

代表的神経・精神疾患と脳内神経細胞質封入体

Stigmoid body との細胞内相互関連について

(Intracellular Interaction of Stigmoid Body with  
Representative Neurological and Psychiatric Disorders)

竹下幸男

山口大学大学院医学系研究科システム統御医学系専攻  
高次神経科学領域機能神経解剖学分野

平成 23 年 1 月 12 日作成

平成 23 年 1 月 25 日修正

## 目次

1. 要旨 (p.3)
2. 研究の背景 (p.4-5)
3. 目的 (p.6)
4. 方法 (p.6-8)
  - ① 「発現 vector の作成」
  - ② 「細胞培養と培養細胞への transfection」
  - ③ 「Western blot 法、蛍光免疫細胞化学法および細胞 count 法」
  - ④ 「免疫沈降法と定量解析」
5. 結果 (p.9-16)
  - ① 「HAP1 と標的分子(Ataxin-1, Ataxin-3Q27,  $\alpha$ -synuclein, UCH-L1, APP, TDP-43 and MAO-) 発現 vector の発現確認」
  - ② 「HAP1 と標的分子との共発現」
  - ③ 「HAP1/STB との細胞内相互関連に必須な Ataxin-3 の domain の決定」
  - ④ 「SCA3 由来 PolyQ 伸長型 Ataxin-3 との細胞内相互関連」
6. 考察 (p.17-18)
7. 結語 (p.19)
8. 参考文献 (p.20-24)
9. Table 1. (p.25)

## 【要旨】

Huntingtin-associated protein1(HAP1)は脳内神経細胞質封入体 Stigmoid body(STB)の必須構成因子であり、Huntington disease(HD)の原因蛋白質 huntingtin(Htt) や spinal-and-bulbar-muscular-atrophy (SBMA)の原因蛋白質 androgen receptor(AR)の結合因子として、これらの疾患に対し神経細胞保護的に働くとされている。最近になり、HAP1/STB は spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17)の原因分子である TATA-binding protein (TBP)や Joubert syndrome や schizophrenia の原因分子とされる Abelson helper integration site 1 (Ahi1)との関与が明らかとなり、HAP1/STB は HD、SBMA、SCA17 などの CAG repeat 病だけでなく精神・神経疾患などの広範囲の疾患群に関与する可能性が示唆されている。そこで、本研究では、HAP1/STB が他の精神・神経疾患にも関与する可能性があるかを検討するために、代表的な神経・精神疾患の病態に強く関与するとされる分子に注目し、正常ヒト脳 RNA よりこれらの標的分子の正常型をクローニングし、発現 vector を作成した。培養細胞 Neuro2A 細胞において標的分子と HAP1 を共発現させ、蛍光免疫細胞化学法により HAP1/STB と細胞内局在が一致する分子をスクリーニングし、HAP1/STB と細胞内局在が一致した標的分子については疾患由来の mutant との親和性の比較についても蛍光免疫細胞化学法、免疫沈降法により検討した。その結果、HAP1/STB の新たな関連分子として spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)の原因分子である Ataxin-3 を同定した。さらに HAP1/STB は正常型 Ataxin-3 の Josephin domain を介して結合し、SCA3 由来の Polyglutamine (PolyQ)伸長型 Ataxin-3 と同程度の親和性を示すことも明らかにした。これらの結果は HAP1/STB が Ataxin-3 の生理機能を修飾していることを示唆しているだけでなく、SCA3 の病態発生にも関与している可能性を示唆すると思われる。

## 【研究の背景】

STB は、これまでの我々の研究において、ほ乳類正常脳内で同定された直径 0.5~4 $\mu$ m の神経細胞質封入体であり[1,2]、視床下部、辺縁系に局在することが明らかにされている[1-6]。近年、ハンチントン病(HD)の関連分子である huntingtin-associated protein 1 (HAP1)を培養細胞へ導入すると STB に類似した構造を形成することが報告された[7]。ラット脳内においても HAP1 の免疫組織化学的手法により電子顕微鏡下で STB 内に HAP1 が検出され[4]、ラットおよびマウスの HAP1mRNA の脳内分布が STB の脳内分布と一致することが示されている[8,9]。さらに HAP1 のノックアウトマウス(ヘテロ型)において、STB の数が減少することが明らかとなり[5]、HAP1 は STB 形成に必須の構成因子であるとともに STB の検出マーカーとして考えられている[6]。さらに我々は、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病などのいわゆるコンフォメーション病にみられるアグリソームと呼ばれる異常蛋白質封入体に特徴的なユビキチン化やビメンチンによる取り囲み像が、STB では認められないこと明らかにした[10]。つまり STB は病的状況で形成されるアグリソームとは全く異なるものであり、生理的状況下で形成される何らかの生理的機能を持つ封入体であると考えられている。

HAP1 は HD の原因分子 Htt と Htt の PolyQ 鎖長依存的に結合する分子として同定され[11]、polyQ 伸長 Htt が引き起こす細胞死に対し細胞保護的に働くことが示されている[9,12]。さらに、HD 同様、代表的な CAG repeat 病である SBMA の原因分子である AR に対しても、HAP1 が AR の PolyQ 鎖長依存的に AR の Ligand-binding domain を介して結合し、PolyQ 伸長型 AR が Ligand 依存的に引き起こす細胞死を抑制することを我々は報告している[13]。最近、HAP1 が CAG repeat 病の一つである SCA17 の原因分子である TBP とも結合し、さらに PolyQ 伸長型 TBP についても正常型 TBP と同程度の親和性を示すことが明らかとなり、SCA17 の病態へ関与が報告された[14]。さらに CAG repeat 病ではない精神疾患の Joubert syndrome や統合失調症の原因分子とされる Ahi についても疾患変異体 Ahi と HAP1 との細胞内関連が示され、これらの疾患の病態関与が示唆されている[15,16]。これらの報告は、HD や SBMA だけでなく SCA17、Joubert syndrome や統合失調症においても HAP1/STB が神経細胞保護的に作用しう

ることを示しており、神経細胞において HAP1/STB の発現が神経毒性の脆弱性に対する閾値を増加させ、神経細胞の安定性に寄与するという我々が提唱した「HAP1/STB protection hypothesis」[9]を裏付けるものとなっている。しかし、この仮説がどの程度の疾患群に適用されるかについては未だ不明である。

