

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 小見 和也

本研究は、ハンチントン病の病因遺伝子である Huntingtin 遺伝子について、正常型 Huntingtin タンパク質の RNA 干渉法 (RNAi) による生理機能の解析及び変異型 Huntingtin タンパク質の凝集体形成機構の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

### RNAi による正常型 Huntingtin タンパク質の機能解析

1. マウス Huntingtin 遺伝子を標的とする short interfering RNA をマウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞(N2a)に導入したところ、Huntingtin 特異的に mRNA 及びタンパク質の発現を 85%以上抑制した。内在性正常型 Huntingtin タンパク質の 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染色剤を用いて観察した結果、小胞体の網状構造は失われ、その形態に異常が生じることが示された。
2. 小胞体の形態異常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。また、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、哺乳動物細胞において小胞体特異的にその形態形成・維持に関与するものと考えられる。

### 変異型 Huntingtin タンパク質の凝集体形成機構の解析

3. GFP を融合した変異型 Huntingtin 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を用いて、変異型 Huntingtin タンパク質の凝集体形成について解析した。その結果、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減少することが示された。
4. 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、凝集体形成を回復させる配列について探索を行ったところ、プリオンタンパク質 (PrP)

の 122-139 アミノ酸を挿入した場合に凝集体形成の回復が認められた。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が示された。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( $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\eta$ 、 $\zeta$ )であることが示された。

5. 14-3-3 タンパク質のアイソフォーム特異的な RNAi を誘導した細胞における Htt86Q-EGFP の凝集体形成について検討した結果、14-3-3 $\zeta$ のノックダウンにより凝集体形成が有意に減少することが示された。即ち、14-3-3 $\zeta$ は Htt86Q-EGFP の N1-17 に結合し、その凝集体形成を促進する因子として働くものと考えられる。

以上、本論文は哺乳動物細胞において正常型 Huntingtin タンパク質が小胞体の形態維持に関与することを明らかにした。また、変異型 Huntingtin タンパク質の凝集体形成の促進因子として 14-3-3 $\zeta$ の存在を明らかにした。ハンチントン病の発症には、正常型 Huntingtin タンパク質の機能喪失及び変異型 Huntingtin タンパク質による凝集体形成が関わるということが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究の成果は、ハンチントン病発症の分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。