

ハンチントン病の分子病態解明

岡澤 均*

要旨：ハンチントン病ではハンチンチン遺伝子の CAG リピート伸長により、変異 RNA と変異タンパクが産生され、神経細胞の機能障害と最終的な細胞死を誘発する。私たちは 20 年近く、網羅的アプローチ (オミックス) をもちいてハンチントン病ならびに関連するポリグルタミン病の分子病態を解析してきた。その結果、PQBP1, Ku70, HMGB, Maxer, Omi などの新たな病態関連分子を同定し、転写、スプライシング、DNA 損傷修復という核機能に深くかかわる新たな分子病態が存在することを、機能変化の面から明らかにしてきた。今後、これらのターゲット分子を介した分子標的治療の開発が期待できる。

(臨床神経 2012;52:63-72)

Key words : ハンチントン病, ハンチンチン, DNA 損傷修復, オミックス, ポリグルタミン

はじめに

ハンチントン病はジョージ・ハンチントンが 1872 年に記載した不随意運動と認知症を主症状とする神経疾患である¹⁾。ハンチントンによる初家系の記載の段階で、遺伝形式については常染色体優性であることがほぼ示されている¹⁾。疾患の記載から原因遺伝子の決定までは長い道のりであったが、Nancy Wexler および James Gusella らによって、ベネズエラにおける大家系の遺伝学的解析から遺伝子部位が 4q16.3 であることが明らかになり²⁾、最終的にハンチントン病共同研究グループによって 1993 年に原因遺伝子ハンチンチンが発見された³⁾。1991 年に Fischbeck らによって球脊髄性筋萎縮症 (Kennedy's disease) の遺伝子が明らかにされていたが⁴⁾、その原因遺伝子であるアンドロジェン受容体と同様に、ハンチンチンは塩基レベルではエキソンに CAG くりかえし配列を持ち、タンパクレベルではポリグルタミン配列を持つものであった。この共通性が CAG リピート病あるいはポリグルタミン病という疾患概念を生むことにつながった。

これと前後して同様なポリグルタミン配列を持つ変性疾患原因遺伝子 (ataxin-1, ataxin-2, ataxin-3, atrophin-1/DRPLA protein, ataxin-6, ataxin-7, ataxin-17) が続けて報告され、ポリグルタミン病態はタンパク毒性説に大きく傾いたが⁵⁾、その後 RNA 毒性についても示唆されており⁶⁾、さらには ATG によらない翻訳も明らかになってきている⁷⁾。またゲノムの CAG 配列による不安定性についても新たに知見が加わっている⁸⁾。つまり新規遺伝子の発見は新たな謎の始まりであり、ポリグルタミン病について膨大な研究がなされてきたが、ハンチンチンをはじめとする原因遺伝子の生理学的機能さらに

は病態理解には依然として不明確な部分が残る、さらに病態を基盤とした治療開発も依然として研究途上にある。私たちのグループも病態解明と治療開発を目指して 20 年近く研究を続けてきた。本論文では、私たちの研究を当該研究領域全体の歴史的経緯の中で述べさせていただきたい。

ポリグルタミン配列結合タンパクのスクリーニング

私たちは、ポリグルタミン配列をポリグルタミン病遺伝子が共通して保有して持つことに注目した。ポリグルタミン病新規原因遺伝子の多くは機能が不明であり、原因遺伝子産物に結合する因子を同定することによって、その機能を解明しようとする研究が当時おこなわれつつあった。たとえば Huda Zoghbi 教授らは、それぞれの原因遺伝子産物にはそれぞれの機能があり、これが発症につながるものと考えていた。Zoghbi 教授のグループはこの発想を今日にいたるまで発展させている。一方、私たちは共通性(いずれの疾患もポリグルタミン配列を持つこと)に、凝集以外にも何らかの病的意味がタンパクレベルで存在するものと考えていた。今日的視点で振り返ると双方が正しいものであり、それは今後の研究の進展によってさらに証明されるものと思われるが、このことについては後で触れたい。

そこで、東大神経内科において金澤一郎教授(現・東大名誉教授・皇室医務主幹)のご指導のもと、私たちは当時一般的になりつつあった yeast two-hybrid (Y2H) 法をもちいてポリグルタミン配列に直接結合しうる分子をマウス胎児脳由来の cDNA ライブラリーからスクリーニングをおこなった。Y2H の釣りえさ (Bait) となるポリグルタミン配列については、あるいは生理的結合も病態に関連するのではないかと考え、転

*Corresponding author: 東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野 [〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45]
東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野
(受付日: 2011 年 10 月 6 日)

Table 1 Yeast-two-hybrid 法によってえられたポリグルタミン結合候補タンパクを示す。TERA (transitional endoplasmic reticulum ATPase) は VCP と同一である。

clone No.	cDNA size	BLAST homology search	motif/character	designation
B83-4	1.0Kb	unknown	Arg. Asp-rich	PQBP-1
B234-4	1.8Kb	unknown	Arg. Asp. Glu-rich	PQBP-2
B255-2	1.0Kb	unknown	Arg-rich	PQBP-3
B264-1	1.0Kb	known	Ser. Asp-rich	TERA/VCP
B375-1	0.6Kb	unknown	Arg-rich	PQBP-4
B436-6	1.3Kb	unknown	Arg. Ser. Lys-rich	PQBP-5

(Imafuku et al. BBRC 1998)

Function in transcription and splicing connection

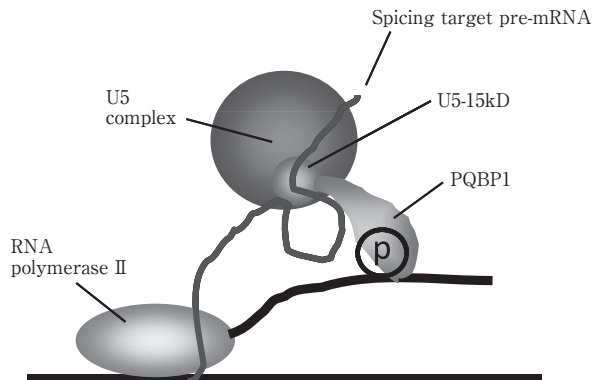


Fig. 1 PQBP1の結合関係と想定される機能を示す。PQBP1はRNAポリメラーゼIIのC末端ドメインとリン酸化依存的に結合し、またスプライシングファクターU5-15kDとも結合する。転写産物はキャッピング、スプライシング、ポリアデニレーションなどのRNA修飾を直ちに受けることが知られているが、PQBP1はスプライシングを中心としたRNA修飾を受け持つ分子と考えられる。つまり、PQBP1の機能低下は遺伝子発現のレベルとプロファイルに影響を与えるものと想定される。

