

神経変性疾患における蛋白質分解システムの解明

Protein degradation system involved in neurodegenerative disease

研究代表者 九州大学生体防御医学研究所細胞機能制御学部門分子発現制御学分野
助教授 畠山鎮次

Associate Professor, Department of Molecular and Cellular Biology,
Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Shigetugu HATAKEYAMA

An increasing number of neurodegenerative diseases result from the expansion of CAG triplet repeats that encode polyglutamine in the specific proteins. Polyglutamine expansion presumably gives rise to altered or misfolded conformation in these proteins. Pathological findings suggest that intracellular aggregates are tethered to ubiquitin, implicating that the alteration of ubiquitin-dependent protein degradation pathway may be involved in the pathogenesis of polyglutamine disease. In fact, several reports show that perturbation of ubiquitin-proteasome system enhances the neurodegeneration induced by expanded polyglutamine. In this study, we show that polyglutamine containing protein, MJD1/Ataxin3, which causes Machado-Joseph disease (MJD)/Spinocerebellar ataxia type 3, is degraded by ubiquitin-proteasome dependent pathway. To identify the enzymes involved in ubiquitination of MJD1 protein, *in vitro* ubiquitination system is established and ubiquitin ligase (E3) activity is partially purified. Furthermore, an MJD1-binding protein is isolated by MJD1-affinity column from E3 containing fractions. Amino acid sequencing revealed that the MJD1-binding protein is VCP, an AAA type ATPase. VCP is a homologue of yeast Cdc48 that interacts with UFD2, a ubiquitin chain assembly factor (E4), which promotes the degradation of artificial ubiquitin fusion protein. UFD2a, a mammalian homologue of yeast UFD2, binds to VCP. Furthermore, UFD2a has an E4 activity, and is a rate-limiting factor for degradation of MJD1 protein. MJD1 protein almost disappears in cells which are transfected with UFD2a cDNA. These findings may give a potential tool for gene therapy to control the clinical conditions of MJD.

1. 研究目的

現代日本は、生活環境や医療レベルの改善等の理由により、国民の平均寿命が延長し、高齢化社会を迎えようとしている。これまでは、医学を含む科学の役割として、病気を治すことに力が注がれたが、今では年齢が高くなっても精神的身体的に健康であることが、社会的要請となっている。高齢化に伴う問題点として、アルツハイマー病を含む神経変性疾患の増加と、介護を含む福祉医療の拡大が考えられる。

最近、アルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患は、神経細胞内にユビキチン化の修飾を受けた蛋白の蓄積が関与していることが報告されている。ユビキチンとは 76 アミノ酸からなる小さな蛋白質であり、それが結合することによりターゲットとなった蛋白は、プロテアソームという蛋白質分

解のためのプロテアーゼ複合体により、分解を受ける。アルツハイマー病においては、老人斑内に APP、神経線維原性変化 (NFT) にタウ蛋白質が、ハンチントン病においては α -シヌクレインがユビキチン化されて神経細胞に蓄積が起きていることが知られている。現在までのところ、ある種の蛋白質の分解機序の破綻が、これらの疾患の原因として関与しているのか、それとも、この疾患の 2 次的な変化として生じるのかは不明のままである。よって、これらの神経変性疾患に蓄積される蛋白質のユビキチン化に関与する酵素系及び、疾患発症のメカニズムの研究は、アルツハイマー病に限らず、一連の神経変性疾患の病因の解明につながる可能性が高い。今回の研究は、蛋白分解という観点から、神経変性疾患 (特にマシャド-ジョセフ病) の発症機序の解明と治療法の開発を目的とする。

2. 研究経過

2.1. 方法

in vivo におけるユビキチン化状態の検討

ユビキチン化が病理学的に報告されているポリグルタミン病のなかのマシャド-ジョセフ病の原因遺伝子産物 MJD1 を細胞内にトランスフェクトし、過剰に発現させた場合もしくはプロテアソーム阻害剤で処理した場合に、ユビキチン化した状態の増加が検出できるかを検討した。

In vitro ユビキチン化反応系の樹立

MJD1 のユビキチン化に¹⁾関与する酵素系を同定するために、*in vitro* における MJD1 のユビキチン化の系を確立する。この段階で、ユビキチン化がいかなるユビキチンリガーゼタイプによって実行されるかを、様々な阻害剤によって検討した。また、この段階でいかなるタイプの E2 が使われるかも明らかにした。

クロマトグラフィーによるユビキチンリガーゼの分画

ウサギ網状赤血球溶解液を各種のクロマトグラフィー（イオン交換、ゲル濾過、疎水、アフィニティーなど）によって分画し、*in vitro* ユビキチン化反応を行い、ユビキチンリガーゼ分画を可能な限り純化及び濃縮を行った。

