

ポリグルタミン凝集タンパク質の細胞内蓄積の意義と その新規分解機構の解明

岩田 淳^{1)*}

要旨：神経変性疾患では異常凝集タンパク質の蓄積がその発症原因と密接にかかわっている。凝集タンパク質は封入体を形成するが、封入体自体には細胞毒性がないとする知見が多くえられている。事実、実験系ではアグリソームといわれる凝集蛋白による封入体が微小管をもちいたモータータンパク質による輸送システムによって形成され、細胞がその処理のために積極的に凝集蛋白を収集していることが想像された。筆者はこれがオートファジー・ライソゾーム系による凝集体分解の促進と密接にかかわっていることを発見した。本来非特異的な細胞質分解系であるオートファジーが凝集タンパク質に対しては「特異的」な認識システムを有して分解をおこなっている。

(臨床神経 2013;53:1-8)

Key words：ポリグルタミン、オートファジー、アグリソーム、ユビキチン・プロテアソーム、HDAC6

はじめに

1990年代以来数多くの神経変性疾患において原因遺伝子が同定されたことで、その発症メカニズムの解明が進んだ。とくにポリグルタミン病では神経細胞内における異常凝集ポリグルタミンタンパク質の蓄積が直接、間接に神経細胞機能不全、そして神経細胞死に関与している事が強く示唆されてきた。これは、ハンチントン病をはじめとするポリグルタミン病の研究が、培養細胞、実験動物モデルの構築が比較的容易であることから先駆的に可能であったためであることが第一の理由であるが、他方では原因遺伝子産物中にポリグルタ

ミンという共通部分を持つ疾患群の病態がポリグルタミンタンパク質の凝集という現象で説明可能と考えられた事などが重なったためである。この分野の研究は神経変性疾患全体の病態解明の端緒を常に開いてきたともいえる。

そして、ポリグルタミン病以外の神経変性疾患でも神経細胞内外で同様に異常タンパク質が凝集蓄積し、神経変性に関与している事が示されており¹⁾、神経変性疾患に共通する病理学的特徴として、異常に凝集したタンパク質より構成される神経細胞内外の様々な構造物の存在が注目されるようになった。つまり、障害部位や凝集タンパクの種類に差はあるものの、凝集タンパク質の脳内蓄積がこれら神経変性疾患の発症に共通した要素であると考えられる (Table 1)。

Table 1 Specific aggregated proteins defines pathological diagnosis in neurodegeneration.

disease	inclusion body	aggregated protein	how aggregate?
Alzheimer's disease	senile plaques neurofibrillary tangles	amyloid beta tau	overproduction, hypodegradation abnormal phosphorylation?
Parkinson's disease	Lewy bodies	alpha-synuclein	mutation, abnormal phosphorylation?
Huntington's disease and other polyglutamin diseases	intra-nuclear and cytoplasmic inclusions	polyglutamine proteins	expansion of polyglutamin chain
Creutzfeldt-Jakob disease	prion plaques	prion	contact with PRP ^{SC}
amyotrophic lateral sclerosis frontotemporal degeneration	skein-like inclusions ubiquitin positive cytoplasmic inclusions	TDP-43	mutation, abnormal phosphorylation?

*Corresponding author: 東京大学医学部附属病院分子脳病態科学特任准教授・神経内科学〔〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1〕

¹⁾ 東京大学医学部附属病院分子脳病態科学・神経内科学

(受付日：2012年10月9日)

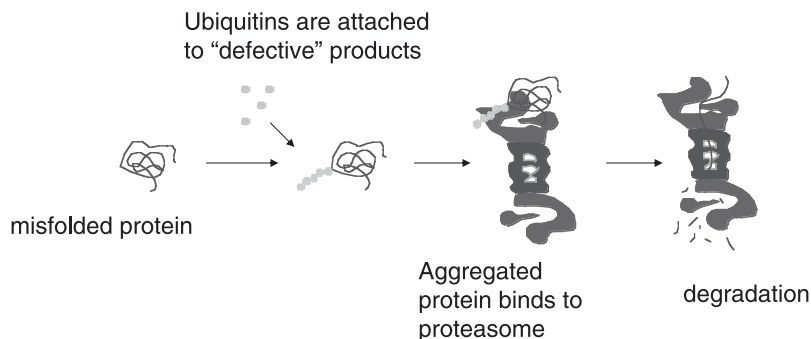


Fig. 1 The ubiquitin proteasome system.

