

信州大学審査学位論文

ハンチントン病における
凝集体形成に関する研究

平成 30 年 3 月

猫沖 陽子

目次

第一章 序論	1
--------	---

第二章 AAV を介した shRNA によるハンチントン病モデルマウスの病理症状の緩和

緒論	6
材料および方法	
1. HD モデルマウス	7
2. rAAV の構築と産生	7
3. In vitro での shRNA 効果の解析	8
4. マウス脳へのウイルス注入	8
5. 蛍光イメージャーによるウイルス形質転換と凝集体の検出	9
6. 免疫染色と凝集体カウント	9
7. フィルタートラップ解析	10
8. In situ ハイブリダイゼーション	10
9. 定量 RT-PCR	10
10. 統計解析	11
結果	
1. AAV-shRNA による遺伝子発現抑制	11
2. マウス脳における shRNA の発現	12
3. shGFP による凝集体形成の減少	13
4. shRNA による DARPP-32 発現の回復	14
考察	15
小括	17
図	18

第三章 ハンチンチンエクソン1アミロイドの異なる構造は in vitro および in vivo において異なる細胞毒性を示す

緒論	22
材料および方法	

1. In vitro におけるアミロイドの調製	23
2. In vitro HTT アミロイドの評価	23
3. HTTQ42 および HTTQ62 の in vitro におけるアミロイド形成	25
4. In vitro HTTQ42 アミロイドの繊維剛性分析	26
5. R6/2 マウスからの HTT アミロイドの精製	26
6. In vitro HTT アミロイドの neuro2a 細胞への導入	27
7. PC12 細胞へのアミロイド形質導入	27
8. 凝集体数計測と細胞生存率計測	28
9. AlexaFluor555 の標識と共局在実験	28
結果	
1. 伸展ポリグルタミンを含む in vitro HTT の異なるアミロイド構造	29
2. In vitro HTT アミロイドの哺乳類細胞への効率的な導入	31
3. In vitro での異なる HTT コンフォメーションの細胞毒性	33
4. HD モデルマウスの HTT アミロイドの構造の違いについて	34
5. HD モデルマウスの HTT アミロイドの異なるコンフォメーションでの異なる細胞毒性	35
考察	36
小括	39
図	41

第四章 ハンチントン病における DISC1 と変異ハンチンチンの共凝集による PDE 4 の調整不全

緒論	55
----	----

材料および方法

1. プラスミドと抗体	55
2. R6/2マウス	57
3. HD患者の剖検脳	57
4. PDE活性の測定	58
5. ウェスタンブロッティング	58
6. 免疫沈降	58
7. 不溶性画分のウェスタンブロッティング	59
8. フィルタートラップ分析	59
9. 免疫染色	60
10. リコンビナントタンパク質の精製と凝集体形成	61

11. In vitro DISC1凝集体の特徴づけ	61
12. ペプチドアレイ	62
13. レンチウイルスとアデノ随伴ウイルス (AAV) の産生とマウスへの注入	63
14. AAV注入マウスのHTT凝集体と神経細胞生存率の解析	64
15. マウスの行動解析	64
16. 統計学的解析	65
17. 研究における法令遵守	65
結果	
1. HDマウスモデルR6/2脳におけるPDE4活性の増大	66
2. 三つ組みのタンパク質複合体によるPDE4活性の調節	66
3. HTT と DISC1 のタンパク質結合でのポリグルタミン伸展の特異的な効果	67
4. R6/2 マウスと HD 脳における DISC1 の SDS 不溶性 HTT 凝集体への選択的隔離	68
5. 易凝集性な DISC1 とポリグルタミン伸展変異 HTT との間のクロスシーディング	69
6. R6/2 マウスにおける可溶性 DISC1 レベルの減少による DISC1-PDE4 複合体の減少	71
7. R6/2 マウスにおいて異常亢進した PDE4 活性に対する HTT-DISC1-PDE4 相互作用	72
8. HTT 結合領域欠損 DISC1 の導入と効果	73
9. R6/2 マウスの非運動機能における HTT-DISC1-PDE4 相互作用の重要性	74
考察	75
小括	77
図	76

第五章 総括	100
--------	-----

謝辞	102
----	-----

引用文献	103
------	-----

第一章 序論

ハンチントン病 (HD) は常染色体優性遺伝による致死性の神経変性疾患である。中年期に発症し、不随意運動に代表される運動機能障害や認知異常、記憶欠損や鬱、人格変化が引き起こされ、また組織学的症状として、脳線条体の萎縮と神経細胞の脱落、神経細胞内における凝集体の形成が観察される。HD の疾患原因遺伝子産生物はハンチンチン (HTT) タンパク質であり、この遺伝子は最初のエクソンに CAG の繰り返し配列 (CAG リピート) を持つ。この CAG リピートが 36 以上異常伸長すると、変異 HTT は伸展したポリグルタミン鎖 (polyQ) を形成し、ベータシートに富んだ繊維性の不溶性凝集体を形成する (Perutz *et al.*, 1994; Scherzinger *et al.*, 1997)。ポリグルタミン凝集体はその構造的特性から、翻訳関連タンパク質や分子シャペロン、ユビキチン結合タンパク質のような多くの必要不可欠なタンパク質を取り込み、細胞の機能不全を誘導する (Cummings *et al.*, 1998; Jana *et al.*, 2000; Dunah *et al.*, 2002; Nagaoka *et al.*, 2004; Doi *et al.*, 2004)。このポリグルタミン凝集体の発現によって、ユビキチン-プロテアソームシステム機能の障害 (Jana *et al.*, 2000; Bence *et al.*, 2001) やミトコンドリアにおけるカルシウム欠乏の促進 (Panov *et al.*, 2002)、軸索輸送の障害および輸送障害による神経細胞の損傷が引き起こされることが示唆されているが (Landles and Bates, 2004; Di Prospero and Fischbeck, 2005; Dompierre *et al.*, 2007; Orr and Zoghbi, 2007; Saudou and Humbert, 2008; Crook and Housman, 2011; Labbadia and Morimoto, 2013; An *et al.*, 2012)、未だ根本的な治療方法はない。しかし、変異 HTT の分子機構の解明を含めさまざまな研究が行われ、治療に有効な物質が報告されている。例えば、コンゴーレッドはポリグルタミン鎖が形成する β シート構造に結合し、凝集を阻害する (Sanchez *et al.*, 2003)。トレハロースはタンパク質の安定性を高めることにより凝集を阻害し (Tanaka *et al.*, 2004)、緑茶に含まれるエピガロカテキンガレートは

抗酸化作用によって神経を保護し治療効果を示す (Ehrnhoefer *et al.*, 2006)。シスタミンはトランスグルタミナーゼ活性を阻害することにより凝集体形成を抑制する (Dedeoglu *et al.*, 2002)。SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) のようなヒストン脱アセチル化阻害剤は、変異 HTT によって引き起こされる転写活性異常を減少させる (Steffan *et al.*, 2001, Hockly *et al.*, 2003)。

これらのような治療効果が期待される物質は変異 HTT 遺伝子の遺伝子産物である HTT タンパク質もしくは関連因子に作用するものであるが、遺伝子転写物を分解することにより遺伝子発現を消失させる RNA interference (RNAi) 技術は非特異的な免疫反応なしに内因性の遺伝子発現を効果的に阻害できるため、変異遺伝子によって引き起こされる神経変性疾患の治療の直接的なアプローチとして期待された (Elbashir *et al.*, 2001)。筋委縮性側索硬化症 (ALS) 関連遺伝子である SOD1 (superoxide dismutase 1) を標的とした shRNA を SOD1 変異マウスへ導入した実験では、発症遅延や行動障害の改善が見られた (Ralph *et al.*, 2005)。脊髄小脳失調症 1 型の原因遺伝子 Ataxin1 を標的とした shRNA 導入もまたモデルマウス小脳における病理学的異常の改善や核内封入体の減少、小脳形態回復を示した (Xia *et al.*, 2004)。HD においては、HD モデルマウスにおける病因遺伝子を標的にした siRNA (short interfering RNA) もしくは shRNA (short hairpin RNA) の導入により、運動障害や神経病理学的異常の発症を遅延させ、寿命を延長させた (Ralph *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005)。これらの研究では RNAi 治療が疾患モデルマウスの神経症状発症前より行われており、発症後の RNAi 導入による治療効果については不明であった。本研究では、臨床的により重要であると考えられる、神経症状発症後の RNAi 治療の有効性について、HD モデルマウスを用いて調べた。

HD では変異 HTT に含まれる伸長ポリグルタミンが HTT タンパク質の構造変化を誘導し、ポリグルタミン凝集体形成し細胞の機能不全を引き起こすため、タンパク

質凝集阻害作用を持つ物質が凝集体形成を阻害するとともに、運動機能障害の改善を示す (Davies *et al.*, 1997; DiFiglia *et al.*, 1997; Ordway *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2004)。しかし、ポリグルタミン凝集体の細胞毒性については議論が分かれており、ポリグルタミン凝集体は細胞毒性に関係していないか、むしろ細胞保護に働くことを示す報告もある (Saudou *et al.*, 1998; Klement *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2007; Chimon *et al.*, 2007; Arrasate *et al.*, 2004)。ポリグルタミン凝集体形成は HD モデルマウスや HD 患者の脳全体に認められるが、皮質や海馬に比べ、線条体における萎縮や神経細胞の脱落が領域特異的に顕著である (Vonsattel and DiFiglia, 1998; Thomas, 2006)。このように、ポリグルタミン凝集体の細胞毒性が脳部位特異的に発現する原因として考えられるのが、タンパク質の構造の違いである。ポリグルタミン凝集体はアミロイドと呼ばれるベータシートに富んだ繊維性の構造を示すが (Perutz *et al.*, 1994; Scherzinger *et al.*, 1997)、アミロイド形成タンパク質はしばしば 1 つ以上の構造にミスフォールドし多様な表現型を示すことが、酵母や哺乳類のプリオン研究において証明されている (Chien *et al.*, 2004; Shorter and Lindquist, 2005)。アルツハイマー病の原因であるアミロイドベータ 1-40 ペプチドもまた、異なる条件下で異なるアミロイド構造にミスフォールドし、ラット胚海馬神経細胞初代培養において異なる毒性を示した (Petkov *et al.*, 2005)。本研究では変異 HTT が異なるアミロイド構造にミスフォールドして異なる細胞毒性を示すことを明らかにし、HD モデルマウス脳に形成されたポリグルタミン凝集体が脳部位特異的な構造を示し、脳部位特異的な細胞毒性を示すことを明らかにした。

HD は鬱を含む非運動性機能障害によっても特徴づけられるが、HD の精神症状をもたらす分子メカニズムについては未だ解明されていない (Craufurd and Snowden, 2002)。HD 患者の脳脊髄液や HD モデルマウス *HdhQ111* knock-in マウスの脳において減少するサイクリック 3'5'アデノシン 1 リン酸 (cyclic 3'5'-adenosine

monophosphate; cAMP) は、高次の脳に含まれる細胞シグナル伝達における主要な調節因子のひとつであり (Cramer *et al.*, 1984; Gines *et al.*, 2003) , この cAMP を分解するホスホジエステラーゼ 4 (PDE4) ファミリー は、脳機能の幅広い範囲、特に鬱や不安のような精神状態を調節している (O'Donnell and Zhang, 2004; Millar *et al.*, 2005; Menniti *et al.*, 2006; Conti and Beavo, 2007; Burgin, *et al.*, 2010; Houslay, 2010) 。 PDE4 活性は生理的に PDE4 の細胞内局在やタンパク質相互作用, そして翻訳後修飾によって制御されており (Conti and Beavo, 2007; Houslay, 2010) , この PDE4 と直接的に相互作用する非常に重要なものの一つは、足場タンパク質である Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)である (Harrison and Weinberger, 2005; Millar *et al.*, 2005; Murdoch *et al.*, 2007; Kvaajo *et al.*, 2011; Niwa *et al.*, 2016) 。 DISC1 は、脳発生や神経シグナル伝達での生理学的役割は集中的に研究されているが、神経病理的な状態における DISC1-PDE4 相互作用の重要性はほとんど理解されていない (Brandon and Sawa, 2011; Johnstone *et al.*, 2011; Narayan *et al.*, 2013) 。 DISC1 は dynactin (p150glued) , nuclear receptor corepressor (N-CoR) , pericentriolar material-1 protein (PCM1) , Kalirin-7 と相互作用し、それらすべてが huntingtin-associated protein 1 (HAP1) ともしくは HTT と相互作用することが報告されている (Brandon and Sawa, 2011; Johnstone *et al.*, 2011; Narayan *et al.*, 2013) 。また、DISC1 は不溶性の凝集体を形成することが示されているが (Leliveld *et al.*, 2008; Atkin and Kittler, 2012; Hamburg *et al.*, 2016; Trossbach *et al.*, 2016) , DISC1 凝集体の構造的基礎や神経病理的な効果はまだ明らかにされていない。そこで、HD における変異 HTT と DISC1, PDE4 の相互関係や、変異 HTT の DISC1 凝集に対する影響を調べることにより、HD における精神症状発症メカニズムの解明を試みた。

本論文は HD において変異 HTT が形成する伸展ポリグルタミン凝集体の構造学的性質およびタンパク質相互作用に与える影響について以下の新たな知見を示したもので

ある。

- (1) HD 原因遺伝子産物である変異 HTT が異なるアミロイド構造にミスフォールドし、異なる細胞毒性を示すことの証明。
- (2) HD モデルマウス脳に形成されたポリグルタミン凝集体が, *in vivo* において, 発現する脳部位によって異なるタンパク質構造を示すことの証明。
- (3) HD における DISC1-PDE4 複合体の同定により HTT が DISC1-PDE4 経路に関係している可能性の示唆。
- (4) HD における DISC1 の凝集を通して DISC1-PDE4 相互作用の障害や行動学的な変化を巻き込む重要な分子メカニズムの解明。

これらの新知見により HD および他の神経変性疾患における治療戦略の開発に貢献することが期待される。

第二章 AAV を介した shRNA によるハンチントン病モデルマウスの病理症状の緩和

緒論

ハンチントン病 (HD) は致命的な進行性の神経変性疾患であり、ハンチンチン (HTT) タンパク質をコードする遺伝子の最初のエクソンに CAG 反復の伸展を持つ。この変異 HTT タンパク質は特に神経細胞内において核内凝集体を形成し、様々な他のタンパク質を巻き込み、細胞機能不全を引き起こす。HD 関連の疾患症状を減弱させるために、RNA 阻害 (RNAi) を介した HTT 発現抑制が提案され、効果が報告されているが、HD モデルマウスの疾患症状発症後における RNAi 治療の有効性は証明されていない。テトラサイクリン制御システムを使った条件付き HD モデルマウスでは、変異 HTT 断片の発現により神経細胞の神経細胞封入体形成や著しい運動不全を示すが、神経症状発症後におけるテトラサイクリン制御による変異 HTT の発現阻害は、封入体の消失や運動障害の緩和をもたらした (Yamamoto *et al.*, 2000)。したがって、RNAi による HTT 発現の減少は、発現阻害処置が神経症状発症のあとで行われた場合においても、HD に関連する症状の進行を減弱させる可能性が高い。したがって第二章では、神経細胞への導入効率の高い recombinant adeno associated virus (rAAV) を介し、病因遺伝子をターゲットとした shRNA を、HD モデルマウスの神経障害の重篤な脳線条体に導入することにより、領域特異的に疾患遺伝子発現を抑制し、その神経病理学的変化について調べた。

材料および方法

1. HD モデルマウス

HD モデルとして HD190QG トランスジェニックマウスを使用した。HD190QG トランスジェニックマウスはゲノムに 190CAG リピートを含む N 末端の断片化された HTT とその下流に EGFP を融合させた外来遺伝子配列を持ち、顕著な運動異常と脳神経細胞における凝集体形成および短寿命などの神経症状を示す (Kotliarova *et al.*, 2005)。このマウスを用いたすべての実験は、理化学研究所脳科学総合研究センターの動物実験委員会の承認の下に行った。

2. rAAV の構築と産生

EGFPmRNA を標的としたショートヘアピン RNA の 10 の候補配列を pSilencer A プラスミド (Ambion®, ThermoFisherScientific, Waltham, MA) に挿入した。遺伝子発現抑制効果を評価するために、それぞれの shRNA を含む pSilencer と EGFP 発現ベクターである pEGFP-N1 (Clontech, Kusatsu, Shiga, Japan) を同時に Neuroblastoma 細胞株である Neuro2a 細胞に導入した。形質転換細胞の細胞抽出液を用いてウエスタンブロット解析を行い、GFP 抗体 (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) による検出強度を比較し RNAi 効果について評価した。GFP 遺伝子発現抑制効果のある shRNA (shEGFP) と効果のないコントロールとしての配列 (shEGFPcontrol) を選択し、U6 プロモーターを含んだ shEGFP 発現カセットを PCR によって作成した。作成に使用したプライマーは *Hind*III 制限酵素サイトを含み、forward primer: 5'-CCCAAGCTTGGGATCTTACCGCTGTTGAGA -3', reverse primer: 5'-

CCCAAGCTTGGGCCACACTTCAAGAACTC-3'である。形質転換を可視化するために、monomeric Red Fluorescence Protein (mRFP) cDNA を pRSET_B (Campbell *et al.*, 2002) 内の mRFP1 より複製した。これを pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に挿入することにより CMV プロモーター制御の mRFP 発現カセットを作製し、プロウイルスプラスミドに挿入した (Fig. 2-1A)。shEGFP 発現カセットもまた AAV2 および AAV5 特異的な繰り返し反転配列末端を持つプロウイルスプラスミドである pAAV2-shEGFP もしくは pAAV5-shEGFP に挿入した。rAAV-shEGFP と rAAV-shEGFPcontrol は既出の three-plasmid transfection protocol によって作製した (Okada *et al.*, 2002; 2005)。ウイルス液は 1×10^{10} genome copies/ μ l にするためにプラスミドを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより力価測定した。

3. In vitro での shRNA 効果の解析

shRNA の遺伝子発現抑制効果を検証するために、pEGFP-N1, もしくは N-terminal HTT exon 1 遺伝子 に CAG 繰り返し配列 16, 60, 150 リピートを含み EGFP を融合させた HTT16QG, HTT60QG および HTT150QG 発現プラスミドを使用した (Wang *et al.*, 1999)。これらのプラスミドを用いて Human Embryonic Kidney cell 293 (HEK 293 細胞)を形質転換し、プラスミド導入 4 時間後に rAAV2-shEGFP もしくは shEGFPcontrol を 1×10^5 genome copies/cell の濃度で培地に加えてウイルス感染を行った。ウイルス感染 48 時間後に RFP 陽性細胞における EGFP 蛍光強度を Cellomics™ Array Scan® V^{TI} System (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) によって解析した。

4. マウス脳へのウイルス注入

rAAV2-shEGFP ウイルスをオスの HD モデルマウス頭蓋十字縫合の前方 0.5mm, 左

右の側方 2mm の 2 カ所に、深さ 3mm に穿刺し、0.3 μ l/min の注入速度で 3 μ l 投与した。同量のバッファーを同時に反対側の脳に注入し、対照実験とした。ウイルス注入は 8 週齢もしくは 12 週齢において行い、24 週齢で解析を行った。

5. 蛍光イメージャーによるウイルス形質転換と凝集体の検出

rAAV2-shEGFP ウイルスもしくはバッファーを注入したマウス脳を 24 週齢において 4%パラホルムアルデヒドを使用して灌流固定を行い、厚さ 40 μ m の切片を作製した。外部レーザー光 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いたレーザースキャンイメージシステム (Molecular Imager FX; Bio-Rad Laboratories) を使用し、488nm 励起光および 530nm バンドパス吸光フィルター, もしくは 532nm 励起光および 640nm バンドパス吸光フィルターを用いて、切片における GFP 蛍光および RFP 蛍光を検出した (Kotliarova *et al.*, 2005)。

6. 免疫染色と凝集体カウント

厚さ 40 μ m の浮遊切片を作製し、蛍光免疫組織染色に用いた。rAAV 感染領域を同定するために、切片を anti-RFP ウサギポリクローナル抗体 (Clontech) と反応させ、続いて AlexaFluor 568-標識抗ウサギ二次抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて免疫反応処理を行い、FV1000-D 共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を使用し蛍光免疫染色画像の解析を行った。変異 HTT 凝集体は EGFP 抗体 (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan), HTT 抗体 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) および ubiquitin (ユビキチン) 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) とそれに続く ABC Elite kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) によって染色し、免疫組織画像を撮影した。凝集体の数のカウントは既出の方法で、デジタルイメージのコントラストや明るさを標準化した後、MacSCOPE (Mitani, Tokyo, Japan) によって算出した (Tanaka *et*

al., 2004)。

7. フィルタートラップ解析

実験対象マウスの線条体、皮質、海馬を摘出し、IMAC buffer (20mM HEPES pH 7.4, 140mM 酢酸カリウム, 1mM 酢酸マグネシウム 1mM EGTA, プロテアーゼインヒビターを含む; Roche) 中でデジタルホモジナイザー (As One, Osaka, Japan) を使用し、1000rpm で7回ホモジナイズして懸濁させた。10 μ g のタンパク質を含む懸濁液を 0.2 mL の 2% SDS に希釈し、ドットプロット装置に装着した 0.2 μ m セルロースアセテート膜 (Advantec Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo Japan) に吸着させ、それぞれ 0.6ml の 2% SDS を用いて洗浄を行った。捕捉された不溶性のタンパク質は GFP 抗体 (Roche) や HTT 抗体 (Chemicon) , および標識二次抗体や蛍光基質と反応させ、LAS-1000plus/Image Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan) によって検出し、定量した。

8. In situ ハイブリダイゼーション

既出の報告により HD190QG マウス脳において発現低下がみられる DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein ; 32 000 ダルトン) 、エンケファリンについて、非 RI ジコキシゲニン標識 cRNA プローブを既出の方法で使用し、厚さ 40 μ m の切片を用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った (Kotliarova *et al.*, 2005) 。

9. 定量 RT-PCR

190QG 線条体における総 RNA の抽出は、TRIZOL® Reagent (Invitrogen) を用いて行った。夾雑 DNA は RQ1 RNase free DNase (Promega, Madison, WI) で除去し、

2 μ g の総 RNA を Superscript™III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) による RT-PCR に使用した。TaqMan PCR 反応は既出の TaqMan プライマーおよびプローブセットを用いて行った (Kotliarova *et al.*, 2005)。GAPDH に対するプライマーをそれぞれのサンプルで同じ方法で使用して実験結果を標準化し、評価を行った。

10. 統計解析

統計的有意性は StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) による Student の t-test をによって算出し、 $p < 0.05$ にて有意に異なると判断した。

