き戻し能を測定する系の開発と治療薬開発

（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ピドプロテイン(*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%の患者さんで見いだした。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いだし、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。

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^{WT}、 GFAP-PLP^{W162L}、 GFAP-PLP^{W162R}、 GFAP-PLP^{A242V} 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は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^{WT}、GFAP-PLP^{W162R}、 GFAP-PLPA^{242V} の安定発現株を作成し(Fig. 2)、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. 3）。

Fig 2 変異型PLPの安定発現株

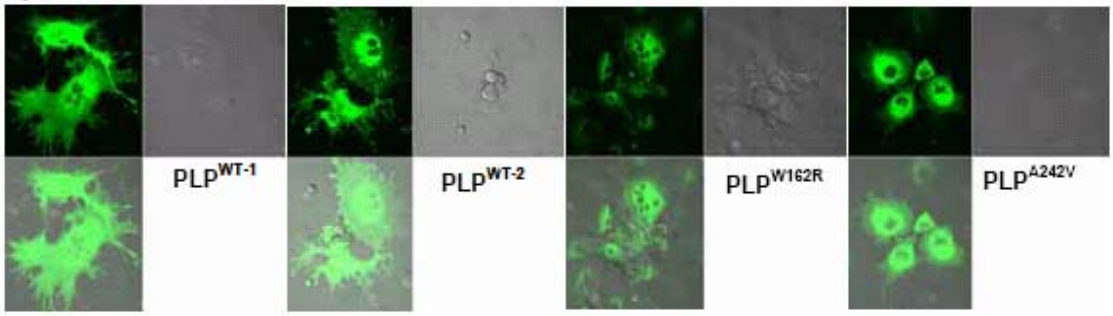
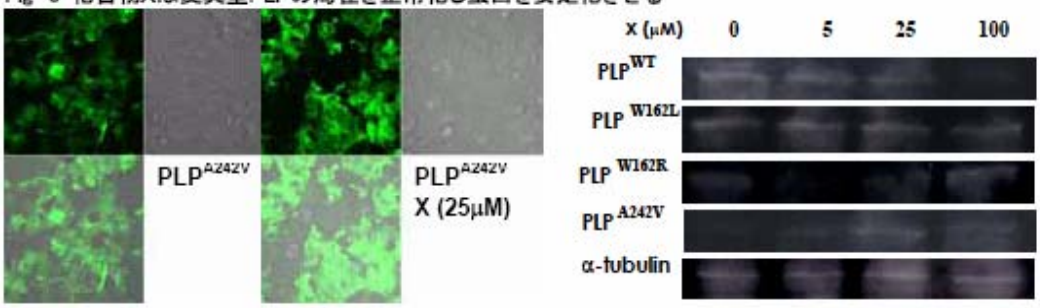


Fig 3 化合物Xは変異型PLPの局在を正常化し蛋白を安定化させる



研究成果3 神経芽細胞腫のユビキチン分解抑制による新しい治療

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[5)]。

今後の展開

(1) 疾患特異的な、蛋白質構造検出による治療薬開発

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。

(2) 神経芽細胞腫のユビキチン分解抑制による新しい治療

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。

研究成果リスト

(1) 原著論文

1. 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)
2. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein J, Lynn BC, Wang Y-L, Osaka H, Wada K, Butterfiel AD. : Proteomic analysis of brain proteins in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse, a syndrome that emanates from dysfunctional ubiquitincarboxyl-terminal hydrolase L-1, reveals ixidation of key proteins. *J Neurochem* 88: 1540-1546. (2004)
3. 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)
4. 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)
5. 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 α. *Cancer Res* 64**:** 7910-7917. (2004)
6. 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; 2005)
7. 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; 2005)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

小坂仁、和田圭司、青木俊介、望月秀樹、王 玉来:「ユビキチン C 末端水解酵素変異体遺伝子導入動物」(特願 2003-303370、出願日:2003/8/27)