そこで、HAP1/STB が他の神経変性疾患や精神疾患に関与する可能性があるかを評価するために、第一に代表的な神経変性疾患、精神疾患の発症原因に強く関与するとされるいくつかの分子を正常ヒト brain RNA library からクローニングし発現 vector を作成した。クローニング分子としては、amyloid precursor protein (APP) ; Alzheimer 型認知症[17]、 $\alpha$ -synuclein、ubiquitin carboxy-terminal esterase L1 (UCH-L1) ; Parkinson 病[18,19]、Transactive Response DNA-binding Protein of 43kDa (TDP-43); amyotrophic lateral sclerosis[20]、Ataxin-1 ; spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)[21]、Ataxin-3 ; spinocerebellar ataxiat type 3 (SCA3) [22]、monoamine oxidase A (MAO-A) ; 統合失調症[23]とした。第二に、スクリーニングテストとして、神経系培養細胞 Neuro2A にこれらの分子と HAP1 と共発現させ、免疫細胞化学法を用いて両者の細胞内局在が一致するかについて検討した。HAP1/STB と細胞内局在が一致した分子については、その分子の重要な領域を欠失させたいくつかの deletion mutants を作成し、HAP1 との相互作用に重要な領域を決定した。最後に蛍光免疫細胞化学法、免疫沈降法を用いて HAP1/STB における疾患由来変異体と正常型との細胞内相互関連について検討し、疾患への関与の可能性について検討した。本研究では、Ataxin-3 を HAP1/STB の新たな結合因子として初めて同定したこと報告する。

## 【目的】

HAP1/STB が多くの神経・精神疾患の病態に関与する可能性があるかを明らかにするために、第一に代表的神経・精神疾患に強く関与するとされる分子の正常型をクローニングし発現 vector を作成する。第二に神経系培養細胞である Neuro2A にそれらの分子を HAP1 と共発現させ、免疫細胞化学法を用いて HAP1/STB との細胞内局在が一致するもののスクリーニングを行う。最後に、免疫細胞化学法や免疫沈降法を用いて、HAP1/STB と細胞内局在が一致した分子について、HAP1/STB との結合領域の決定や、疾患由来 mutant を用いた細胞内相互関連を明らかにし、病態への関与の可能性を検討する。

## 【方法】

### 「発現 vector の作成」

本研究において発現 vector の作成の際に使用したプライマーは table1 (文末) に記載した。HAP1 cDNA は Invitrogen 社の Full-length Human Clone Collection により PCR 法にて増幅し、制限酵素 *EcoRI*、*XhoI* にて制限酵素処理した後、Invitrogen 社の pcDNA3 vector に挿入した。Ataxin-1、 $\alpha$ -synuclein、UCH-L1、APP、TDP43、MAO-A の cDNA は Clontech 社の human brain total RNA により RT-PCR 法にて増幅した後、Clontech 社の Gateway technology を用いて entry vector である pDONR201 vector (Clontech) に挿入後、発現 vector の p3 x FLAG-CMV-10 vector (SIGMA) に挿入した。Full-length human normal Ataxin-3 (Ataxin-3Q27) と SCA3 患者由来の polyQ 伸長型 Ataxin-3 (Ataxin-3Q79) の cDNAs は、京都大学の垣塚彰教授より提供を受け [22,24]、Gateway technology を用い、発現 vector の p3 x FLAG-CMV-10 vector (SIGMA) に挿入した。作成した発現 vector は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) を用いてシーケンス反応を行い、DNA 配列を確認した。

### 「細胞培養と培養細胞への transfection」

培養細胞は、Mouse neuroblastoma cell line である Neuro2A 細胞を用いた。

Dulbecco's-modified-Eagle's-medium (DMEM) (Gibco BRL)に 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)と penicillin G sodium (100 UI/ml) と streptomycin sulphate (100  $\mu$ g/ml)を添加したものを培養液とし、37°C、加湿した環境下(5% CO<sub>2</sub>-95% air)で培養した。Transfection 試薬は、Jet PEI transfection reagent (Polyplus-Transfection)を使用した。

「Western blot 法、蛍光免疫細胞化学法および細胞 count 法」

Western blot 法：培養細胞を 6-well plate で培養し、発現 vector を transfection 後 48 時間培養した細胞を遠心分離により集めた。サンプルを 5 秒間超音波処理し、10% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動により蛋白を分離した。semi-dry transfer 装置を用いて、PVDF-membrane に transfer した。PVDF-membrane を、0.1% Tween-20 を含む Tris-buffered saline (TBST) で希釈した 5% skim-milk に 1 時間浸した。TBST で membrane を洗浄した後、一次抗体として rabbit anti-HAP1 polyclonal antibody (HAP1 H-300, Santa Cruz Biotechnology)または mouse anti-FLAG monoclonal antibody (FLAG-M5, Sigma-Aldrich)を用いて室温で membrane に反応させた。再び TBST で membrane を洗浄後、secondary antibody (horseradish peroxidase labeled anti-rabbit IgG 或いは、anti-mouse IgG, Amersham Pharmacia Biotech)を用いて室温で membrane に反応させた。再度 TBST で複数回 membrane を洗浄し、ECL kit (Amersham, Arlington Heights, IL)で可視化させ、反応を見た。

蛍光免疫細胞化学法：発現 vector 導入後、phosphate-buffered saline (PBS)で希釈した 4% paraformaldehyde を培養細胞に反応させた。その後、PBS で 3 回細胞を洗浄し、0.5% Triton X /PBS を細胞に浸透させ、PBS で希釈した 5% normal goat serum (NGS)を室温で反応させた。その後を rabbit anti-HAP1 polyclonal antibody (HAP1 H-300, Santa Cruz Biotechnology)または mouse anti-FLAG monoclonal antibody (FLAG-M5, Sigma-Aldrich)用いて、4°Cで反応させた。PBS で 3 回洗浄後、二次抗体 として Donkey anti-mouse IgG Alexa 594 または Donkey anti-rabbit IgG Alexa 488 (Molecular Probes)を用いて室温で反応させた。最後に PBS で数回洗浄した。解析は 山口大学遺伝子実験施設において image analysis software program Meta Morph (Universal

Imaging Corp, West Chester, PA, USA).を用いて蛍光顕微鏡下で行った。

細胞 count 法：両者の細胞内局在が一致している細胞の数を HAP1/Ataxin-3-double-labeled cytoplasmic-aggregation formation (HA3-CAF)として count し、Ataxin-3 と HAP1 が共発現している細胞の数あたりの割合を HA3-CAF ratio とした。X20 倍の視野で 3 視野ずつ細胞の count を行い、得られた data を Mann-Whitney's U test(信頼区間 95%)にて統計処理を行った。

#### 「免疫沈降法と定量解析」

免疫沈降法：FLAG Immunoprecipitation Kit (Sigma Aldrich)を用いた。100 mm dish に HAP1 と Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79、ATX3 1-510、ATX3Q27 511-1083 をそれぞれ共発現させ、48 時間後に細胞を回収し lysis buffer にて蛋白質を抽出させた。mouse monoclonal anti-FLAG M2 affinity gel を加え、4°C で 10 時間攪拌し、anti-FLAG M2 affinity gel に結合した蛋白質を沈降させ抽出した。沈降物を SDS-sample buffer 内で煮沸させ、rabbit anti-HAP1 polyclonal antibody (HAP1 H-300, Santa Cruz Biotechnology)を用いて、Western blot 法を行った。

定量解析: Western blot 法により得られた band を *Scion Image*® processing and analysis program (Scion Corporation)を用いて定量化し、input の HAP1 band で標準化し、Statcle software (OMS)を用いて、Fisher's post-hoc least significant difference test 法にて(信頼区間 95%)統計処理を行った。