"Defective" proteins are ubiquitinated and the ubiquitin chain binds to the proteasome for their degradation.

細胞内のタンパク質品質管理

細胞は絶えず必要なタンパク質を新規に生産し続け、そして不要なタンパク質を処理し続ける必要があります。細胞を工場とするならばタンパク質はその製品といえる。工場は正しい設計図 (DNA 情報) に基づく正しい鋳型 (転写された RNA)、製品 (翻訳されたタンパク質) を生産し、市場 (細胞質や細胞外) に送り出す必要があるが、常に完璧な製品が作られるわけではなく、歩留まりは高くはない。実際、正常な細胞でもおよそ 30% のタンパク質は正しく生産されていないと考えられている²⁾。このため、工場で様々な検査をおこない、完璧な製品を送り出すように品質管理をおこなっているのと同じく、細胞においてもタンパク質の品質管理がおこなわれており、その役目の主な部分はユビキチンプロテアソーム系 (UPS) が担っている。UPS は細胞内で粗悪品とみなされたタンパク質にユビキチンが鎖のように結合し、それがタンパク質分解酵素であるプロテアソームに認識されて分解されるシステムである³⁾ (Fig. 1)。

しかし、変性疾患脳には高度にユビキチン化された凝集タンパク質が蓄積しており、何らかの原因で UPS によって分解を逃れた物が蓄積している事が想定される。つまり、疾患脳では UPS によるタンパク質の品質管理が不十分であり、正常な構造をとらずに凝集してしまう不良品タンパク質が脳内に蓄積していく過程が存在している。異常凝集タンパク質は細胞毒性を有するため、細胞内での異常凝集タンパク質の分解機構の詳細な検討は病態の把握、さらには治療法の開発にとって非常に重要であると考えられるようになった。

ユビキチンプロテアソーム系の限界とアグリソーム

細胞内の異常凝集タンパク質の蓄積は間接的なプロテアソーム活性の低下をひきおこす^{4)~7)} ため、凝集タンパク質の蓄積がさらに促進される悪循環が存在すると考えられる。細胞内の凝集タンパク質はその凝集の程度に応じて様々な状

態で存在する。すなわち、凝集以前の単量体、凝集初期のオリゴマー、そして多量体、凝集が進んだ状態での線維、そして高度に凝集した状態での封入体である。これらすべての状態に等しく細胞毒性があるというよりは、凝集初期のオリゴマー凝集体にもっとも強い細胞毒性があり⁸⁾⁹⁾、細胞内の封入体は細胞に保護的に作用している可能性が論じられるようになってきた¹⁰⁾¹¹⁾。

細胞内の封入体は個々の凝集タンパク質の集積だが、最初から凝集タンパク質のすべてが封入体に集中するわけではない。事実、培養細胞に易凝集性のタンパク質を発現すると、当初は細胞質に均一に分布していたものがある時点を境として一カ所の封入体に収束する様子が観察される。現在ではこのような現象の一部はある一定の秩序を持って封入体が成長する能動的な形成と考えられて、そのような特殊なメカニズムによって形成される封入体をアグリソーム (aggresome) と呼ぶ¹²⁾。アグリソームは UPS の働きが阻害された際に凝集タンパク質を処理するためのシステムで、凝集タンパク質を微小管およびモータータンパク質の働きを利用して微小管形成中心へと輸送することによって形成される封入体である (Fig. 2)。そして、アグリソームは細胞内の ATP を利用して形成される構造物であるため、封入体形成には何らかの目的があるという可能性が考えられる¹³⁾。

ライソゾームとオートファジー

神経変性疾患におけるライソゾームの関与については以前より多数報告があったが^{14)~18)}、疾患発症プロセスとの関連において詳細に検討された事はなかった。ライソゾームは内部が酸性の細胞内小器官であり、細胞外から取り込んだ分子の分解をエンドサイトーシスというメカニズムを通じて行う。オートファジーはオートファゴソームという細胞内構造物が分解基質を取り込み、その後にライソゾームと融合することで内容物が分解される。オートファジーにはマクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー、ミクロオートファジーがある。この中でマクロオートファジーは、非選

