

審査の結果の要旨

氏名 櫻井 靖之

本論文は、神経変性疾患の原因遺伝子の一つである tau タンパク質の凝集を制御する因子の同定を目的とし、ヒト培養細胞による tau の凝集モデル細胞を樹立し、この細胞を用いたゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施することで、Small ubiquitin-like modifier 2 (SUMO2) が tau の凝集を抑制していることを見出している。

神経変性疾患に共通する病理所見として、神経細胞内にミスフォールドタンパク質がユビキチン陽性の凝集体へ蓄積することが知られている。凝集体の形成は細胞内で緻密に制御された品質管理機構であり、ミスフォールドタンパク質の分解を担うユビキチンプロテアソーム系や、ミスフォールドタンパク質のリフォールディングや脱凝集を行う分子シャペロン等と共に、細胞内恒常性を維持している。これまで、ミスフォールドタンパク質の凝集体形成機構については多くの研究がされてきたが、ポリグルタミン伸長タンパク質等安易に細胞内で凝集するタンパク質に限定されていた。しかし、各ミスフォールドタンパク質の凝集体形成には、共通するメカニズムも期待されるものの、各タンパク質特有な因子も重要な役割があると予想される。微小管結合タンパク質 tau はアルツハイマー病等多くの神経変性疾患でユビキチン陽性の過剰リン酸化された凝集体が蓄積することが知られている。Tau の凝集過程については、ショウジョウバエを用いた遺伝学的なスクリーニングは行われたものの、哺乳類培養細胞を用いた tau の凝集に関する因子の包括的なスクリーニングは例がない。これは、tau タンパク質が可溶性の天然変性タンパク質であり、ポリグルタミン伸長タンパク質に似た簡便な凝集モデル細胞が存在しなかったことが一つの原因だと考えられる。ここで、近年 tau の微小管結合領域(tau repeat domain; tau RD)を用いた、細胞分裂後も tau RD の凝集体を恒久的に維持する凝集陽性細胞の樹立を報告した。そこで、本研究ではこの凝集陽性細胞を独自に樹立し、ゲノムワイド siRNA スクリーニングを行うことで、tau RD の凝集に関する因子の同定を行なった。

蛍光画像解析によるハイコンテンツスクリーニングを行うために、蛍光タンパク質 Venus を融合した tau RD(P301L)を安定発現する HEK293A 細胞株を樹立した。前頭側頭葉変性症で見られる P301L 変異は tau の凝集性を大幅に上昇させることが報告されている。この細胞に対して、リコンビナント tau RD を用いて *in vitro* で作製したアミロイド型凝集体をリポフェクションにより細胞内に導入することで、細胞内の tau RD を凝集させた。凝集を恒久的に維持する細胞をクローン化することで、凝集陽性細胞を樹立した。

この凝集陽性細胞を用いて、細胞質の tau RD 凝集体の定量解析を行うことで siRNA スクリーニングを行った。1 次スクリーニングでは 4 種類の配列を含んだ pooled siRNA で約 18,000 遺伝子をターゲットするゲノムワイド siRNA ライブラリーを用いた。1 次スクリーニングのヒットから、効果が既知のプロテアソームサブユニットや、広範囲に影響を及ぼすため解析が困難な核膜孔形成因子等を除外した 283 遺伝子について、off-target 効果を抑制する修飾が行われた 4 種類の配列を含んだ pooled siRNA を用いて 2 次スクリーニングを行った。この際、細胞特異的 off-target 効果を除外する目的で U2OS 細胞でも tau RD の凝集陽性細胞株を樹立し、HEK293A と U2OS の 2 種類の細胞で凝集形成を促進したものをヒット遺伝子とした。さらに、タンパク質分解全般に影響を与える siRNA を除外するため、プロテアソーム活性の低下に依存して蓄積する蛍光プローブである ZsGreen-mODC を用いたカウンタースクリーニングを行い、ZsGreen-mODC 分解に影響を示したものを除外し、35 個の候補遺伝子を得た。これらに対して、4 本の配列の異