結果

1. AAV-shRNA による遺伝子発現抑制

EGFP 融合 HTT-190Q 断片は、HD190QG マウスにおいて病原導入遺伝子であることが明らかにされている (Kotliarova *et al.*, 2005)。EGFP 融合 HTT-polyQ 断片に対する効果的な shRNA を選択するために、培養細胞を用いた *in vitro* 実験を行った。EGFP を標的にした shRNA 配列を含む shRNA ベクター 10 種類それぞれを EGFP もしくは EGFP 融合 HTT-polyQ 断片発現ベクターと同時に Neuro2a 細胞に導入することにより、遺伝子発現阻害効果を評価した。EGFP を標的にした配列 5'-GCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT -3' (shEGFP) は、EGFP および EGFP 融合 HTT-polyQ の発現を最も顕著に減少させた。10 個の候補配列のうち 3 個は遺伝子発現阻害効果を示さなかったため、そのうちの 1 個の shRNA 配列 5'-GTTTCATCTGCACCACCGGCTT -3' をコントロールとして使用した (shEGFPcontrol)。次に、AAV ベースのベクターを構築し (Fig. 2-1A)、作製したベクターを使用して rAAV を産生した。rAAV を介した shEGFP 遺伝子導入が EGFP 融合

HTT-polyQ 断片の遺伝子発現を阻害することができるかを試すために、EGFP もしくは EGFP 融合 HTT-polyQ 断片発現ベクター（それぞれ EGFP, HTT16QG, HTT60QG および HTT150QG）によって形質転換した HEK293 細胞に rAAV5-shEGFP もしくは rAAV5-shEGFPcontrol を添感染させ、GFP 蛍光強度を測定した。shEGFP 導入細胞群は shEGFPcontrol 導入細胞群に比べて、顕著に GFP 蛍光強度を減少させた (Fig. 2-1B)。また、shEGFP は HTT-polyQ-EGFP の発現も効果的に抑制した。shEGFP の GFP 強度の値は shEGFPcontrol 形質導入細胞と比べて EGFP, HTT16QG, HTT60QG および HTT150QG の群において それぞれ 0.43 ± 0.014 , 0.37 ± 0.033 , 0.50 ± 0.032 , および 0.58 ± 0.027 (mean \pm SEM, n = 5) であった (Fig. 2-1C)。

2. マウス脳における shRNA の発現

作製した rAAV5-shEGFP を 12 週齢の片側の線条体に注入し、同じ量のバッファをもう片方の線条体に注入した。処置されたマウスは 24 週齢で屠殺し、厚さ 40 μ m の切片を作製し、レーザースキャンイメージシステムを使用して観察した。RFP 蛍光の検出により rAAV5-shEGFP 注入部位において rAAV 感染領域を同定することができた (Fig. 2-2A)。190QG マウス脳においては、HTT190Q-GFP の凝集による GFP 蛍光は線条体において特異的に強く検出された (Fig. 2-2A)。そのシグナルは rAAV5-shEGFP を注入した RFP 陽性領域では明らかに減退していた (Fig. 2-2A)。さらに免疫蛍光染色した切片を使用して共焦点レーザー顕微鏡によって高倍率での解析を行い、RFP 陽性神経細胞における GFP 蛍光凝集体形成が、shEGFP の形質導入 3 か月後においても抑制されていたことを明らかにした (Fig. 2-2B)。対照的に shRNA を導入していない反対側の線条体では GFP 蛍光を発する凝集体が多量に観察された (Fig. 2-2B)。RFP 発現は線条体だけでなく皮質、淡蒼球外節、海馬そして黒質でも検出されたが、

GFP 陽性凝集体の減少は、より線条体や皮質、海馬で顕著に観察された。

3. shGFP による凝集体形成の減少

GFP, HTT, ユビキチンに対する抗体を用いて免疫組織化学的に観察した。GFP 抗体と HTT 抗体は核内凝集体と細胞質の凝集体を、ユビキチンは大きな核内凝集体を HD190QG および HD モデルマウス R6/2 トランスジェニックマウスにおいて検出する (Davies *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2004; Kotliarova *et al.*, 2005)。凝集体の減少は HD マウスモデルの病理症状の改善のひとつの指標である (Sanchez *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005)。HD190QG マウスでは、凝集体形成は最初 4 週齢の線条体で観察され、振戦、運動失調、不随意運動は 6 週齢で観察される (Kotliarova *et al.*, 2005)。HD の病理症状発症後における RNAi 治療の効果を調べるために、神経症状発症後の 12 週齢の HD190QG マウスの線条体に shRNA を投与した。24 週齢でマウス脳を薄切し、GFP, HTT, ユビキチン抗体を使用して免疫組織染色を行った (Fig. 2-3A)。shEGFP 導入線条体の GFP 陽性凝集体の数は対照注入線条体に比べて明らかに減少しており、shEGFP 導入線条体の GFP 陽性凝集体の数は対照注入線条体の 19.4%であった (Figs. 2-3B 1, 2)。shEGFP 導入線条体の HTT 陽性凝集体の数は対照注入の 17.7%であり (Figs. 2-3C 1, 2)、shEGFP 導入線条体のユビキチン陽性凝集体の数は対照注入の 34.1%であった (Figs. 2-3D 1, 2)。

さらに、shEGFP 導入線条体の凝集体の数を、shEGFP 導入時と同じ週齢の HD190QG マウス脳線条体で形成される凝集体の数と比較した。12 週齢で shEGFP を導入したマウスを 24 週齢において免疫組織染色し、rAAV およびバッファー注入処置を行っていないマウス 12 週齢の線条体と比較した。shEGFP 導入線条体の GFP 陽性凝集体の数は、未処置の 12 週齢の HD190QG マウス線条体のその 26.8%に減少していた (Figs. 2-3B 2, 3)。shEGFP 導入線条体の HTT 陽性凝集体の数も、12 週齢の

HD190QG マウス線条体の HTT 陽性凝集体の 41.1% に減少しており (Figs. 2-3C 2, 3), shEGFP 導入線条体のユビキチン陽性凝集体の数は, 12 週齢の HD190QG マウス線条体のユビキチン陽性凝集体の 42.9% に減少していた (Figs. 2-3D 2, 3)。24 週齢の対照注入部位での凝集体の数は, 未処置の 24 週齢の HD190QG マウスと同様であった (Figs. 2-3B-D 1, 4)。また, rAAV-shEGFPcontrol 導入マウス脳 of 24 週齢における凝集体の数は, 未処置の 24 週齢の HD190QG マウスおよびバッファー注入部位における凝集体数と同様であった。この結果は, この shRNA 導入方法が線条体での凝集体形成には影響していないことを証明しており, shEGFP の発現により HD190QG の病理症状が処置時よりも改善したことを示している。

本研究ではさらに脳内の不溶性タンパク質の蓄積に対する shEGFP の効果を調べた。HD190QG マウスでは核内および核外凝集体にとりこまれる不溶性タンパク質が, 週齢依存的に増加する (Kotliarova *et al.*, 2005)。フィルタートラップ解析により, 不溶性タンパク質の蓄積が shEGFP 導入部位では対照処置線条体のそれにくらべて顕著に減少していることと, 非導入部位である皮質での不溶性タンパク質量が両側線条体においてほとんど差がないことが証明された。減少は線条体では 73% であり, 皮質では 5% であった (Fig. 2-3E)。同様の結果が HTT 抗体を使用しても得られた。

4. shRNA による DARPP-32 発現の回復

DARPP-32 やエンケファリン、オキシトシンやバソプレッシンは HD モデルマウスおよび HD190QG マウス線条体において発現抑制されている (Kotliarova *et al.*, 2005, Luthi-Carter *et al.*, 2000)。HD モデルの線条体特異的な転写活性への shEGFP の効果を調べるため, RNA プローブを用いた *in situ hybridization* を行った。その結果, DARPP-32 の発現は回復傾向にあった (Fig. 2-4A)。さらに TaqMan プライマーを用いた定量 RT-PCR 解析を行い, DARPP-32 とエンケファリンの mRNA 発現が shEGFP

導入線条体で対照注入部位よりも高くなっていることを明らかにした (Fig. 2-4B)。したがって shEGFP 導入によりそれらの遺伝子発現が部分的に回復していることが示唆された。

考察

本研究により, HD に関連する不溶性タンパク質の蓄積や DARPP-32 発現抑制のような神経病理学的異常が, 病因遺伝子に対する RNAi 導入によって緩和されることが示された。shRNA 導入後, 線条体でのユビキチン抗体によって検出される神経細胞核内凝集体は対照処置された線条体の 43.1%に減少した。shEGFP 導入線条体の凝集体の数が RNAi 形質導入と同時点の線条体のそれよりも少なかったことは重要な発見である。

様々な治療実験が HD マウスモデルの病理学および行動学的欠損を含む HD 関連異常の改善を示しているが (Chen *et al.*, 2000; Ferrante *et al.*, 2000; 2003; Sanchez *et al.*, 2003; Karpuj *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2004), ほとんどの研究が HTT の下流や HTT の疾患関連遺伝子による間接的な効果を標的とし, 病気の進行を遅延させるという結果になっている。変異遺伝子発現のサイレンシングは HD 条件付きマウスモデルを用いて行われており (Yamamoto *et al.*, 2000), toxic gain of function の場合の神経変性疾患を処置する直接的な方法として変異遺伝子発現の抑制は効果的であることから, RNAi は標的遺伝子のノックダウンの強力な道具として期待されている。合成 siRNA 注入のサイレンシング効果は新生マウス脳で 14 日以上持続し, R6/2 の発病を遅らせ, 寿命が延長した (Wang *et al.*, 2005)。それ以上に, ベクターによる RNAi は導入後 2 から 5 か月以上安定的に継続し, 運動障害や神経病理学的異常の改善を示した (Harper *et al.*, 2005; Rodriguez-Lebron *et al.*, 2005)。AAV5 はマウス脳での神経細胞

の形質導入に効果的であり (Mastakov *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2005), U6 プロモーターによる shRNA 発現はマウス線条体において効果があることが報告されている (Harper *et al.*, 2005)。これまで RNAi を介した戦略は発症前治療として研究されてきたため、本研究では、RNAi 治療が病気の発症後の HD モデルの病理症状に機能するかどうかを調べた。rAAV を介した shRNA 投与によってマウス脳の HD 病理症状は、形質導入が病理症状がすでに発現した後で行われたにもかかわらず、強烈に改善した。疾患原因遺伝子のサイレンシング効果はマウス脳でウイルス注入後 2 週間で観察され、効果は 3 か月以上持続した。凝集体の形成は shRNA 導入によって効果的に阻害され、凝集体の数は形質導入の週齢の動物と比べても顕著に減少していた。この結果は、条件付き遺伝子発現 HD モデルマウスにおいて、神経症状発症後に疾患遺伝子発現を停止させ症状を改善させた既出の報告の実験結果 (Yamamoto *et al.*, 2000) を、AAV を介した shRNA 導入により、後天的に遺伝子をノックダウンすることによって実現させたことを示している。変異 HTT の発現は HD モデルマウスにおいて線条体特異的な mRNA の量の減少をもたらすが (Luthi-Carter *et al.*, 2000; Rodriguez-Lebron *et al.*, 2005; Kotliarova *et al.*, 2005), 特に線条体で広く発現する DARPP-32 は、HD190QG マウスにおいて野生型マウスに比べて 8 週齢で 50% 発現抑制される (Kotliarova *et al.*, 2005)。本研究では変異 HTT の発現を阻害する shRNA 導入により DARPP-32 の遺伝子発現の回復が示された。この結果より、HD190QG マウスの shRNA 導入領域の神経細胞における遺伝子発現調節が改善していることが示唆される。病理症状の改善を確認するために同一個体での比較を行ったが、その後の実験において HD190QG マウス脳両側に shEGFP を導入した個体も作製し、体重減少等の疾患症状の緩和を観察した。今後、機能回復および寿命延長のための shRNA の形質導入のタイミングの検討が必要である。

本研究では EGFP に対する shRNA を HD190QG マウスに用い、変異遺伝子発現を

阻害した。この shEGFP は本研究の動物モデルにおいて変異 HTT 発現を調整するためにデザインされたもので、ヒトの HD の遺伝子治療の臨床研究には応用できない。HTT に対する siRNA や shRNA はこれまでに研究されているが (Harper *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005) , これらの siRNA 配列は変異 HTT だけでなく、野生型 HTT も同時に減少させる。野生型 HTT は胚発生において不可欠であり、野生型 HTT の完全な欠失は胚性致死となり、また、野生型 HTT の減少は行動学的異常や神経細胞欠失をもたらす (Van Raamsdonk *et al.*, 2005) 。事実、YAC128 マウスの野生型 HTT の欠失は野生型 HTT を発現する YAC128 マウスに比べ、運動機能障害を誘導し生存性が悪い (Van Raamsdonk *et al.*, 2005) 。これらの理由から、選択的に変異 HTT だけサイレンシングし野生型 HTT の発現には影響を及ぼさない siRNA 配列のデザインが必要である。今後この問題が解決すれば、RNAi を介した遺伝子治療が発症前、発症後の治療戦略として、実用的になり得るだろう (Ralph *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2005) 。

小括

致命的な進行性の神経変性疾患であるハンチントン病 (HD) は、病因遺伝子であるハンチンチン (HTT) に含まれる CAG 反復の異常伸長により変異 HTT タンパク質が発現し、凝集、蓄積することにより引き起こされる。本研究は HD モデルマウスにおいて AAV を介した RNAi 導入による変異 HTT 遺伝子の発現阻害を試み、大脳線条体における神経細胞内に形成される変異 HTT 凝集体の数を減少させた。また、RNAi 導入を疾患症状発症後に行うことにより、RNAi が HD に関連する病理的異常を処置時よりも改善させることを明らかにした。従って、RNAi による変異遺伝子の発現抑制は、神経症状発症後の神経変性疾患においても病気の進行を改善させる可能性がある。

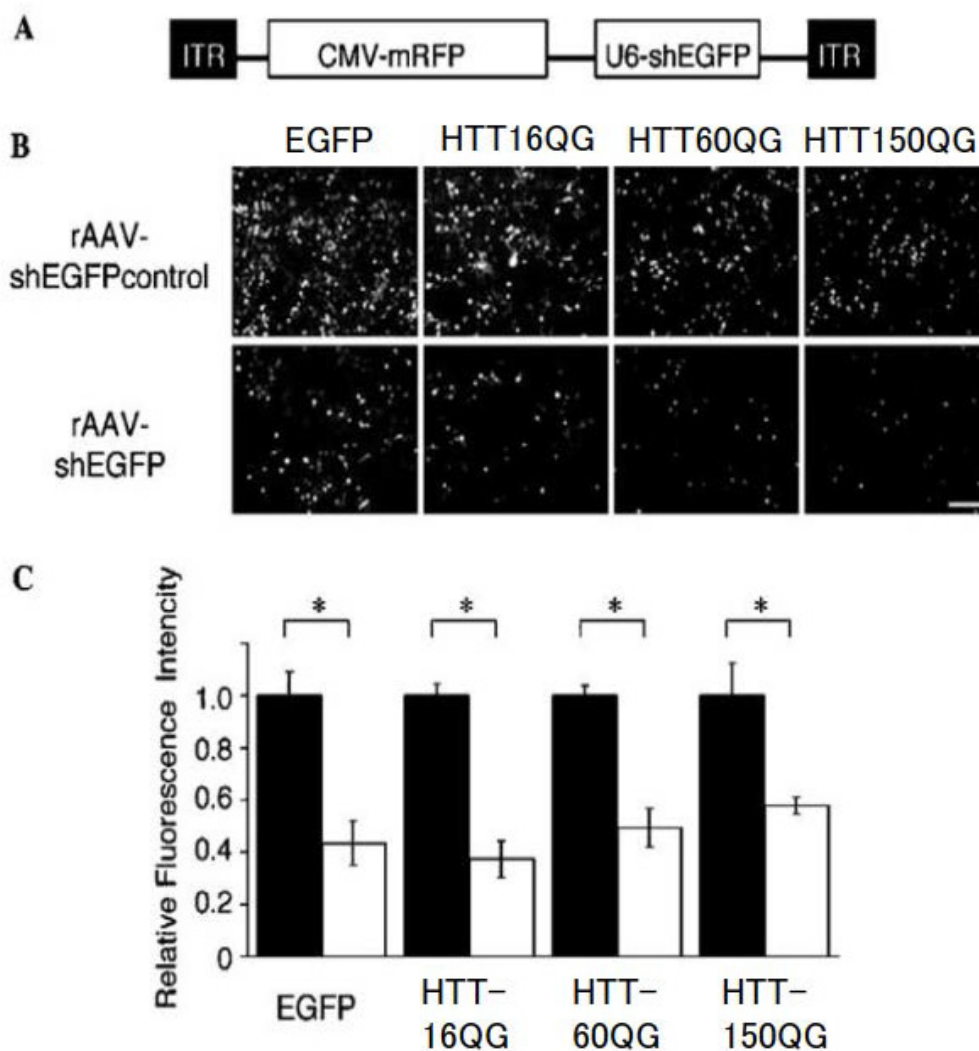


Fig. 2-1. rAAV-shEGFP reduced GFP expression in vitro. (A) AAV-shEGFP viral vector construct. ITR, inverted terminal repeat. CMV and U6 promoters were used for RFP and shEGFP. (B) Fluorescence photomicrographs of HEK-293 cells transfected with EGFP, HTT16QG, HTT60QG, and HTT150QG expression vectors and transduced with rAAV-shEGFP or rAAV-shEGFPcontrol, respectively. The photograph was taken after 48 h after viral transduction. Scale bar refers to all panels, 100 μ m. (C) The relative level of GFP fluorescence intensity of rAAV-shEGFP transduced cells was compared to that of shEGFPcontrol transduced cells. The relative level of GFP fluorescence intensity of rAAV-shEGFPcontrol transduced cells (black bars); rAAV-shEGFP transduced cells (white bars). Values are given as means \pm SEM (n = 5). *p < 0.001.

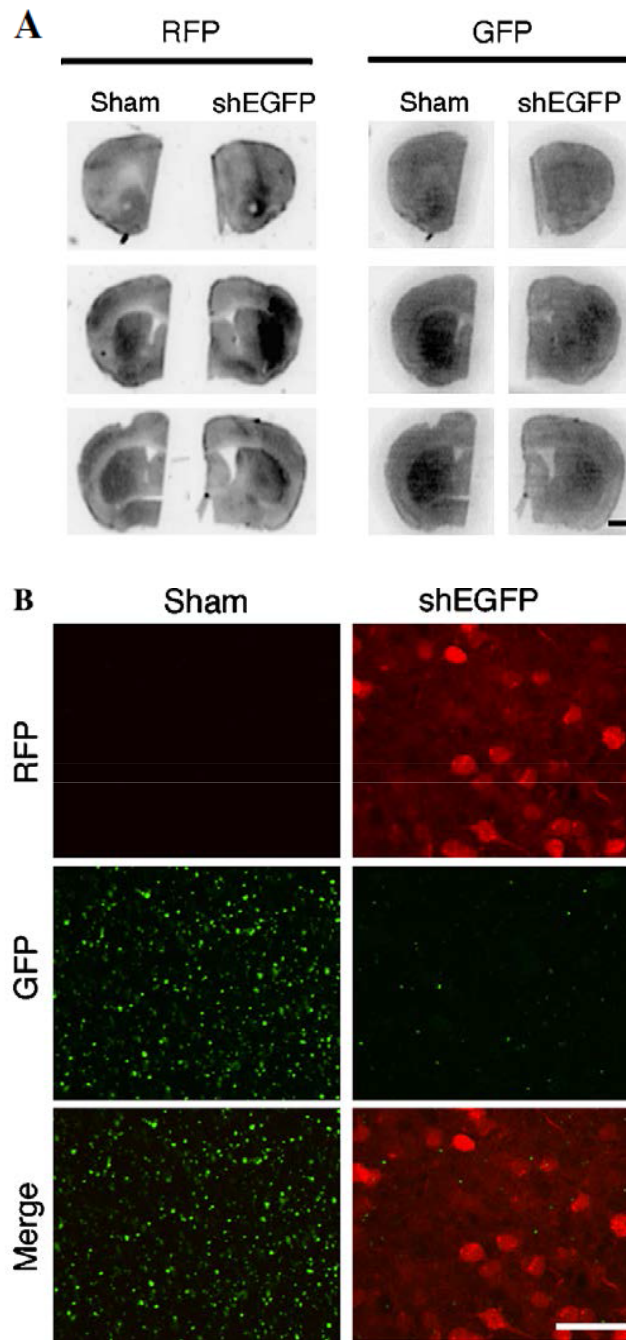


Fig. 2-2. rAAV-shEGFP transduction in the mouse brain decreases EGFP-positive aggregates (direct observation of EGFP fluorescence). (A) A montage of rostral-to-caudal coronal sections illustrates the extent of expression of RFP and EGFP in the brain. Three microliters of buffer was injected into striatum; sham, and rAAV-shEGFP was simultaneously injected into the contralateral side; shEGFP. Dark areas show fluorescent signal. Scale bar is 1 mm and refers to all panels. (B) EGFP fluorescence of the shEGFP-transduced striatum in high magnification. EGFP fluorescence was directly observed, while RFP was detected by anti-RFP because of the weak fluorescence after fixation. Scale bar is 20 μ m and refers to all panels.

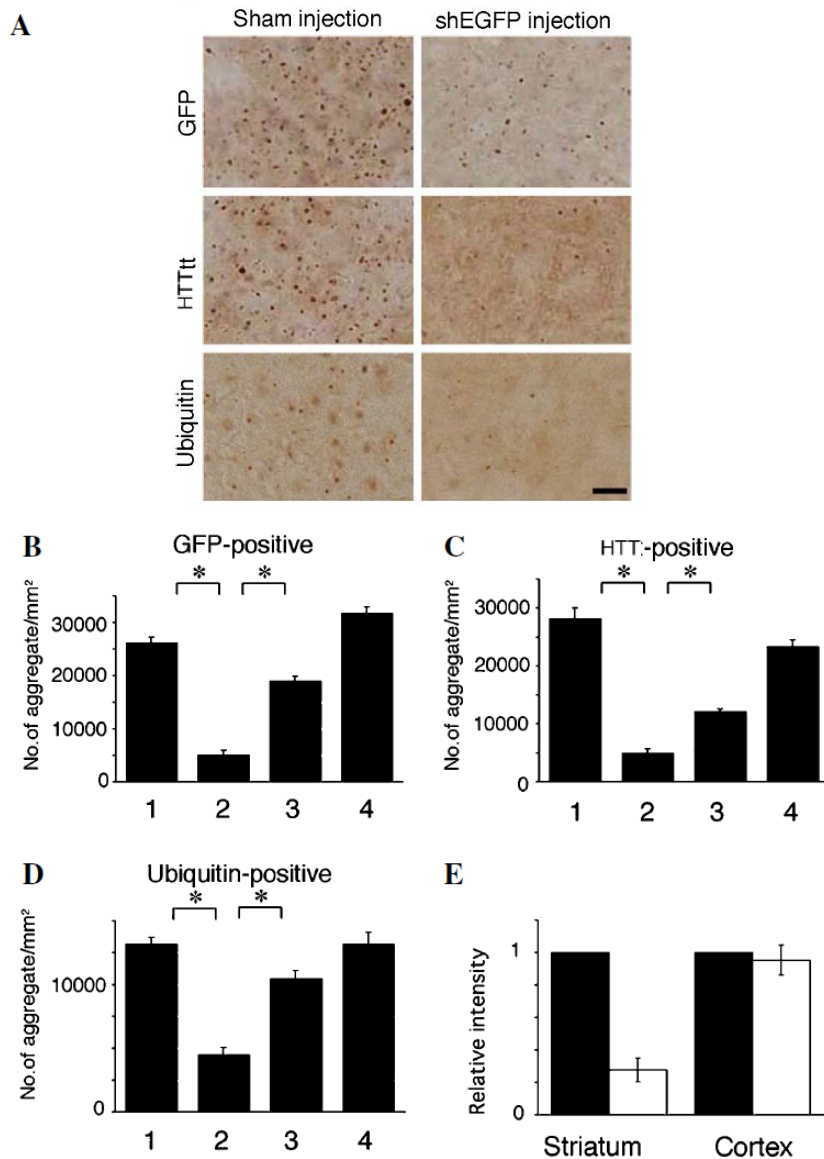


Fig. 2-3. shEGFP decreased antibody-positive aggregates and ameliorated aggregation pathology. (A) Representative images show GFP-, HTT-, and ubiquitin-positive aggregates in the sham-injected or shEGFP-transduced striatum. Scale bar is 20 μ m and refers to all panels. (B-D) Number of aggregates in the striatum is shown. rAAV-shEGFP was injected into the striatum at 12 weeks old and analyzed at 24 weeks old. The bars indicate aggregate number in the sham-injected striatum at 24 weeks old (1), shEGFP-transduced striatum at 24 weeks old (2), non-treated 12 weeks old HD190QG striatum, at the time point of shRNA transduction (3), and non-treated 24 weeks old HD190QG, as non-treatment control (4). The graphs show the number of GFP-positive aggregates (B), HTT-positive aggregates (C), and ubiquitin-positive aggregates (D). Data are shown as average \pm SEM (Y axis indicates the number of aggregates/mm². Sham-injected, shEGFP-transduced, and 12 weeks old control striatum; n = 3, 24 weeks old control striatum; n = 4). *p < 0.0001. (E) Quantitative analysis of filter trap assay indicates relative amount of insoluble protein in the treated striatum. The relative fluorescence levels of sham-injected side (black) and shEGFP-transduced side (white) are shown as the average \pm SEM (n = 4). *p < 0.0001.