## 【結果】

### HAP1 と標的分子 (Ataxin-1, Ataxin-3Q27, $\alpha$ -synuclein, UCH-L1, APP, TDP-43 and MAO-) 発現 vector の発現確認

HAP1 及び標的分子発現 vector を Neuro2A 細胞に transfection した。transfection された細胞から得られた lysate に対し、それぞれ HAP1 抗体、FLAG 抗体で Western blot 法を行い、予想される分子量の band を得た (Fig.1 A and B)。次に HAP1 を transfection した細胞に対し、蛍光免疫細胞化学法を行い蛍光顕微鏡下で観察すると、以前より報告している [7,9,10] STB と類似した HAP1 陽性の細胞質封入体 (HAP1/STB) を認めた (Fig.1 C)。また、蛍光免疫化学法により作成した標的分子の発現 vector の細胞内局在を観察したところ、Ataxin-1 と TDP-43 では、主に核内にその発現を認め (Fig.1 D and I)、Ataxin-3Q27, APP, MAO-A においては、主に細胞質に発現が見られた (Fig.1 E, H and J)。UCH-L1、 $\alpha$ -synuclein は核内、細胞質両方に分布し細胞全体に発現を認めた (Fig. F and G)。これらの標的分子の細胞内局在については過去の報告と同一であった [25-32]。

Figure 1

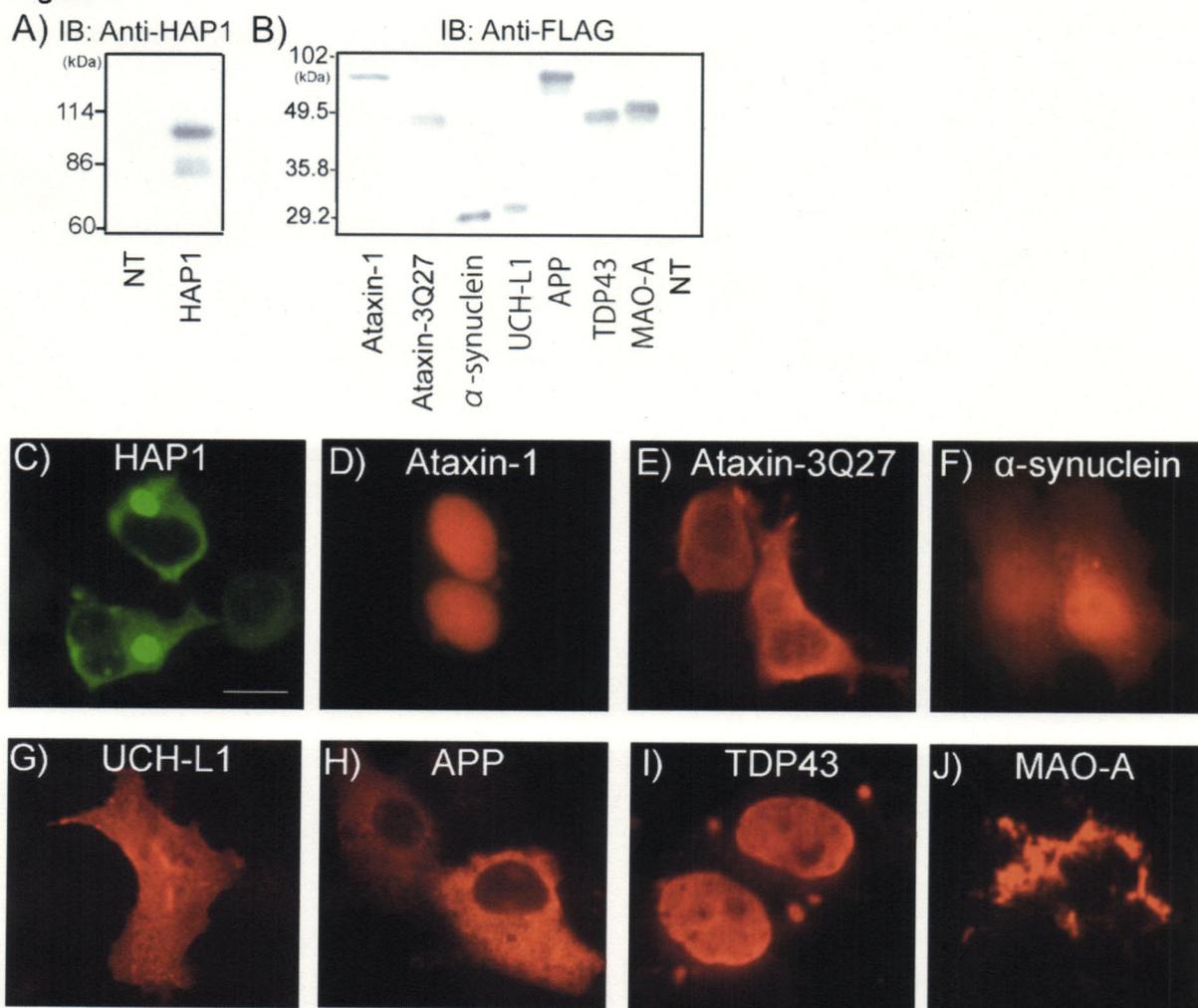


Fig1. Neuro2A における HAP1 と標的分子の発現

A and B) 抗 HAP1 抗体及び抗 FLAG 抗体を用いた HAP1、FLAG tag が付加された標的分子 (Ataxin-1, Ataxin-3Q27,  $\alpha$ -synuclein, UCH-L1, APP, TDP-43, MAO-A) の Western blots 法。分子量はパネルの左側に記載。C-J) HAP1 及び各標的分子を transfection した培養細胞における蛍光免疫細胞化学法。(bar = 10  $\mu$ m)

## HAP1 と標的分子との共発現

HAP1/STB と標的分子の細胞内局在が一致するかを明らかにするために、HAP1 と標的分子を Neuro2A 細胞に共発現させ、蛍光免疫細胞化学法によりそれらの細胞内局在を検討した。HAP1 と Ataxin-3Q27 との共発現において、HAP1-Ataxin-3 両陽性細胞質封入体を認めた(Fig.2 D-F)。一方、Ataxin-3Q27 以外の分子については、HAP/STB との両陽性細胞質封入体は見られなかった(Fig.2 A-C, and G-U)。HAP1/STB が細胞質に発現しているにも関わらず、Ataxin-1 は核内のみ発現がみられ、 $\alpha$ -synuclein, UCH-L1, APP and MAO-A は細胞質全体に発現がみられたが、HAP1/STB と細胞内局在が一致する封入体の形成はみられなかった(Fig.2 G-O and S-U)。TDP-43 については、細胞質に封入体は形成するものの HAP1/STB との細胞内局在は一致しなかった(Fig.2 P-R)。Ataxin-3Q27 と HAP1 を共発現させた細胞においては、抗 FLAG 抗体に対する免疫沈降を行い、沈降物中の HAP1 の発現を Western blot 法により検出したところ HAP1 の band を検出した(Fig.3 O and P)