なる siRNA を個別に使用して HEK293A と U2OS の tau RD 凝集陽性細胞に対する効果を 3 次スクリーニングとして検証した。いずれかの細胞で 4 本中 3 本以上の siRNA によるノックダウンが tau RD 凝集を促進するもの、すなわち遺伝子の機能としては tau RD 凝集形成を抑制するものとして、14 個の候補遺伝子を同定した。

14 個の最終候補遺伝子中では SUMO2 と SUMO 活性化 E1 酵素 SAE1 が HEK293A 細胞、U2OS 細胞の両方で 4 本中 4 本でノックダウンが凝集体形成を促進する効果が見られた。SUMO 付加 E2 酵素 UBE2I についても、1 次、2 次スクリーニングどちらにおいても同様の効果がみられた。以上から、SUMO2 化を抑制すると tau RD 凝集体形成が促進すると考えられた。ヒトは 3 種類の SUMO のアイソフォーム、SUMO1、SUMO2、SUMO3 を発現するが、4 本の個別の siRNA では SUMO2 ノックダウンのみが 4 本全ての siRNA において効果が見られた。フローサイトメトリーによる凝集体の定量解析実験においても、SUMO2/3 のノックダウンでは凝集体による蛍光強度が 3 倍程度増加したのに対して、SUMO1 では効果が見られず、SUMO2 ノックダウン特異的な効果であることが確認できた。

Tau RD が直接 SUMO 化されているかを調べるために、新たに Flag-Halo タグを融合した tau RD(P301L)を安定発現する凝集陽性 HEK293T 細胞を樹立した。この細胞に SUMO1 と SUMO2 を過剰発現し、SDS 可溶性画分から Flag-免疫沈降を行うことで、tau RD が直接 SUMO 化されていることを確認した。また、SUMO の過剰発現により、tau RD のユビキチン化が減少したことから、SUMO 化とユビキチン化が競合していることが示唆された。次に、SUMO 化が凝集している不溶性 tau RD 特異的に行われているか調べるために、同様の実験を tau RD の凝集陰性細胞を用いて行った。Tau RD は凝集陰性細胞では凝集陽性細胞に比べてより多くの割合が SUMO 化されており、凝集陰性細胞の tau RD は殆どが凝集していない可溶性の tau RD であるため、SUMO 化修飾は可溶性の tau RD に対して行われると考えた。そこで、再び凝集陽性細胞を用いて、SDS より弱い界面活性剤の Triton X-100 可溶性と不溶性画分からそれぞれ Flag-免疫沈降を行うことで、各画分の tau RD の SUMO 化状態を観察した。すると、可溶性 tau RD のみが SUMO 化されており、不溶性 tau RD はユビキチン化されていた。以上から、tau RD は SUMO 化されることにより、可溶性に保たれていることが示唆された。

そこで、凝集陽性細胞に対して、SUMO1 と SUMO2/3 のノックダウンを行い、tau RD を可溶性画分と不溶性画分から Flag-IP し、ユビキチン化を観察した。すると、SUMO1、SUMO2/3 いずれのノックダウンも不溶性 tau RD のユビキチン化には影響がなかったものの、可溶性 tau RD のユビキチン化は SUMO2/3 ノックダウンでのみ増加した。すなわち、SUMO2/3 修飾が tau RD のユビキチン化を抑える効果がある可能性を示した。

以上の研究は SUMO2 化が tau RD の凝集形成を抑制することを見出した。近年、SUMO 化が多く神経変性疾患のミスフォールドタンパク質の凝集に関わることが示されているものの、網羅的アプローチからも SUMO 化の重要性を確認したのは初めてである。また、過去の報告では tau は SUMO1 修飾を受けることで、ユビキチン化が抑制され、リン酸化が促進されることにより不溶性になるとされていたが、本研究では SUMO1、SUMO2 修飾いずれも可溶性 tau RD にのみ観察されたことから、tau の SUMO 化の新たな影響が示唆された。本研究より、tau RD は SUMO2 修飾されることにより可溶性が保たれることでユビキチン化と不溶性の凝集体形成が抑制されると考えられ、これは tau の凝集が確認される多くの神経変性疾患の治療に貢献しうる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。