

＜シンポジウム 9—2＞ポリグルタミン病への分子生物学的アプローチ

ショウジョウバエをもちいたポリグルタミン病へのアプローチ

倉永英里奈¹⁾²⁾ 殿城亜矢子¹⁾²⁾ 三浦 正幸¹⁾²⁾

(臨床神経, 49 : 910—912, 2009)

Key words : 遺伝学的スクリーニング, ユビキチン—プロテアソーム経路, ショウジョウバエ

ポリグルタミン病をふくむ多くの神経変性疾患に共通する特徴として、神経細胞内に異常タンパク質が蓄積・凝集すること、加齢にともなって発症リスクが上昇し病態が進行することが挙げられる。これまでに、異常タンパク質の主要な分解経路であるユビキチン—プロテアソームシステムが、神経変性疾患における神経細胞内の異常タンパク質の凝集に深く関与することが示唆されてきた¹⁾²⁾。しかし、神経変性疾患が晩発性に発症し、進行する理由は未だ明らかではない。神経変性疾患が晩発性に発症する機構の研究は、個体をもちいて若齢から老齢まで長期にわたって解析する必要があるために困難とされてきた。そこで、ヒトの神経変性疾患モデルが確立されており、寿命が約 60 日と短く、遺伝学的な研究アプローチにすぐれているショウジョウバエをモデル生物としてもちいることで、神経変性疾患が晩発性に発症する機構の解明を目指した。われわれは神経変性を抑制する因子を網羅的に探索するために、未知遺伝子発現系統(Gal4/UAS システムをもちいた異所性発現系)のスクリーニングをおこなった。スクリーニングにより神経変性を抑制する系統を同定することに成功し、この系統において強制発現されている遺伝子の同定を試みたところ、19S プロテアソームの蓋部構成因子の一つである Rpn11 が候補遺伝子として明らかとなった(Fig. 1A)。複眼特異的にポリグルタミンを発現させると、視神経細胞の変性と脱落をとまなう神経変性様表現型が加齢にともない観察される。しかし、Rpn11 の強制発現系統は、ポリグルタミンによる異常タンパク質の凝集を抑制し、加齢にともなう神経変性様表現型の進行を有意に抑制した(Fig. 1B)。異常タンパク質を分解するプロテアソームは、プロテアーゼ活性を有する 20S プロテアソームの両端または片側に、調節ユニットである 19S 複合体が会合した分子集合体であり 26S プロテアソームと呼ばれる。Rpn11 が 19S 複合体の蓋部構成因子であり、その過剰発現が神経変性の進行を抑制したことから、加齢にともなうプロテアソームの活性変化に注目した。

まず、野生型系統やコントロール(LacZ 発現)系統における生体内のプロテアソーム活性を様々な日齢において測定したところ、若齢個体と比較して老齢個体におけるプロテアソーム活性が低下していることが明らかとなった³⁾。このような加齢にともなうプロテアソーム活性の低下が、神経変性の

進行を抑制した Rpn11 の強制発現によって回復していることを予想し、Rpn11 強制発現系統における生体内のプロテアソーム活性を測定したところ、老齢個体においてもプロテアソーム活性が維持されており、野生型系統でみられた加齢にともなうプロテアソーム活性の低下が、Rpn11 の強制発現によって回復していることが明らかとなった³⁾。

次に、プロテアソームの蓋部構成因子の一つである Rpn11 が、どのようなメカニズムで加齢にともなうプロテアソーム活性の低下を回復しているのかを明らかにすることを試みた。通常、20S プロテアソームは不活性型として存在し、調節ユニットである 19S プロテアソームが会合することによって活性型になることが知られている。まず、プロテアソーム活性が加齢にともないどのように低下するのかを明らかにするために、グリセロール密度勾配遠心法をもちいて 20S、26S プロテアソームを分離し、それぞれのプロテアソームの活性・量的変化を若齢個体、老齢個体とでそれぞれ比較した。その結果、老齢個体では若齢個体にくらべて 26S プロテアソームの量および活性が減少していた³⁾。一方で、コントロール(LacZ 発現)系統の老齢個体と Rpn11 過剰発現系統の老齢個体を比較すると、加齢にともなう 26S プロテアソームの量および活性低下が Rpn11 過剰発現系統において回復することが明らかとなった³⁾。

生体内における 26S プロテアソームの量および活性の変化が、神経変性の発症に与える影響を明らかにするために、Rpn11 のノックダウン系統と神経変性モデルとの遺伝学的相関を解析した。Rpn11 を標的とする double strand RNA(dsRNA)の発現(Rpn11-IR)によって内在性 Rpn11 をノックダウンする手法がショウジョウバエでは確立されている。ポリグルタミンの発現系統による進行性の神経変性様表現型は Rpn11 のノックダウンによって増強した³⁾。さらに、複眼特異的に Rpn11 を単独でノックダウンさせると、視神経細胞の脱落をとまなう神経変性様表現型が加齢依存的に観察された³⁾。Rpn11 ノックダウン系統において神経変性様表現型がみられたことから、26S プロテアソーム活性の変化にともなう異常タンパク質の蓄積を、ユビキチン化タンパク質の蓄積を指標に検討した。コントロール系統において、加齢にともないユビキチン化タンパク質の蓄積が増加したが、Rpn11 ノッ

