

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

1. 研究のねらい

神経難病の根本治療薬開発のために、蛋白質のリフォールディング・分解能検出系を構築し、それらを高める薬物探索を行う (ref. 8, 9)。

2. 研究成果と考察

神経系における特異なユビキチン・ユビキチン化維持機構の解明をすすめ (研究成果1)、生体内のリフォールディング能やユビキチン化分解能を改善する薬物探索のため、生体内の防御機構を可視化するためのプローブの開発を試みた。また疾患特異的なシャペロン分子を単離する目的で蛋白質高次構造を位置情報に還元し薬物スクリーニングを行い有望な化合物を見いだした (研究成果2)。更に神経変性疾患のみならず神経腫瘍においてもユビキチン化に着目することにより新たな薬物治療の可能性を示した (研究成果3)。

研究成果1；

自然発症神経変性マウス解析により、神経系でのユビキチン量を保ちユビキチン依存性蛋白質分解を保持されるメカニズムをあきらかにした(ref. 2)。またこの神経細胞でのユビキチン化障害を受けたマウスを用い、神経系でのユビキチン化の役割やアポトーシス、加齢、神経変性などとの関連を共同研究により明らかにした (ref. 3-6)。

研究成果2；

- (1) 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の融合蛋白質として蛍光蛋白質を精製し、変性させ蛍光を消失させた。次に培地に加え神経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。しかしながら大量精製系の確立が難しく、生体内での動態解析は断念した。
- (2) 疾患特異的な構造変化を検出するために、従来から国内外の患者より解析を依頼された難治性神経疾患 (ref. 1)の原因膜蛋白質の構造不全を、細胞局在の位置情報に変換する系を作成。その系を元に細胞内局在を正常化させる薬物の候補を見いだした。現在各種変異体細胞モデルでの解析が進行中であり、疾患モデルマウスの投与計画中。

研究成果 3 ;

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 (ref. 7)。

3. 成果リスト

論文

1. Inoue, K., Osaka, H., Thurston, V.C., Clarke, J.T., Yoneyama, A., Rosenbarker, L., Bird, T.D., Hodes, M.E., Shaffer, L.G. and Lupski, J.R.: Genomic rearrangements resulting in PLP1 deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females. **Am. J. Hum. Genet.** 71: 838-53, 2002
2. Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S., and Wada, K. : Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. **Hum. Mol. Genet.** 12: 1945-1958, 2003
3. Bonin, M., Poths, S., Osaka, H., Wang, Y.L., Wada, K. and 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
4. Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn, B.C., Wang, Y.-L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, A.D. ,Proteomic analysis of brain proteins in the gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse, a syndrome that emanates from dysfunctional ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1, reveals oxidation of key proteins. **J. Neurochem.** 88: 1540-1546, 2004
5. Wang, Y.L., Takeda, A., Osaka, H., Hara, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Sun, Y.J., Kwon, J., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Accumulation of beta- and gamma-synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient *gad* mouse. **Brain Res.** 1019: 1-9, 2004

6. Harada, T., Harada, C., Wang, Y. L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada, K. Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-11 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. **Am. J. Pathol.** 164: 59-64, 2004
7. Nagai, J., Yazawa, T., Okudela, K., Ito T., Kigasawa, H., Kitamura, H. and 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

総説

8. 小坂 仁、和田圭司：ユビキチンシステムの破綻と神経変性疾患 *Vita.* 19: 37-41, 2002
9. 滝沢修一、小坂 仁、和田圭司: Ubiquitin-proteasome 経路と unfolded protein response. 脳の科学「パーキンソン病のすべて」(増刊号) 26 : 148-154, 2004

特許

特願 2003-303370 「ユビキチンC末端水解酵素変異体遺伝子導入動物」

謝辞

前半の研究成果は国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部で行われたものであり、自由な雰囲気での研究をお許しいただいた和田圭司部長、在籍していたすべての研究員の方々にお礼を申し上げます。また後半の研究では神奈川県立こども医療センター、気賀沢寿人臨床研究機構長、黒澤健司博士、小井詰史朗博士、永井淳一専門技師に深謝致します。また共同研究に際しては、特に慈恵会医科大学高田耕司博士、順天堂大学望月秀樹博士、国立精神・神経センター井上健博士にお世話になり、ここに深謝いたします。