Figure 2

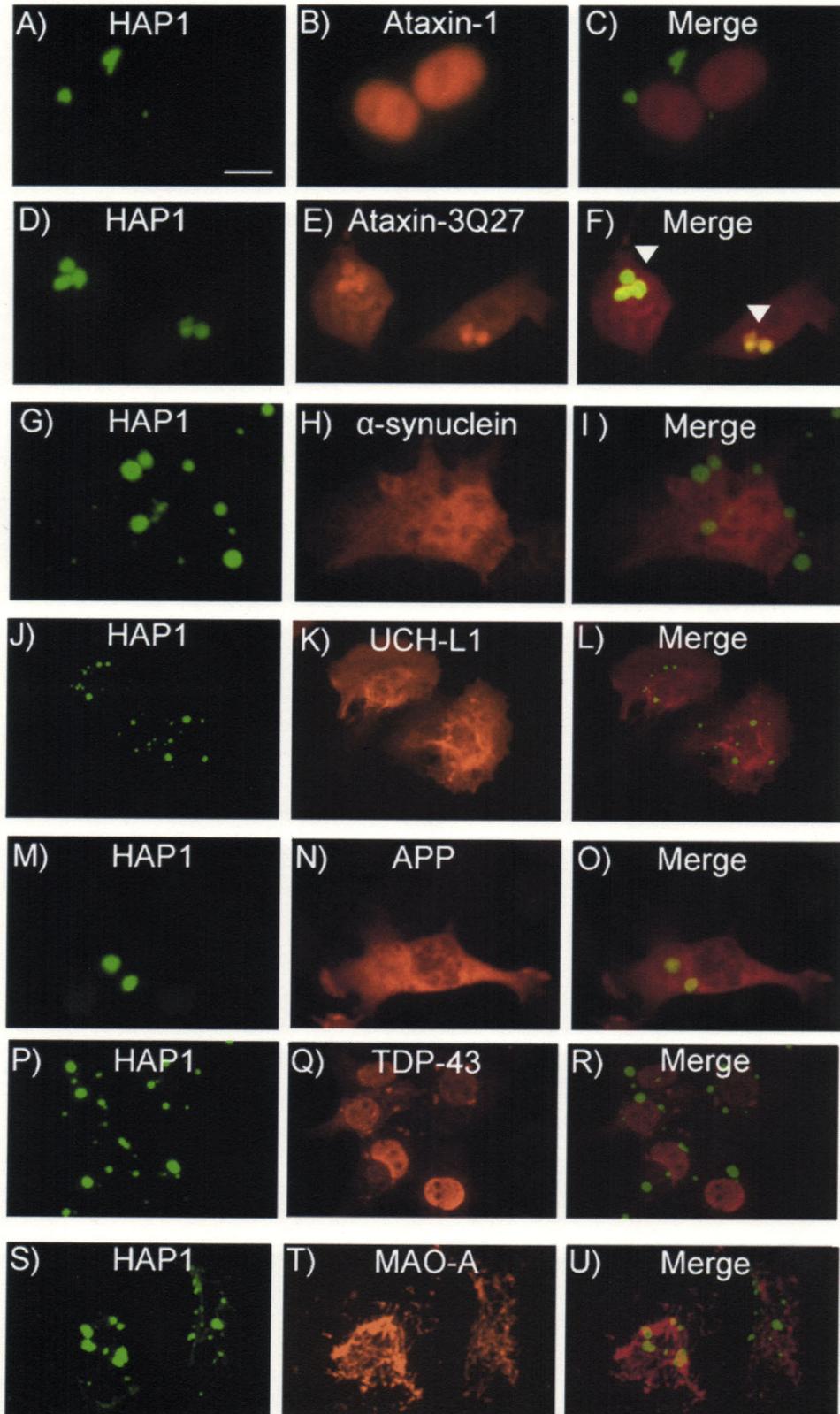


Fig.2 Neuro2A における HAP1 と標的分子との共発現

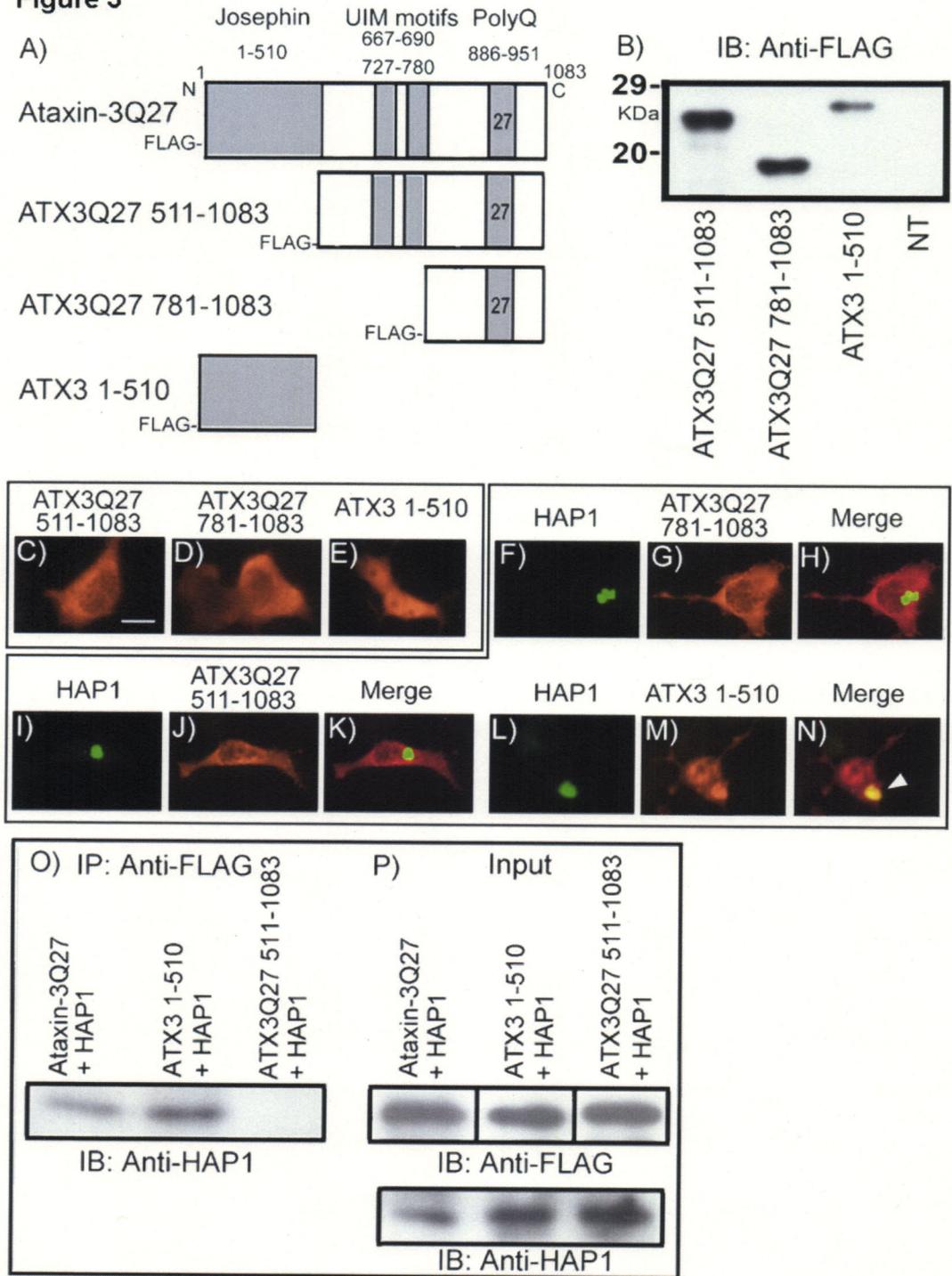
A-U) HAP1(Alexa488:green)と標的分子(Ataxin-1, Ataxin-3Q27,  $\alpha$ -synuclein, UCH-L1, APP, TDP-43, MAO-A)(Alexa594:red)を共発現させた細胞における蛍光免疫細胞化学法。矢頭は Ataxin-3Q27 が HAP1/STB との両陽性細胞質封入体を示している(F)。 (bar = 10  $\mu$ m)