写因子 Brn-2 のポリグルタミン配列をもちいた⁹⁾。

この発想には一つの裏話があり、少し脱線させていただきたい。筆者は東大神経内科・萬年徹教授のご紹介で東大生化学教室に内地留学の形で入れてもらい博士号を取得した。この時の指導教授であった村松正實先生(現・東京大学名誉教授・埼玉医科大学ゲノム医学研究所名誉所長)から浜田博司助教授(現・大阪大学教授)のグループで仕事をするように指示を受け、両先生の御指導のもと新規転写因子のクローニングをおこなうことになった。さまざまな組織の発生には多様な機能分子が関与する。あるものは接着因子でありあるものは栄養因子である。しかし、転写因子研究の立場からすると、おそらく受精の膜シグナルあるいは核融合のシグナルは一番早い段階で転写因子の変化をおこすはずであり、これがすべての始まりと考えられる。転写因子のON/OFFは次の転写因子のON/OFFを誘導し、これが転写因子のカスケード(あるいはピラミッド状の流れ)を形成する。もちろんこの流れの中に転写産物としての接着因子や液性因子が絡むことはい

までもない。これは細胞がある状態を保つときのネットワークとはことなり、時間軸を持ったカスケードである。当時、浜田グループでは、発生制御をおこなうこの転写因子ピラミッドの頂点にある分子を探していた。

すでに、その手がかりは浜田助教授のカナダ時代の研究で存在していた。浜田先生は enhancer trap という新たな手法を導入し、EC細胞(ES細胞と同様に多分化能を持つ幹細胞であるが、がん細胞ゆえに扱いやすい)のP19およびF9細胞に enhancer trap を掛けて、レチノイン酸による分化誘導で活性が消失するエンハンサーを捕まえていた。当時、転写研究領域では同様な試みはされていたものの、分化によって活性がONになるものをほとんどの研究者は探していた。私たちはOFFになるものを探したところに勝機があった。エンハンサーには ATTTGCAT というオクタマー配列がふくまれており、1989年までに Oct-1, Oct-2, Pit-1, Unc86 というオクタマー配列結合転写因子が同定され、頭文字を POU グループという概念ができた¹⁰⁾ことも幸いした。私は、この POU 転写因子群に共通した DNA 結合ドメインのアミノ酸配列からプローブを作成して、P19のcDNAライブラリーから転写因子をスクリーニングすることになった。40個ほどのクローンがえられて、その多くは共通した配列を持っていた。全長をえるために再度クローニングをくりかえし、えたアミノ酸配列はまさしく新規のPOU因子であった。Oct-3と名付けて報告した¹¹⁾。われわれに遅れて数カ月後にイギリスとドイツから同一分子の報告があり¹²⁾¹³⁾、ドイツグループは共に犯したシーケンスまちがいを根拠に Oct-4と名付け、今日までの混乱を招いていることは残念である。Oct-3/4と呼ばれるのはこの理由である。Oct-3/4がiPS細胞あるいはES細胞の本質にかかわっていることは多くの方はご存知だと思う。その後、oct-3/4の染色体遺伝子構造と転写調節についても報告をした¹⁴⁾。Oct-3/4が約20年後に山中伸弥教授の開発したiPS細胞作成上の最重要因子であり、ES細胞分化のゲートキーパーとしても最も重要であることは、周知の事実であり、ここでは詳しくは述べない。

このような訳で、転写因子の配列を2年間眺めていた筆者は、転写因子にしばしばふくまれ、転写活性化ドメインとの報告もあったポリグルタミン配列が、核の転写機能に関連あるものと考えていた。これが、Brn-2のポリグルタミン配列を bait に使った理由である。スクリーニングの結果、新規遺伝子

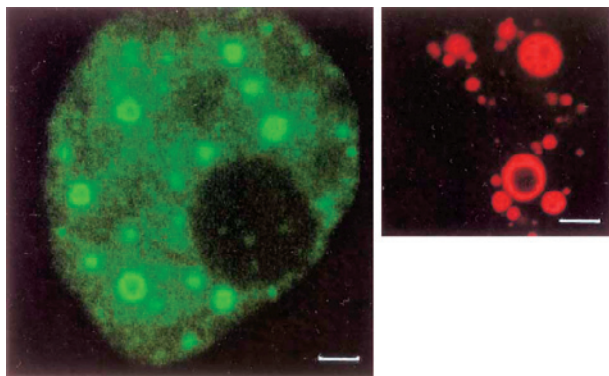


Fig. 2 PQBP1 の核内分布を PQBP1-GFP, PQBP1-RFP を細胞株に発現させてしらべた. 転写因子あるいはスプライシング因子が構成する nuclear body に相当する分布を示すことが明らかになった.

(Okazawa et al. *Neuron* 2002)

PQBP1 とすでに報告のあった TERA/VCP (transitional endoplasmic ATPase/valosin containing protein) をポリグルタミン配列結合分子として同定した¹⁵⁾. 他にいくつかの断片的な配列を候補としてえたが, PQBP1 と TERA/VCP 以外の配列がタンパクをコードしている cDNA 配列である保証は今のところない (Table 1). VCP は今日では前頭葉側頭葉型認知症及び運動ニューロン疾患の原因遺伝子として知られている.

