

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	萬野 篤
論文題目	神経変性疾患と IBMPFD の発症機構における VCP とその補因子の役割		
(論文内容の要旨)			
パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症やポリグルタミン病といった様々な神経変性疾患では、神経細胞に異常蛋白質の凝集が起き、その後神経細胞死に至るという共通の発症機構があると考えられている。申請者の属する研究室では、ポリグルタミン病原因蛋白質の伸長したポリグルタミン鎖に結合するタンパク質として VCP (valosin-containing protein)とよばれる細胞内の主要な ATPase を同定し、ポリグルタミン病や様々な神経変性疾患で見られる凝集体に VCP が共局在していることを見出した。さらに近年、ヒトの優性遺伝病である IBMPFD (inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia)の原因遺伝子として VCP が同定され、IBMPFD 患者の神経細胞や筋肉細胞内に抗 VCP 抗体陽性の凝集体が観察された。しかし、VCP が凝集体に局在している理由や、IBMPFD の発症機構における VCP の役割はいまだ明らかになっていない。そこで申請者は、神経変性疾患や IBMPFD の発症機構を明らかにするために、神経変性疾患や IBMPFD で見られる凝集体形成における VCP と VCP の補因子の役割を解明しようと試みた。 1. 凝集体形成機構における VCP と補因子の役割 培養細胞にプロテアソーム阻害剤を処理するとユビキチン化蛋白質の凝集体が形成される。また、伸長したポリグルタミンを発現させることでもポリグルタミンの凝集体が形成される。これらの凝集体形成における VCP の経時的観察を行うと、いずれもまず VCP がユビキチン化蛋白質やポリグルタミンの局在する小さな凝集体を形成し、その後小さな凝集体が核近辺に集まっていくことが観察された。さらに、核内移行シグナル(NLS)を付与した VCP(NLS-VCP)を発現させた細胞では核内に凝集体を形成した。一方、NLS を付与した ATPase 活性を失った VCP 変異体を発現させた細胞では核内での凝集体形成が抑制されることが明らかになった。また、VCP のみならず、VCP の補因子の内 Ufd1 と Npl4、さらに、Ufd1 と Npl4 とともに小胞体関連分解に関わることが示されている Derlin-1 の共局在が観察され、これらの蛋白質のいずれかの発現を siRNA によりノックダウンすると、凝集体の形成が抑制された。以上の結果から、VCP と小胞体関連分解に関わると想定されている VCP の補因子が凝集体形成機構に関与していることが示された。 2. IBMPFD の発症機構における VCP と補因子の役割 IBMPFD の発症機構を解明する目的で、IBMPFD で同定された VCP 変異体 (IBMPFD-VCP)のうち初期に同定された 6 つについて機能解析を行った。その結果、ほ乳動物の細胞に発現させたこれら 6 つの IBMPFD-VCP は、全てにおいて凝集体形成能と ATPase 活性が亢進していることが明らかになった。さらに、これらの IBMPFD-VCP は、Ufd1 と Npl4、さらには、Ufd1 と Npl4 を介してポリユビキチン化された蛋白質との結合能が亢進していることが明らかになった。一方、<i>Drosophila</i> のポリグルタミン病複眼変性モデルにおいて、IBMPFD-VCP や ATPase 活性が亢進している VCP(T761E) といった別の VCP 変異体の共発現によって複眼変性を増悪させたが、この時、ポリグルタミンの凝集体形成の亢進は観察されなかった。以上の結果から、IBMPFD 発症には、VCP の ATPase 活性の亢進がより密接に関与する可能性が示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

パーキンソン病やポリグルタミン病といった神経変性疾患の病変部位では、神経細胞の脱落がみられ、また、残存神経細胞には異常な蛋白質の凝集体が観察される。これらのことから、神経変性疾患には、異常な蛋白質の蓄積に関連した共通の発症機構が存在すると推測されるようになってきた。申請者の属する研究室で、ポリグルタミン病の 1 つである Machado-Joseph 病の原因遺伝子産物と結合する蛋白質として同定された VCP という細胞内の主要な ATPase は、ポリグルタミンのみならず、複数の神経変性疾患で細胞内の凝集体と共局在する。その後、この VCP 内に 1 アミノ酸置換をもたらす遺伝子変異によってヒトの優性遺伝病 IBMPFD が引き起こされることが報告された。

本論文は、第一章で、多くの神経変性疾患に共通して観察される異常な蛋白質の凝集体の形成機構における VCP とその補因子の役割の解析を行い、以下の点を明らかにした。

1) GFP を融合した VCP(GFP-VCP)を発現させた細胞をプロテアゾーム阻害剤で処理し GFP シグナルを経時的にトレースすると、GFP シグナルはまず小さい凝集像として観察され、その後、それらが融合して大きな凝集像に変化していくことが観察された。同様な VCP の挙動が、伸長したポリグルタミンを発現させた細胞においても観察された。

2) 核移行シグナルや核外移行シグナルをつけた VCP の発現によって、異常蛋白質の凝集体は、それぞれ核内と核外に際だって形成された。一方、核移行シグナルを付けた場合でも ATPase 活性を失った VCP を発現させた場合には、核内での異常蛋白質の凝集体の形成は顕著に抑制された。

3) 異常蛋白質の凝集体には、VCP のみならず、VCP の補因子の内 Ufd1 と Npl4、さらに、Ufd1 と Npl4 とともに小胞体関連分解に関わることが示されている Derlin-1 の局在が観察された。

4) VCP のみならず、Ufd1、Npl4、Derlin-1 のいずれかを siRNA によってノックダウンした場合に、異常蛋白質の凝集体の形成が抑制された。

第 2 章では、IBMPFD に同定された変異 VCP(IBMPFD-VCP)のうち、初期に報告された 6 つの変異体について機能解析を行い、以下の点を明らかにした。

1) ほ乳動物細胞に発現させたこれらの IBMPFD-VCP は、プロテアゾーム阻害剤で処理した場合及びポリグルタミンを共発現させた場合に、野生型 VCP を発現させた場合に比べ凝集体形成の亢進が観察された。また、野生型 VCP に比べて有意に ATPase 活性の亢進が認められた。

2) ほ乳動物細胞に発現させたこれらの IBMPFD-VCP は、Ufd1 と Npl4、さらには、Ufd1 と Npl4 を介してポリユビキチン化された蛋白質との結合能が亢進していた。

3) *Drosophila* のポリグルタミン病複眼変性モデルにおいて、ATPase 活性の亢進している IBMPFD-VCP などの VCP 変異体の共発現によって、複眼の変性の増悪が観察された。しかしこの時、凝集体形成の亢進は観察されなかった。

本研究により、神経変性疾患において観察される異常な蛋白質の凝集体の形成において、VCP は、Ufd1、Npl4 などと協調的に働き、異常蛋白質を認識・結合し、さらには、それらを集めて大きな凝集体を形成する作用を担うことが示された。一方、IBMPFD を発症させる変異 VCP では、凝集体形成能の亢進と ATPase 活性の亢進が認められ、その内、後者の方が、より神経細胞の障害に関与している可能性が *Drosophila* でのモデル実験で示された。

以上、本論文は、神経変性疾患に認められる異常な蛋白質の凝集体の形成機構とヒトの遺伝病 IBMPFD の発症機構に対し極めて重要な知見を提供したものとして、博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 23 年 7 月 6 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公開可能日：2012 年 3 月 31 日