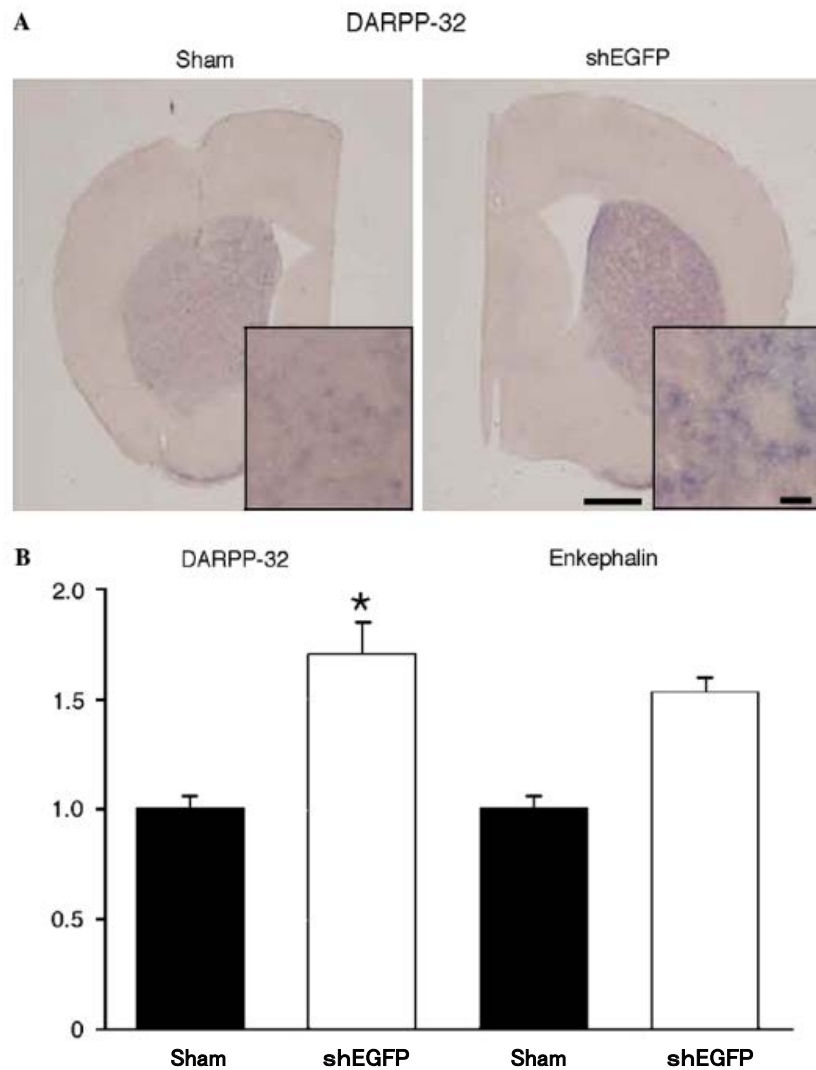


Fig. 2-4. shRNA restored DARPP-32 and enkephalin expression. (A) In situ hybridization of DARPP-32 at 24 weeks old after rAAV-shEGFP injection into the striatum at 9-week-old. Scale bar shows 1 mm. Higher magnification images of striatum are shown in inset, respectively, and scale bar is 20 μ m. (B) DARPP-32 and enkephalin mRNA expression in striatum was determined by TaqMan RT-PCR analysis at 24 weeks after rAAV-shEGFP injection into the striatum performed at 12 weeks old. The expression levels of mRNA were normalized by that of GAPDH. DARPP-32 showed a significant increase in the shEGFP-injected side and enkephalin showed not significant but the tendency to restore. The values are given as means \pm SEM (n = 3). *p < 0.05.

第三章 ハンチンチンエクソン1アミロイドの異なる構造 は *in vitro* および *in vivo* において異なる細胞毒性を示す

緒論

神経変性疾患のうち、病因遺伝子配列内に CAG のリピートを含み、この繰り返し配列が異常伸長することにより疾患症状を引き起こす病気の総称を、ポリグルタミン病という。HD を含むポリグルタミン病の特徴は、ベータシートに富んだ凝集体の形成である。この凝集体はアミロイドと呼ばれ、伸展したポリグルタミンを含む病因タンパク質 HTT に起因する。しかしながら、このポリグルタミンを含むアミロイドの形成が病理症状の直接的な原因なのか単純な二次的な症状なのか未だ不明瞭であり、ポリグルタミンアミロイドそのものに毒性があるかどうか不明のままである。HD においては、ポリグルタミンアミロイド形成が引き起こす病理症状は、脳部位によって異なる。この部位特異性は、プリオン病における表現型の多様性と似ている。酵母と哺乳類の両方のプリオンについての研究成果により、プリオン病の表現型の多様性はプリオンの立体構造の違いに起因することが立証されている (Chien *et al.*, 2004; Shorter and Lindquist, 2005)。同様に、神経変性疾患におけるアミロイド形成タンパク質もしばしば一つ以上の構造にミスフォールドし、そのタンパク質が選択する特異的なアミロイドの構造によって表現型や病理学的重要性が異なることが明らかになっている (Dobson, 2003; Chien *et al.*, 2004; Eisenberg *et al.*, 2006; Haass and Selkoe, 2007; Kodali and Wetzal, 2007)。アルツハイマー病の原因であるアミロイドベータ 1-40 ペプチドもまた、特異的な状況下で異なるアミロイド構造にミスフォールドすることができ、ラット胚海馬神経細胞初代培養において、異なる構造のアミロイドベータ 1-40

は異なる毒性を示す (Petkov *et al.*, 2005)。従って第三章は、新しく開発したアミロイドの細胞導入法を用いて、伸展ポリグルタミンを含む HTT アミロイドが異なるアミロイド構造を形成し、*in vitro* および *in vivo* において構造依存的な細胞毒性を示すことを明らかにすることと、HD の新しい治療戦略の開発のために毒性のあるアミロイド構造の証明することを目的とした。

材料および方法

1. *In vitro* におけるアミロイド調製

精製タンパク質調製のために、Q10, Q42, Q62 を含む HTT の N 末端断片を、ポリヒスチジン-GST タグをもつ pGEX6P2 プラスミド (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) に挿入し、大腸菌発現用プラスミドを構築した。この Q10, Q42, Q62 をもつ HisGST 融合 HTT タンパク質を *E.coli* に発現させ、Ni-NTA agarose (Pro-ChemInc., Alpharetta GA) と GST resin (GE Healthcare) を用いて精製した。HTT タンパク質はそれぞれの実験直前に 540,000×g で 30 分遠心し、すでに存在しているかもしれない凝集体を除去してから使用した。5μM HisGST-HTT に GST タグを切断するために prescission protease (GE Healthcare) を混合し、4, 23, 37°C 条件下でそれぞれの実験に適した方法により重合し、アミロイドを形成させた。

2. *In vitro* HTT アミロイドの評価

HTT アミロイド (10μM) は 150mM の塩化ナトリウムを含む 5mM リン酸カリウムバッファー (pH7.4) (KPi バッファー) に溶解し、JASCO J-720 分光光度計を使用して遠紫外円偏光二色性スペクトル (Far-UV CD spectra) を 25°C で計測した。スペクトルは 190nm から 26nm 間で 10nm/min の速さで解像度 0.1nm で計測し、4 回スキャンし

た平均値を使用した。HTTQ42/62 アミロイドのフーリエ変換赤外分光スペクトル(FT-IR スペクトル)は、Nicolet 6700 FT-IR 分光測定器と Nicolet Continuum 顕微鏡 (Thermo Scientific) を使用して、室温中において窒素ガス供給下で、二枚の塩化バリウム窓板の間にアミロイドを挟んで計測した。スペクトルの平滑化は IgorPro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) を適用した。HD モデルマウス R6/2 マウス脳からの凝集体の構造解析をするために、5 μ M の HTTQ42 精製タンパク質を、マウス脳より精製された HTT 凝集体 (0.5 μ g) と prescission protease とともに 4 $^{\circ}$ C で重合させた。その結果形成されたアミロイドは、熱安定性実験と FT-IR 分析に使用した。

アミロイド構造におけるチオフラビン T 蛍光の測定は、12.5 μ M チオフラビン T と 50mM グリシンバッファー (pH 8.0) に希釈した 5 μ M HTT アミロイド を混合し、プレートリーダー (ARVO MX, PerkinElmer, Waltham, MA) を使って励起 442nm, 吸収 483nm により測定した。アミロイド構造に対するコンゴレッド結合については、4 μ M コンゴレッド と 5mM KPi バッファーに希釈した 1.25 μ M HTT アミロイド を反応させ、UV-可視分光光度計 (UV-2400, Shimadzu, Atsugi, Japan) を用いて測定した。X線繊維回折実験のために、HTT アミロイドを 5mM KPi バッファーを用いて 5 μ M に希釈し 1mL 中でアミロイド形成を行った。HTT アミロイドは 20,000 \times g, 30 min 遠心して集め、1.0mm 幅のスリット入射後 12 μ m のピークフィルム上に置いた。サンプルと検出器の距離は 706mm で、ベヘン酸銀の粉体回折によって校正し、水和した HTT アミロイドは Spring-8 の BL45XU を用いて 0.9 \AA X 線放射に暴露した。データはオンラインイメージ検出器 RIGAKU R-AXIS IV++によって室温にて 30 秒取得した。HTT アミロイド (5 μ M) の熱安定性は既出の方法により (Perutz *et al.*, 1994; Thomas, 2006) , 1.6%SDS の存在下で 5 分ごとに温度を上げていくこと (25 $^{\circ}$ C から 95 $^{\circ}$ C の間, 10 $^{\circ}$ C ずつのインターバル) でアミロイドを溶出させ、続いて抗伸展ポリグルタミン抗体 (1C2) (1:2000) (Chemicon) を用いたイムノブロッティングを行っ

た (Scherzinger *et al.*, 1997)。サイプロルビー染色 (Bio-rad) によってそれぞれのサンプル間で使用したタンパク質が同量であることを確認し、イムノブロットのバンド強度を ImageJ (NIH) によって分析した。電子顕微鏡観察のために、HTT アミロイドは 2% タングステン酸ナトリウムでネガティブ染色を行った。HTT アミロイドの形態は、電子顕微鏡 (LEO) もしくは原子間力顕微鏡 (Digital Instruments) のシリコンプローブ (RTESP, Veeco Instruments Inc., Painview, NY) を使用したタッピングモードによって調べた。フィルタートラップ分析はドットブロット装置 (Bio-rad) とセルロースアセテートメンブレン (0.2 μ m, Advantec) を使用し 5 μ M の濃度で重合させた HTTQ42 アミロイドを吸着させた。メンブレンは 0.5% triton X-100 もしくは 1% SDS を含む 5mM KPi バッファーで洗浄し、続いて 1C2 抗体 (1:2,000), 3B5H10 抗体 (Davies *et al.*, 1997) (1:2,000) (Sigma, Tokyo, Japan), 抗-HTT 抗体 (1:2,000) (Chemicon) を用いてイムノブロットティング, もしくはクマシーブリリアントブルー (CBB) を用いた染色を行った。

3. HTTQ42 および HTTQ62 の in vitro におけるアミロイド形成

HTT アミロイドの形成は、5 μ M の HTT タンパク質 と 12.5 μ M のチオフラビン T を含む 50mM グリシンバッファー (pH 8.0) を混合し、チオフラビン T 蛍光 (励起 442nm, 吸収 483nm) を 96-well のプレートリーダーを使用して経時的に測定した (Spectra Max M2, Molecular device, Sunnyvale, CA)。アミロイド形成速度については 5mM KPi バッファーに希釈した 5 μ M HTT タンパク質を、96-well plate 中で 2 分毎に 3 秒振盪させ、吸光度 (turbidity) を O.D. 340 nm において測定した。実験では、それぞれ示されたタンパク質を超音波破碎し (Branson sonifier, 20%, Branson Ultrasonics, Danbury, CT), シードとして使用した。繊維成長速度はアミロイド形成反応の初期線形勾配 (およそ 1 時間以内) から算出した。

4. In vitro HTTQ42 アミロイドの繊維剛性分析

5mM KPi バッファーに希釈した 1mL の 2.5 μ M HTTQ42 を 2mL チューブに分注し、4 もしくは 37°C に静置してアミロイド形成させた。分注されたそれぞれのアミロイド溶液をカットチップを使ってチューブから取り出し、2% リン酸タングステンによってネガティブ染色した。さらにアミロイド溶液の入ったチューブを回転振盪器 (Labquake, Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA) を使用し 8rpm の速さで 3 時間反転するように回転させた後、それぞれのアミロイド溶液をカットチップで取り出し、同様に染色した。アミロイド繊維の形態は電子顕微鏡で調べた。

5. R6/2 マウスからの HTT アミロイドの精製

R6/2 トランスジェニックマウスと週齢が一致する野生型マウスは、氷冷 PBS を用いて経心腔灌流し、脳を取り出し、続いて大脳皮質、線条体、海馬、そして小脳を分離した (それぞれ 3, 12, 6, 1 個体のマウスからの大脳皮質、線条体、海馬そして小脳を用いた)。In vivo HTT 凝集体の精製は、それぞれの組織 0.35g を RIPA バッファー (100mM トリス, 150mM 塩化ナトリウム, 0.5% triton X-100, プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche) , 1mM PMSF) 中で、デジタルホモジナイザー 1000rpm でホモジナイズし、30 秒超音波破碎した (Branson sonifier, 20%)。2%SDS と混合した上清は 30 分 540,000 \times g 超遠心し、そのペレットを 2%SDS に再懸濁し、30 秒超音波破碎した (Branson sonifier, 50%)。この手順を 3 回繰り返す。超遠心後に 5 分間の煮沸を行い、最終的に精製されたタンパク質凝集体を超音波破碎し、in vivo 凝集体とした。この in vivo 凝集体については、BSA を標準とした Bradford 分析によって濃度を算出した。それぞれの脳部位からの凝集体の相対的な量もまた、サイプロルビー染色 (Bio-rad) と turbidity 測定 (濁度測定 : 280 および 700nm における吸光度測定) によって確認した。

6. In vitro HTT アミロイドの neuro2a 細胞への導入

HTTQ42/62 (5 μ M) を 4 $^{\circ}$ C と 37 $^{\circ}$ C で重合し、その結果形成されたアミロイドを 20,000 \times g 30 分の遠心分離で集めた。上清の除去後、5mM KPi バッファーに溶解した 50 μ M のアミロイド溶液を 30 秒超音波破碎した (Branson sonifier, 20%)。超音波破碎された繊維を原子間力顕微鏡 (Digital Instruments) によって観察し、超音波破碎された繊維の長さがほぼ均一であることを確認した。Lipofectamine LTX と Plus 試薬 (Invitrogen) の製品プロトコールに従って調製し、最終濃度 2.5 μ M のアミロイドを 50 μ l の DMEM に混合し、30 分間室温で静置した後、250 μ l の DMEM にて培養液中の HD モデル細胞株 (HTT16Q-EGFP, HTT60Q-EGFP, HTT150Q-EGFP neuro2a 細胞: Wang *et al.*, 1999) に滴下した。アミロイド形質導入の 3 時間後、1 μ M の PonasteroneA (Invitrogen) によって HTT GFP 発現を誘導し、5mM dibutyrylcyclic AMP (Nacal tesque) によって分化誘導を行った。

7. PC12 細胞へのアミロイド形質導入

HTTQ42 アミロイドを PC12 細胞 (a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla) へのアミロイド形質導入のために用意した。アミロイド溶液は製造元のプロトコールに従って、pEGFPN1-HTTQ60 プラスミド (1 μ g) と最終濃度 1.25 μ M のアミロイドと Lipofectamine LTX and Plus reagents (Invitrogen) を 50 μ l の DMEM に混合し、室温で 30 分静置して反応させ、10%ウマ血清と抗生物質を含む DMEM 培養液 250 μ l 中の PC12 細胞に滴下した。細胞は神経成長因子 nerve growth factor (100ng/mL) (Sigma) によって分化させた。HTTQ60-GFP の点 (HTTQ60 凝集体) を含む細胞の数はアミロイド形質導入の 15 時間後に測定した。

8. 凝集体数計測と細胞生存率計測

HTT 発現誘導および細胞分化処理の 15 時間後に、蛍光顕微鏡下で撮影した画像を用いて、HTT 凝集体の GFP の凝集体を持つ細胞の数（～200）を手動で計測した。15 時間後における細胞死はほとんど観察されなかった。細胞の生存率は MTT 細胞数計測キット (Nacalai Tesque) によって HTT 発現の 4 日後に決定した。蛍光と光学画像は FV1000-D 共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) によって得た。統計解析 ($n > 3$) は Statview5.0 (SAS) によって行った。

9. AlexaFluor555 の標識と共局在実験

ポリヒスチジンと GST のタグのついたシステインを C 末に持つ HTTQ42 もしくは Q62 タンパク質を E.coli で発現させ、10mM の 2-メルカプトエタノール存在下で精製し、HTTQ42 および Q62 タンパク質とした。還元剤は脱塩遠心カラム (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) によって除去し、精製した HTT タンパク質を 10 倍量の Alexa Fluor 555C2 マレイミド (Molecular Probes) と 37°C で 1 時間反応させた。過剰量の色素はスピンカラムで取り除き、標識した HTT タンパク質を 37°C で一晩重合させた。HTTQ150-GFP neuro2a 細胞への蛍光標識アミロイドの形質導入を行い、HTTQ150-GFP 発現誘導および細胞分化処理の 2 日後に、細胞を 4%PFA で固定し、核をヘキストで染色した。蛍光標識した HTTQ42 アミロイドと HTTQ150-GFP の凝集体との共局在は FV1000-D 共焦点顕微鏡 (Olympus) によって調べた。

結果

1. 伸展ポリグルタミンを含む *in vitro* HTT の異なるアミロイド構造

10 個, 42 個, 62 個のグルタミンリピートを含んだ N 末ポリヒスチジン, GST 標識 HTT タンパク質 (HTTQ10, HTTQ42, HTTQ62) を大腸菌において発現させ精製した。標識の切断後, HTTQ10 以外の HTTQ42 と HTTQ62 はアミロイドと呼ばれる繊維性の凝集体を自発的に形成し, アミロイド特異的色素チオフラビン T と結合した (Fig. 3-1)。アミロイド形成はタンパク質溶液の濁度によって計測し, チオフラビン T 結合でみられるものと同様の S 字曲線を示した (Fig. 3-1)。

これまでの研究によってアミロイド形成タンパク質が様々な繊維のタイプを自発的に選択することが示されており (Chien *et al.*, 2004), これは伸展ポリグルタミンを持つ HTT が様々なアミロイド構造にミスフォールドする可能性を示唆している。本研究では, 最初に *in vitro* で HTT タンパク質を単純に 4°C と 37°C で重合させることによって, HTT アミロイドの構造多様性について調べた。X 線繊維回折は両方が β シートに富んでおり, 典型的なアミロイド繊維を持つことを示した (Fig. 3-2A)。電子顕微鏡による観察では, 4°C と 37°C 両方のアミロイドの形態がほぼ同一で似ていることが示された (Fig. 3-2B)。しかしながら, さらなる分析は, 二つのアミロイド構造が構造的に異なることを示唆した。4°C アミロイドはアミロイド結合色素であるチオフラビン T やコンゴレッドに対して 37°C アミロイドよりも高い親和性があることを示した (Fig. 3-3)。CD 分光測定器により, 4°C のアミロイドは標準的なベータシート, 37°C のアミロイドは伸展したベータシート構造のスペクトルを示し, それはそれぞれ 218 と 225cm^{-1} のネガティブピークを持っていた (Fig. 3-4A)。より詳細な構造的相違を調べるために, FT-IR 分光測定を計測した。FT-IR スペクトルは 4°C アミロイドにおいてより多くのループ/ターン構造の存在を示したが ($1655\sim 1680\text{cm}^{-1}$), 37°C アミロイドはより

分子内ベータシート構造を含んでおり (1615cm^{-1}) (Ismail and Mantsch, 1992; Seshadri *et al.*, 1999), 両方のアミロイドコンフォメーションの大部分がベータシート構造 (1640cm^{-1}) であった (Fig. 3-4B)。さらに異なるアミロイドの生理的特性について調べた。アミロイドの温度変性と物理的剪断への耐性を調べるため、最初に熱処理した HTTQ42 アミロイドから可溶化させたモノマーHTTQ42 の定量によりそれぞれのアミロイドの温度安定性を調べた。その結果, HTTQ42 の二つの形態のアミロイドは著しく異なる温度安定性を示し, 4°C アミロイドは 37°C アミロイドより熱不安定であった (Fig. 3-5A, B, C)。次に, 二つのアミロイドの物理学的安定性を調査した。HTTQ42 4°C と 37°C アミロイド両方は障害のない状況下では同様の長い繊維を作るが (Fig. 3-6A), 4°C アミロイドは 37°C アミロイドより攪拌や超音波破砕によってより簡単に破壊された (Fig. 3-6B)。この結果は, 4°C アミロイドはより脆弱でそれゆえに機械的な圧力によってより簡単に破砕されることを意味している。さらに 4°C アミロイドコンフォメーションはループ/ターン構造の存在によりよりもろく, 反対に 37°C コンフォメーションは伸長ベータシートのせいでより堅固であることを示唆している。