PQBP1 は 265 アミノ酸からなる比較的小さなタンパクであることがわかった. 特異的抗体の作成によって, 確かにタンパクとして発現していることがわかった. アミノ酸配列の中には WW ドメインとして知られるタンパク間結合ドメイン, 核移行シグナル, RE/RD のくりかえし配列, さらに C 末端には種を超えて保存されているドメインが存在することが明らかになった⁹⁾. これらのドメインを介して PQBP1 は転写およびスプライシングなどの RNA 代謝に関与すると考えられる (Fig. 1). PQBP1 は哺乳類を超えてシロイヌナズナ, 線虫にも保存されており, 機能的な重要性を示唆している¹⁶⁾. 実際に GFP 融合タンパクを作成して細胞株に発現すると, 核優位な局在を示し, さらに高解像度の顕微鏡で観察すると, 中抜け構造の nuclear body あるいは speckle と呼ばれる核内局在を示すことが示された¹⁶⁾ (Fig. 2). Nuclear body は転写因子あるいはスプライシングに関与するタンパクが入り出す核内構造として知られている¹⁷⁾. RD/RE のくりかえし配列はロイシンジッパー構造を取ることがノーベル賞学者である故 Max Perutz 教授によって示されており¹⁸⁾, 同じくロイシンジッパー構造を取るポリグルタミン配列と相互に結合することが想定された. Deletion construct を作成し Y2H によってこのことを確認した. 正常/伸長ポリグルタミン配列との結合については, 伸長した配列により強く結合することも併せて確認した.

そこで, 次の段階として, 伸長した異常ポリグルタミン配列を持つ ataxin-1 (核内部に存在するタンパクとしてすでに確

認されていた) と PQBP1 が共に発現していたときに, 核機能としてもっとも重要な一つである転写に, どのような影響を与えるかをしらべることにした. この結果, PQBP1 と ataxin-1 は nuclear body (転写・スプライシングにかかわることはすでに述べた) の中で共局在し, 機能的には転写を抑制することが示された¹⁹⁾. その後, PQBP1 は ataxin-1 のみならず, ハンチントン病の原因遺伝子産物である huntingtin とも同様に共局在することが, 共同研究により Wanker 教授 (マックスデルブルック分子医学研究所) により示された²⁰⁾. 私たちが Y2H スクリーニングで報告した TERA/VCP とポリグルタミン病タンパクとの結合については, 後に, 京都大学の垣塚教授が SCA3 の原因遺伝子である ataxin-3 との結合を示している. TERA/VCP と huntingtin との共局在についてもすでに示されている²¹⁾.

この間に, ポリグルタミン病研究領域においては多くの病態関連因子 (原因タンパクへの結合分子) が示されてきた (Table 2). 詳細は 2003 年の著者の総説をみていただければ幸いである²²⁾. 基本的には, 転写・スプライシング関連分子が一つのグループ, タンパク分解にかかわる分子がもう一つのグループといえよう. これら以外にも細胞質の軸索輸送関連タンパク, 膜輸送タンパクなども, 個々の疾患原因タンパクでは報告されている. この中で, タンパク分解関連分子は, 変異タンパクの処理にかかわっているものと考えられ, ポリグルタミン病原因タンパクがひきおこす細胞機能障害の上でのターゲットとは考えられない. したがって, ポリグルタミン原因遺伝子産物の結合相手として, 核タンパクは主要な一群と考えられ, とくに最近になってこの考え方は一般的になりつつある. 図に示すように, この結合は転写を介した遺伝子発現に影響を与えることが容易に予想される (Fig. 3). それでは実際に, PQBP1 をふくむ転写・スプライシング関連の核機能分子がターゲットになったばあいに, どのような細胞の機能的変化が生じるであろうか? そして機能変化と変性疾患の特徴である細胞死との関連はどのようであろうか? これらの点は, 10 年近く経た今でも十分には明らかではないが, 現在の研究のフォーカスとなっている. この点は, 近年の TDP43 や FUS などの RNA スプライシング因子の運動ニューロン変性における発見も示唆的である.

PQBP1 の機能異常と認知障害

PQBP1 と huntingtin あるいは ataxin-1 が結合したときにどのような障害がおきるだろうか. PQBP1 の分子機能については, 現在までに転写—スプライシングのカップリング¹⁹⁾, およびスプライシングそのもの²³⁾²⁴⁾に関与することが概ね明らかになってきた. そこで, 私たちは PQBP1 の過剰発現および発現低下によって個体レベルでどのような表現型につながるかを検討することで PQBP1 の機能変化が個体の症状におよぼす影響とその分子基盤を明らかにすべく, モデル動物の作成を急いでいた.

この間に, 非常に示唆に富む結果がヨーロッパからもたら

Table 2 ポリグルタミン病タンパクとの結合が報告されている生理的タンパクをまとめた. (Okazawa, *Cell Mol Life Sci* 2003)