## HAP1/STB との細胞内相互関連に必須な Ataxin-3 の domain の決定

Ataxin-3 には、N 末に Josephin domain、C 末に Ubiquitin interacting motif(UIM)の 2 つの重要な領域があることが知られている[33]。そこで、HAP1/STB との細胞内局在の一致に重要な領域を決定するために、これらの Ataxin-3 の領域を欠失させた 3 種類の Ataxin-3 deletion mutants を作成した(Fig.3 A)。ATX3 1-510 は Josephin domain のみを発現する mutant、ATX3Q27 511-1083 は、Josephin domain を欠失させた mutant、ATX3Q27 781-1083 は、Josephin domain と UIM を欠失させた mutant である。これらの mutants を培養細胞 Neuro2A に transfection させた細胞の lysates を用いて Western blot 法により予想される分子量に band を得た(Fig.3 B)。さらに蛍光免疫細胞化学法によりこれらの細胞内局在について検討したところ、ATX3Q27 511-1083 または ATX3Q27 781-1083 では細胞全体にびまん性の発現を認め(Fig.3 C and D)、ATX3 1-510 では、主に核内に発現を認めたが一部に細胞質に発現が観察された(Fig.3 E)。

HAP1/STB との細胞内局在を確認するために、これらの mutants と HAP1 を培養細胞 Neuro2A に共発現させ、蛍光免疫化学法にて両者の細胞内局在を検討した。ATX3 1-510 と HAP1 を共発現させた細胞においては、HAP1/ATX3 1-510 の両陽性細胞質封入体が観察されたが(Fig. 3 L-N)、ATX3Q27 511-1083 または ATX3Q27781-1083 においては、HAP1/STB との両陽性細胞質封入体は見られなかった(Fig. 3 F-K)。次に、生化学的な HAP1/STB との結合性を示すために、HAP1 と Ataxin-3Q27、ATX3 1-510、ATX3Q27 511-1083 をそれぞれ共発現させた培養細胞の lysates を用いて抗 FLAG 抗体にて免疫沈降を行った(Fig.3 O and P)。HAP1 と Ataxin-3Q27、ATX3 1-510 をそれぞれ共発現させた細胞の lysates における抗 FLAG 抗体の免疫沈降物から HAP1 の band が検出されたが、HAP1 と ATX3Q27 511-1083 と共発現させた細胞の lysate における抗 FLAG 抗体の免疫沈降物からは、HAP1 の band は検出されなかった。これらのことから、HAP1/STB との細胞内局在の一致に必須な領域は Josephin domain であることが明らかとなった。

**Figure 3**



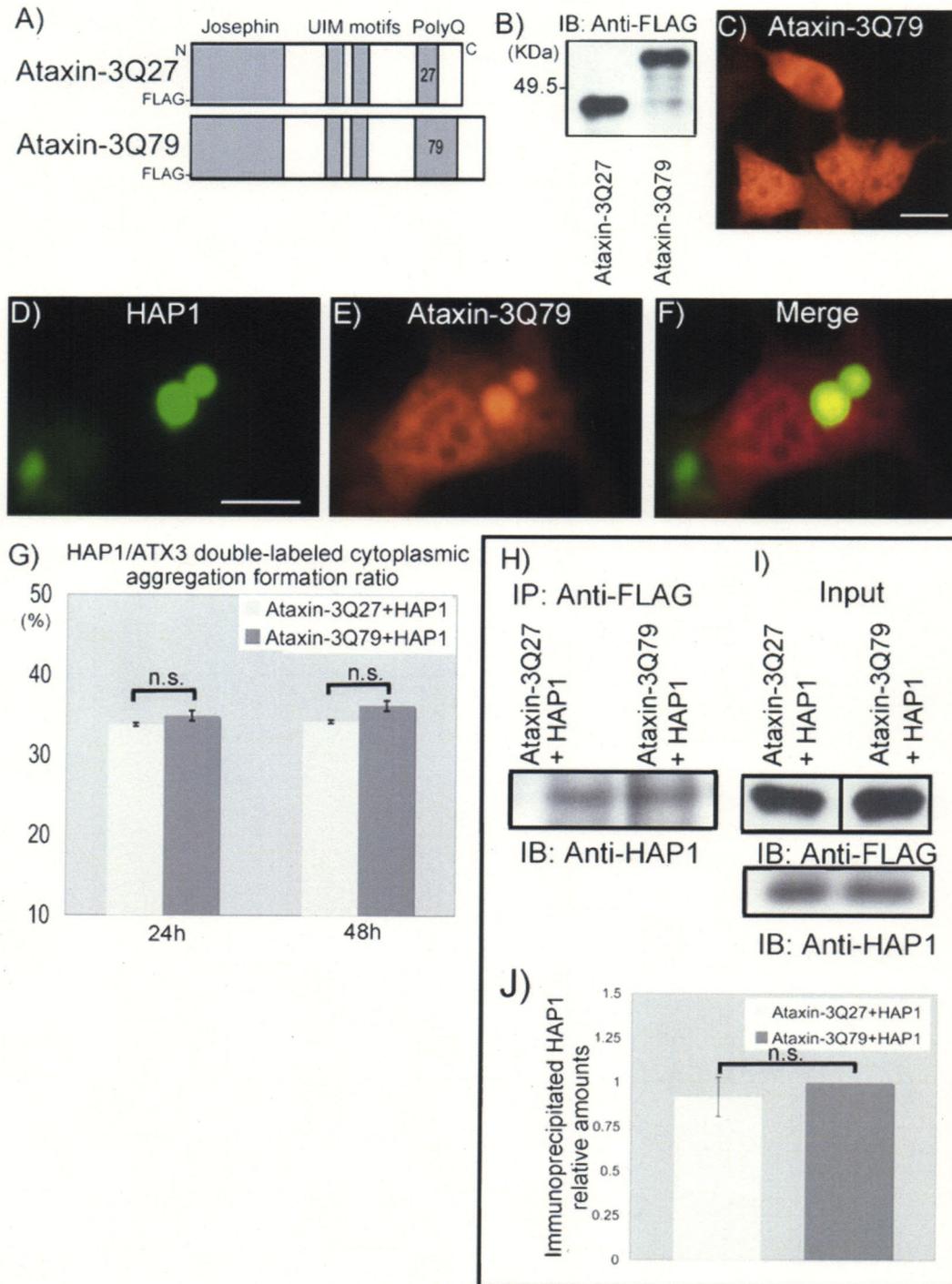
**Fig.3 Ataxin3 deletion mutants の作成と Neuro2A における HAPI との共発現**