¹⁾ 東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室 [〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1]

²⁾ CREST, JST

(受付日 : 2009 年 5 月 22 日)

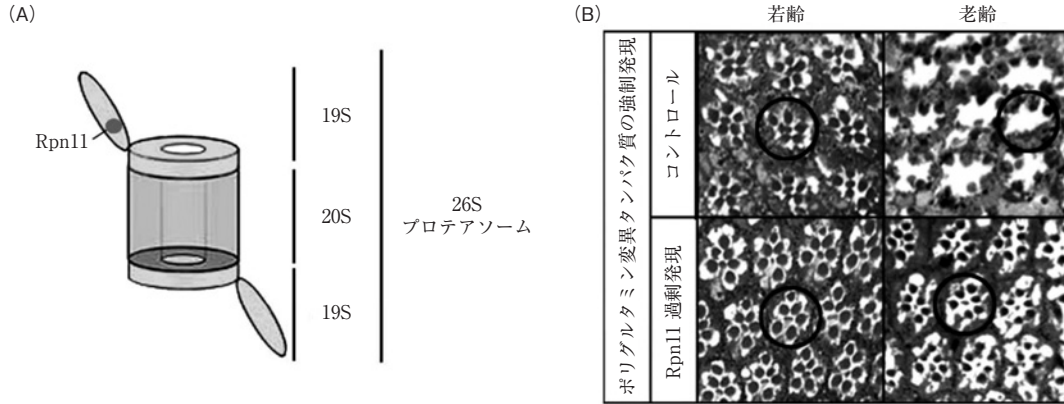


Fig. 1 Rpn11 過剰発現によって神経変性の進行が抑制される. (A) 26S プロテアソームの構造模式図. Rpn11 は 19S 複合体の蓋部に位置する構成因子. (B) ショウジョウバエの複眼にポリグルタミンタンパク質を強制発現させると加齢とともに神経変性が進行する様子が観察されるが, Rpn11 を過剰発現させた個体では神経変性の進行が抑制される.