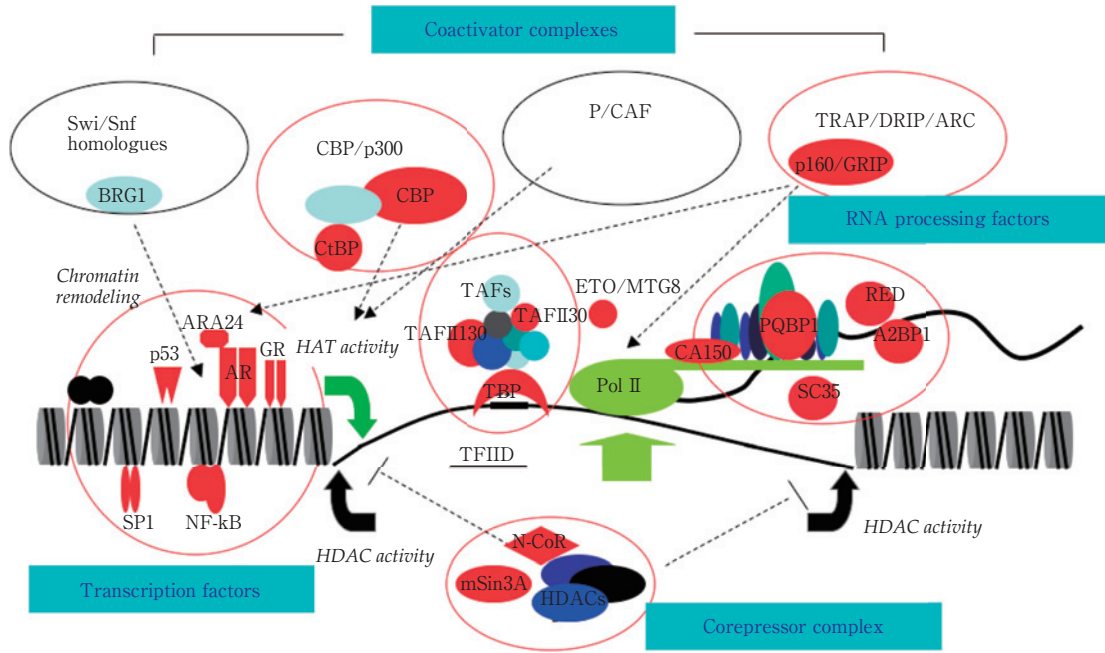
Interacting protein, binding domain	Disease protein
<i>Interaction was confirmed by biochemical and morphological experiments</i>	
LANP:	ataxin-1
PQBP-1, polar amino acid rich domain	ataxin-1, poly-Q
N-CoR, C-terminal domain	huntingtin
ARA24, N-terminal domain	androgen receptor, poly-Q
p53	huntingtin
mSin3A	huntingtin
ETO/MTG8, N-terminal domain, non poly-Q	atrophin-1
P160/GRIPI, C-terminal domain	androgen receptor
A2BP1	ataxin-2, C-terminal domain
CBP, CH3 domain/ a part of acetyl- transferase domain	huntingtin
TAF _{II} 130 (colocalization with ataxin-2, -3 and huntingtin was also reported)	atrophin-1
CBP	atrophin-1
CA150	huntingtin
CRX	ataxin-7
Sp1	huntingtin
C-terminal binding protein [CtBP]	huntingtin
<i>Colocalization confirmed by morphological experiments</i>	
PML	ataxin-1
TATA-binding protein [TBP]	ataxin-3
PML	ataxin-3
RED	ataxin-1
TAF _{II} 30	ataxin-7
SC35	huntingtin
<i>Genetic relationship and colocalization reported</i>	
MLF1	polyglutamine tract

された。PQBP1 は X 染色体伴性精神遅滞の原因遺伝子であることが、European X-linked MR consortium から報告されたのである²⁵⁾。PQBP1 遺伝子異常とリンクするこれらの疾患群では、顔貌の変化、小頭症などの奇形をともなうばあいと (syndromic MR)、知能低下だけにとどまるもの (non-syndromic MR) が存在する²⁶⁾。遺伝子変異は、フレームシフトによる non-sense RNA decay による発現低下、あるいは WW ドメインに主要な働きをするアミノ酸の変異、による機能低下につながるものと考えられる。

私たちは、PQBP1 をポリグルタミンあるいはハンチンチン結合分子として同定してきた。ハンチントン病態には、神経細胞の機能低下という側面と、細胞死という側面があることは、これまでの研究の中でも明らかである。たとえば、モデルマウスにおいて、症状が発症していても、ハンチンチンタンパクの発現を OFF すれば、回復がみられる。これは、細胞死ではな

く細胞機能障害が症状を呈していることを示すものと考えられる。したがって、PQBP1 機能低下が細胞死ではなく神経細胞機能の低下につながるであれば、ハンチントン病における認知障害と PQBP1-MR の知能低下は共通性を持った病態として説明可能かもしれない。

PQBP1 のホモログ遺伝子エキソン 1 にトランスポゾン挿入した変異ショウジョウバエを作成し、その学習と記憶を検討したところ、学習獲得に障害を示すことが明らかになった²⁷⁾。興味深いことに、記憶の各成分 (短期記憶、麻酔耐性記憶、長期記憶) には異常がないことも明らかになった (Fig. 4)。これは、本来的な意味での『認知』の障害ともいえる。通常、ショウジョウバエの記憶形成にはキノコ体と呼ばれる脳の一部が主要な役割を果たしているといわれている。しかし、PQBP1 変異体のばあいには、キノコ体で PQBP1 発現を下げても症状はみられず、投射ニューロンというより入力側の神



(Okazawa, Cell Mol Life Sci 2003)

Fig. 3 DNA構造変換分子群, 転写関連分子群, 及びスプライシング関連分子群とポリグルタミン原因遺伝子産物との結合性の関連を示す. 赤でマーキングした分子はポリグルタミン病タンパクとの結合が報告されている.

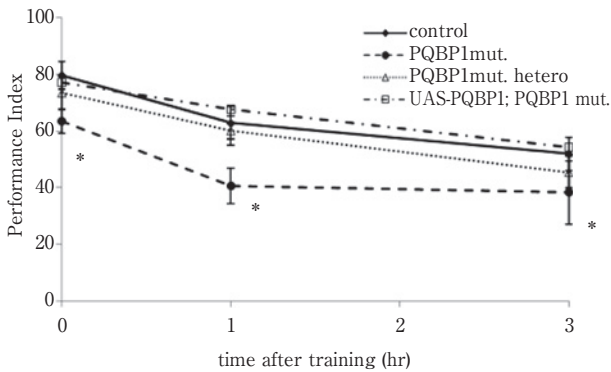


Fig. 4 PQBP1 変異ショウジョウバエの臭い条件付けにおける学習記憶曲線を示す. 学習獲得 (0 時間での performance index に対応する) に問題があり, 記憶自体の減衰はコントロールと変わらない.

(Tamura et al. J Neurosci 2010)

神経細胞が PQBP1 機能低下を表現型に変換していることが明らかになった²⁷. しかも PQBP1 変異により投射ニューロンでは NMDA 受容体 NR1 サブユニットの発現が顕著に低下しており, これが症状の原因であることも明らかになった²⁷. 投射ニューロンの記憶形成の上での役割は数年前から示唆的な報告があるものの, 個体の表現型として示されたものは PQBP1 変異体ははじめてであり興味深い. ハエとは哺乳類の脳構造の対応は難しいところがあるが, 海馬あるいはそれ以前の入力段階での神経細胞の機能障害を示唆するものとも考え

られる.

