

論文の内容の要旨

論文題目: Molecular biological analyses of Huntington's disease gene
ハンチントン病原因遺伝子 Huntingtin に関する分子生物学的解析

指導教官 徳永勝士 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 小見和也

ポリグルタミン病は、病因遺伝子の翻訳領域内にあるポリグルタミンをコードする CAG リピートの異常伸長を共通の原因とする疾患群である。現在までに 9 つの遺伝性神経変性疾患、すなわち、ハンチントン病 (Huntington's disease: HD)、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)、歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、Machado-Joseph 病(MJD)、Spinocerebellar ataxia1 型(SCA1)、2 型(SCA2)、6 型(SCA6)、7 型(SCA7)、17 型(SCA17)がポリグルタミン病として同定されている。これらの疾患には CAG リピート長と発症年齢の関係など多くの共通性が認められる一方、それぞれの疾患に特徴的な選択的神経変性が知られており、個々の疾患発症機構については不明な点が多い。

本研究では、HD の病因遺伝子(Huntingtin 遺伝子)から産出される Huntingtin タンパク質について、

(I) RNA 干渉法 (RNAi) による正常型タンパク質の機能解析

(II) 変異型タンパク質の凝集体形成機構の解析

を行った。

I. siRNA-mediated inhibition of endogenous Huntingtin gene expression induces an aberrant configuration of the ER network

HD は、常染色体優性遺伝形式を示す遺伝性神経変性疾患で、主に中年期から初老期に発症し、舞踏様不随意運動、精神症状や痴呆をともなって進行する疾患である。HD の病因遺伝子 (Huntingtin 遺伝子) は 1993 年に同定され、その遺伝子が産出する Huntingtin タンパク質の異常伸長したポリグルタミン鎖が神経細胞に障害を与えることで疾患の原因になると考えられている。そのため、これまでの研究の多くがポリグルタミン鎖異常伸長をもつ「変異型 Huntingtin タンパク質」の解析を目的としており、「正常型 Huntingtin タンパク質」の生理機能に関しては未だ不明な点が多い。「正常型 Huntingtin タンパク質」の機能を明らかにするためには、遺伝子機能の喪失による機能解析が有効な手段のひとつであると考えられるものの、Huntingtin 遺伝子のノックアウトマウスは胎性致死であるためマウス生体における機能解析は困難である。細胞レベルではアンチセンスオリゴ法によるノックダウンが試みられたが、その抑制効果は部分的であり機能解析には結局不十分であった。

そこで本研究では、効果的な遺伝子ノックダウン法である RNAi 法を用いて「正常型 Huntingtin タンパク質」の機能解析を行った。Huntingtin 遺伝子を標的とする short interfering RNA を合成し、マウス神経芽細胞腫 N2a 細胞に導入したところ、Huntingtin 遺伝子特異的に mRNA 及びタンパク質の発現を 85%以上抑制することに成功した。「正常型 Huntingtin タンパク質」の機能喪失が細胞に与える影響を検討するため、RNAi を誘導した細胞のオルガネラについて、その形態・局在を蛍光抗体法や各オルガネラ特異的な染色剤を用いて解析した。その結果、RNAi を誘導した細胞では小胞体の断片化が観察された。また、小胞体の断片化に伴う小胞体ストレス関連タンパク質の発現上昇や、分泌経路の異常は認められなかった。T98G 細胞 (ヒト神経膠芽腫細胞腫細胞) でも同様の異常が観察されることから、「正常型 Huntingtin タンパク質」の機能のひとつとして小胞体の形態形成に重要な働きをすることが示唆された。さらに、ミトコンドリアやゴルジ体、リソソームなど他のオルガネラの形態・分布に全く異常は認められないことから、「正常型 Huntingtin タンパク質」は小胞体特異的にその形態

形成・維持に関与しているものと考えられた。

II. Molecular recognition of aggregation-prone Huntingtin protein by 14-3-3 proteins induces an efficient polyglutamine aggregation