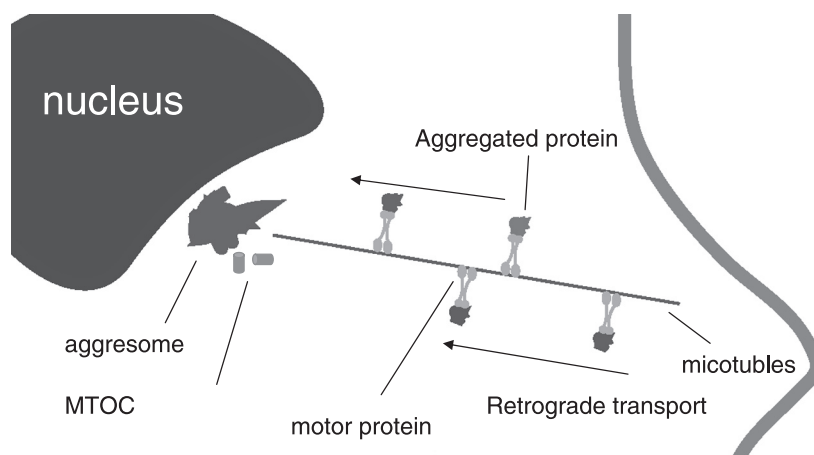


Fig. 2 The aggresome.

Aggregated proteins are brought to the microtubule organizing center by the motor proteins to a structure named aggresome.

ハンチントン病とオートファジー

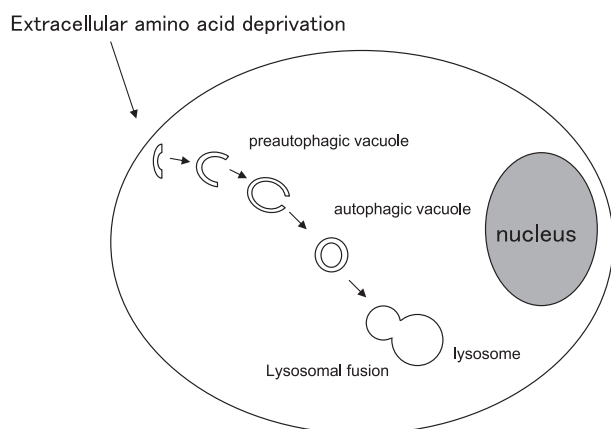


Fig. 3 Macroautophagy.

Macroautophagy is triggered by starvation. A cup shaped double membrane structure emerges in the cytoplasm and grows to form a complete sphere—an autophagic vacuole carrying various engulfed microorganelles—which finally fuses to the lysosome for the degradation of the inner components of the former.

択的なタンパク質分解システムであり、細胞質の分子、ミトコンドリアなどの細胞内小器官がオートファゴソームに取り込まれ、それがライソゾームと融合することで、取り込まれた細胞内小器官などが分解される (Fig. 3), その詳細な分子機構は Ohsumi の一連の研究により明らかにされた¹⁹⁾. それについての詳細は専門的な文献に譲るが、UPS が高度に分解基質の選択性を持つのに対して、オートファジーには選択性がないことが特徴的であるとされている。

ポリグルタミン病, とくにハンチントン病とオートファジー, ライソゾームとの関連についてはニューロンや患者細胞でオートファジーが活性化されているという報告があった²⁰⁾²¹⁾. また, ラバマイシンによって活性化される mTOR 経路を経たオートファジーの活性化により異常凝集タンパク質の量が減少することも判明している²²⁾²³⁾. そして, 実験動物においてオートファジーを活性化させる薬剤を投与することで症状や病理学的所見が改善することも示された²⁴⁾. すなわち, 外的刺激によるオートファジーの活性化が治療法の一つとしての可能性を有している。

一方, Yamamoto らは, 遺伝子発現の制御が可能なハンチントン病のモデルマウスを作成し, 病理学的に判別可能な封入体を形成させた状態で異常タンパクの発現を抑制することによって神経細胞内から封入体が消失することをみだした²⁵⁾²⁶⁾. 筆者はこの論文において封入体を消失させた現象に注目した. 神経細胞内の封入体は直径がマイクロメートルの単位であり, プロテアソームの 0.1 nm の内径で処理できる大きさでは到底ない. 一方でオートファジーとライソゾームはミトコンドリアのような細胞内小器官の分解が可能である。