一方, PQBP1 ノックダウンマウスにおいても NR1 の発現の低下が脳の広範な部位でみられ, 不安関連認知に障害がみとめられた²⁸. さらに HDAC 阻害剤 (ヒストンの脱アセチル化阻害によって転写を全般的に上昇させる) によって, この障害が軽減することも明らかになった²⁸. HDAC 阻害剤についてはショウジョウバエ PQBP1 変異体においても同様な効果をもとめている²⁷. これらの PQBP1 機能低下にとまなうモデル動物の認知障害とハンチントン病における認知障害の関連については, NR1 の剖検例での低下を示す報告も存在しており, 今後さらに検討をする必要があると考えている.

転写障害に基づく神経細胞死

先述したように, ポリグルタミン病の主要なターゲット分子は転写関連分子である. では, 転写がいちじるしく障害を受けたときに神経細胞にはどのようなことがおこるのだろうか? 私たちは, RNA polymerase II (Pol II) の特異的な阻害剤であるアルファ・アマニチン (AMA) を, 神経細胞初代培養に加えることで, この問題について検討した²⁹. AMA と Pol II の相互関係は, これもノーベル賞学者である Kornberg 教授によってすでに解かれている³⁰. Pol II は DNA をまたぐように結合するが, AMA は Pol II へ DNA がはまり込む溝にピタリと結合する. AMA の濃度を転写阻害濃度に振っても神経細胞の細胞死は比較的マイルドであり, アポトーシスが增加することはなかった. そこで電子顕微鏡によって形態学的

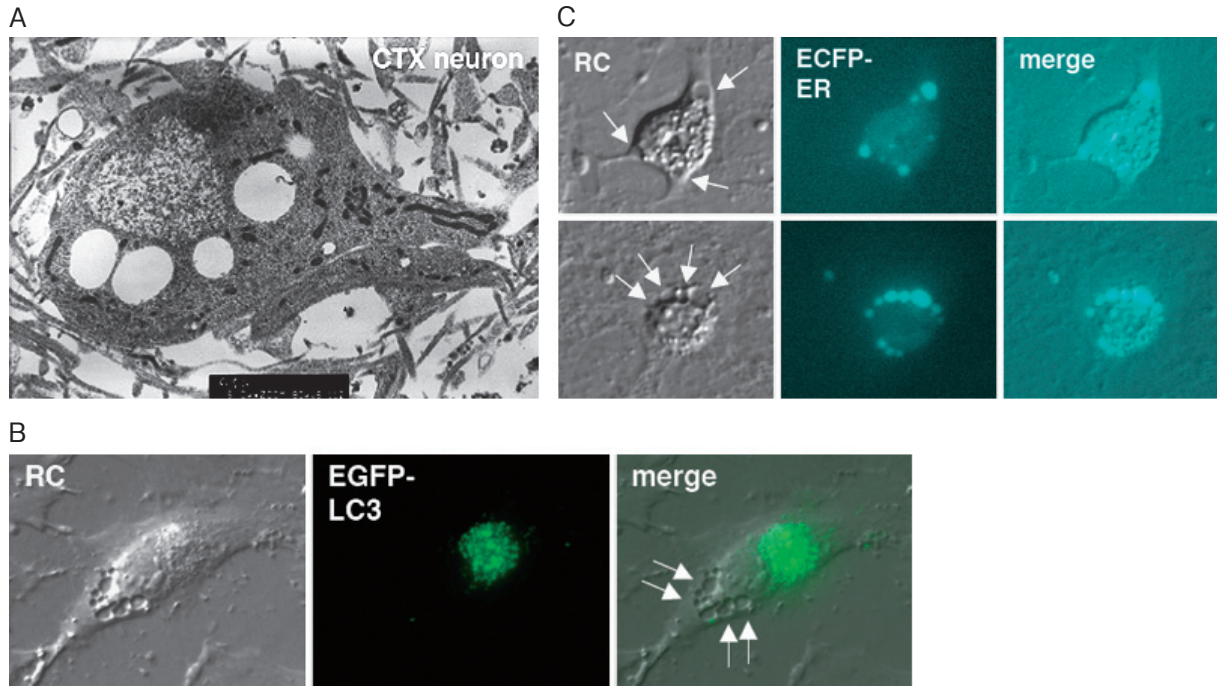


Fig. 5 α アミニチンによる転写抑制で誘導される神経細胞死における形態変化を示す. 細胞内の空胞形成がめだつ (A). これらはLC3陽性のオートファゴゾームとはことなる分布であり (B), ERマーカーと合致する (C). (Hoshino et al. *J Cell Biol.* 2006)

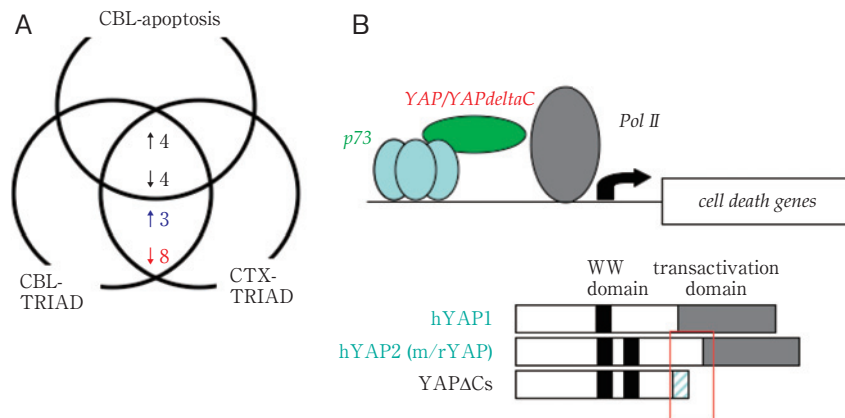


Fig. 6 マイクロアレイ解析により転写抑制性神経細胞死 (TRIAD) に特異的で, アポトーシスでは変化しない遺伝子を検索した (A). その中には, YAPdeltaCが含まれていた. YAPdeltaCはC末端ドメインを欠くため, YAPのようにポリメラーゼIIに結合して細胞死遺伝子を誘導することが出来ない. このためYAPに対してdominant negativeに働く (B). (Hoshino et al. *JCB* 2006)