次に, 1C2 抗体を使って二つの異なるアミロイドのポリグルタミンのコンフォメーションを調べた。1C2 は埋没したポリグルタミンとはほとんど反応せず露出した伸展ポリグルタミンを選択的に認識する (Trottier *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2003)。この抗体を使ったフィルタートラップ分析では 4°C アミロイドのポリグルタミンが 1C2 抗体とより反応性が高く, それに反して 37°C アミロイドの 1C2 抗体への反応性は低いことが観察された (Fig. 3-6C)。同じサンプルを使用し HTT 抗体および CBB によって検出すると両方のアミロイドタンパク質を同程度検出したことから, 1C2 抗体における抗原抗体反応に影響を与える構造の違いが 4°C と 37°C アミロイドに存在することが示唆された。すなわち, 4°C アミロイドコンフォメーションの伸展ポリグルタミンは 1C2 抗体に結合するのに十分な程度に露出し柔軟であり, 反対に 37°C アミロイドコンフォ

メーションはより伸長されたベータシート形成により埋没され、それゆえこの抗体とほとんど反応しないことが示された。興味深いことに、4°Cアミロイドコンフォメーションは毒性の高い伸展ポリグルタミンと反応する 3HB510 抗体とより反応性が高かった (Fig. 3-6C)。フィルタートラップ解析における CBB を使用したタンパク質の染色からは、4°Cコンフォメーションよりも 37°Cコンフォメーションがより SDS 耐性が高いことが証明された (Fig. 3-6C)。

加えて、4°Cと 37°Cアミロイドが 4°Cと 37°Cで異なる繊維成長を示すことが観察された (Fig. 3-7)。これらの結果から伸展ポリグルタミンを持つ HTT タンパク質は異なる生理学的特性をもつ違ったアミロイドコンフォメーションにミスフォールドすることが立証された。

2. In vitro HTT アミロイドの哺乳類細胞への効率的な導入

異なるアミロイドコンフォメーションの細胞毒性を直接試験するために、面倒なマイクロインジェクションなしに哺乳類細胞に in vitro アミロイドを導入する、高効率で用途の広いプロトコールの開発を試みた。哺乳類細胞では、ponasterone 制御プロモーター下の Q16, Q60, Q150 を含む HTT-GFP を過剰発現する neuro2a 細胞株を使用した (Wang *et al.*, 1999)。試行の末、リポフェクションのプロトコールを採用することにより、HTT アミロイドを neuro2a 細胞に効率よく導入することに成功した。最初に in vitro の HTTQ42 アミロイドを HTTQ150-GFP 細胞に導入し、続いて内因性 HTT150Q-GFP 発現と細胞の分化誘導を行った (Wang *et al.*, 1999)。HTT 発現と分化誘導の 15 時間後に内因性 HTT150Q-GFP の凝集の状態を測定したが、in vitro HTT アミロイドがうまく細胞に導入されていれば、アミロイドが内因性 HTT-GFP タンパク質のシード (種) となり、それゆえ HTT-GFP の凝集を促進させることが予想された。注目すべきことに、導入した HTTQ42 アミロイドは HTTQ150-GFP の凝集を著しく

促進させた (Fig. 3-8A)。HTTQ150-GFP の凝集の結果である GFP 蛍光を示す凝集体は、GFP 陽性細胞の 80%以上で観察され、反してバッファーのみで処理した細胞群の GFP の凝集体は細胞の 15–20%のみで、それは HTTQ150-GFP のタンパク質発現を誘導したときの内在性の凝集体と同様であった (Fig. 3-9A)。モノマー-HTT もしくは BSA 凝集体の導入は HTTQ150-GFP 凝集を促進しなかったことから、シード効果は HTT アミロイド特異的であることが示された (Fig. 3-9A)。in vitro HTTQ42 アミロイドの導入による顕著な HTT-GFP 凝集の促進は、異なる神経細胞株である PC12 細胞でも、in vitro アミロイドと HTT-GFP をコードするプラスミドを同時に導入することにより、観察された (Fig. 3-9B)。したがって、このアミロイド形質導入のための方法は特異的な細胞に制限されず、むしろ用途は広い。すなわち、蛍光ラベルした in vitro HTT アミロイドと HTTQ150-GFP の凝集体の共局在が示すように (Fig. 3-8B), in vitro HTT アミロイドは哺乳類細胞にうまく導入され、細胞内で“シード”として働くことを立証している。

次に内在性 HTT-GFP アミロイドのコンフォメーションが、細胞に導入された in vitro アミロイドの構造を維持しているかどうかを調べた。in vitro HTT42Q-4°Cもしくは HTTQ42-37°Cアミロイドを HTTQ60-GFP neuro2a 細胞株に導入し、その後形成された細胞内凝集体を SDS で徹底的に洗うことにより精製し、それらの温度に対する耐性を分析した。neuro2a 細胞の HTTQ60-GFP アミロイドのコンフォメーションは、細胞に導入した in vitro HTTQ42 のそれと似ていることが観察された (Figs. 3-10A, B)。それは HTTQ42-4°Cアミロイドによってシードされた HTT60Q-GFP はより熱不安定で、HTTQ42-37°Cによってシードされたそれは熱により安定で、in vitro HTTQ42-4°Cアミロイドと HTTQ42-37°Cアミロイドの、それぞれすでに観察されていたことと同様であった。これらの結果から、HTT アミロイドのコンフォメーションは忠実に哺乳類細胞内で伝搬されていることが認められた。In vitro HTTQ42 アミロイドにシードさ

れた HTTQ60-GFP アミロイドのコンフォメーションの熱安定性の結果が *in vitro* アミロイドにおける結果より差異が小さかったこと理由は, HTTQ60-GFP 細胞における相互作用タンパク質の存在かもしくは HTTQ60-GFP の GFP タグに起因している可能性がある。

3. *In vitro* での異なる HTT コンフォメーションの細胞毒性

本研究で HTT アミロイドにおいて異なるコンフォメーションを作成し, 哺乳類細胞内への導入効率を高くできたことから, 哺乳類細胞において特異的なアミロイドコンフォメーションの毒性を直接調べることが可能となった。*in vitro* HTT アミロイドの 4°C と 37°C の両コンフォメーションともに, バッファーを細胞に導入すると, バッファーのみに比べてアミロイド導入細胞において HTT-GFP の凝集が顕著に加速された (Fig. 3-10C)。さらに, HTTQ60 と HTT150Q-GFP neuro2a 細胞両方で, 4°C と 37°C のコンフォメーションのアミロイドは内在性 HTTQ60-GFP もしくは HTT150Q-GFP の凝集を同じ程度 (~80%) 促進した。対照的に, これらのアミロイドは HTTQ16-GFP の凝集は誘導しなかった (Fig. 3-10C)。

さらに一般的な細胞生存率測定法である MTT 検定によりこれらの異なる HTT アミロイドの細胞毒性を試験した。HTTQ60/Q150-GFP は 4°C と 37°C コンフォメーションの導入により同様の凝集の程度が観察された (Fig. 3-10C)。そのため, HTTQ60-GFP および HTTQ150-GFP の neuro2a の両方で, 4°C と 37°C のアミロイドコンフォメーションの導入によって示された細胞生存率の違いは, 異なる毒性によるものであることが立証できた (Fig. 10D)。すなわち, 4°C アミロイドコンフォメーションはより毒性が高く, 反対に 37°C コンフォメーションは毒性が弱かった。このアミロイドの毒性効果は量依存的であり (Fig. 3-10E), そしてモノマー HTT や BSA 凝集体は細胞毒性を示さなかったことから (Fig. 3-10D), HTT アミロイドが細胞毒性の原因であることが

明らかとなった。重要なことに、4°Cと37°Cのアミロイドコンフォメーションは HTT-Q16-GFP を過剰発現させた neuro2a 細胞では HTT 凝集も細胞毒性もどちらも誘導しなかった (Figs. 3-10C, D)。従って、伸展ポリグルタミンをもつシードとなるアミロイドそのものは本来毒性はなく、むしろ HTTQ42-4°Cのような特異的な構造を持つ HTT アミロイドを形成する過程が細胞死をもたらしていることを示している。以上の結果から、伸展ポリグルタミンは伝搬能力を持つ異なるコンフォメーションを選択することができ、これらのコンフォメーションの相違により異なる細胞毒性がもたらされることが立証された。

4. HD モデルマウスの HTT アミロイドの構造の違いについて

次に、*in vitro* HTT アミロイドの構造の違いを *in vivo* で再現できるかどうかを調べた。シードとなる HTT アミロイドは、HD モデルマウスである R6/2 トランスジェニックマウスの大脳皮質、線条体、海馬、そして小脳を含む様々な脳部位から SDS を用いて精製した (Mangiarini *et al.*, 1996)。R6/2 マウスからの SDS 耐性 HTT アミロイドは *in vitro* HTTQ42 タンパク質の重合に顕著なシード効果を示し、反対に、同様に野生型マウスから同じ手順で得られた不溶性画分はほとんどシード効果を示さなかった (Fig.3-11A,B)。これらの結果は、*in vivo* の HTT アミロイドが R6/2 マウスから効果的に精製され、精製 HTT タンパク質を使用した *in vitro* でのアミロイド形成に“シード”として働くことを示している。

さらに *in vivo* における HTT アミロイドのコンフォメーションの多様性について調べた。R6/2 マウスから分離した凝集体を完全に精製するのは困難なため、直接構造解析に使用するには適していないと考えた。しかしながら、HTT アミロイドの *in vivo* コンフォメーションは Fig. 3-11 C, D に示すように、シード反応によって伝搬し得る。そのため本研究では HTTQ42 タンパク質を *in vivo* 凝集体に重合させることによって *in*

vivo HTT アミロイドの特異的な構造を増幅させ、熱安定性試験や構造解析に使用した。その結果、線条体由来の in vivo 凝集体を増幅させた HTT アミロイドがもっとも熱不安定であり、海馬や小脳由来の HTT アミロイドは熱処理により高い耐性を示した (Figs. 3-11C, D)。線条体由来の HTT アミロイドには大部分のベータシート構造 (1640 cm^{-1}) に加えて、ループ/ターン構造 ($1655 \sim 1681 \text{ cm}^{-1}$) が観察され、海馬や小脳由来の HTT アミロイドには、より豊富な分子間ベータシート (1615 cm^{-1}) が観察された (Figs. 3-11E, F)。これらの線条体、海馬、小脳由来の HTT アミロイドの物理的な、構造的な特性は in vitro における 4°C と 37°C アミロイドの特性と似ていた。これらの結果から HD マウスの異なる脳部位由来の HTT アミロイドは、in vitro HTT アミロイドで観察されたように、異なるコンフォメーションを持つことを示している。

5. HD モデルマウスの HTT アミロイドの異なるコンフォメーションでの異なる細胞毒性

次に前述したアミロイド形質導入のプロトコールを使って、in vivo アミロイドを増幅させた HTT アミロイドを直接 neuro2a 細胞に導入することにより、異なる in vivo アミロイドのコンフォメーションの効果および HTT 凝集と細胞生存性について調べた。R6/2 マウス由来の HTT アミロイドは neuro2a 細胞での HTTQ150-GFP の凝集を顕著に加速させた (Fig. 3-12A)。また R6/2 マウスから精製した全ての脳部位由来の HTT 凝集体が HTTQ150-GFP の凝集を促進させたが、野生型マウス脳から精製した不溶性画分ではシード効果はほとんどみられなかった。これらの結果は in vitro アミロイドのシード実験の結果と一致し (Figs. 3-11A, B), R6/2 マウスから精製された HTT アミロイドは哺乳類細胞の内因性 HTTQ150-GFP をシードする (HTTQ150-GFP のシードとなる) ことを明らかにした。

さらに R6/2 マウス由来の HTT アミロイドの異なるコンフォメーションが

HTTQ150-GFP neuro2a 細胞内で異なる細胞毒性効果を示すかどうかを調べた。その結果、線条体からの HTT アミロイドが高い毒性を示し、海馬や小脳由来のアミロイドは相対的に弱い毒性効果を示した (Fig. 3-12B)。野生型マウス脳からの不溶性画分は HTTQ150-GFP neuro2a 細胞における実質的な毒性効果はなかった。特に、線条体の熱不安定な HTT アミロイドの毒性効果は *in vitro* の脆弱な HTTQ42-4°Cのそれに近似していた (Fig. 3-10D)。

考察

疾患原因タンパク質のアミロイドのような不溶性凝集体の蓄積は、多くの神経変性疾患の特徴であり、易凝集性のタンパク質のオリゴマーのシードがこれらの病気の原因であることが示唆されている (Davies *et al.*, 1997; DiFiglia *et al.*, 1997; Ordway *et al.*, 1997; Klement *et al.*, 1998; Saudou *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002; Arrasate *et al.*, 2004; Chimon *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2007)。アミロイドそのものが毒なのか、単純に病理症状の二次的な徴候なのかもしくは細胞の防御の結果なのかというアミロイドの毒性に関するこれまでの研究結果における不一致は、アミロイドの構造的多様性の結果であり、アミロイドを形成するタンパク質がしばしば多くのコンフォメーションにミスフォールドし、それぞれのコンフォメーションが異なる生理学的効果を示したためと考えられる (Chien *et al.*, 2004; Petkova *et al.*, 2005)。これまでの報告は温度の熱力学要因がタンパク質フォールディングとアミロイド形成タンパク質の動態を調整し、異なるアミロイドコンフォメーションをもたらすことを示しているが (Chien *et al.*, 2004; Krishnan and Lindquist, 2005; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Toyama *et al.*, 2007)、本研究では、この事実を利用し、単純に HTT タンパク質を 4°C と 37°C で重

合させることによって異なる HTT アミロイドを作製し、使用した。さらに、哺乳類細胞にアミロイドを導入する高効率な手法を開発した。In vitro のポリグルタミンの哺乳類細胞への導入は報告されているが (Yang *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2009) , 本研究における効果的なアミロイド導入の手法と HTT アミロイドの異なるコンフォメーションの作成との組み合わせは、HTT タンパク質の異なるコンフォメーションの毒性を直接評価することを可能にした。

本研究では HTT-4°Cと HTT-37°C凝集体について、プロトフィブリルとは違う成熟したアミロイドの形態が観察された (Fig. 3-2A) 。二つのコンフォメーションは同質で電子顕微鏡解析によって似た形態を示し、分子内外片方もしくは両方に大量のベータシートが存在する (Perutz *et al.*, 1994, Scherzinger *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2002; Poirier *et al.*, 2002) (Figs. 3-2B, 3-4A, B) 。しかしながら、比較的低い解像度での解析にもかかわらず、二つのアミロイドのコンフォメーションの構造的相違が観察された。特に、4°Cアミロイドは大部分の露出したポリグルタミンを含むベータシートとともにいくらかの柔軟なループ/ターン構造を持つが、ループ/ターン構造が伸展したポリグルタミンから得られるのか HTT の残りなのかは不明のままである。4°Cアミロイドはより高い毒性効果を示し、反対に埋没したポリグルタミンを含む伸長ベータシートを持つ 37°Cアミロイドは低い毒性を示した (Fig. 3-12C) 。柔軟で伸展したポリグルタミンは相互作用しやすくまたほかの機能的なタンパク質を取り込みやすく、それゆえ細胞死をもたらす可能性が高い。一方、アミロイド核に埋め込まれたポリグルタミンはポリグルタミン同士が強固に結合し他のタンパク質との相互作用が制限されるために、無毒もしくは高くない毒性しか発揮しないと考えられる。本研究により、HTT アミロイドがとるコンフォメーションによって、HTT アミロイドは有毒もしくは無毒になり得ることが証明された。この発見は、ポリグルタミン凝集体が沈着することが毒性に関連していないという既出の報告と一致した (Arrasate *et al.*, 2004) 。オリゴマーおよ

びモノマーの HTT の相互作用において、伸展ポリグルタミンは細胞毒性に果たす重要な役目を持つことを示唆している (Tanaka *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2007)。さらに伸展ポリグルタミンの柔軟かつ露出するという特性が、ポリグルタミンを持つタンパク質がモノマー、オリゴマー、もしくはアミロイド形態をしているかどうかにかかわらず、細胞毒性の重大な決定因子であることが明らかにされた。

神経変性疾患の分野におけるもう一つの重要な論点は、部位特異性である (Thomas, 2006)。HD では線条体は最も脆弱で、それに反して小脳プルキンエ細胞の欠失は若年性発症の場合のみに限られている (Vonsattel and DiFiglia, 1998; Thomas, 2006)。それにもかかわらず、HD の部位特異性を決定するものが何かは不明のままである。本研究は異なる脳部位での HTT アミロイドの構造の相違が、HD の細胞脆弱性に影響し部位特異性に関連しているという仮説を立てた。そして *in vivo* の HTT アミロイドのコンフォメーションが実に多様で、それらが異なる細胞毒性をもたらすことを示した。線条体の HTT アミロイドのような、より高い毒性は、*in vitro* での HTT-4°C アミロイドでもまた観察された。重要なことに、HTT-4°C アミロイドと線条体の HTT アミロイド両方の形態は同じような構造の特徴を示した。すなわち、HTT-4°C アミロイドと線条体の HTT アミロイドはループ/ターン構造をベータシートとともに持ち、比較的脆弱で温度不安定な構造をもつ。反対に、堅固な HTT アミロイドはベータシートの伸長を持ち、37°C の *in vitro* 実験や海馬、小脳において形成され、弱い毒性しか示さない。これらの結果を一致させると、線条体神経細胞は HD で最も神経細胞死を受けやすいということになる (Vonsattel and DiFiglia, 1998)。それゆえ、線条体の HTT アミロイドの脆弱で露出した特性は、HD での線条体の弱さのひとつのカギとなる要因かもしれない。これらの結果は HTT アミロイド (もしくは可溶性の凝集したシード) のコンフォメーションの違いが HD の部位特異性を決めているのかもしれないことを示している。異なる脳部位においては、異なる発現レベルやシャペロンの種類や HTT と相互作用す

るタンパク質が、フォールディングの程度や動態の調整をする (Giadalevitz *et al.*, 2006)。事実、マイクロアレイ実験では、伸展ポリグルタミンを持つ HTT に結合するシャペロンや転写因子の mRNA 発現レベルは、違う脳部位の間で異なっている (Hodges *et al.*, 2006)。これらの違いもまた、異なる細胞毒性をもつ HTT アミロイドコンフォメーションの幅をもたらすのかもしれない。これまでにアミロイド病に介入するためのさまざまな努力がなされてきたが (Balch *et al.*, 2008), 本研究の発見はポリグルタミン病の新しい治療戦略を生み出した。すなわち、脆弱で毒性の高い 4°C アミロイドのコンフォメーションは将来 HD を予防するターゲットになり得る。さらに、変異 HTT の様々な可能性のあるミスフォールディング経路の中で、伸長ベータシートを含む変異 HTT を堅固な 37°C アミロイド同様のコンフォメーションにミスフォールドするように仕向ける試みが、変異 HTT の潜在的な毒性を減少させ得ると提唱する。

小括

アミロイド形成タンパク質はしばしば 1 つ以上の構造にミスフォールドし、多様な表現型を示す。本研究により伸展ポリグルタミンを持つ変異 HTT が多くの異なるコンフォメーションにミスフォールドし、その構造の多様性がアミロイドの毒性の違いと関連づけられることが証明された。すなわち、4°C で形成させたアミロイドのコンフォメーションは脆弱で伸展ポリグルタミンが露出しており、37°C におけるアミロイドのコンフォメーションは堅固で伸展ポリグルタミンが露出しない構造を示した。本研究はアミロイドを効率的に培養細胞に導入する方法を開発し、4°C アミロイドは細胞毒性が高く、37°C アミロイドは毒性が低いことを証明した。さらに HD モデルマウス脳における変異 HTT の凝集体の構造は部位特異性を示し、線条体における凝集体は 4°C で形成させたアミロイドのコンフォメーションと似た性質を示し、海馬や小脳における凝

集体は 37°C アミロイドのコンフォメーションと同様の性質を示した。HD における表現型の違いや脳における部位特異性のメカニズムを証明し、ポリグルタミン病の新しい治療戦略を示唆した。

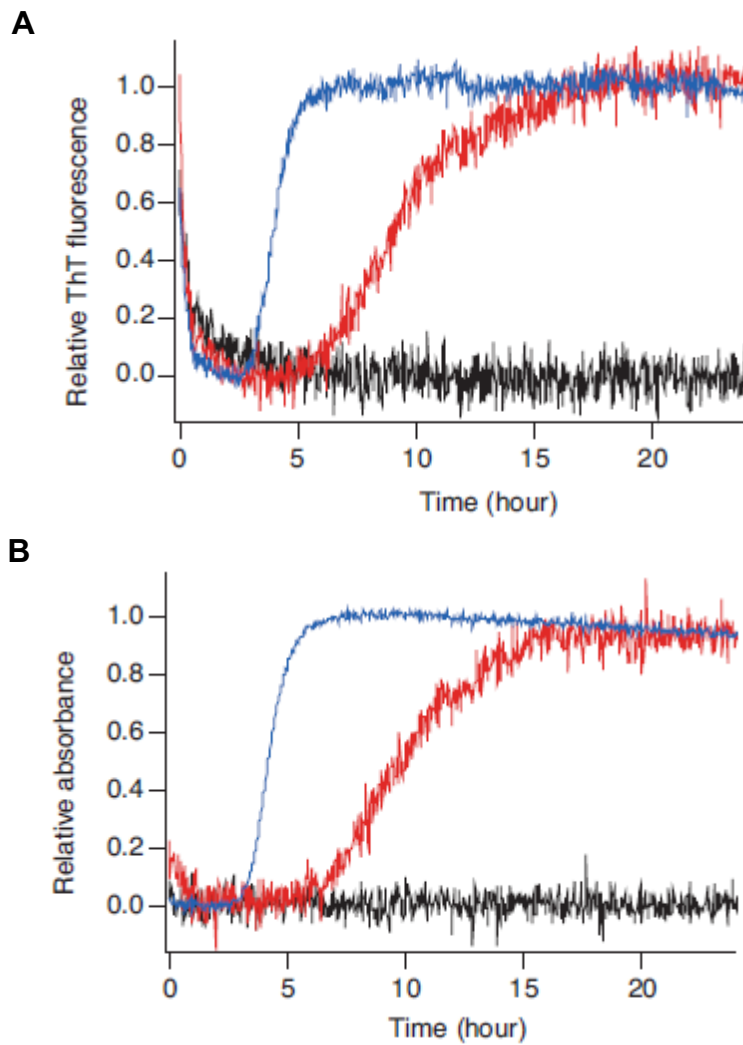


Fig. 3-1. Amyloid formation of *in vitro* HTTQ10, Q42, Q62 proteins. Amyloid formation was monitored by (A) thioflavine T fluorescence and (B) absorbance (turbidity) at 340 nm at room temperature. Black, red and blue lines show aggregation of 2.5 μ M HTTQ10, HTTQ42, and HTTQ62 proteins, respectively. Note, both assays show a very similar lag time for the aggregation of HTTQ42 and HTTQ62 proteins.