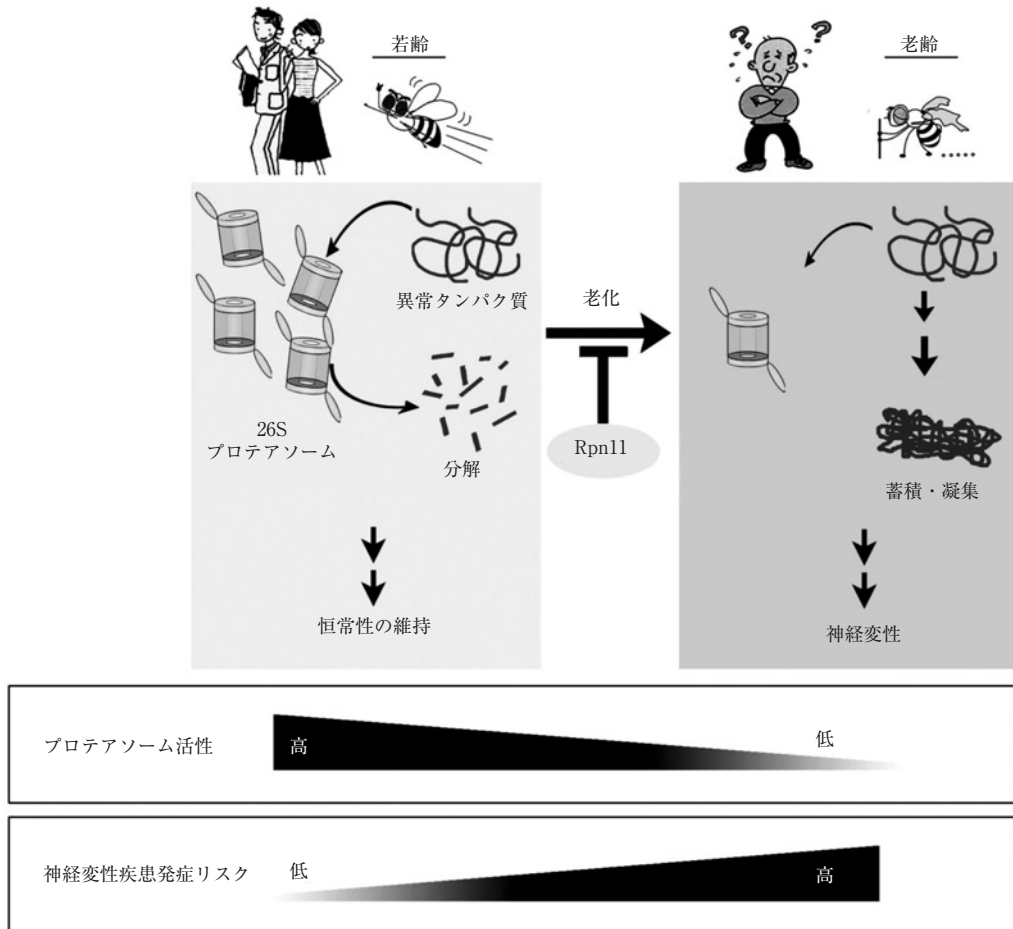


Fig. 2 神経変性疾患が年をとってから発症する仕組み. 本研究より, 加齢ともなう生体内のプロテアソーム活性の低下が神経変性疾患の晩発性発症や進行の原因の一つであることが示唆された.

クダウン系統においてユビキチン化タンパク質の蓄積が顕著に亢進した³⁾. 一方で, Rpn11 強制発現系統におけるユビキチン化タンパク質の蓄積は抑制された.

本研究において, 遺伝学的スクリーニングによってえられた神経変性の進行を抑制する因子 Rpn11 の同定により, 老齢個体における生体内の 26S プロテアソーム活性の低下を遺

伝学的操作で向上させることによって神経変性の進行を抑制できる可能性を示した。これは加齢にともなう生体内の26Sプロテアソーム活性の低下が、神経変性疾患の晩発性発症や加齢にともなう進行の原因、つまり危険因子の一つであることを強く示唆するものである (Fig. 2)。

そこでわれわれは、加齢にともなうプロテアソーム活性の低下に関与する因子を想定し、機能欠失型遺伝学的スクリーニングをおこなった。スクリーニングでは変異原であるEMSをもちいて点突然変異体系統のコレクションを作成し、それぞれの系統に関して若年個体と老齢個体の頭部におけるプロテアソーム活性を測定し、その変化の度合を指標に、加齢にともなう生体内のプロテアソーム活性低下を制御する因子の探索をおこなった。約1,000系統の変異体系統に関して一次スクリーニングをおこなった結果、安定したプロテアソーム活性維持の表現型を示した系統が複数えられた。現在これらの系統について、ポリグルタミン病モデルとの遺伝学的相関、ユビキチン化タンパク質蓄積量の検討、および寿命の測定をおこなっている。

今後、加齢にともなうプロテアソーム活性の低下を制御する因子が明らかになることで、神経変性疾患が晩発性に発症

する機構が解明されるとともに、神経変性の早期発見や、発症リスクを軽減させる新たな治療法の開発へと結びつくことが期待される。

謝辞：ここで紹介した筆者らの研究は、当研究室の富岡武泰氏、東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室の村田茂穂先生、濱崎純先生、東京都臨床医学総合研究所先端研究センターの田中啓二先生らとの共同研究でおこないました。ここに深く感謝致します。

文 献

- 1) Hardy J, Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353—356
- 2) Ross CA, Poirier MA: Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 891—898
- 3) Tonoki A, Kuranaga E, Tomioka T, et al: Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with aging process. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 1095—1106

Abstract

Genetic approach for understanding of the late-onset mechanisms of polyglutamine disease

Erina Kuranaga¹⁾²⁾, Ayako Tonoki¹⁾²⁾ and Masayuki Miura¹⁾²⁾

¹⁾Department of Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

²⁾CREST, JST

The intracellular accumulation of unfolded or misfolded proteins is believed to contribute to aging and age-related neurodegenerative diseases. However, the links between age-dependent proteotoxicity and cellular protein degradation systems remain poorly understood. Here, we show that 26S proteasome activity and abundance attenuate with age, which is associated with the impaired assembly of the 26S proteasome with the 19S regulatory particle (RP) and the 20S proteasome. In a genetic gain-of-function screen using *Drosophila*, we characterized *Rpn11*, which encodes a subunit of the 19S RP, as a suppressor of expanded polyglutamine-induced progressive neurodegeneration. *Rpn11* overexpression suppressed the age-related reduction of the 26S proteasome activity, resulting in the extension of flies' life spans with suppression of the age-dependent accumulation of ubiquitinated proteins. On the other hand, the loss of function of *Rpn11* caused an early onset of reduced 26S proteasome activity and a premature age-dependent accumulation of ubiquitinated proteins. It also caused a shorter life span and an enhanced neurodegenerative phenotype. Our results suggest that maintaining the 26S proteasome with age could extend the life span and suppress the age-related progression of polyglutamine diseases.

(*Clin Neurol*, 49: 910—912, 2009)

Key words: Genetic screening, Ubiquitin-Proteasome system, *Drosophila*