変化を検索したところ, 細胞質に大きな空胞を持つ細胞が増加していることに気づいた²⁹⁾. ただしこのような細胞はAMA不添加の状態でも少数は存在していることと, また初代培養にはベースラインの状態であポトーシスがつきものであることは注意が必要である. いずれにせよAMAによって変化を示すのは空胞をともなう細胞であり, これが緩やかな細胞死に関連する形態変化であると考えられた (Fig. 5). 2005年当時はオートファジーと細胞死の関連が着目されだした時

期であったが, 神経変性疾患におけるオートファジー細胞死のことは誰も報告していなかったし, オートファジーが変性タンパクの除去に働いているという報告もこの後の話である. しかし, オートファゴゾームとの異同は重要なポイントであり, これを当時東京都臨床医学総合研究所の水島昇先生 (現・東京医科歯科大学教授) からいただいたLC3-GFPによって検討した. LC3と空胞は明らかにことなる部位に存在しており, オートファゴゾームの可能性は否定された. 次に,

Total number of reports: 63

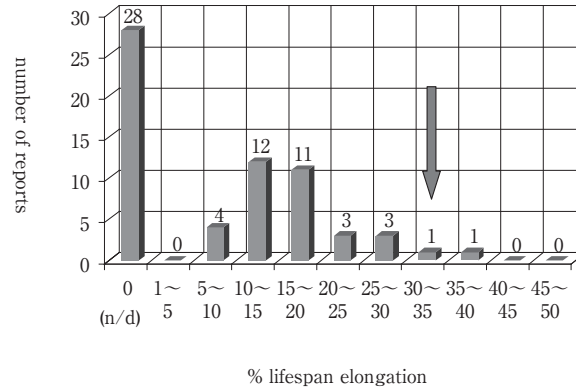


Fig. 7 ハンチントン病モデルマウス R6/2 を使用した過去の治療成績を示す。2010 年の時点で 63 件の報告があり、30% の寿命延長を示した報告は Ku70 以外には 1 件しかない。
(Enokido et al. *J Cell Biol.* 2010)

細胞死の分子カスケードを探る予備的な検討をおこなった。AMA による転写抑制性細胞死 (TRIAD: transcriptional induced atypical cell death) を大脳由来神経細胞および小脳由来神経細胞で誘導し、それぞれの遺伝子発現プロファイルと比較して共通変化分子を抽出した。さらに、小脳の低カリウムによるアポトーシスにおいても同様に発現プロファイルを取り、先ほどの共通分子変化から除去した。これにより、TRIAD 関連分子が 11 個同定できた。この中で、明らかに細胞死と関連すると思われるものは YAP (yes-associated protein) であった²⁹⁾。YAP は p73 が細胞死遺伝子の発現誘導をおこなう際に、転写補助因子として p73 に結合する²⁹⁾。念のため神経細胞に発現する YAP を RT-PCR によってクローニングし、配列を確認したところ、神経細胞には従来報告のない alternative splicing isoform (YAPdeltaC) が存在していることが明らかになった。また、YAPdeltaC は C 末端の転写活性化ドメインを欠如しており、このためドミナントネガティブな効果を全長型の YAP に対して示すことが明らかになった²⁹⁾ (Fig. 6)。AMA 添加後の全長型 YAP および YAPdeltaC の発現変化をみると、全長型が急速に減少する一方で、YAPdeltaC の発現は比較的長期に残存し、これがアポトーシス抑制あるいは TRIAD 自体の抑制の一助となっていることが想定された。実際、YAPdeltaC を過剰発現すると TRIAD が抑制された²⁹⁾。さらにヒトのハンチントン病患者脳において YAPdeltaC が発現していることも確認した²⁹⁾。これらの結果は TRIAD が何らかの形でハンチントン病神経細胞死にかかわっていることを示唆しているが、分子カスケードの詳細あるいはハンチントン病など転写抑制が想定される変性疾患とのかかわりについてはさらに検討が必要と考えている。

ポリグルタミン病態のオミックス解析

タンパク結合関係ではなく、核内タンパクの量的変化からみた際に、どのような病態が浮かんでくるのであろうか？私

たちは初代培養神経細胞にアデノウイルスベクターによって huntingtin あるいは ataxin-1 を発現させ、可溶性核タンパクのみを抽出してプロテオーム解析をおこなった。これによって変異タンパク発現によってのみ HMGB タンパクが減少することをみだした³¹⁾。さらにそれぞれのモデルマウス (過剰発現およびノックインマウス) の脆弱な神経細胞において HMGB がやはり減少していることを確認した³¹⁾。HMGB タンパクはもっとも量の多い核タンパクの一つであり、DNA 高次構造変換に際して主要な働きを持っている³¹⁾。すなわち、ヒストンタンパクからの DNA の解きほぐしに使われ、これは転写のみならず DNA 修復においても主要なステップである。したがって、HMGB の減少は転写障害のみならず、DNA 修復障害をきたすことが想定できる。そこで、DNA 損傷シグナルを形成する H2AX のリン酸化、Chk1/2 のリン酸化などを検討すると、まさしく DNA 損傷が増加しており、変異ポリグルタミンタンパク発現神経細胞に改めて HMGB を過剰発現すると、DNA 損傷シグナルと回復と細胞死の抑制が観察された³¹⁾。さらに、ショウジョウバエのハンチントン病モデル、SCA1 モデルに HMGB を過剰発現すると病態の改善が観察された³¹⁾。以上から HMGB の減少がポリグルタミン病態に影響を与えているものと考えている。現在進行中のモデルマウスをもちいた実験でも期待される結果をえつつある。

さらに、私たちはハンチントン病タンパクそのもののタンパク間結合に基づいた網羅的解析もおこなった。これは、共同研究者である Wanker 博士が huntingtin をもちいたインタラクトーム解析をおこなったことに起源している³²⁾。かれらのデータの中には神経細胞における DNA 修復に主要な働きをなす Ku70 が直接の結合分子として示されていた。HMGB の研究の際に DNA 損傷シグナルが亢進していることはすでに観察していたが、DNA 損傷そのものを観察していなかった。また、HMGB 減少が DNA 損傷のすべての原因であるという保証もなかった。そこで、Ku70 と huntingtin の結合が同じく DNA 損傷に影響を与えるかどうかについて