このため, われわれはまずオートファジーの実行分子 Atg5, Atg8, Atg12, Atg16L タンパク質, そしてライソゾームのマーカー cathepsinD, Rab7 に対する特異的抗体を作成, それぞれについて培養細胞におけるハンチントン病の原因タンパク質による細胞質ハンチンチン封入体を染色した. われわれが試した細胞すべてにおいてハンチンチン封入体の周辺部が染色され, オートファジーに必要なタンパク群が封入体近傍に集積していることが示された (Fig. 4). また, ポリグルタミンとも無関係な凝集タンパク質で実験的に作成した封入体も Atg8 陽性であった (Fig. 5). さらに, オートファジーのコンポーネントに対する特異的遺伝子ノックダウンによっ

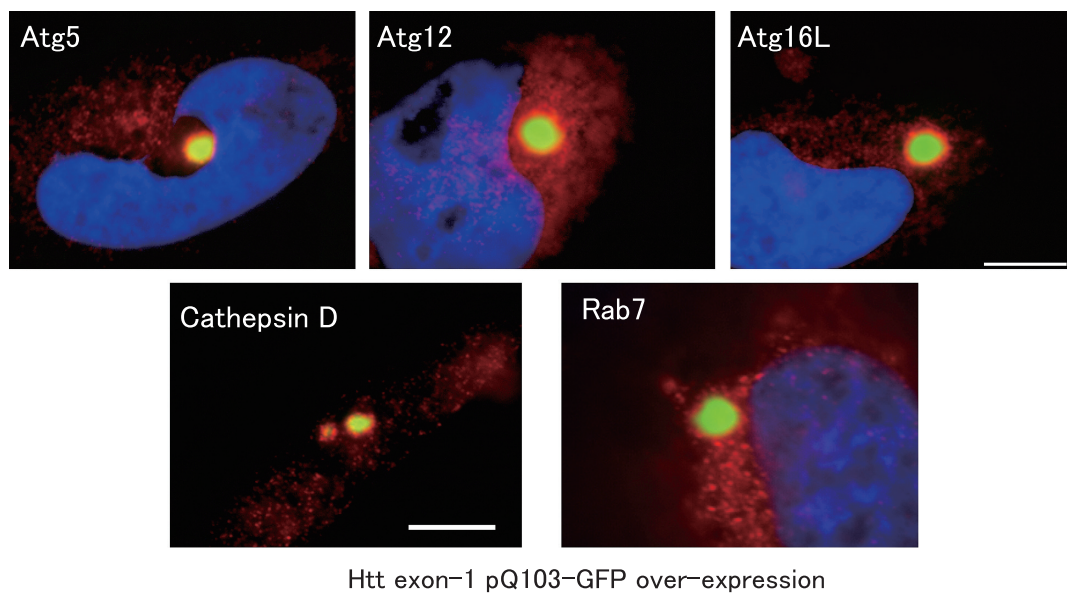


Fig. 4 Huntingtin inclusion bodies are decorated by various autophagy components. Inclusion bodies formed by Q103 huntingtin exon-1 are immunostained by various antibodies related to autophagies and lysosomes. The inclusion bodies are surrounded by Atgs and two lysosomal markers, cathepsin D and Rab7. Bar=10 μ m