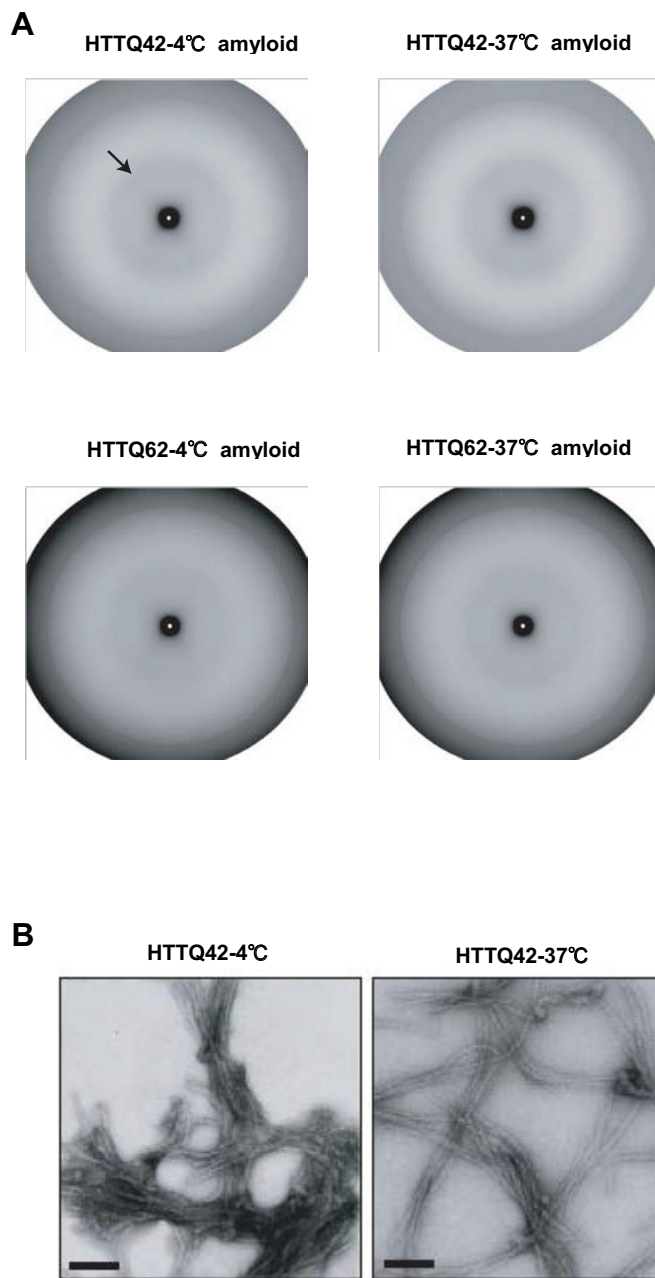


Fig. 3-2. X-ray fiber diffraction and EM images of HTTQ42 and HTTQ62 amyloids. (A) X-ray diffraction patterns from HTTQ42-4°C, HTTQ42-37°C, HTTQ62-4°C, HTTQ62-37°C fibrils are shown. The white and black arrows show the spacing at 4.8Å and ~10Å, respectively. (B) EM images of HTTQ42-4°C and HTTQ42-37°C amyloids. Scale bar shows 100nm.

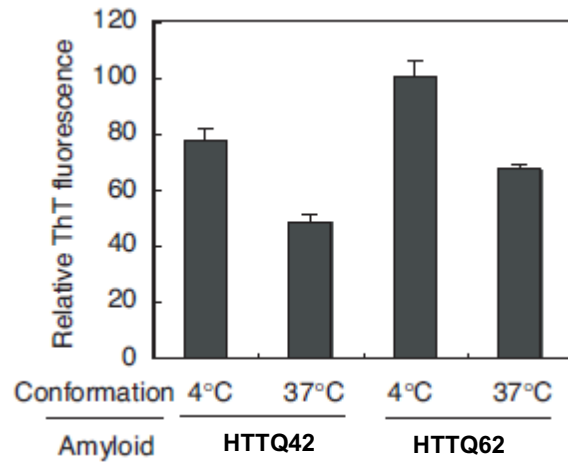
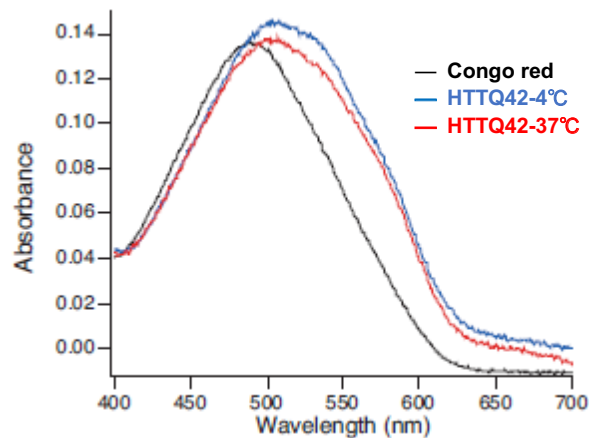
A**B**

Fig. 3-3. HTTQ42-4°C and HTTQ42-37°C amyloids show different affinities for thioflavine T and Congo red. (A) Relative thioflavine T fluorescent intensities of HTTQ42-4°C, HTTQ42-37°C, HTTQ62-4°C and HTTQ62-37°C amyloids. Values are mean + S.D. (B) UV-visible absorption spectra of Congo red bound to HTTQ42-4°C (blue) or HTTQ42-37°C (red) amyloid. A black line shows a spectrum of Congo red without amyloid.

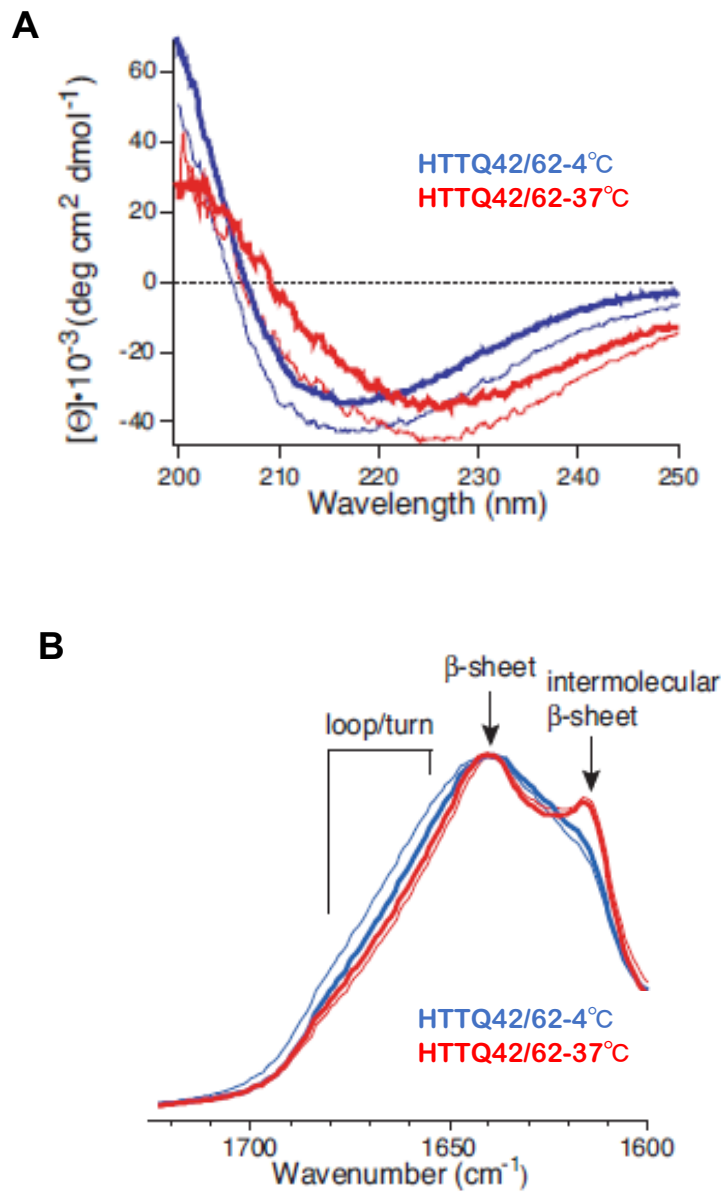


Fig. 3-4. HTT protein with expanded polyglutamines misfolds into distinct amyloid conformations *in vitro*. (A) CD spectra of HTTQ42-4°C (thin, blue), HTTQ42-37°C (thin, red), HTTQ62-4°C (bold, blue) and HTTQ62-37°C (bold, red) amyloids. (B) FT-IR spectra of HTTQ42-4°C (thin, blue), HTTQ42-37°C (thin, red), HTTQ62-4°C (bold, blue) and HTTQ62-37°C (bold, red) amyloids.

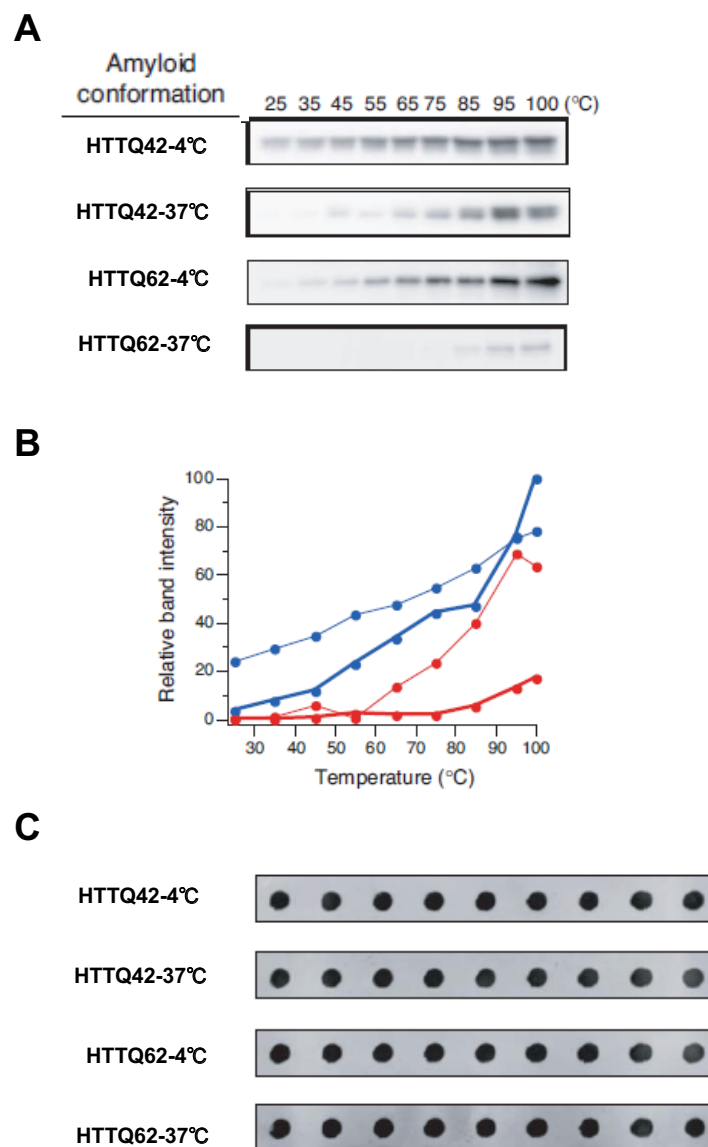


Fig. 3-5. HTT protein with expanded polyglutamines misfolds into distinct amyloid conformations *in vitro*. (A) Thermal stability of HTTQ42-4°C, HTTQ42-37°C, HTTQ62-4°C and HTTQ62-37°C amyloids. The bands indicate monomeric HTTQ42/62 solubilized from HTTQ42/62 amyloids by the heat treatment. (B) The band intensity in (A) was plotted against temperature for HTTQ42-4°C (thin, blue), HTTQ42-37°C (thin, red), HTTQ62-4°C (thick, blue) and HTTQ62-37°C (thick, red) amyloids. (C) Sypro Ruby dot staining of HTT amyloid samples showed protein loading (1.00 ± 0.11) between each sample.

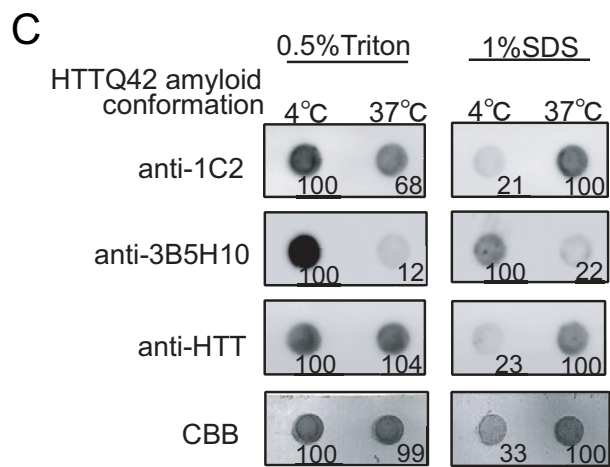
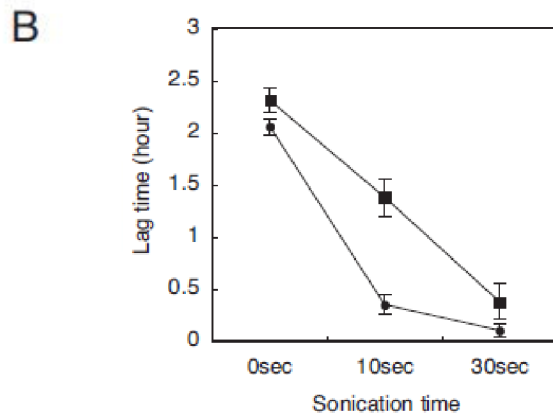
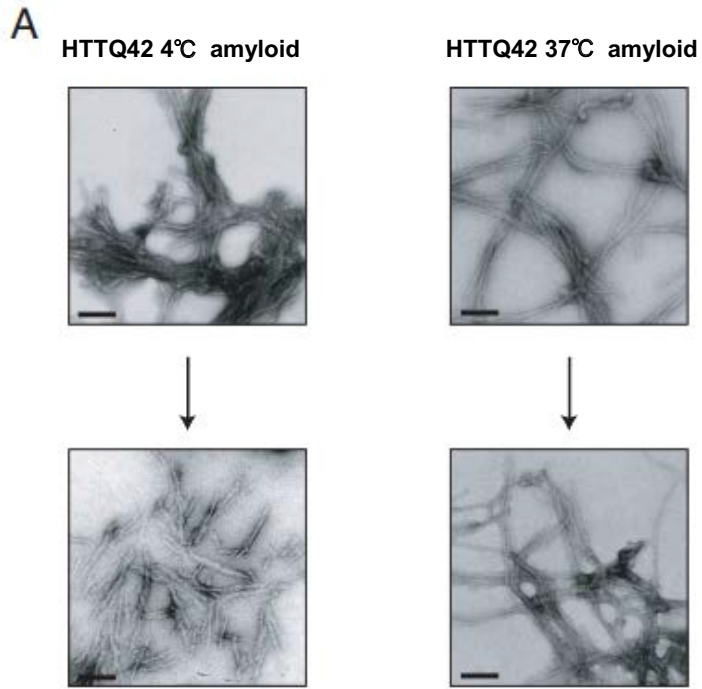
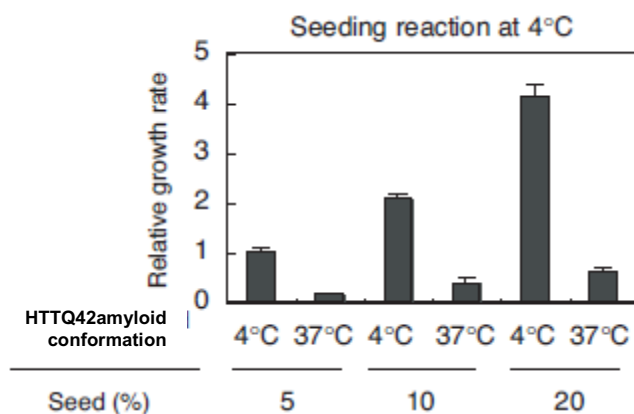


Fig. 3-6. HTT42Q-4°C amyloid conformation is more fragile than HTT42Q-37°C conformation. (A) EM images of (left) HTT42Q-4°C and (right) HTT42Q-37°C amyloids (top) before and (bottom) after agitation of the amyloid solutions. Scale bar shows 100nm. (B) Dependence of sonication time on lag time of HTTQ42 fibrillization. Amyloid formation of 5µM HTTQ42 in the presence of 10% (mol/mol) unsonicated or sonicated seeds was monitored by absorbance (turbidity) at room temperature. Lag time of HTTQ42 fibrillization was plotted against sonication time of HTTQ42-4°C (circle) and HTTQ42-37°C (square) amyloids used as seeds. The decrease in lag time indicates that a large number of seeds by sonication accelerated the amyloid formation. Values are mean ± S.D. (C) Reactivity of HTTQ42-4°C and HTTQ42-37°C amyloids with various antibodies. A filter trap assay was performed in the presence of 0.5% triton X-100 (left) or 1% SDS (right) and processed for immunoblotting against a 1C2, 3B5H10 or anti-htt antibody. Coomassie brilliant blue (CBB) staining is also shown below. Values show intensities of the spots.

A



B

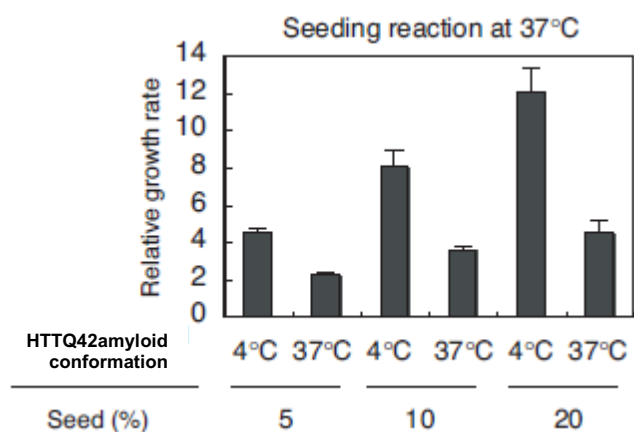


Fig. 3-7. Different growth rates of HTTQ42-4°C and HTTQ42-37°C amyloids suggest distinct conformations. Fiber growth rates were calculated from initial linear slopes (generally within 1 hour) of the seeding reactions of HTTQ42 in turbidity assay at (A) 4°C or (B) 37°C. 5, 10 or 20% (mol/mol) of sonicated HTTQ42-4°C or HTTQ42-37°C amyloids were used as seeds. Values are mean + S.D. The difference in relative fiber growth rates of the 4°C and 37°C amyloids between the seeding reactions at 4°C and 37°C suggests that the two amyloid conformations are different.

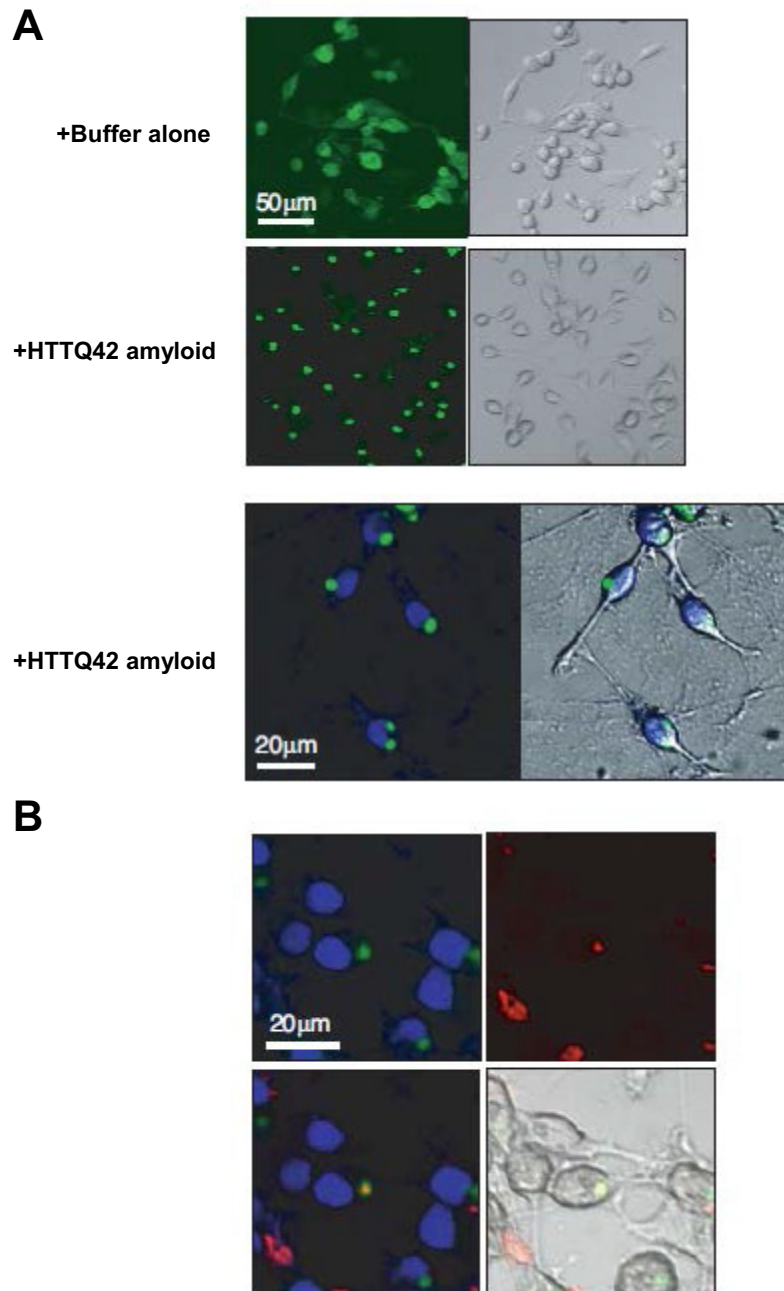


Fig. 3-8. High magnification images of HTTQ150-GFP neuro2a cells in which HTTQ42 amyloid was introduced and colocalization of HTTQ150-GFP foci with *in vitro* HTTQ42 amyloids. (A) Fluorescent and DIC images of the HTTQ150-GFP neuro2a cells after 15 hours of HTTQ150-GFP expression and cell differentiation. (B) Fluorescent and DIC images of HTTQ150-GFP aggregates (green) and *in vitro* HTTQ42 amyloids labeled by Alexa Fluor 555 (red) in HTTQ150-GFP neuro2a cells. Nuclei are stained by Hoechst (blue). Note, the colocalization was not observed in all GFP foci, probably because a very small size of labeled HTTQ42 seeds introduced into cells could not be easily visualized due to the coverage of the seeds by large HTTQ150-GFP aggregates. Scale bar shows 20 μm.