MJD1 ユビキチンリガーゼのアミノ酸配列の決定

蛋白サンプルを、ゲル内プロテアーゼ消化、逆相クロマトグラフィー後、微量蛋白シークエンサーでアミノ酸配列を解読する。アミノ酸配列より、各種データベースより蛋白の cDNA 配列を同定する。その後、通常のバクテリオファージベクターの cDNA ライブラリーから目的の cDNA を単離した。

ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の作製

同定された蛋白分子に対して抗体を作製する。この際、用途によりポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を適時作製した。

MJD1 ユビキチンリガーゼ発現による細胞生物学的検討

ユビキチンリガーゼの発現ベクターを作製して、それを発現させることにより細胞内で MJD1 の発現を低下させ、封入体形成を抑制できるかを調べた。これに組織特異的な発現操作を加えることにより、

遺伝子治療に使用できるかを検討する。

MJD1 ユビキチンリガーゼ関連蛋白の同定

MJD1 ユビキチンリガーゼに相同性のある分子を EST データベースより同定し、クローニングしそのユビキチンリガーゼ活性を調べた。

2.2. 結果および考察

細胞内に発現した MJD1 分子の動態

MJD1 はプロテアソーム阻害剤を処理しない状態でもユビキチン化を受けた分画が多く存在することが判明した。さらに、プロテアソーム阻害剤を処理した場合、さらにユビキチン化が亢進し、MJD1 はユビキチン化によりその発現量が調節されていることが判明した(Figure 1)。また、各種の MJD1 変異体を発現させた場合、特にそのポリグルタミン以外の部分を発現させた場合、細胞内封入体を形成することが明らかとなった。よって、親水性部分が減少し、ポリグルタミン鎖の比率が蛋白内で増えた場合、疎水性が増し、凝集体（細胞内封入体）が形成しやすいことが推測された。これはポリグルタミン病を含め、各種の神経変性疾患に共通した病理所見であり、病態解析のモデル系として利用できる可能性がある。

In vitro ユビキチン化反応を指標とした MJD1 ユビキチン化酵素の同定

MJD1 を基質とした *In vitro* ユビキチン化反応により、MJD1 をユビキチン化させる活性を純化していった。ウサギ網状赤血球溶解液を各種のクロマトグラフィー（イオン交換、ゲル濾過、ハイドロキシアパタイト）によって分画し、*in vitro* ユビキチン化反応を行い、ユビキチンリガーゼ分画を解析した。この後、ユビキチン化活性が失われたので、MJD1 を担体としたアフィニティーカラムにより、MJD1 に対する結合蛋白を分離した(Figure 2)。その蛋白を、ゲル内プロテアーゼ消化、逆相クロマトグラフィー後、微量蛋白シークエンサーでアミノ酸配列を解読した。アミノ酸配列より、MJD1 結合蛋白は VCP と呼ばれる AAA 型の ATP アーゼ活性を有する分子であることが判明した。VCP の分裂酵母ホモログは UFD2 というユビキチン鎖を伸長させる酵素と結合することが明らかにされている。その後、通常のバ

クテリオフィージベクターのマウス cDNA ライブラリーから完全長の VCP と UFD2 cDNA を単離した。

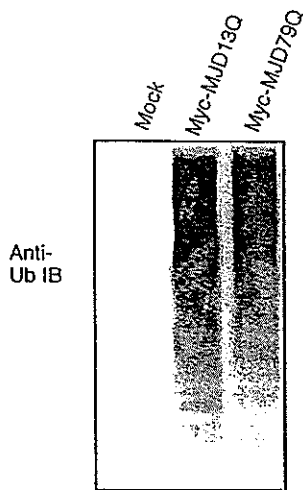


Figure 1. The anti-Myc immunoprecipitates of Myc-MJD1 which was expressed in 293T cells, were immunobolted with anti-ubiquitin antibody.

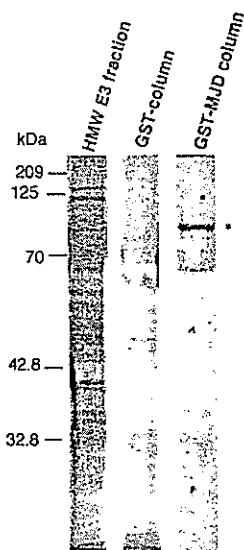


Figure 2. approximately 100kDa protein was isolated by MJD-affinity chromatography

MJD1 及び VCP に対する抗体の作製

MJD1 及び VCP に対する抗体をウサギに免疫することにより作製した。この抗体を使用してマウスの各組織のウエスタンブロットを行ったところ、両分子ともさまざまな組織に発現し、神経組織特異的な