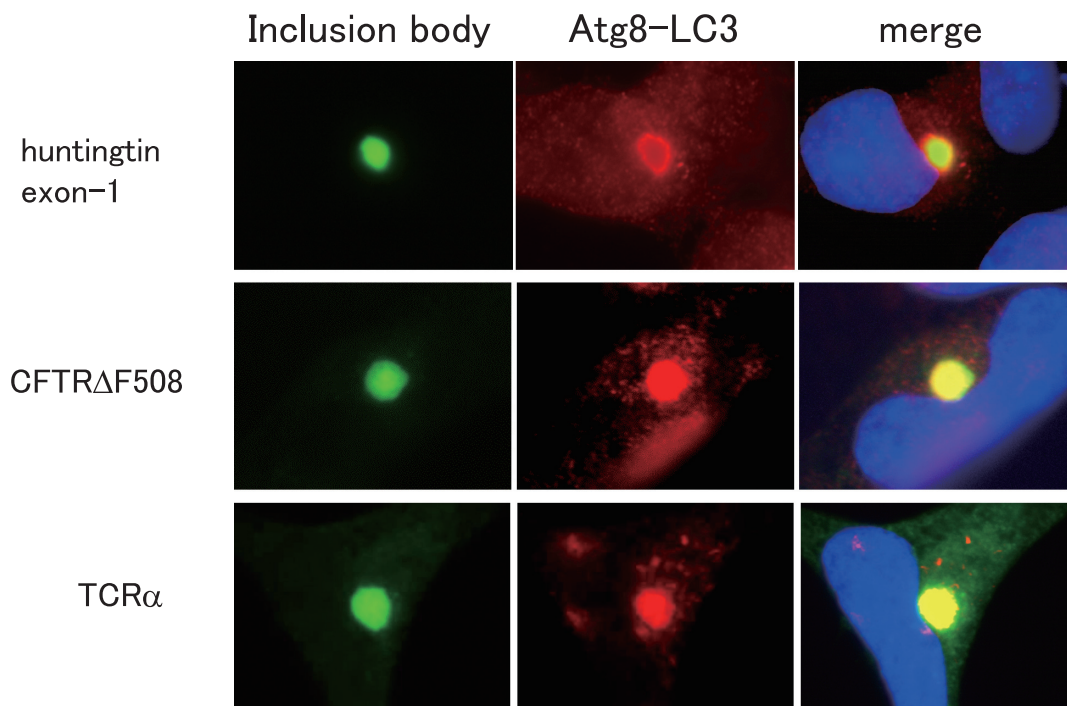


Fig. 5 Various inclusion bodies are Atg8 positive. Polyglutamine, CFTR and TCR-alpha aggresomes are immunostained by Atg8 antibodies.

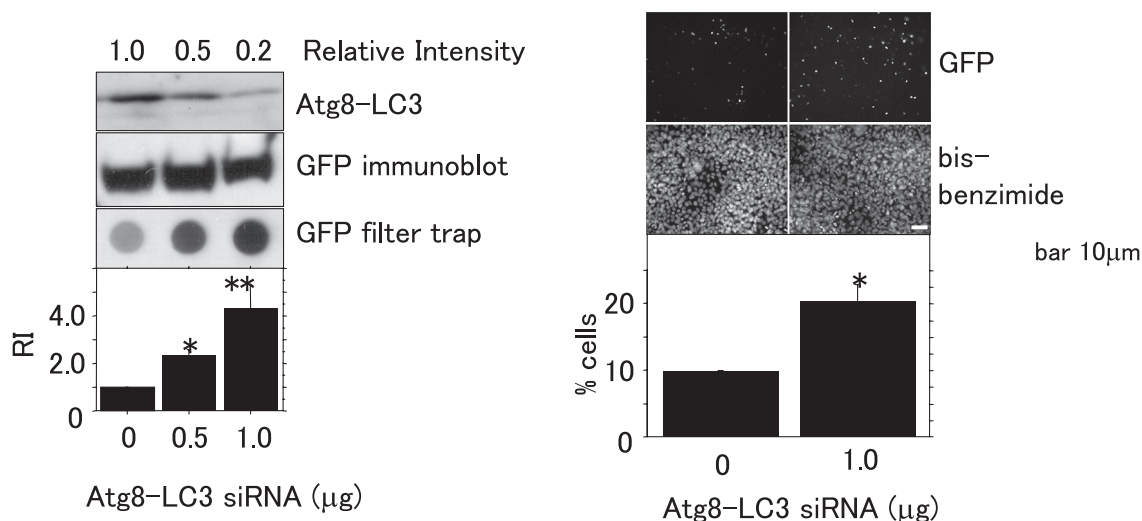


Fig. 6 Autophagy inhibition blocks aggregate degradation.

Filter trap assay and inclusion body counting reveals that LC3 knockdown resulting in polyglutamine aggregate increase.

て凝集タンパク質の分解が阻害される事が示された (Fig. 6).

これによって、凝集タンパクの蓄積によってオートファジーが活性化される可能性が示唆されただけでなく、細胞質タンパク質を非特異的に分解するためのオートファジーというメカニズムに必要なタンパク質群が、封入体という特異的構造物の周囲に集積することが示された²⁷⁾.

オートファジーによるユビキチンプロテアソームのバックアップ

ニューロンでのオートファジーの活性環因子は他の細胞とことなり餓餓ではない²⁸⁾. われわれは凝集タンパク質の蓄積にともなうオートファジーが活性化されることより、プロテアソームの阻害がオートファジーの活性化因子ではないかと考えた. そこで様々なプロテアソーム阻害剤によって細胞を処理し、オートファジーがプロテアソーム阻害によって活性化されることを示したが、これはオートファジーがUPSのバックアップをおこなっている可能性を示唆している²⁹⁾. またさらに、オートファジー関連遺伝子 Atg7 のノックアウトマウスにおいては細胞内にユビキチン化タンパク質が高度に蓄積することが示されており、オートファジーは定常状態でもUPSをバックアップしていると考えられる³⁰⁾. オートファジーの活性化は発癌抑制³¹⁾³²⁾, 長寿との関連³³⁾が示唆されており、UPSと共働して細胞内異常タンパク質の浄化による細胞内のタンパク質品質管理を担っていることが強く示唆される.