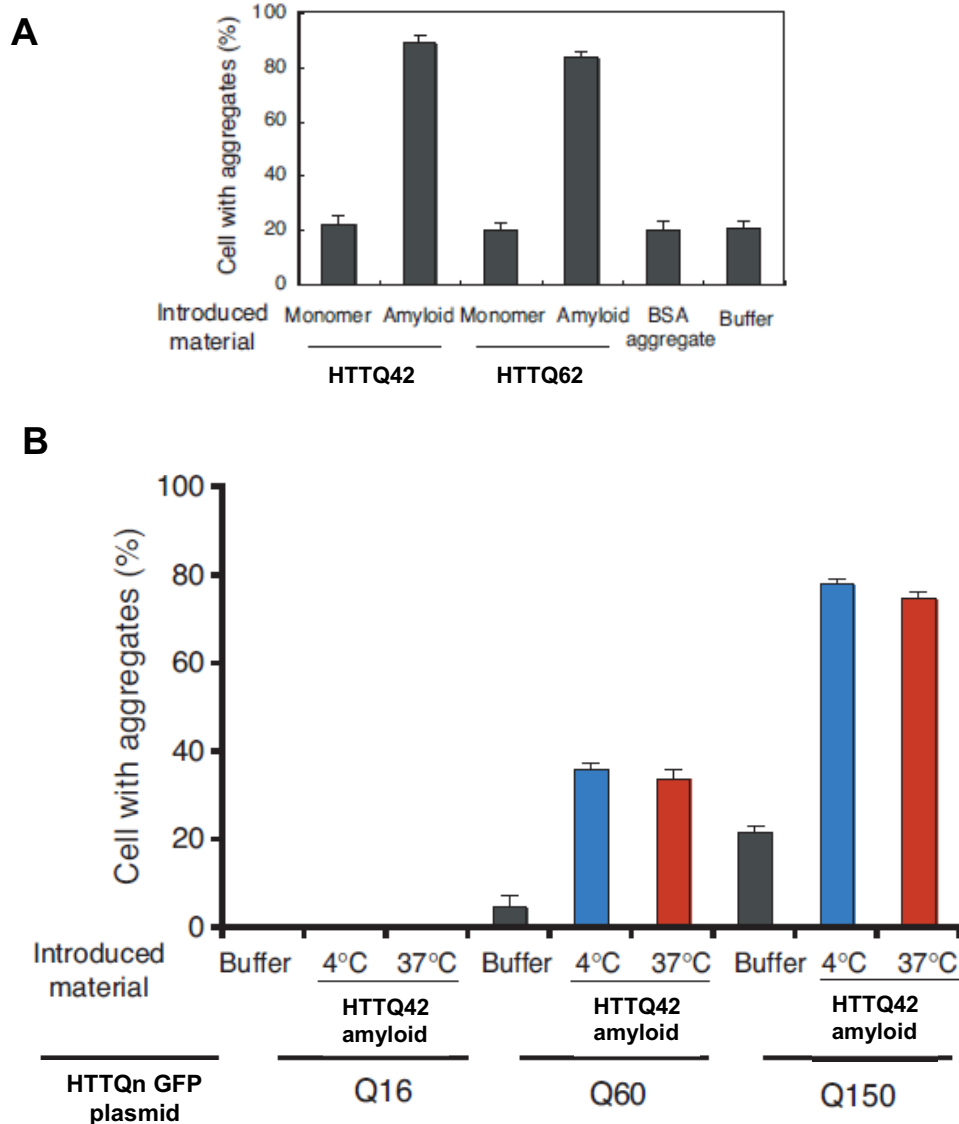


Fig. 3-9. Significant acceleration of HTTQ150-GFP aggregation by introduction of *in vitro* HTT amyloids. (A) Buffer alone, GSTHTTQ42 monomer, HTTQ42 amyloids, GSTHTTQ62 monomer, HTTQ62 amyloids or BSA aggregates were introduced into stable HTTQ150-GFP neuro2a cells. The number of cells with HTTQ150-GFP foci was counted after 15 hours of the HTTQ150-GFP expression and cell differentiation. Values are mean + S.D. (B) *In vitro* HTTQ42-4°C or HTTQ42-37°C amyloids together with HTTQ60-GFP plasmids were introduced into PC12 cells. The number of cells with HTTQ60-GFP foci was counted after 15 hours of the amyloid transduction. Values are mean + SD.

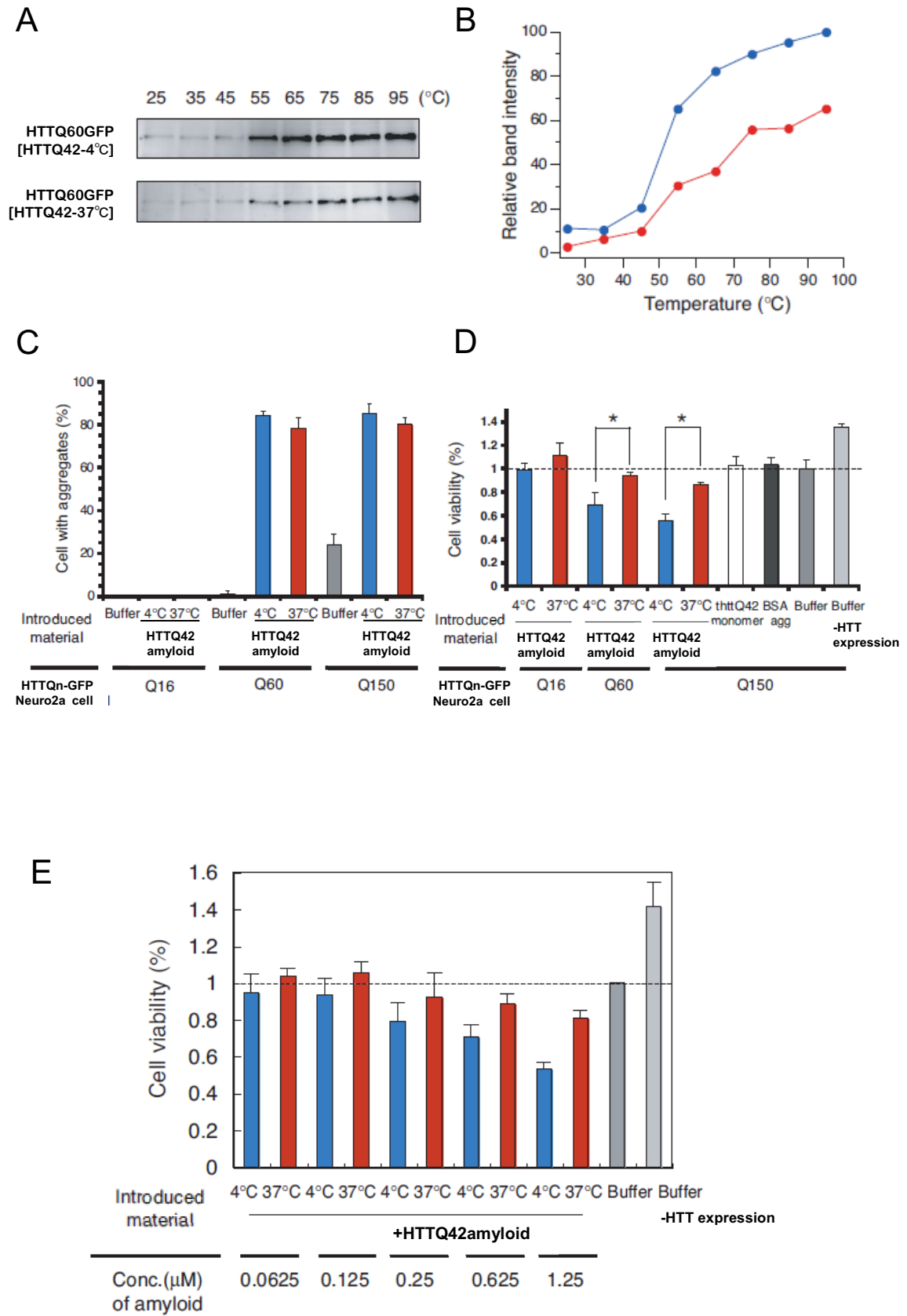


Fig. 3-10. Different conformations of HTT amyloids show distinct cytotoxicity in neuro2a cells. (A) Thermal stability of the HTTQ60-GFP amyloids formed in the presence of *in vitro* HTTQ42-4°C (HTTQ60-GFP[HTTQ42-4°C]) or HTTQ42-37°C amyloid “seeds” (HTTQ60-GFP[HTTQ42-37°C]). (B) The band intensity of HTTQ60-GFP[HTTQ42-4°C] (blue) or HTTQ60-GFP[HTTQ42-37°C] (red) amyloids in (A) was plotted against temperature. (C, D) Buffer alone, *in vitro* HTTQ42-4°C amyloids, HTTQ42-37°C amyloids, GSTHTTQ42 monomer or BSA aggregates were introduced into HTTQ16-, Q60-, or Q150-GFP neuro2a cells under a regulatable promoter. HTT expression and cell differentiation started after 3 hours of the *in vitro* amyloid transduction. The number of cells with HTT-GFP foci was counted after 15 hours (C) and cell viability was examined by MTT assay after 4 days of the HTT expression and cell differentiation (D). Asterisk denotes $P < 0.01$. Values are mean + S.D. (E) Cell viability is dependent on concentration of *in vitro* HTT amyloids introduced into neuro2a cells. Buffer alone, *in vitro* HTTQ42-4°C or HTTQ42-37°C amyloids were introduced into stable HTTQ150-GFP neuro2a cells. Cell viability was examined by MTT assay after 4 days of HTTQ150-GFP expression and cell differentiation. Values are mean + S.D.

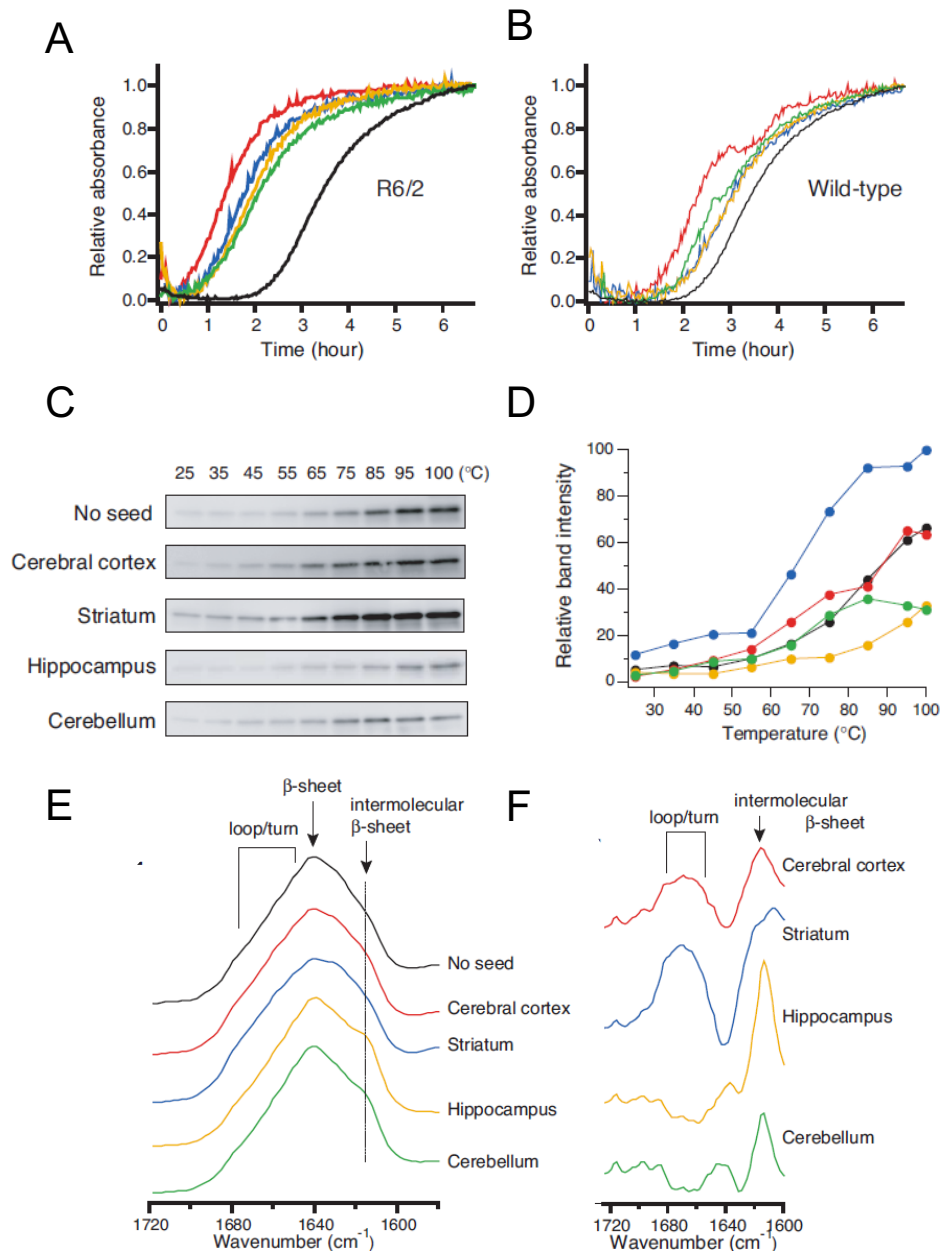


Fig. 3-11. HTT amyloids in different brain regions from R6/2 mice show distinct conformations. (A, B) Aggregation profile of *in vitro* HTTQ42 in the presence of HTT amyloids from R6/2 mice (A) or corresponding insoluble fractions from wild-type mice (B). Black, red, blue, yellow and green lines show *in vitro* HTTQ42 fibrillization in the presence of *in vivo* aggregates from cerebral cortex, striatum, hippocampus and cerebellum, respectively. (C) Thermal stability of *in vitro* HTTQ42 amyloids formed in the absence or presence of HTT amyloids from different brain regions of R6/2 mice. (D) The band intensity of HTT amyloids in different brain regions of R6/2 mice in (C) was plotted against temperature. (E, F) Structural analysis of HTT amyloids in different brain regions of R6/2 mice. (E) FT-IR spectra of *in vitro* HTTQ42 amyloids formed in the absence or presence of HTT amyloids from different brain regions of R6/2 mice. (F) Difference FT-IR spectra by subtraction of a spectrum of spontaneously formed HTTQ42 (without seeds) from those of HTT amyloids in different brain regions of R6/2 mice.

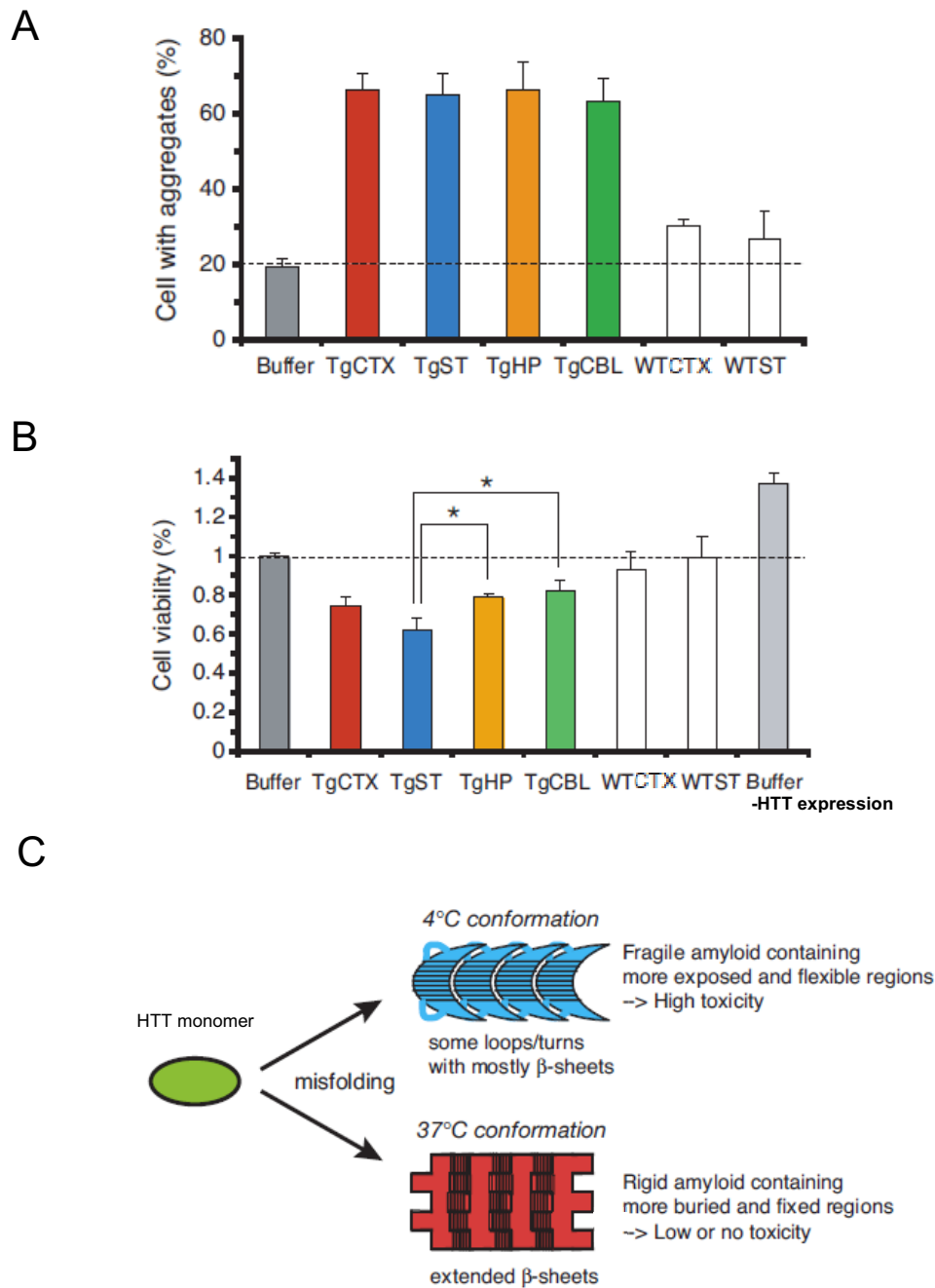


Fig. 3-12. Distinct conformations of HTT amyloids in different brain regions of R6/2 mice show distinct cytotoxicity in neuro2a cells. (A, B) Buffer alone or *in vitro* HTTQ42 amyloids formed in the presence of HTT amyloids from different brain regions of R6/2 or WT mice were introduced into stable HTTQ150-GFP neuro2a cells. The number of cells with HTTQ150-GFP foci was counted after 15 hours of HTTQ150-GFP expression and cell differentiation (A) and cell viability was examined after 4 days by MTT assay (B). Tg, WT, CTX, ST, HP and CBL denote R6/2 mice, wild-type mice, cerebral cortex, striatum, hippocampus and cerebellum, respectively. Asterisk denotes $P < 0.05$. Values are mean + S.D. (C) A proposed mechanism of conformation-dependent cytotoxicity of HTT amyloid.

第四章 ハンチントン病における DISC1 と変異ハンチンチンの共凝集による PDE 4 の調整不全

緒論

HD は鬱を含む非運動性機能障害によっても特徴づけられるが (Craufurd and Snowden, 2002) , HD の精神症状における分子メカニズムについてはよく研究されていない。HD 患者の脳脊髄液や HD モデルである *HdhQ111* ノックインマウスの脳において減少されるサイクリック 3'5'アデノシン 1 リン酸 (cyclic 3'5' adenosine monophosphate; cAMP) は細胞シグナル伝達における主要な調整因子のひとつであり, この cAMP を分解するホスホジエステラーゼ 4 (PDE4) ファミリーは脳機能の幅広い範囲, 特に鬱や不安のような精神状態を調節していることが示唆されている (O'Donnell and Zhang, 2004; Millar *et al.*, 2005; Menniti *et al.*, 2006; Burgin *et al.*, 2010; Houslay, 2010) 。この PDE4 との直接的な相互作用する足場タンパク質である DISC1 は不溶性の凝集体を形成することが示されているが, 神経病理学的な状態での DISC1-PDE4 相互作用の重要性はほとんど理解されていない (Harrison and Weinberger, 2005; Millar *et al.*, 2005; Murdoch *et al.*, 2007; Kvajo *et al.*, 2011; Brandon and Sawa, 2011; Johnstone *et al.*, 2011; Narayan *et al.*, 2013; Niwa *et al.*, 2016) 。第四章は, HD における異常 HTT の凝集が引き起こす DISC1-PDE4 相互作用の障害と, それが誘導する行動学的な変化における分子メカニズムの解明を目的とした。

材料および方法

1. プラスミドと抗体

培養細胞を用いた実験を行うために、全長マウスDISC1 cDNAおよび全長ヒトPDE4B1, 4B2, もしくは4B3を、N末端にHA もしくはmyc タグをもつpRK5ベクター、もしくはC末端にmyc/His6タグをもつpcDNA4 ベクター (Invitrogen) に挿入し、発現ベクターを構築した。同様に、N末端1-67アミノ酸断片および N末端1-513 アミノ酸断片に18もしくは82のグルタミンリピートを含むHTT cDNAを、C末端にEGFPをもつpCSII-CMVベクター (理化学研究所バイオリソースセンターより入手) に導入した。ヒトDISC1cDNA, PDE4B2cDNA, HTT513Q18, HTT67Q42は、pCold-TF (Takara) , pET29b (Addgene, Cambridge, MA), pMAL (NEB) , pGEX6P2 (GE Healthcare), ベクターに挿入し、精製タンパク質産生に使用した。レンチウイルスを作製するために、C末端にHAタグをつけた全長DISC1もしくはN末断片1-316のうち201-228アミノ酸を欠失させた変異マウスDISC1 (Δ 201-228nDISC1) を、pCSII-CMV-IRES-Venusプラスミド(理化学研究所バイオリソースセンターより入手)にサブクローニングし、ベクタープラスミドを構築した。また、rAAV作製のために、全長DISC1もしくは Δ 201-228nDISC1を、pAAV2ベクタープラスミドに導入した。レンチウイルス産生に必要なヘルパープラスミドであるpCAG-HIVgp, pCAG-VSV-Gプラスミドは理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。

マウスDISC1の317-852アミノ酸断片精製タンパク質に対するウサギポリクローナル抗マウスDISC1抗体 (m317C) と、ヒトDISC1の316-854アミノ酸断片精製タンパク質に対するウサギポリクローナル抗ヒトDISC1抗体 (h316C) は、理化学研究所脳科学総合研究センターのリサーチリソースセンターにおいて作製を行った。マウスモノクローナル抗マウスDISC1抗体 (M49) は、マウスDISC1の317-852アミノ酸断片精製タ

ンパク質を抗原として作製した (MBL, Nagoya, Japan) 。マウスDISC1抗体の検証のために, DISC1の主要な完全長100キロダルトンのアイソフォームを欠失したDisc1遺伝子座損傷マウス (*Disc1* LI) を使用した (Seshadri *et al.*, 2015; Shahani *et al.*, 2015) 。抗体については, HAタグ, mycタグ, GFP タグに対するマウスモノクローナル抗体 (Nacalai tesque) , マウスDISC1 (2B3) および β -アクチンに対するマウスモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK) , HAタグ, mycタグ, GFPタグに対するウサギポリクローナル抗体 (MBL) , マウスDISC1抗体 mEx3 (Ishizuka *et al.*, 2007; Ishizuka *et al.*, 2011; Seshadri *et al.*, 2015; Shahani *et al.*, 2015; Saito, *et al.*, 2016) およびD27 (Brandon *et al.*, 2004; Schurov *et al.*, 2004; Hayashi-Takagi *et al.*, 2010; Ishizuka *et al.*, 2011) , ヒトDISC1抗体 14F2 (Ottis *et al.*, 2011) , HTT 抗体 EM48 とMAB2144 (Millipore, Burlington, MA) , ヒツジポリクローナル抗-pan PDE4B抗体 (Huston *et al.*, 1997) を使用した。また, 共免疫沈降実験のコントロールのためのマウス, ウサギ, ヒツジIgG (Santa Cruz, Dallas, TX) を使用した。