A) Ataxin-3Q27 と Ataxin3 deletion mutants の模式図。ATX3Q27 511-1083 ; Ataxin-3 から Josephin domain を欠失させた。ATX3Q27 781-1083 ; Ataxin-3 から Josephin domain と UIM motifs を欠失させた。ATX3 1-510; Josephin domain のみ発現する。B) Ataxin3 deletion mutants 発現細胞における Western blots 法。C-E) Ataxin3 deletion mutants 発現細胞における蛍光免疫細胞化学法。F-N) HAPI と Ataxin3 deletion mutants 共発現細胞における蛍光免疫細胞化学法。矢頭は ATX3 1-510 と HAPI/STB の両陽性細胞質封入体を示している(N)。O and P) HAPI と Ataxin-3Q27, ATX3Q27 1-510, ATX3Q27 511-1083 の共発現細胞における免疫沈降法。抗 FLAG M2 affinity gel で免疫沈降を行い、沈降物に対し抗 HAPI 抗体で Western blot 法を行った。Inputs は共発現細胞における発現のコントロール量を示している。(bar = 10 μm)

## SCA3 由来 PolyQ 伸長型 Ataxin-3 との細胞内相互関連

HAP1/STB における SCA3 の病態への関与の可能性を明らかにするために、SCA3 患者由来の PolyQ 伸長型 Ataxin-3(Ataxin-3Q79)発現 vector を作成した(Fig.4 A)。Ataxin-3Q79 を transfection した細胞の lysate を用いて Western blot 法を行ったところ、予想される分子量に Ataxin-3Q79 の band を得た(Fig.4 B)。培養細胞に Ataxin-3Q79 を transfection し、蛍光免疫細胞化学法にて細胞内発現を検討したところ、大半の細胞において核内と細胞質にびまん性に発現を認めた(Fig.4 C)。さらに、HAP1/STB との細胞内局在を明らかにするために、Ataxin-3Q79 と HAP1 を共発現させ蛍光免疫細胞化学法にて検討したところ、HAP1/Ataxin-3Q79 両陽性細胞質封入体が観察された(Fig.4 D-F)。HAP1/STB との細胞内局在における Ataxin-3 の PolyQ 鎖長の影響を明らかにするために、HAP1 と Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79 それぞれを共発現させた細胞において、HAP1/Ataxin-3 double-labeled cytoplasmic aggregation formation (HA3-CAF) ratios(HAP1 と Ataxin-3 の細胞内局在が一致している細胞/HAP1 と Ataxin-3 を共発現している細胞)を HAP1/STB との affinity を計る指標として用いた。Ataxin-3Q27 における HA3-CAF ratio は、共発現後 24 時間で 33.7%、48 時間で 34.1%であるのに対し、Ataxin-3Q79 における HA3-CAF ratio は 24 時間で 34.8%、48 時間で 36.1%であった(Fig. 4 G)。24 時間、48 時間において Ataxin-3Q27 と Ataxin-3Q79 との HA3-CAF ratio に有意な差は認められなかった。さらに、生化学的に HAP1/STB に対する Ataxin-3Q27,Ataxin-3Q79 の affinity を比較するために、HAP1 と Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79 それぞれを共発現させた細胞において、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法を行い沈降物中の HAP1 の発現量を Western blot 法により検出し、定量解析を行った(Fig.4 H-J)。HAP1 と Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79 それぞれを共発現させた細胞において、抗 FLAG 抗体での沈降物から HAP1 の band は認めたが、定量解析では両者の band に有意な差は認められなかった。

**Figure 4**



**Fig.4 PolyQ 伸長型 Ataxin-3 と HAP1/STB との Neuro2A における細胞内相互関連**

**A)** Ataxin-3Q27 と Ataxin-3Q79 の模式図。**B)** Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79 発現細胞における Western blot 法。**C)** Ataxin-3Q79 発現細胞における蛍光免疫細胞化学法。**D-F)** HAP1、Ataxin-3Q79 共発現細胞における蛍光免疫細胞化学法。HAP1 と Ataxin-3Q79 両陽性細胞質封入体を認める。(bar = 10 μm) **G)** Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79 における HAP1 との共発現後(24、48 時間)の HA3-CAF ratios の比較。(n.s.: not significant) **H and I)** Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79 における HAP1 との共発現細胞における免疫沈降法。抗 FLAG M2 affinity gel で免疫沈降を行い、沈降物に対し抗 HAP1 抗体で Western blot 法を行った。Inputs は共発現細胞における発現のコントロール量を示している。**J)** Ataxin-3Q27、Ataxin-3Q79 における HAP1 との共発現細胞における免疫沈降法による HAP1 の定量化。(n.s.: not significant)

## 【考察】

本研究では、代表的精神神経疾患の原因となる分子の正常型を標的分子とし、それらを normal human brain RNA を用いたクローニングに成功した。そして培養細胞 Neuro2A においてそれらの標的分子と HAP1 との細胞内局在を検討し、新たな HAP1/STB の結合分子として SCA3 の原因分子 Ataxin-3 を同定した。次に Ataxin-3 欠失 mutants を作成し HAP1 との細胞内局在を検討することにより Ataxin-3 の Josephin domain が HAP1/STB との細胞内局在の一致に必須であることを明らかにし、免疫沈降法を使った生化学的な検討でも Josephin domain に結合することが示された。さらに、SCA3 由来 PolyQ 伸長型 Ataxin-3 においても HAP1/STB との細胞内局在が一致し、HAP1/STB への結合親和性は正常型 Ataxin-3 と同程度であることが明らかとなった。これらのことから HAP1/STB は Ataxin-3 の Josephin domain を介し正常型及び SCA3 由来の Ataxin-3 と結合し、HAP1/STB が SCA3 への病態になんらかの関与があることが示唆される。

Josephin domain は、Ataxin-3 の N 末に位置し cystein protease sequence を持つことから、内在性の ubiquitin protease 活性を持つをされる[34]。さらにこの domain は histone や transcriptional coactivator と結合することで histone のアセチル化や転写活性を調節していると報告されている[35]。今回の結果より HAP1/STB が Josephin domain を介して ataxin-3 と結合することから、STB は Ataxin-3 のこうした ubiquitin protease や転写機能を一部調節している可能性が考えられる。