HDAC6 とオートファジー

われわれのさらなる疑問は、凝集タンパク質を ATP を使

用してまで微小管形成中心へと輸送する現象を支える中心となるタンパク質が何であるかであったが、アグリソーム形成に重要なタンパク質として HDAC6 が報告された³⁴⁾ 事で、その答えをえることができた. HDAC6 はユビキチン化タンパク質に一端で結合し、また一端では微小管と関連することで、ユビキチン化された凝集タンパク質をアグリソームへと集積する働きがある. われわれはその特異性に注目し、HDAC6 の機能を阻害するとオートファジーによるポリグルタミン凝集タンパク質の分解が抑制されること²⁹⁾, つまり封入体近傍での凝集タンパク質のオートファジーによる分解には HDAC6 が必要であることを解明したのである (Fig. 7). 換言すれば、われわれは、それまで「非特異的」なタンパク質分解機構と考えられていたオートファジーが、凝集タンパク質にかざれば特異的にそれらを見つけ出し、分解する事が可能な機構である事をみだしたことになるが、当時はこの考え方はあまり受け入れられなかった.

オートファジーと凝集タンパク質のその後

われわれの研究の後、さらにこの分野は発展し、「特異的」オートファジーについての知見はほぼ確立したといつて良い. とくに凝集タンパク質にかざっていえば、p62³⁵⁾, alfy³⁶⁾といった一連のタンパク質がユビキチンなどに結合することで「特異的オートファジーの基質」である事を示し、それらがオートファゴソームに取り込まれ、分解を受ける事が示されている.

臨床においてはオートファジーを活性化する薬剤による疾患治療へ向けた研究が進められるようになった. 今後、この分野の研究がさらに発展することで根本治療の実現を可能にしていきたい.

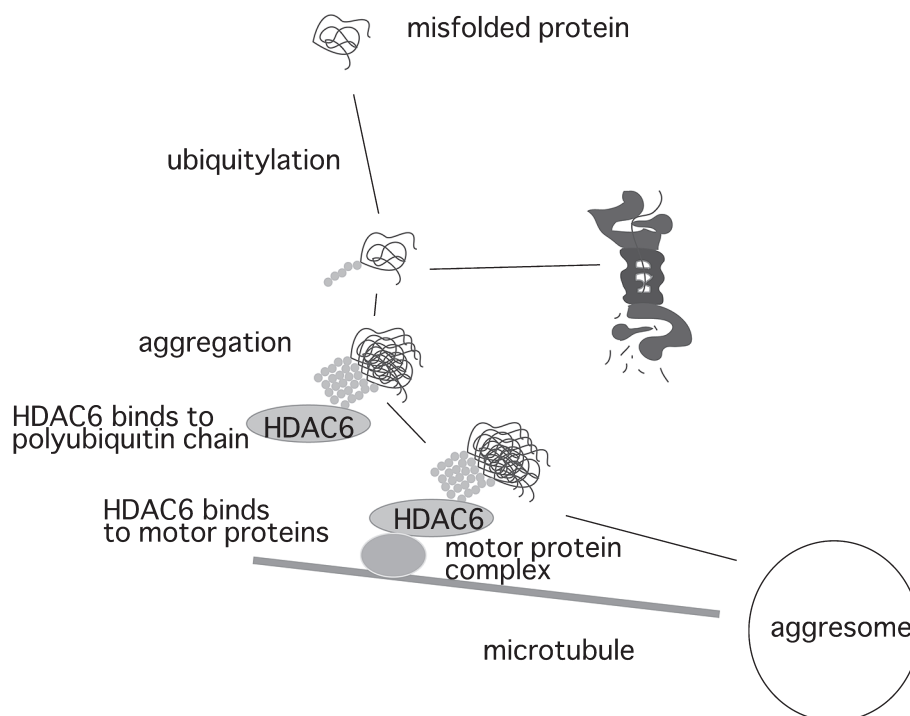


Fig. 7 Role of HDAC6 in aggresome formation.