2. R6/2マウス

HTT67 cDNA(HTTエクソン1に相当) に140–147のCAGリピートを含むトランスジェニックマウスR6/2をJackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より入手し, 約130 CAGリピートを持つ雌マウスを卵巣移植することによって系統維持し, 使用した。R6/2トランスジェニックマウスおよび同齡の野生型マウスを麻酔し, 脳を取り出し, 皮質と線条体を分離した。PDE活性を調べるために, 脳は -80°C で保管した。

3. HD患者の剖検脳

37-76歳の6人のHD患者と3人の正常者より得た剖検脳 (死後脳摘出時間PMI:12-32) を, Harvard Brain Tissue Resource Centerより入手した。凍結および固定済みパラフ

インブロックは前脳皮質や尾状核, 被殻, 側坐核を含む。

4. PDE活性の測定

PDE4活性は報告された方法によって計測した (Takimoto *et al.*, 2005)。脳もしくは細胞を, プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche) を含むKHEM バッファー (50 mM KCl, 10 mM EGTA, 1.92mM MgCl₂, 1 mM DTT, and 50 mM HEPES, pH 7.2) 内でホモジナイズし, 遠心し, その上清をPDE4活性に用いた。1 μM cAMP基質濃度における総cAMP特異的ホスホジエステラーゼ活性を, 蛍光偏光法 (Molecular Devices) を使用し, PDE4 (10μM) を完全に特異的に阻害する濃度が分かっている PDE 4 阻害剤であるロリプラム存在下および非存在下での直線条件をもとに算出した (Houslay and Adams, 2003)。

5. ウェスタンブロッティング

可溶性タンパク質の検出には, 5–20%濃度勾配アクリルアミドゲル (ATTO, Tokyo Japan) およびPVDF膜を用いたウェスタンブロッティングの基本的な方法を使用した。目的タンパク質を抗原とした一次抗体との反応後, 動物種の適合するペルオキシダーゼ複合二次抗体 (GE Healthcare) を反応させ, さらにSupersignal West picoもしくはfemto 化学蛍光試薬 (Thermo Fisher) と反応させ, LAS3000 (GE Healthcare) によって画像を解析した。

6. 免疫沈降

細胞や脳は, RIPAバッファー (50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1%SDS, プロテアーゼインヒビターカクテル; Roche) に溶解した。細胞溶解液を超音波破碎し, 細胞破片を 4°C下で200×g, 3分間遠心し,

可溶性分画を一次抗体もしくは適合したコントロールIgGと結合させたDynabeadsプロテインG (Invitrogen) と免疫沈降させた。緑色蛍光タンパク質 (GFP) もしくはモノマー赤色蛍光タンパク質 (mRFP) を結合パートナーのネガティブコントロールとして使用した。連続免疫沈降実験では, Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit (Pierce) を製造元のプロトコールに従って使用した。一次および二次免疫沈降はそれぞれanti-DISC1 (m317C) と HTT抗体(MAB2166) を用い, それぞれに適したIgGをネガティブコントロールとして使用した。競合結合実験として, HTT513Q18-GFP もしくは HTT513Q82-GFP を過剰発現させたHEK293T細胞の細胞溶解液を, DISC1-mycおよびPDE4B1-HAを過剰発現させたHEK293T細胞溶解液に加え, この混合液を抗c-myc抗体による免疫沈降実験に使用した。

7. 不溶性画分のウエスタンブロッティング

野生型およびR6/2のマウス脳皮質もしくは線条体のサンプル (0.1 g) を1 mLのRIPAバッファー (50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1%SDS, and protease inhibitor cocktail; Roche) 中でデジタルホモジナイザーを使用し1,500rpmにて15回往復させた後, 10秒間超音波破碎 (Branson sonifier, 出力15%) することで懸濁した。この懸濁液を4℃, 200×gで3分間遠心することによって不溶画分を除去し、総分画とした。総分画の一部をさらに16,000×gで15分間遠心し上清を分画した。総分画 (total homogenate) と上清分画 (supernatant) のタンパク質濃度をBCA assay kit (Thermo Fisher) で測定し, それぞれ60μgのタンパク質を1 ウェルごとに使用し, イムノブロッティングを行った。

8. フィルタートラップ分析

野生型およびR6/2のマウス, ヒト正常もしくはHD患者の脳皮質および線条体サンプ

ル (0.1g) を, 1mLのプロテアーゼインヒビターカクテルを含むPBS中でデジタルホモジナイザーを使用し1,500rpmにて15回往復させた後, 10秒間超音波破碎 (Branson sonifier, 出力15%) することで懸濁した。懸濁液を4°C, 200×gで3分間遠心することによって不溶画分を除去し総分画とし, その総分画のタンパク質濃度をBCA分析キット (Thermo Fisher) で測定した。50μgの総分画タンパク質をドットブロット装置 (Bio-Rad) に設置したセルロースアセテート膜 (0.2μm, Advantec) に1穴ごとに載せ, 2%SDSで洗浄し, イムノブロッティングを行った。膜上に載せたサンプルのタンパク質総量はウエスタンブロッティングおよびクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色によって確認した。

9. 免疫染色

マウス脳を4%パラホルムアルデヒド緩衝液によって固定し, ティッシュマウント (Shirai Kogyo) によって包埋し, 二酸化炭素ガスによって凍結させた。クリオスタット (Leica CM3050 S) によって凍結包埋した脳から10μmの厚さの切片を作製し, 免疫蛍光染色を行った。パラフィン包埋されたヒト脳は5μmの厚さに薄切し, 10mMクエン酸バッファー溶液 pH 6.0中で121°C 3分間オートクレーブすることにより, 賦活化処理を行った。さらに, パラフィン切片はリポフスチンによる自家蛍光を消失させるためにTrueBlack (Biotium) で処理した。その後, 一次抗体 (100-500倍希釈) およびAlexa Fluor 488もしくは546-標識二次抗体 (300倍希釈) (Invitrogen) を使用し, 免疫蛍光染色を行った。各切片はVectorshield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて封入を行った。凍結もしくはパラフィン連続切片の蛍光画像は, 共焦点レーザー顕微鏡TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Germany) もしくはLSM710 (ZEISS, Oberchoen, Germany) によって解析した。

10. リコンビナントタンパク質の精製と凝集体形成

HisGSTタグ付きHTT67Q42の発現と精製の方法は第三章に示した。His-タグ付きヒトPDE4B2 は *E. coli*. (BL21 (DE3) Rosetta) で25°Cで培養して発現させ、ニッケルアガロース担体 (GE Healthcare) を使用して精製した。DISC1タンパク質はpCold TF (Takara) ベクターからのHisx7-タグおよびtrigger factor (TF) との融合タンパク質として、*E. coli*. (BL21 (DE3) Rosetta) を15°Cで培養して、ニッケルアガロース担体 (GE Healthcare) を使用して非変性条件下で1 M NaCl および2mM β-メルカプトエタノールを含む50mM Tris-HClバッファー pH8.0を使用して精製した。DISC1タンパク質を250mMのイミダゾールを含むバッファー中に溶出し、濃縮し、1000Kフィルター (Millipore) を通し、すでに存在する凝集体を取り除いた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のCBB 染色によりDISC1が90%以上精製されていることを確認し、タンパク質濃度をHisTF-DISC1の吸光係数 (85,600mM/cm) より算出した。凝集体形成のために、1mLの5μM タンパク質溶液にタグを切断するための10ユニットのturbo3Cプロテアーゼ (Accelagen) を加え、第三章と同様の方法で、2mLチューブ内で37°C条件下で反転させ回転させることによりアミロイドを重合させた。

11. In vitro DISC1凝集体の特徴づけ

DISC1凝集体の生理学的特性はアミロイド特異定期色素であるチオフラビンT (Sigma) を用いて実験した。12.5μM のチオフラビンTと5μMのDISC1凝集体を含む50mM のグリシンバッファー (pH 8.0) を反応させ、チオフラビンTの蛍光を蛍光プレートリーダー (ARVO MX, PerkinElmer : 励起442 nm; 吸収483 nm) で経時的に測定した。透過型電子顕微鏡によるDISC1の形態学的観察のために、2μMのDISC1凝集体をカーボンコートされた400メッシュの銅グリッド上に載せ、100mMリン酸バッファーで緩衝した2%パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒドに浸漬し、2%リ

ン酸タグステンでネガティブ染色した。DISC1凝集体の遠紫外性偏光円二色性スペクトル (Far-CD) とフーリエ変換赤外分光光度計のスペクトル (FT-IR) は第三章に記述した方法で測定した (Ohhashi *et al.*, 2010)。DISC1凝集体の凝集中心領域は4800 plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (AB SCIEX) を用いて既出の方法で同定した (Suzuki *et al.*, 2012)。DISC1凝集体の動態は、2ユニットのturbo3C proteaseを加えた5 mMリン酸カリウムバッファー (150mM塩化ナトリウムを含む) (pH 7.4) に希釈した10 μ MのDISC1もしくはPDE4B2タンパク質の吸光度 (濁度 : O.D.405nm) を、プレートリーダー (SpectraMax M2, Molecular Devices) を使用して経時的に計測した。プレートリーダーは2分ごとに5秒間攪拌した。凝集体のシードは、5 μ Mタンパク質の凝集体を10秒間超音波破碎 (Branson sonifier, 出力15%) して用意し、コントロールとしてタグであるTFも凝集測定に使用した。フィルタートラップアッセイはドットブロット装置 (Bio-Rad) に装着したセルロースアセテート膜 (0.2 μ m, Advantec) に、2日間凝集させた10 μ gのHTT67Q42, DISC1 もしくは BSA凝集体を吸着させることにより行った。サンプルを吸着させたセルロースアセテート膜は5mMのリン酸カリウムバッファー (pH 7.4) と2% SDSで洗浄し、免疫抗体反応もしくはサイプロルビー染色 (Bio-Rad) によって不溶性画分を検出した。免疫沈降実験はリコンビナント可溶DISC1タンパク質を、300キロダルトン限外濾過膜 (Sartorius, Göttingen, Germany) によって濾過し、既存のオリゴマーを除去してから用いた。リコンビナントDISC1とBSAタンパク質はHA-HTT67Q42 アミロイドシード (10% mol/mol) 存在下もしくは非存在下で重合させた。一晚反応させた後、形成された凝集体を抗HAビーズ (Invitrogen) で捕捉し、0.1% triton X-100を含むバッファーで洗浄し、抗HA抗体およびh316C DISC1抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

12. ペプチドアレイ

MBP-HTT513Q18を *E. coli*. BL21 (DE3) Rosetta でN末端にHisx7タグを融合させたタンパク質として20°Cで発現させ、TF-DISC1同様に精製した。CBB染色により精製タンパク質のMBP-HTT513Q18の純度が90%以上であることを確認し、MBP-HTT513Q18の吸光係数 (37,940mM/cm) によりタンパク質濃度を算出した。マウスおよびヒトDISC1のペプチドアレイは、1μgのMBPのみもしくはMBP-HTT513Q18タンパク質をペプチドアレイに載せPBSで洗浄し、計測を行った (Bolger *et al.*, 2006; Murdoch *et al.*, 2007; Hayashi-Takagi *et al.*, 2010)。

13. レンチウイルスとアデノ随伴ウイルス (AAV) の産生とマウスへの注入

HEK293T 細胞をpCSII-CMV-mouse DISC1もしくはΔ201-228-DISC1-IRES-Venus プラスミドとpCAG-HIVgp, pCAG-VSV-G プラスミドを用いて形質転換し、10μMのforskolin (Sigma, Tokyo, Japan) を細胞培養液に加えた。レンチウイルスの精製は、Lenti-X Concentrator (Clontech) を使用して濃縮する以外は既出の方法の通りに行った (Hayashi-Takagi *et al.*, 2010)。レンチウイルス溶液は、10mLの培地から精製し、200 μlに濃縮したペレットはMACS B27 plus (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) とペニシリン ストレプトマイシン (Nacalai Tesque) を含むMACS Neurobasal media (Miltenyi Biotec) に懸濁した。

定位固定脳注入は2週齢の野生型およびR6/2マウスの十字縫合から両側2.0mm, 前方に向かって 0mm および 1.0mm, 深さ2.0mmの位置に行った。1μlのレンチウイルス溶液は0.1μl/minの速さでマイクロインジェクター (Narishige, Tokyo, Japan) を用いて注入した。マウスの凍結切片を用いた免疫組織学的解析は、VenusとDISC1の線条体における発現を確認するために行った。ウイルス感染させた神経細胞を精製するためにマウスの線条体を取り出し、Papain Dissection System (Worthington, Columbus, OH) および細胞をヨウ化プロピジウム (Nacalai Tesque) で処理し、Venusを発現し

かつヨウ化プロピジウム陰性の細胞をフローサイトメトリー (FACS Aria, BD) で集め、4°Cで1,000×g 15分間遠心して集めた。

AAVの産生、精製および濃縮は既出の方法に従った (Seshadri *et al.*, 2015) 。定位脳注入も上記同様に行った。

14. AAV注入マウスのHTT凝集体と神経細胞生存率の解析

AAV注入マウスの線条体におけるHTT凝集体をもつ細胞と神経細胞の数の解析は、既出の方法で行った (Tanaka *et al.*, 2004) 。AAV-EGFP もしくは-Δ201-228-nDISC1を注入したマウスの線条体の免疫染色はEM48 (Millipore) および NeuN抗体 (Millipore) を用いて、蛍光免疫染色もしくはABC Elite kit (Vector Laboratories) を用いた免疫染色によって行った。

15. マウスの行動解析

線条体へのAAV注入後、8-9週齢の野生型およびR6/2マウスを用いて行動実験を行った。ロータロッド行動試験: マウスを回転式の軸 (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) に載せ、マウスの回転軸上での走行時間を計測した。回転スピードは、1日目は4rpm , 2日目から5日目は4分間で4rpmから40rpmに加速しさらに40rpmでもう1分間維持させた。マウスは1日目に2分間のトレーニングを行い、そして2日目から5日目はインターバルを20-30秒とりながら、一日4回、各回最大300秒として実験を行った。マウスの回転軸での走行時間は装置において計測した。オープンフィールドテスト: オープンフィールドテストは既出の報告に従って行った (Takashima *et al.*, 2011) 。それぞれのマウスをオープンフィールド (50×50×40 (H) cm) の中央に置き、15分間自由に行動させた。行動距離 (cm) , 中央区域 (30%) もしくは角5×5 subdivisionsでの滞在時間 (%) を1分毎に測定し、TimeOFCR4 (O'Hara & Co.) によって解析した。明暗箱

選択試験は既出の方法に従って行った (Takashima *et al.*, 2011)。マウスをそれぞれ明るい箱に入れ、ソフトウェアがマウスを検出すると直ちに自動的にトンネルへのドアが開く。マウスをLDボックスに入れて10分間自由に行動させ、総行動距離と明箱での滞在時間の割合と、明箱と暗箱の間の移動回数と最初に暗箱へ入るまでの時間を計測した。記録は、Time LD4 (O'Hara, Tokyo, Japan) によって解析した。スクロース嗜好性試験: マウスを2つの別々のボトルから水もしくは2%スクロースが飲めるように設置し、水もしくはスクロースの消費量を4日間毎日計測した。2つのボトルの場所は2日後に交換した。ボトルもしくは位置に特異性はなかった。スクロース嗜好性の計測値については、4日間の総引水量におけるスクロース摂取量の割合を算出し、平均化した。ビー玉埋め試験: マウスを15個のビー玉を置いたケージに入れ、20分後にケージの写真を撮影し、床材に埋めたビー玉の数を数えた。ネスティング行動試験では、マウスを綿材の入ったケージに入れ、48時間後にケージの写真を撮影し、巣作りの効率を、既出の方法同様にスコア1から5によって評価した (Nollet *et al.*, 2013)。

16. 統計学的解析

二つのグループはStudentのt-test (両側検定) によってP値を算出した。マウスの行動解析を含む3もしくはさらに多いグループの場合は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) のあとさらにボンフェローニ事後修正を行った。P値を<0.05 (*), <0.01 (**), <0.001 (***) として有意差を表記した。

17. 研究における法令遵守

すべての動物実験は、理化学研究所およびジョンズホプキンス大学の実験動物委員会の承認の下、関連する法令やガイドラインを遵守して行った。剖検脳はHarvard Brain Tissue Resource Center (McLean Hospital, Belmont, MD) より入手した。

結果

1. HDマウスモデルR6/2脳におけるPDE4活性の増大

R6/2マウスモデルにおけるHTT凝集体形成は、3.5週齢において大脳皮質、4.5週齢において線条体で始まり、7週齢で明瞭に検出され、進行的に継続する (Davies *et al.*, 1997)。このモデルを使用し、まずPDE4活性を4, 8, 12週齢で計測した。すると興味深いことに、8週齢の大脳皮質と線条体両方でPDE4活性のめざましい増大が観察された (Fig. 4-1A)。HDモデルでのPDE4活性の増強が検出されたことは、R6/2においてPDE4抑制剤であるロリプラムが有益な効果を示した既出の報告と一致する (DeMarch *et al.*, 2008; Giampà *et al.*, 2009)。PDE4活性は伸展ポリグルタミンを発現する安定発現細胞モデルHTT67Q150 (Wang *et al.*, 1999) においても、HTT67Q16細胞に比べて3倍以上に上昇したことから、PDE4活性の亢進はpolyQの長さに影響を受けることが示された (Fig. 4-1B)。PDE4活性の変化は12週齢まで観察されたが、大脳皮質でのPDE4活性の増加は時間とともに減少した (Fig. 4-1A)。大脳皮質におけるこの時間に伴う減少は、皮質での神経細胞死の結果かもしれないが、それはむしろR6/2マウスの線条体で先行して起こることが知られている (Davies *et al.*, 1997)。なお、この実験では全てのPDE4サブタイプを抑制することが知られているpan-PDE4選択性ロリプラムを10 μ Mの濃度で使用した (MacKenzie and Houslay, 2000; Houslay and Adams, 2003; Houslay *et al.*, 2005)。

2. 三つ組みのタンパク質複合体によるPDE4活性の調節

DISC1は、dynactin (p150glued), nuclear receptor corepressor (N-CoR), pericentriolar material-1 protein (PCM1), Kalirin-7と相互作用しており、それらすべてがhuntingtin-associated protein 1 (HAP1) ともしくはHTTと相互作用している

(Brandon and Sawa, 2011; Johnstone *et al.*, 2011; Narayan *et al.*, 2013)。DISC1とHTTに共通な結合パートナーが高頻度で存在することは、これらの二つのタンパク質が直接もしくは間接的に相互作用するであろうことを意味しており、最近のバイオインフォマティクスアプローチもまた同様の提案をしている (Boxall *et al.*, 2011)。DISC1とPDE4タンパク質が生理学的に機能的に相互作用するのと同様に (Millar *et al.*, 2005; Murdoch *et al.*, 2007; Carlyle *et al.*, 2011), 本研究ではDISC1-PDE4, PDE4-HTT, そして HTT-DISC1が相互作用するだろうという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、マウス全脳懸濁液を用いた共免疫沈降を実施し、DISC1-PDE4, PDE4-HTT, や HTT-DISC1タンパク質の相互作用を同定した (Figs. 4-2A, B)。DISC1-HTT および DISC1-PDE4結合は小脳より線条体や大脳皮質でさらに顕著であった (Fig. 4-2C)。

次に、これらの三種のタンパク質が複合体を形成するかを調べたところ、連続的共免疫沈降によりそのような三つ組みの複合体の形成を観察することができた (Fig. 4-3A)。PDE4のアイソフォームのひとつであるPDE4Bは大脳皮質や線条体において相対的に豊富に発現し、直接的にDISC1と相互作用する (Murdoch *et al.*, 2007)。さらに遺伝子相互作用研究により、PDE4B がDISC1の機能的な重要なパートナーであることが示唆されている (Millar *et al.*, 2005; Fatemi *et al.*, 2008)。PDE4B遺伝子はいくつかの明確なアイソフォームをコードし、主要なものとしてPDE4B1とPDE4B3の長い形態とPDE4B2の短い形態がある (Huston *et al.*, 1997)。本研究ではそのようにDISC1とこれらのそれぞれのアイソフォームとの結合について評価し、そしてそれぞれのDISC1とそしてHTTとの結合を証明することができた (Figs. 4-3B, C)。

3. HTTとDISC1のタンパク質結合でのポリグルタミン伸展の特異的な効果

PDE4, HTT, DISC1は三つ組みのタンパク質複合体を形成する。この3つのタンパ

ク質の相互作用に対し、HTTのポリグルタミン異常伸展がどのように影響するのかを、HTT513Q18、HTT513Q82をDISC1およびPDE4と同時に発現させることにより検討した。その結果、HTT513とDISC1の相互作用はポリグルタミンが伸展しているときに2倍に増大した (Fig. 4-3D)。この結合の増加は、同じ長さのポリグルタミンを含む短いN末断片 HTT67Q82をDISC1と反応させたときにもまた観察された (Fig. 4-3E)。しかしながら、DISC1とHTT513の結合は、HTT67とのそれより強かった (Fig. 4-4A)。これらの結果はHTTのアミノ酸1から67番を含む断片はDISC1と結合するのに十分であるが、付加的なアミノ酸68から513番断片がさらに相互作用を促進することを示している。伸展したポリグルタミンの影響はPDE4BとHTT513の間での相互作用では観察されず (Fig. 4-4B)、ポリグルタミンの伸展がHTT-DISC1相互作用において特殊な病態生理学的な影響を持っていることを示している。

4. R6/2マウスとHD脳におけるDISC1のSDS不溶性HTT凝集体への選択的隔離

HDの特徴の一つは伸展ポリグルタミンを含む変異HTTのSDS耐性凝集体/封入体の形成である (Scherzinger *et al.*, 1997)。DISC1もまた凝集しやすいことが報告されているが (Leliveld *et al.*, 2008; Atkin and Kittler, 2012)、その病態生理学的重要性についてははっきりしていない。そのためDISC1の貯留がR6/2モデルだけでなくHD患者からの脳のSDS耐性分画において検出されるかどうか、フィルタートラップアッセイを実施した。R6/2マウス的大脑皮質や線条体のSDS耐性不溶分画におけるDISC1検出値は、正常マウスのそれと比べて極めて高かった (Fig. 4-5A)。同様の結果が、HD患者および正常ヒトサンプルからのSDS不溶性分画で観察された (Fig. 4-5B)。対照的に、PDE4Bはどの脳サンプルのSDS耐性不溶性分画においてもほとんど検出されなかった (Fig. 4-5C)。さらに、ウエスタンブロッティングでは、R6/2マウスからの脳懸濁液を注入した時のゲルの上端において、DISC1の免疫反応を検出したが、PDE4Bでは