検討した。まず、免疫沈降の結果は Y2H と同様に結合関係を支持した。結合はほとんど変異タンパクのみにとめられた³³⁾。Huntingtin を GST 融合タンパクとして大腸菌で発現し、これを核抽出物に混ぜて Ku70 に依存する DNA-PK 活性を測定したところ、可溶性の GST-huntingtin においてのみ DNA-PK 活性の低下をみとめた³³⁾。これらのことは huntingtin が Ku70 と結合して Ku70 の DNA 修復活性を阻害していることを示唆していた。そこで、ハンチントン病モデルマウス R6/2 と新たに作成した Ku70 発現マウスを交配して、Ku70 増加の病態への効果を観察した。Ku70 の量は 2 倍程度にしか増加していなかったが、線条体での神経細胞の DNA 損傷シグナルは明らかに低下し、さらにモデルマウス R6/2 の寿命は従来の報告を上回る改善 (30% 延長) を示した³³⁾ (Fig. 7)。

その他の病態関連分子

わたしたちのオミックス解析は、これ以外に Omi/HtrA2, Hsp70, Maxer を病態関連分子として同定することになった。プロテオーム解析と同様に初代培養神経細胞 (大脳皮質由来, 小脳由来, 線条体由来の 3 種類) に huntingtin と ataxin-1 を発現させて、これらの mRNA 発現をジーンチップで網羅的に解析した。この際、神経細胞の種類によってことなる変動を示す遺伝子、共通して変化をしめす遺伝子が抽出されると同時に、疾患特異的あるいは疾患共通の変化が捉えられる³⁴⁾。私たちは変異 huntingtin によって小脳細胞のみで hsp70 の mRNA 発現が 30 倍近く上昇することに驚いた。タンパクレベルでも 8 倍の発現上昇がみとめられ、さらに患者脳においても小脳顆粒細胞層のタンパク発現上昇は明瞭であった。Hsp70 はシャペロンとして変性タンパクの構造無毒化あるいは除去に働くものであり、変性病態において細胞保護的な機能を果たすことはすでに知られていたが、神経細胞間で発現変化にいちじるしく違いがあることは、系統変性の機序にも関連するものできわめて興味深い。さらに、変異 huntingtin によって線条体細胞において特異的に減少する分子として Omi/HtrA2 も同定された³⁵⁾。Omi はパーキンソン病との関連が知られ³⁶⁾、ミトコンドリアから細胞質への放出によりアポトーシスを誘導することが知られている³⁷⁾。しかし、ミトコンドリアの恒常性維持のためにも必要であり、ノックアウトマウスあるいは変異マウスにおいては、線条体と運動ニューロンに変性が生じることも知られている³⁸⁾³⁹⁾。したがってミトコンドリアにおける恒常性維持と変性の関連が考えられる。さらに、Omi が線条体で特異的に減少していることは、やはり線条体神経細胞の脆弱性に関与するものと想定できる。また私たちは、小脳細胞のみで発現が低下する新規分子として Maxer を発見した。Maxer は *in vivo* の小脳では主にバグマングリアに発現しており、バグマングリアの細胞周期調節から細胞増殖などにかかわる分子と考えられる⁴⁰⁾。Maxer が減少することでバグマングリアの恒常性に破綻が生じて、バグマングリアがグルタミン酸毒性除去などの機構を介して保護しているブルキンエ細胞にも異常が生じることを

示唆している⁴⁰⁾。

これらの成果は、いずれも変性疾患における脆弱性の神経細胞間での違いに関与するものである。おそらくは、同一のタンパクが同一レベル発現したとしても神経細胞の種類によって処理機構あるいは結合タンパクのレパートリーがことなり、このような『レスポンス』の差異を生むのだろう。そしてそのことが選択的細胞死あるいは系統変性という変性疾患に特徴的な現象につながるのではないだろうか。この古典的課題については筆者が現在代表者を務めている新学術領域研究『シナプス・サーキットパソロジーの創成』でも主要なテーマとして取り上げており、多くの方々の参画を期待している。

まとめ

これまでの網羅的解析から、ハンチントン病をはじめとするポリグルタミン病の共通病態そして特異的病態について知見がえられた。共通病態についての結果をまとめると、huntingtin や Ataxin-1 などのポリグルタミンタンパクは複数の転写・スプライシング・DNA 修復関連分子と結合することになる。DNA 修復機能と転写機能は互いに深い関係にある。DNA 損傷修復時には転写を止める必要があるし、転写を抑制すると強い DNA 損傷が誘導される。つまり、双方の機能病態は合併した形で生じるものと考えてよい。DNA 損傷修復分子はすでに複数の神経変性疾患の原因遺伝子であることが明らかになっている。わたしたちの結果は、根底にある分子病態においてこれらの疾患とポリグルタミン病が共通性を持つことを示唆しており、興味深い。一方、細胞によって、あるいは疾患遺伝子によって、ことなる反応を示す分子群も同定された。それぞれの機能と発現分布は系統変性の分布とも対応しており、変性疾患病理の特異性につながる知見と考えられる。

DNA 修復機構をターゲットにした治療は今後の課題であるが、他のターゲットとなる分子機構、たとえばミトコンドリア品質管理異常、細胞内輸送、シナプス過剰興奮などと共に、将来の治療の柱の一つとなることを期待している。神経変性疾患の治療は、今後も長い時間がかかるのではないかと思われる。がん治療の先例をみると、がん遺伝子とがん抑制遺伝子が発見されたからといって、直ぐには治療にはつながらなかった。一方で、がん細胞の特定の分子異常が明らかになった後に、それをターゲットとする治療は効果を発揮しつつある。ポリグルタミン病研究においても、ターゲット分子の機能を調整することで治療が生まれる可能性がある。現在、私たちはターゲット分子としてこれまで同定してきた HMGB, Ku70, PQBP1 をはじめとする分子の機能補足、あるいはターゲットとポリグルタミン病タンパクの結合阻害を目指した治療開発をおこなっている。これらが、真の治療に結びつくように願っている。

筆者が研究を始めて以来、20 年以上が過ぎた。この間の神経内科学の進歩はいちじるしいものがあり、日本発の世界レベルの研究が多く発信された。とくに変性疾患の原因遺伝子