また、Ataxin-3 は代表的な脱 ubiquitin 化酵素であることが報告されている[36]。我々のこれまでの免疫組織学的検討では、HAP1/STB と ubiquitin との間に明らかな関連は認めておらず、HAP1/STB は非 ubiquitin 化された封入体であることが示唆されている[3]。従って、STB は HAP1 及び Ataxin-3 を内在させることで脱 ubiquitin 化酵素や脱 ubiquitin 化活性をもつ可能性があり、このことは STB が正常環境下で ubiquitin 化から免れている一つの理由になるかもしれない。

代表的な CAG リピート病である SCA3 は Machado-Joseph 病とも呼ばれ、Ataxin-3 内の PolyQ 鎖の異常伸長により引き起こされる常染色体優性遺伝形式をとる疾患である[37]。本研究では

正常型 Ataxin-3 と同程度に PolyQ 伸長型 Ataxin-3 においても HAP1/STB との細胞内相互関連が示されており、このことは HAP1/STB が疾患由来 Ataxin-3 と直接的あるいは間接的に結合することで SCA3 の病態に HAP1/STB が一部関与している可能性を示唆している。これまでの報告では HAP1 は PolyQ 伸長型 Htt や AR と polyQ 鎖長依存的に結合し、その核移行を阻害することで細胞毒性を抑制することが知られている[9,12,13]。そして HD や SBMA において、HAP1 が正常型よりも疾患由来の mutant と強い親和性を示すことによって細胞毒性を抑制し病態に関与することが示唆されてきた。しかし、SCA17 や Joubert syndrome においては、疾患由来の mutants の HAP1/STB への親和性は正常型ほど強くないにも関わらず、HAP1/STB が細胞保護的に作用しうることを示しており [14,15]、神経細胞での HAP1/STB の発現が神経毒性の脆弱性に対する閾値を増加させ、神経細胞の安定性に寄与するという HD や SBMA でも示唆されている「HAP1/STB protection hypothesis」の関与が想定されている。したがって、HAP1/STB は Ataxin-3 と PolyQ 鎖長非依存的な結合ではあるが、正常 Ataxin-3 の生理的機能へ関与するだけでなく、「HAP1/STB protection hypothesis」を介した SCA3 の病態に重要な役割を果たしている可能性がある。

**【結語】**

今回、我々は HAPI/STB の新たな関連因子として Ataxin-3 を同定した。さらに HAPI/STB は Ataxin-3 内の Josephin domain を介して、SCA3 患者由来の PolyQ 伸長型 Ataxin-3 と正常型 Ataxin-3 と同程度に培養神経細胞内で結合することを明らかとした。このことは、HAPI/STB が正常の Ataxin-3 の生理機能を調節しうることに加えて SCA3 における病態にも関与している可能性がある。

【参考文献】

- [1] K. Shinoda, S. Mori, T. Ohtsuki, Y. Osawa, An aromatase-associated cytoplasmic inclusion, the "stigmoid body," in the rat brain: I. Distribution in the forebrain, *J. Comp. Neurol.* 15 (1992) 360-376.
- [2] K. Shinoda, M. Nagano, Y. Osawa, An aromatase-associated cytoplasmic inclusion, the "stigmoid body," in the rat brain: II. Ultrastructure (with a review of its history and nomenclature), *J. Comp. Neurol.* 329 (1993) 1-19.
- [3] M. Nagano, K. Shinoda, Coexistence of the stigmoid body and estrogen receptor in some neuronal groups involved in rat reproductive functions, *Brain Res.* 634 (1994) 296-304.
- [4] C.A. Gutekunst, S.H. Li, H. Yi, R.J. Ferrante, X.J. Li, S.M. Hersch, The cellular and subcellular localization of huntingtin-associated protein 1 (HAP1): comparison with huntingtin in rat and human, *J. Neurosci.* 18 (1998) 7674-7686.
- [5] S.H. Li, Z.X. Yu, C.L. Li, H.P. Nguyen, Y.X. Zhou, C. Deng, X.J. Li, Lack of huntingtin-associated protein-1 causes neuronal death resembling hypothalamic degeneration in Huntington's disease, *J. Neurosci.* 23 (2003) 6956-6964.
- [6] R. Fujinaga, A. Yanai, H. Nakatsuka, K. Yoshida, Takeshita Y., Uozumi K., Zhao C., Hirata K., Kokubu K., Nagano M., and Shinoda K. (2007) Anti-human placental antigen complex X-P2 (hPAX-P2) anti-serum recognizes C-terminus of huntingtin-associated protein 1A common to 1B as a determinant marker for the stigmoid body. *Histochem. Cell Biol.* 128, 335-348.
- [7] S.H. Li, C.A. Gutekunst, S.M. Hersch, X.J. Li, Association of HAP1 isoforms with a unique cytoplasmic structure, *J. Neurochem.* 71 (1998) 2178-2185.
- [8] K.J. Page, L. Potter, S. Aronni, B.J. Everitt, S.B. Dunnett, The expression of Huntingtin-associated

protein 1 (HAP1) mRNA in developing, adult and ageing rat CNS: implications for Huntington's disease neuropathology, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 1835-1845.

[9] R. Fujinaga, J. Kawano, Y. Matsuzaki, K. Kamei, A. Yanai, Z. Sheng, M. Tanaka, K. Nakahama, M. Nagano, K. Shinoda, Neuroanatomical distribution of Huntingtin-associated protein 1-mRNA in the male mouse brain, *J. Comp. Neurol.* 478 (2004) 88-109.

[10] R. Fujinaga, Y. Takeshita, K. Uozumi, A. Yanai, K. Yoshioka, K. Kokubu, K. Shinoda, Microtubule-dependent formation of the stigmoid body as a cytoplasmic inclusion distinct from pathological aggresomes, *Histochem. Cell Biol.* 132 (2009) 305-318.

[11] X.J. Li, S.H. Li, A.H. Sharp, F.C.Jr. Nucifora, G. Schilling, A. Lanahan, P. Worley, S.H. Snyder, C.A. Ross, A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology, *Nature* 378 (1995) 398-402.

[12] M. Koga, R. Fujinaga, A. Yanai, J. Kawano, K. shinoda: Interaction between HAP1 and polyglutamine protein *in vitro*. 2002. Nov.9, Yonago, Japan: P13(abstr).

[13] Takeshita Y, Fujinaga R, Zhao C, Yanai A, Shinoda K. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with androgen receptor (AR) and suppresses SBMA-mutant-AR-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 2006; **15**:2298-2312.

[14] Prigge JR, Schmidt EE. HAP1 can sequester a subset of TBP in cytoplasmic inclusions via specific interaction with the conserved TBP(CORE). *BMC Mol Biol* 2007; **8**: 76.