発現はしていないことが判明した。

MJD1 ユビキチンリガーゼ発現による細胞生物学的検討

UFD2 を細胞内に過剰発現させることにより、細胞内に共発現させた MJD1 のユビキチン化介在性の分解が進行されることが、細胞内の MJD1 の安定性を測定することで、明らかとなった。実際に UFD2 が存在しているときには、MJD1 のパルスチェイス解析により、MJD1 の半減期が短くなり、安定性が低下していることが判明した(Figure 3)。

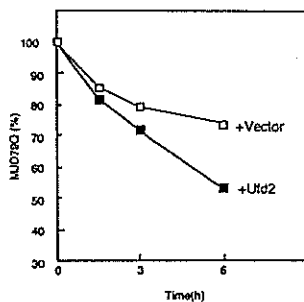


Figure 3. The half-life of MJD1 was shortened by the co-expression of UFD2

UFD2 関連蛋白群の同定

UFD2 はそのC末端部分に U-ボックスとよばれる他の蛋白にも存在するドメイン構造を有しているが、その機能解析はなされていない。我々は、ヒトおよびマウスに存在する U-ボックスドメインを有する一連の蛋白 (U-ボックス蛋白) の cDNA を同定し、ユビキチン化における関与を検討した。U-ボックス蛋白のリコンビナント蛋白を作製し、ユビキチンリガーゼ活性を測定したところ、現在まで、我々が同定したすべての U-ボックス蛋白はユビキチンリガーゼ活性を有していることが判明した(Figure 4)。さらに、それらの欠損変異体を使用した *in vitro* ユビキチン化アッセイにより、U-ボックスドメインそのものがユビキチンリガーゼ活性に必須であることが明らかとなった。したがって、U-ボックス蛋白群は、HECT 型ユビキチンリガーゼ、RING 型ユビキチンリガーゼの他に、新たに同定されたユビキチンリガーゼ群と定義づけられる。

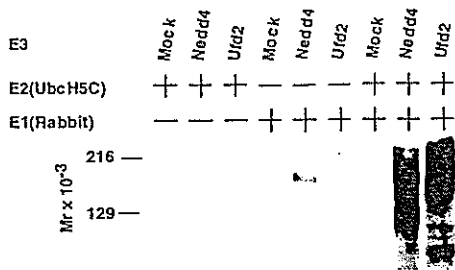


Figure 4. UFD2 has ubiquitin ligase activity like Nedd4 (HECT type ubiquitin ligase).

まとめ

神経変性疾患のなかで特に小脳に変性を示す疾患であるマシャド-ジョセフ病の原因遺伝子産物の結合蛋白質として VCP が同定され、さらに VCP 結合蛋白と考えられていた UFD2 が MJD1 の発現安定性、特にユビキチン介在性蛋白分解に関与していることが明らかとなった。さらに UFD2 分子に存在する U-ボックスと呼ばれるドメインを有する一連の蛋白群がユビキチンリガーゼ活性を有する蛋白であることが判明した。

3. 研究成果

本研究では、封入体構成蛋白（特に MJD1）の安定性を調節するメカニズムとしてユビキチン-プロテアソーム系がどのような役割を果たしているのかを検討した。次に、封入体構成分子をユビキチン化させる酵素系（ユビキチンリガーゼ）を同定し、これらの蛋白に対しての生理的役割と病態上の役割を調べた。さらに、ユビキチンリガーゼの発現系を利用することにより、封入体構成蛋白の細胞内における出現を抑制できるかを検討した。

4. 今後の課題と発展

現在、神経変性疾患に関して多くの関係分子の報告がなされ、病態に対しての関係が明らかにされてきている。しかし、ユビキチン化された封入体に関しての意味に関しては、病理組織学的所見以外、ほとんどの報告がない。我々は、神経細胞内に形成される封入体におけるユビキチン化は、分子シャペロ

ンとともに細胞内の防御機構であると考えている。つまり、細胞内で異常な構造をとり蓄積する蛋白に対して、正常に戻す、もしくは分解して消去する機構として、それぞれ分子シャペロンもしくはユビキチン-プロテアソーム系が存在するのではないかと仮定している。実際、ポリグルタミン病においては原因遺伝子産物の安定化の増加とそれに伴う異常な蓄積が各種の細胞死に向かう原因になることが示唆されている。よって、生体内に存在するユビキチン化酵素系を利用して、発症の可能性のある家系の患者に予防的治療を施すことにより、寿命を全うするまで発症を予防させることが期待できる。さらに一旦発症した患者に対しても、遺伝子治療による異常蓄積蛋白の分解によって、病状の進行停止や軽減が可能になるかもしれない。

5. 発表論文リスト

1. U-Box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N., Nakayama K-i. (投稿中)
2. UFD2a, a mammalian ubiquitin-chain assembly factor (E4), promotes ubiquitination and degradation of the polyglutamine-containing protein, Machado-Joseph disease protein 1. Matsumoto M., Yada M., Hatakeyama S., Kitagawa M., Nakayama K-i. (投稿準備中)