の同定においては日本の神経内科学は大きな貢献を果たしてきた。本稿は、筆者の研究紹介が主目的でもあり、それらについて十分に触れられなかったことをお詫びしたい。また、個人的には博士号取得時の研究成果である Oct-3/4 の発見が ES 細胞研究あるいは iPS 細胞開発に大きく貢献し、それらの研究が神経内科学とすでに接点を持っていることに深い感慨を覚えている。当時も、Oct-3/4 が分化のスイッチとして働いていることを期待していたが、自分たちでは十分な証明をなしえなかったことには悔いがある。今後、これらの研究を結びつけて自らの研究を完結させたいという思いを新たにしているところである。

最後に、東大神経内科入局以来、自由な研究をお許しいただいた萬年徹先生、金澤一郎先生、さらに生化学教室で筆者の可能性を広げて下さった村松正實先生、浜田博司先生に、深く感謝を申し上げます。また、私の研究グループに参加してくれた若手研究者が上述の研究成果を挙げていただいたことに対して、改めて敬意と感謝を表したい。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

- 1) Huntington G. On chorea. *Med Surg Report* 1872;26:317-321.
- 2) Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983;306:234-238.
- 3) The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993;72:971-983.
- 4) La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, et al. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991;352:77-79.
- 5) Zoghbi HY, Orr HT. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:217-247.
- 6) Li LB, Yu Z, Teng X, et al. RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature* 2008;453:1107-1111.
- 7) Pearson CE. Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet* 2011;7:e1002018.
- 8) Kovtun IV, Liu Y, Bjoras M, et al. OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 2007;447:447-452.
- 9) Waragai M, Lammers CH, Takeuchi S, et al. PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Hum Mol Genet* 1999;8:977-987.
- 10) Benditt J. POU! Goes the homeobox. *Sci Am* 1989;260:20, 22.
- 11) Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 1990;60:461-472.
- 12) Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 1990;345:686-692.
- 13) Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, et al. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 1990;344:435-439.
- 14) Okazawa H, Okamoto K, Ishino F, et al. The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *Embo J* 1991;10:2997-3005.
- 15) Imafuku I, Waragai M, Takeuchi S, et al. Polar amino acid-rich sequences bind to polyglutamine tracts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:16-20.
- 16) Okazawa H, Sudol M, Rich T. PQBP-1 (Np/PQ): a polyglutamine tract-binding and nuclear inclusion-forming protein. *Brain Res Bull* 2001;56:273-280.
- 17) Handwerker KE, Gall JG. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* 2006;16:19-26.
- 18) Perutz M. Polar zippers: their role in human disease. *Protein Sci* 1994;3:1629-1637.
- 19) Okazawa H, Rich T, Chang A, et al. Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. *Neuron* 2002;34:701-713.
- 20) Busch A, Engemann S, Lurz R, et al. Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J Biol Chem* 2003;278:41452-41461.
- 21) Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, et al. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* 2001;8:977-984.
- 22) Okazawa H. Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1427-1439.
- 23) Waragai M, Junn E, Kajikawa M, et al. PQBP-1/Npw38, a nuclear protein binding to the polyglutamine tract, interacts with U5-15kD/dim1p via the carboxyl-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:592-595.
- 24) Tapia VE, Nicolaescu E, McDonald CB, et al. Y65C missense mutation in the WW domain of the Golabi-Ito-Hall syndrome protein PQBP1 affects its binding activity and deregulates pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2010;285:19391-19401.
- 25) Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, et al. Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked

- mental retardation. *Nat Genet* 2003;35:313-315.
- 26) Stevenson RE, Bennett CW, Abidi F, et al. Renpenning syndrome comes into focus. *Am J Med Genet A* 2005;134:415-421.
- 27) Tamura T, Horiuchi D, Chen YC, et al. *Drosophila* PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci* 2010;30:14091-14101.
- 28) Ito H, Yoshimura N, Kurosawa M, et al. Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. *Hum Mol Genet* 2009;18:4239-4254.
- 29) Hoshino M, Qi ML, Yoshimura N, et al. Transcriptional repression induces a slowly progressive atypical neuronal death associated with changes of YAP isoforms and p73. *J Cell Biol* 2006;172:589-604.
- 30) Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD. Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1218-1222.
- 31) Qi ML, Tagawa K, Enokido Y, et al. Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. *Nat Cell Biol* 2007;9:402-414.
- 32) Goehler H, Lalowski M, Stelzl U, et al. A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell* 2004;15:853-865.
- 33) Enokido Y, Tamura T, Ito H, et al. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol* 2010;189:425-443.
- 34) Tagawa K, Marubuchi S, Qi ML, et al. The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J Neurosci* 2007;27:868-880.
- 35) Inagaki R, Tagawa K, Qi ML, et al. Omi/HtrA2 is relevant to the selective vulnerability of striatal neurons in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 2008;28:30-40.
- 36) Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, et al. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005;14:2099-2111.
- 37) Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001;8:613-621.
- 38) Jones JM, Datta P, Srinivasula SM, et al. Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of *mnd2* mutant mice. *Nature* 2003;425:721-727.
- 39) Martins LM, Morrison A, Klupsch K, et al. Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 2004;24:9848-9862.
- 40) Shiwaku H, Yoshimura N, Tamura T, et al. Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *EMBO J* 2010;29:2446-2460.

Abstract

Elucidation of molecular pathomechanisms of Huntington's disease

Hitoshi Okazawa, M.D., Ph.D.

Department of Neuropathology, Tokyo Medical and Dental University

In Huntington's disease, CAG repeat expansion of the Huntingtin gene produces mutant RNA and mutant protein containing elongated polyglutamine tract, which causes dysfunction and cell death of neurons. From our research of Huntington's disease and other polyglutamine diseases for nearly 20 years, we identified new disease-related genes including PQBP1, Ku70, HMGB, Maxer, and Omi. Through the analysis of these molecules, we unraveled new pathomechanisms deeply linked to nuclear functions such as transcription, splicing, DNA damage repair. These findings will become the basis to develop new molecule targeted therapeutics.

(*Clin Neurol* 2012;52:63-72)

Key words: Huntington's disease, Huntingtin, DNA damage repair, Omics, polyglutamine