HDAC6 scaffolds aggregate and motor protein to enrich aggregated polyglutamine and autophagy components to MTOC.

謝辞：以上の研究は、平成 14 年度より平成 17 年度にかけて東京大学医学部附属病院神経内科日本学術振興会特別研究員、スタンフォード大学 BIO-X ポスドク研究員としておこないました。研究においてはスタンフォード大学 Ron Kopito 教授、理化学研究所脳科学総合研究センター貫名信行チームリーダー、そして東京大学大学院医学系研究科神経内科辻省次教授、そして東京大学名誉教授金澤一郎先生に多大なご指導を賜りました。この場をお借りして深謝いたします。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業・組織や団体
寄付講座：ヤンセンファーマ

文 献

- Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Gene* 2005;6: 743-755.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770-774.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;82:373-428.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001;292: 1552-1555.
- Bennett EJ, Bence NF, Jayakumar R, et al. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 2005;17:351-365.
- Hipp MS, Patel CN, Bersuker K, et al. Indirect inhibition of 26S proteasome activity in a cellular model of Huntington's disease. *J Cell Biol* 2012;196:573-587.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang G, et al. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 2001;10:1049-1059.
- Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 2002;416:507-511.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003;300:486-489.
- Tanaka M, Kim YM, Lee G, et al. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem* 2004; 279:4625-4631.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, et al. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004;431:805-810.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 1998;143:1883-1898.
- Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein

- aggregation. *Trends Cell Biol* 2000;10:524-530.
- 14) Okamoto K, Hirai S, Iizuka T, et al. Reexamination of granulo-vacuolar degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991;82:340-345.
 - 15) Nakano I, Shibata T, Uesaka Y. On the possibility of autolysosomal processing of skein-like inclusions. Electron microscopic observation in a case of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1993;120:54-59.
 - 16) Nixon RA, Cataldo AM. The endosomal-lysosomal system of neurons: new roles. *Trends Neurosci* 1995;18:489-496.
 - 17) Sapp E, Schwarz C, Chase K, et al. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 1997;42:604-612.
 - 18) Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res* 2000;25:1161-1172.
 - 19) Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:211-216.
 - 20) Kegel KB, Kim M, Sapp E, et al. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 2000;20:7268-7278.
 - 21) Nagata E, Sawa A, Ross CA, et al. Autophagosome-like vacuole formation in Huntington's disease lymphoblasts. *Neuroreport* 2004;15:1325-1328.
 - 22) Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 2002;11:1107-1117.
 - 23) Ravikumar B, Stewart A, Kita H, et al. Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum Mol Genet* 2003;12:985-994.
 - 24) Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004;36:585-595.
 - 25) Martin-Aparicio E, Yamamoto A, Hernandez F, et al. Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2001;21:8772-8781.
 - 26) Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 2000;101:57-66.
 - 27) Iwata A, Christianson JC, Bucci M, et al. Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13135-13140.
 - 28) Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004;15:1101-1111.
 - 29) Iwata A, Riley BE, Johnston JA, et al. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* 2005;280:40282-40292.
 - 30) Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005;169:425-434.
 - 31) Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999;402:672-676.
 - 32) Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003;112:1809-1820.
 - 33) Melendez A, Tallochy Z, Seaman M, et al. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 2003;301:1387-1391.
 - 34) Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, et al. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 2003;115:727-738.
 - 35) Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005;171:603-614.
 - 36) Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, et al. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alf1. *Mol Cell* 2010;38:265-279.

Abstract**Identification and significance of a novel degradation system for polyglutamine aggregates**Atsushi Iwata, M.D., Ph.D.¹⁾¹⁾ University of Tokyo Hospital, Department of Neurology

In neurodegeneration, accumulation of aggregated protein results in the formation of inclusion bodies, which is a pathological hallmark of the diseases. There are various forms of aggregates; from oligomers to filaments and to inclusion bodies, of which small species such as oligomers are considered to be more toxic compared to tightly packed inclusion bodies. *In vitro* experiments show that artificial inclusion bodies called aggresomes are generated with motor proteins and microtubules, which represents cellular effort to manage aggregated proteins. We showed that the aggresomes are formed in order to concentrate autophagy components and aggregates in order to give specificity to autophagy against aggregated proteins, thus facilitating their selective degradation.

(Clin Neurol 2013;53:1-8)

Key words: polyglutamine, autophagy, aggresomes, ubiquitin proteasome, HDAC6