HD を含むポリグルタミン病に共通する現象として、変異タンパク質による凝集体形成が知られている。HD における凝集体形成の病理的意義については意見の分かれるところであるが、転写因子などの結合による遺伝子発現への影響や、ユビキチン・プロテアソーム系への障害などが多数報告されており、凝集体形成過程の疾患発症機構への関与が示唆される。「変異型 Huntingtin タンパク質」のポリグルタミン鎖は *in vitro* ではそれ自体で凝集体を形成するが、細胞内における凝集体形成過程は細胞性因子により調節されることが示されている。これまで凝集体形成を抑制する細胞性因子として、タンパク質の折りたたみ・分解に関わる因子が複数同定されているが、凝集体形成を促進する因子についてはほとんど解析が行われていない。

本研究では、「変異型 Huntingtin タンパク質」の凝集体形成過程について解析するため、GFP を融合した変異型 Huntingtin 遺伝子のエクソン 1 発現ベクター (Htt86Q-EGFP) を構築し、培養細胞を用いた一過性発現の系において検討した。Htt86Q-EGFP を発現した N2a 細胞は高率に凝集体を形成したが、Htt86Q-EGFP から N 末の 17 アミノ酸(N1-17)を欠失させた場合には凝集体形成率が有意に低下することが明らかとなった。他のアミノ酸領域を欠失させた場合には顕著な影響は認められないことから、Htt86Q-EGFP の凝集体形成には、異常伸長したポリグルタミン鎖に加えて N1-17 も重要であると考えられた。次に、ポリグルタミン鎖の N 末に存在するアミノ酸配列が凝集体形成に与える影響について検討するため、N1-17 欠失 Htt86Q-EGFP の N 末に様々な特徴をもったアミノ酸配列を挿入した N 末 chimeric Htt86Q-EGFP を構築し、それらの凝集体形成を観察した。核移行配列、核排出配列、ER 移行シグナル、ミトコンドリア移行シグナル、任意のタンパク質 (GAPDH 及び Hsc70) の 1-17 アミノ酸などを N 末に挿入した chimeric Htt86Q-EGFP では、Htt86Q-EGFP に比べて凝集体形成は低率であった。一方、PrP の 122-139 アミノ酸を N 末に挿入したところ、Htt86Q-EGFP

と同程度の凝集体形成が観察された。PrP の 122-139 アミノ酸は、14-3-3 タンパク質の結合部位として同定された領域であり、14-3-3 タンパク質の結合により PrP の凝集体形成が促進されることが報告されている。14-3-3 タンパク質は脳組織で発現量の多いタンパク質ファミリーであり、神経変性疾患に関わる様々な異常タンパク質と結合し、凝集体（封入体）の形成に関与する可能性が近年提唱されている。そこで、14-3-3 タンパク質と Htt86Q-EGFP との結合について免疫沈降法による解析を行ったところ、14-3-3 タンパク質は Htt86Q-EGFP と N1-17 依存的に結合し、ポリグルタミン鎖の異常伸長はその結合を促進することを見出した。また、Htt86Q-EGFP と結合するのは 14-3-3 タンパク質の 4 つのアイソフォーム(β 、 γ 、 η 、 ζ)であることを確認した。Htt86Q-EGFP の凝集体形成に対する 14-3-3 の寄与を調べるため、14-3-3 アイソフォーム特異的な RNAi を誘導した細胞における凝集体形成について検討した。その結果、14-3-3 ζ のノックダウンにより Htt86Q-EGFP の凝集体形成が有意に低下することが明らかとなった。以上の結果より、14-3-3 ζ は Htt86Q-EGFP の N1-17 に結合し、その凝集体形成を促進する因子である可能性が示された。

以上、本研究では、「正常型 Huntingtin タンパク質」の機能喪失が小胞体の形態異常を誘導することを明らかにした。他のオルガネラの形態・分布には顕著な影響が認められないことから、「正常型 Huntingtin タンパク質」は小胞体特異的にその形態形成に関わることが示唆される。

また、「変異型 Huntingtin タンパク質」の凝集体形成には N 末 17 アミノ酸が重要であることを見出し、凝集体形成を調節する因子として 14-3-3 ζ を同定した。14-3-3 タンパク質は「変異型 Huntingtin タンパク質」の N 末 17 アミノ酸に結合することが示された。さらに、14-3-3 ζ のノックダウンにより「変異型 Huntingtin タンパク質」の凝集体形成が有意に減少することから、14-3-3 ζ の結合により変異型タンパク質の凝集体形成が促進されると考えられる。