[15] T. Dixon-Salazar, J.L. Silhavy, S.E. Marsh, C.M. Louie, L.C. Scott, A. Gururaj, L. Al-Gazali, A.A. Al-Tawari, H. Kayserili, L. Sztriha, J.G. Gleeson, Mutations in the AHI1 gene, encoding joubertin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004) 979-987.

- [16] D. Amann-Zalcenstein, N. Avidan, K. Kanyas, R.P. Ebstein, Y. Kohn, A. Hamdan, E. Ben-Asher, O. Karni, M. Mujaheed, R.H. Segman, W. Maier, F. Macciardi, J.S. Beckmann, D. Lancet, B. Lerer, AHI1, a pivotal neurodevelopmental gene, and C6orf217 are associated with susceptibility to schizophrenia, *Eur. J. Hum. Genet.* 14 (2006) 1111-1119.
- [17] A. Goate, M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature* 349 (1991) 704-706.
- [18] M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetroopoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* 276 (1997) 2045-2047.
- [19] E. Leroy, R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M.J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P.J. Steinbach, K.D. Wilkinson, M.H. Polymeropoulos, The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature* 395 (1998) 451-452.
- [20] A. Tagawa, C.F. Tan, K. Kikugawa, M. Fukase, R. Nakano, O. Onodera, M. Nishizawa, H. Takahashi, Familial amyotrophic lateral sclerosis: a SOD1-unrelated Japanese family of bulbar type with Bunina bodies and ubiquitin-positive skein-like inclusions in lower motor neurons, *Acta Neuropathol.* 113 (2007) 205-211.
- [21] H.T. Orr, M.Y. Chung, S. Banfi, T.J. Jr. Kwiatkowski, A. Servadio, A.L. Beaudet, A.E. McCall, L.A. Duvick, L.P. Ranum, H.Y. Zoghbi, Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1, *Nat Genet.* 4 (1993) 221-226.

- [22] Y. Kawaguchi, T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akiguchi, CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1, *Nat Genet.* 8 (1994) 221-228.
- [23] P. Stern, Monoamine-oxidase & psychic functions; a biochemical theory of schizophrenia, *Wien Z Nervenheilkd Grenzgeb.* 14 (1958) 311-315.
- [24] H. Ikeda, M. Yamaguchi, S. Sugai, Y. Aze, S. Narumiya, A. Kakizuka, Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo, *Nat. Genet.* 13 (1996) 196-202.
- [25] A. Servadio, B. Koshy, D. Armstrong, B. Antalffy, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals, *Nat. Genet.* 10 (1995) 94-98.
- [26] Y. Trottier, G. Cancel, I. An-Gourfinkel, Y. Lutz, C. Weber, A. Brice, E. Hirsch, J.L. Mandel, Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3, *Neurobiol. Dis.* 5 (1998) 335-347.
- [27] P.J. McLean, H. Kawamata, S. Ribich, B.T. Hyman, Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 8812-8816.
- [28] J.F. Doran, P. Jackson, P.A. Kynoch, R.J. Thompson, Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis, *J. Neurochem.* 40 (1985) 1542-1547.
- [29] H.L. Paulson, S.S. Das, P.B. Crino, M.K. Perez, S.C. Patel, D. Gotsdiner, K.H. Fischbeck, R.N. Pittman, Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain, *Ann. Neurol.* 41 (1997) 453-462.

- [30] Y. Takao, H. Fujiwara, S. Yoshioka, S. Fujii, M. Ueda, Monoamine oxidase A is highly expressed by the human corpus luteum of pregnancy, *Reproduction* 136 (2008) 367–375.
- [31] E. Buratti, T. D'rk, E. Zuccato, F. Pagani, M. Romano, F.E. Baralle, Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping, *EMBO J.* 20 (2001) 1774-84.
- [32] F. Colciaghi, B. Borroni, L. Pastorino, E. Marcello, M. Zimmermann, F. Cattabeni, A. Padovani, M. Di Luca, [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients, *Mol Med.* 8 (2002) 67-74.
- [33] J. Goto, M. Watanabe, Y. Ichikawa, S.B. Yee, N. Ihara, K. Endo, S. Igarashi, Y. Takiyama, C. Gaspar, P. Maciel, S. Tsuji, Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini, *Neurosci. Res.* 28 (1997) 373-377.
- [34] E.W. Doss-Pepe, E.S. Stenroos, W.G. Johnson, K. Madura, Ataxin-3 Interactions with Rad3 and Valosin-Containing Protein and Its Associations with Ubiquitin Chains and the Proteasome Are Consistent with a Role in Ubiquitin-Mediated Proteolysis, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 6469-6483.
- [35] F. Li, T. MacFarlan, R.N. Pittman, D. Chakvarti, Ataxin-3 Is a Histone-binding Protein with Two Independent Transcriptional Corepressor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 45004-45012.
- [36] B. Burnett, F. Li, R.N. Pittman, The polyglutaimne neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 3195-3205.
- [37] Y. Kawagushi, T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akigushi, J. Kimura, S. Narumiya, A. Kakizuka, CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1, *Nat. Genet.* 8 (1994) 221-228

Table1 Primers used for the construction of plasmids

| Primers             | Sequences (5' to 3') and enzyme site                | Used to construct              |
|---------------------|---|--------------------------------|
| HAP1 s <i>EcoRI</i> | GAGAATTCTATGCGCCCGAAGAGGTTGGGC ( <i>EcoRI</i> site) | HAP1                           |
| HAP1 as <i>XhoI</i> | TTCCTCGAGTCATCGGCACGACGATTTC ( <i>XhoI</i> site)    | HAP1                           |
| ATX3 s              | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGTCCATCTTC      | ataxin-3,<br>ATX3 1-510        |
| ATX3 as             | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATGTCAGATAAAG        | ATX3 511-1083<br>ATX3 781-1083 |
| ATX3 511-1083 s     | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGATTGCGAAGCTGAC      | ATX3 511-1083                  |
| ATX3 781-1083 s     | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCTCCAGAAACATATCT      | ATX3 781-1083                  |
| ATX3 1-510 as       | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGGCAGATCACCTT         | ATX3 1-510                     |
| ATAXIN-1s           | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGATGTATTTCATG       | ataxin-1                       |
| ATAXIN-1as          | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGGCTTCAGGTTC        | ataxin-1                       |
| SYNUCLEIN s         | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAAATCCAACCAA        | $\alpha$ -synuclein            |
| SYNUCLEIN as        | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTACTTGCCTACATT         | $\alpha$ -synuclein            |
| UCH-L1 s            | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAGCTCAAGCCG      | UCH-L1                         |
| UCH-L1 as           | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGGCTGCCTTGCA        | UCH-L1                         |
| APP s               | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCTGCCCGTTTG       | APP                            |
| APP as              | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTAGTTCTGCATCTG         | APP                            |
| TDP-43 s            | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGTCTGAATATATT      | TDP-43                         |
| TDP-43 as           | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTACATCCCCAGCC          | TDP-43                         |
| MAO-A s             | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGAATCAAGAG      | MAO-A                          |
| MAO-A as            | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAGACCGTGGCAG        | MAO-A                          |