検出されなかった (Fig. 4-5C)。このことから, R6/2脳において貯留されたDISC1は SDS不溶性が亢進し凝集性が高まっていたが, PDE4BはHTT凝集体の存在に影響を受けず, 不溶化されていないことが示唆された。

不溶性DISC1が変異HTT凝集体と相互作用することができるかどうか調べるために, 免疫蛍光組織染色を行い検討した。この実験により, R6/2マウスの大脳皮質と線条体の両方で, 神経細胞核内における高強度のDISC1抗体陽性凝集体が変異HTTの核内凝集体と共局在していることが観察された (Fig. 4-6A)。DISC1は報告されているように細胞質と核両方に局在する (Sawamura *et al.*, 2005; 2008; Malavasi *et al.*, 2012; Soda *et al.*, 2013)。それゆえ, DISC1の核内局在は核内HTT凝集体内への取り込みに関連している可能性が高い。さらに, DISC1とHTT凝集体との共局在はHD患者の皮質や線条体の切片でもまた観察された (Fig. 4-6B)。対照的に, HTT凝集体におけるPDE4Bの共局在は検出されなかった (Figs. 4-6C, D)。

5. 易凝集性なDISC1とポリグルタミン伸展変異HTTとの間のクロスシーディング

上記の結果は, DISC1とHTTとの相互作用がHTTの変異のために異常亢進され, HTT凝集体内へのDISC1の選択的な取り込みが促進されている可能性を示唆した。そのため, 自然状態で易凝集性を示すことが十分に特徴づけられてないDISC1について, 潜在的な生化学的メカニズムの評価および全長DISC1の凝集体の構造物理学的特性の解明を試みた (Leliveld *et al.*, 2008; Atkin and Kittler, 2012)。多種の生物物理学アッセイにより, DISC1は典型的なアミロイドであるHTT67Q42と同様に, アミロイド特異的な色素であるチオフラビンTに反応する凝集体を自発的に形成することが観察された (Scherzinger *et al.*, 1997) (Fig. 4-7A)。この繊維性の形態を電子顕微鏡によって観察し (Fig. 4-7B), さらに, DISC1凝集体の円偏光二色性スペクトルを計測した。円偏光二色性スペクトルの負のピークは228nmであり, これは多量のベータシートに

富んだ構造を指し示している (Fig. 4-7C)。これらの結果はDISC1がin vitroで繊維性の凝集体を形成できることを示している。DISC1は凝集を促進しうるグルタミン/アスパラギンが豊富なドメインを含んでいないため、DISC1凝集体のコア領域を質量分析法によって調べた。DISC1凝集体のタンパク質はプロテイナーゼK処理後、MALDI-TOF mass 分析によって計測し、マスペクトルにおいて2012.9 (m/Z) に1本の主要なピークを検出した。この結果により、DISC1凝集体のコア領域が209-227残基によって構成されることが同定された (Fig. 4-8A)。

つぎにDISC1凝集の動態におけるHTTの凝集体の影響について検討した。DISC1は自発的に凝集体を形成する。経時的測定実験下において最初の2時間は凝集形成による吸光度の上昇は見られないが、その後凝集が加速し吸光度が上昇する (Fig. 4-8B)。しかしこの2時間の遅れは、DISC1凝集体をシード (種)として添加 (10% mol/mol) することによりほぼ完全に消失し (Harper and Lansbury, 1997; Tessier and Lindquist, 2009; Eisenberg and Jucker, 2012)、測定開始直後からDISC1凝集が計測された (Fig. 4-8B)。DISC1凝集はDISC1シードの添加により促進されたが、重要なことに、DISC1凝集はHTT67Q42凝集体のシードの添加によっても促進された (Fig. 4-8B)。しかし、コントロールとして行ったBSAの凝集体の添加では促進されなかった (Fig. 4-8B)。また、PDE4B2タンパク質およびHTT67Q42のTF (トリガー因子) 断片は、シードを添加しても凝集は見られなかった (Fig. 4-8B, Fig. 4-8C)。免疫沈降実験ではHTT67Q42によって促進されたDISC1凝集は共凝集によるものであり、自発的なDISC1凝集の割合が増加したためではないことが示された (Fig. 4-8D)。HA-HTT67Q42 アミロイドシード (10% mol/mol) とともに可溶性DISC1を培養すると、HA-HTTQ42凝集体がDISC1をまき込むという結果になるが、それは可溶性DISC1がHA-HTTQ42シードと共凝集体を形成したことを示している (Fig. 4-8D)。これらの結果からISC1と変異HTTは互いにクロスシーディングすることが明らかとなり、それ

はin vivoのHD脳において二つのタンパク質が明らかに共局在することと一致した (Fig. 4-6B)。

HTT67Q42の凝集体のシード添加によって形成されたDISC1凝集体は、フーリエ変換赤外スペクトルにおいて 1620 cm^{-1} でのピークの上昇を示した。それはシードなしで形成された自発的なDISC1凝集体に比べて、HTT67Q42シードと共凝集したDISC1では、分子内の β シート構造がより多く形成されていることを示している (Seshadri *et al.*, 1999) (Fig. 4-8E)。また、自発的なDISC1凝集体よりHTT67Q42アミロイドによってシードされたDISC1凝集体のほうが、2%SDSに対する耐性が亢進した (Fig. 4-3F)。これらの実験は一貫して、変異HTTアミロイドによるクロスシーディングによって、DISC1凝集体の構造や生理学的特性が変化している可能性を支持した。

6. R6/2マウスにおける可溶性DISC1の減少によるDISC1-PDE4複合体の減少

HDの病理において、DISC1の生理学的蓄積が、HTT凝集体におけるDISC1の選択的な取り込みによって障害されるかどうかを調べた。最初に、大脳皮質と線条体の懸濁液の沈降分析を行った。野生型のマウスに比べてR6/2マウスは可溶性DISC1の検出量が減少していたが、PDE4Bは減少していなかった (Fig. 4-9A)。DISC1は可溶性分画においてPDE4Bと相互作用し、PDE4の酵素反応を調節する (Millar *et al.*, 2005; Carlyle *et al.*, 2011)。可溶性DISC1の検出量の減少は、DISC1-PDE4複合体の総量の減少やPDE4活性の上昇の原因となる可能性がある。可溶性分画におけるDISC1の重大な変化 (Fig. 4-9Aにおいてウエスタンブロッティングで検出) やPDE4活性の変化に比べて (Fig. 4-1A), HTT凝集体へのDISC1の組み込みはより控えめである (Figs. 4-6A, B)。HTT微小凝集体と結合した不溶性DISC1は拡散することができるため、HTTと結合した不溶性DISC1は大きなHTT凝集体との共局在として視覚化されたのかもしれない。マウス脳懸濁液では、DISC1-PDE4の量はR6/2において、野生型に比べて顕著

に減少した (Fig. 4-9B)。

さらに, DISC1-PDE4B複合体の減少が変異HTTの存在により直接的に誘発されるかどうかを調べた。HTT513Q18 もしくは HTT513Q82を過剰発現した細胞の溶解液をDISC1とPDE4Bが相互作用している細胞溶解液に加え, 外因性のHTT513タンパク質がDISC1-PDE4B複合体にどのような影響を与えるかを調べた。HTT513Q82の添加はもともと存在していたDISC1-PDE4B複合体の量を顕著に減少させたが, それに反してHTT513Q18は減少しなかった (Fig. 4-9C)。とりわけ, HTTのDISC1への結合の増強は, HTT513Q18 に比べ, HTT513Q82存在下において観察された (Fig. 4-3C)。

DISC1とPDE4との相互作用の相対的な欠失が, DISC1とポリグルタミン伸展変異HTTとの優先的な結合の結果として起こるDISC1のHTT凝集体への隔離の, 主要な影響なのかもしれない。

7. R6/2マウスの異常亢進したPDE4活性に対するHTT-DISC1-PDE4相互作用

本研究は, DISC1のHD凝集体への取り込みがDISC1のPDE4に対する調整効果を妨げ, それがHDの病理に関連したPDE活性の異常増強を引き起こすことを示唆した。もしこのシナリオが正しいならば, ここで研究に用いられているモデルにおけるPDE4活性の上昇は, 野生型DISC1の付加的な導入により緩和され得る。前述のように, 高いレベルの内因性のDISC1を発現しているneuro2aにおけるHTT67Q150の過剰発現は, PDE4活性を3-4倍に増強した (Fig. 4-1B)。HTT67Q150を発現するneuro2a細胞に外因性の野生型DISC1を過剰発現させると, PDE4活性の異常増強は緩和された (Fig. 4-10A)。これらの結果は, 病理学的なPDE4活性化に対し細胞保護の面でDISC1による有益な効果があるが, 完全な正常状態に戻すことはできなかったことを示した。これは外因的に発現されたDISC1も少なくとも一部はHTT凝集体に取り込まれてしまい, 完全に内因性PDE4活性を統制することはできなかったためであると考えられる。

本研究では、DISC1とタンパク質相互因子、PDE4と様々なパートナータンパク質の結合ドメインをマップにするのに成功したペプチドアレイを用いて、HTTとの結合に不可欠なDISC1領域の同定をはじめた (Murdoch *et al.*, 2007; Houslay, 2010)。それにより、同定したHTTと相互作用するための最小限のドメインを欠落させつつPDE4結合能は保持する変異DISC1が、HTT凝集体に隔離されずにPDE4活性を統制することができるかと予想したためである。マウスとヒトのDISC1の分析結果は一致した。これは2つの種で保存されており、アミノ酸206から220番目が、マウスとヒトのDISC1両方においてHTTとの結合に決定的に必須であることを示している (Fig. 4-10B)。さらにペプチドアレイによって、アミノ酸201-228欠失 ($\Delta 201-228$) 変異マウスDISC1は、野生型DISC1に比べて培養細胞におけるDISC1-HTT513結合の劇的な減少を示した (Fig. 4-10C)。一方、この欠失変異タンパク質はDISC1-PDE4B2 結合には影響がなく、DISC1-PDE4B1 相互作用には顕著に影響した (Fig. 4-10C)。これはDISC1とPDE4アイソフォームとの間の結合の複雑さに起因している (Murdoch *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2007)。

8. HTT結合領域欠損DISC1の導入と効果

HTT断片を発現しているneuro2aに、野生型DISC1もしくは $\Delta 201-228$ nDISC1を発現させると、 $\Delta 201-228$ nDISC1は完全に異常増強PDE4活性を正常化させた。この $\Delta 201-228$ nDISC1の効果は、野生型DISC1より高かった (Fig.4-10A)。もしDISC1の凝集がHD脳において低下したPDE4の活性を調節しているならば、付加的なDISC1の局所的な導入はHDでみられる異常なPDE4活性を救済するかもしれない。

PDE4活性は8週齢のR6/2の線条体で増強されていることが示されたため (Fig. 4-1A)、外因性のDISC1をR6/2のマウスに導入し治療を試みた。すなわち、DISC1と蛍光タンパク質ビーナスをIRES経由で結合させた遺伝子 (DISC1/ビーナス) を持つレンチ

ウイルスベクターを、定位脳固定インジェクションによって2週齢のR6/2マウス線条体に導入した。そして8週のマウスの線条体からフローサイトメトリーによってDISC1/ビーナスを発現している細胞を集め、PDE4活性を測定した。野生型のDISC1はR6/2マウスの異常なPDE4活性を顕著に減少させた (Fig. 4-10D)。 Δ 201-228 nDISC1の導入はさらに上回る効果をもたらし、それは細胞モデルにおける観察と一致した (Fig. 4-11A)。したがって、HD病理におけるPDE4活性の病的な増強は、PDE4活性を統制しているDISC1の部分的な欠失によって、支配的に調節されている可能性がある。このDISC1の欠失によるPDE4活性増強の過程は、HTT-DISC1間の特異的で優先的な結合および共凝集の結果として起こる、HTT-DISC1-PDE4の三つ組みの複合体からのDISC1の隔離によって引き起こされる。

9. R6/2マウスの非運動機能におけるHTT-DISC1-PDE4相互作用の重要性

*in vivo*において阻害されたDISC1-PDE4相互作用を調べるために、PDE4結合部位を含みHTT結合部位を欠損したマウスDISC1N末1-316アミノ酸断片をコードしているアデノ随伴ウイルスを作製した (rAAV- Δ 201-228-nDISC1) (Fig. 4-11B)。そして、コントロールEGFPもしくは Δ 201-228-nDISC1をコードしているAAVを、3週齢のR6/2マウスに定位的に注入した。そして免疫学的手法により、外因的な Δ 201-228-nDISC1の発現はHTT凝集や神経細胞の生存に影響しないことを明らかにした (Figs. 4-10 E, F, G)。さらにマウスの運動性や非運動性の行動について調べた。R6/2およびHDモデルマウスは、運動機能障害および鬱のような精神症状を示す(Hickey et al.,2002; Tanaka et al.,2006; Pouladi *et al.*, 2009)。R6/2の運動機能障害は、ロータロッド行動解析における障害やオープンフィールドテストにおける移動距離の短縮によって明らかであったが、それは外因的な Δ 201-228-nDISC1の発現によって変化しなかった (Figs. 4-11A, B)。次に明暗箱選択テストやビー玉埋め試験、ネスティング行動試験、さらにスクロ

ウス選好実験を含む、非運動性機能のため様々な行動実験を実施した。興味深いことに、スクロース選好試験ではコントロールに比べ、 $\Delta 201-228$ -nDISC1を発現しているほうが、顕著にR6/2の減少していた選好性が回復した (Fig. 4-12C)。逆に、ビー玉埋めテストやネスティング行動試験では、R6/2マウスでは欠陥が見られたが、 $\Delta 201-228$ -nDISC1による改善は観察されなかった (Figs. 4-12D, E)。重要なことに、R6/2マウスは明暗箱選択試験やオープンフィールドでの中央部に留まる時間も変化を示さなかった (Figs. 4-12F, G)。これらの結果はDISC1-PDE4-HTT経路がR6/2マウスの非運動性行動の特異的な一部分に参与している可能性を示唆している。

考察

本研究は、PDE4ではなく、本質的に凝集性の高いDISC1の変異HTT凝集体への取り込みが、HTT-DISC1-PDE4の三つのタンパク質の適正な複合体形成を妨げていることを示した。これがDISC1による生理学的な制御をこえたPDE4遊離分画を生成し、それがPDE4活性の異常な上昇をもたらすことを明らかにした。さらに、*in vivo*における研究は、この分子経路がR6/2マウスモデルの無快感症 (アンヘドニア) の根底にあるかもしれないことを示唆した (Fig. 4-13)。本研究は、変異HTTと他の凝集性のあるタンパク質との共凝集が運動障害に巻き込まれることを示す多くの既出の研究 (Lee *et al.*, 2004; Tyedmers *et al.*, 2010; Poças *et al.*, 2015) と異なりHDの精神的徴候について示し、HTT-DISC1-PDE4の三つ組みのタンパク質複合体形成メカニズムが病理や潜在的な精神病症状の主要な分子基盤を供給することを提案する。HD患者やモデルマウス両方においてcAMPの減少が観察され (Cramer *et al.*, 1984; Gines *et al.*, 2003), PDE4抑制剤であるロリプラム投与がR6/2マウスにおける運動機能障害とHTT凝集と

神経細胞死両方の減少を緩和するが (Davies *et al.*, 1997; DeMarch *et al.*, 2008; Giampà *et al.*, 2009), $\Delta 201-228$ -nDISC1発現はそれらについては影響がなかったことが観察された (Figs. 4-10F, G, Fig. 4-11A, B)。これらの対照的な結果は、ロリプラムの作用機序と、局所的な $\Delta 201-228$ -nDISC1共発現の根底にある分子メカニズムは異なるということを強く示唆している。ロリプラムが多様なPDE4の作用を標的にできた事実とは対照的に、 $\Delta 201-228$ -nDISC1はDISC1に関係したPDE4活性に対してしか、特異的な阻害効果がなかった。

本研究は、DISC1の凝集が変異HTTシードの存在により顕著に促進されることを示した。重要なことに、DISC1凝集体の構造分析によって、変異HTTとDISC1の間の効率的なクロスシーディングの機序を明らかにした。それはDISC1凝集体のコア領域(残基209-227)はHTT結合サイト(残基206-220)を含むことである。それぞれのDISC1分子は凝集性の高いコア領域の間で相互作用する機会を増加させ、さらに変異HTT凝集体へのDISC1の取り込みを促進すると考えられる。加えて、変異HTTとのクロスシーディングにより増加したDISC1凝集体の β シート構造やSDS耐性は、可溶性DISC1の変異HTT凝集体へのとりこみを促進し、凝集体の分解をより強く阻害するかもしれない。

細胞生物学および生物物理学的戦略を合わせた本研究は、重要な仮説を提案する一方で、将来の研究のための課題も残している。一つ目は、ミスフォールドしたタンパク質分画や凝集体へのDISC1の取り込みが、HD特異的な現象なのか、もしくはより一般的に他のポリグルタミン病および凝集体形成を示す神経変性疾患にも適合するのかわかを明らかにすることが重要である。ポリグルタミン病の病理症状を発現するR6/2マウスからの知見であるため、DISC1は他のポリグルタミン疾患にも関連している可能性がある。二つ目はHD病理の幅広い面におけるHTTの影響を調べるために全長HTTマウスモデルの利用が望まれる。三つ目は、どのように他のDISC1相互作用相手が

HTT-DISC1-PDE4の三つ組みのタンパク質複合体によって統制されるPDE4規制メカニズムに巻き込まれるかを明らかにすることである。

最近の研究により、統合失調症、双極性障害、鬱、もしくはそのような状態にある臨床試験前の動物モデルおよび患者の小グループからの脳サンプルが、不溶性のDISC1やdysbindin、および精神機能の生物学に関係する他のタンパク質を含むことが示されている (Leliveld *et al.*, 2008; Hamburg *et al.*, 2016; Trossbach *et al.*, 2016; Ottis *et al.*, 2011; Nucifora *et al.*, 2016)。本研究は、ここに不溶性になりやすいミスフォールドしたタンパク質の選択的ネットワークが、精神医学的徴候を含む脳機能不全の多くの局面に横たわるだろうことを提言する。

小括

ハンチントン病 (HD) においては舞踏病を主症状とする運動障害が集中的に研究されているなか、精神症状のような非運動症状の分子メカニズムは理解されていないままである。ここでは、HTTがDISC1とPDE4と三つ組みのタンパク質複合体を形成し、PDE4活性を調節することを示した。また、変異HTT凝集体とDISC1との病的なクロスシーディングによる選択的なDISC1の凝集促進を、HD患者脳やHDモデルマウス脳において観察した。さらに、可溶性DISC1の結果的な減少がDISC1-PDE4複合体の制御不全をもたらし、PDE4活性の異常な亢進を誘導することを明らかにした。重要なことに、PDE4との結合部位を有しHTTとの結合部位を欠損させた変異DISC1の外因的な発現は、異常亢進していたPDE4活性を正常化し、R6/2モデルの神経症状を一部緩和させた。しかし運動障害は改善されなかった。

ここに、変異HTTとDISC1のクロスシーディングやPDE4活性の結果として生じ

る変化が, HD の精神症状徴候の特異的な一部の病理の基礎になっている可能性があることを提案する。このことにより一般的な精神病の分子伝達の重要な見識がもたらされると考える。

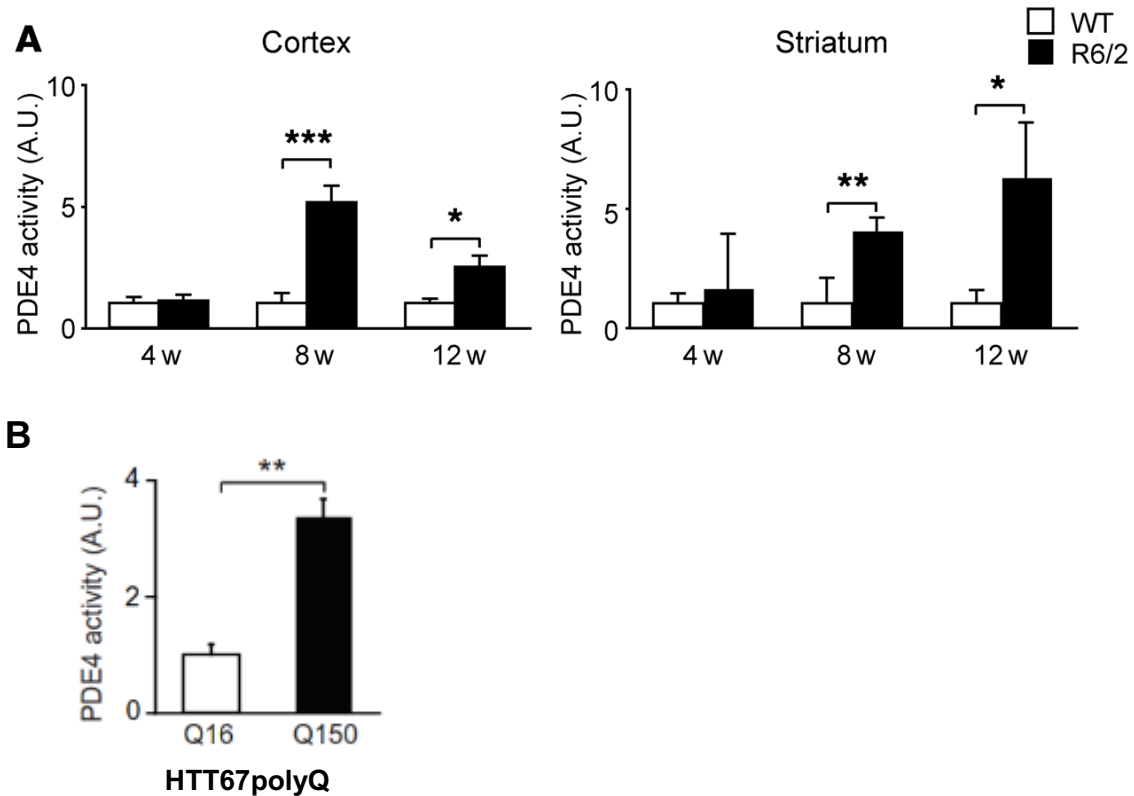


Fig. 4-1. PDE4 activity could be regulated by the newly identified HTT-DISC1-PDE4 ternary protein complex. (A) PDE4 activities of the homogenates of cerebral cortex (left) and striatum (right) in R6/2 mice were increased compared with those in WT at 8 and 12 weeks (w) of age. Data represent mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; unpaired 2-tailed t test. Cortex: 4 weeks, $n = 4$ per group; 8 weeks, $n = 5$ per group; 12 weeks, $n = 9$ (WT), 6 (R6/2). Striatum: 4, 8, and 12 weeks, $n = 4$ per group. (B) PDE4 activity was augmented in a cell model of HTT with expanded polyglutamine (polyQ) PDE4 activity of neuro2a cells overexpressing HTT67Q150-EGFP (Q150) was higher than that of the cells overexpressing HTT67Q16-EGFP (Q16) at 5 days after the expression of HTT67polyQ-EGFP. Data represent mean + SEM (4 independent sample sets). ** $P < 0.01$; Unpaired two tailed t-test.

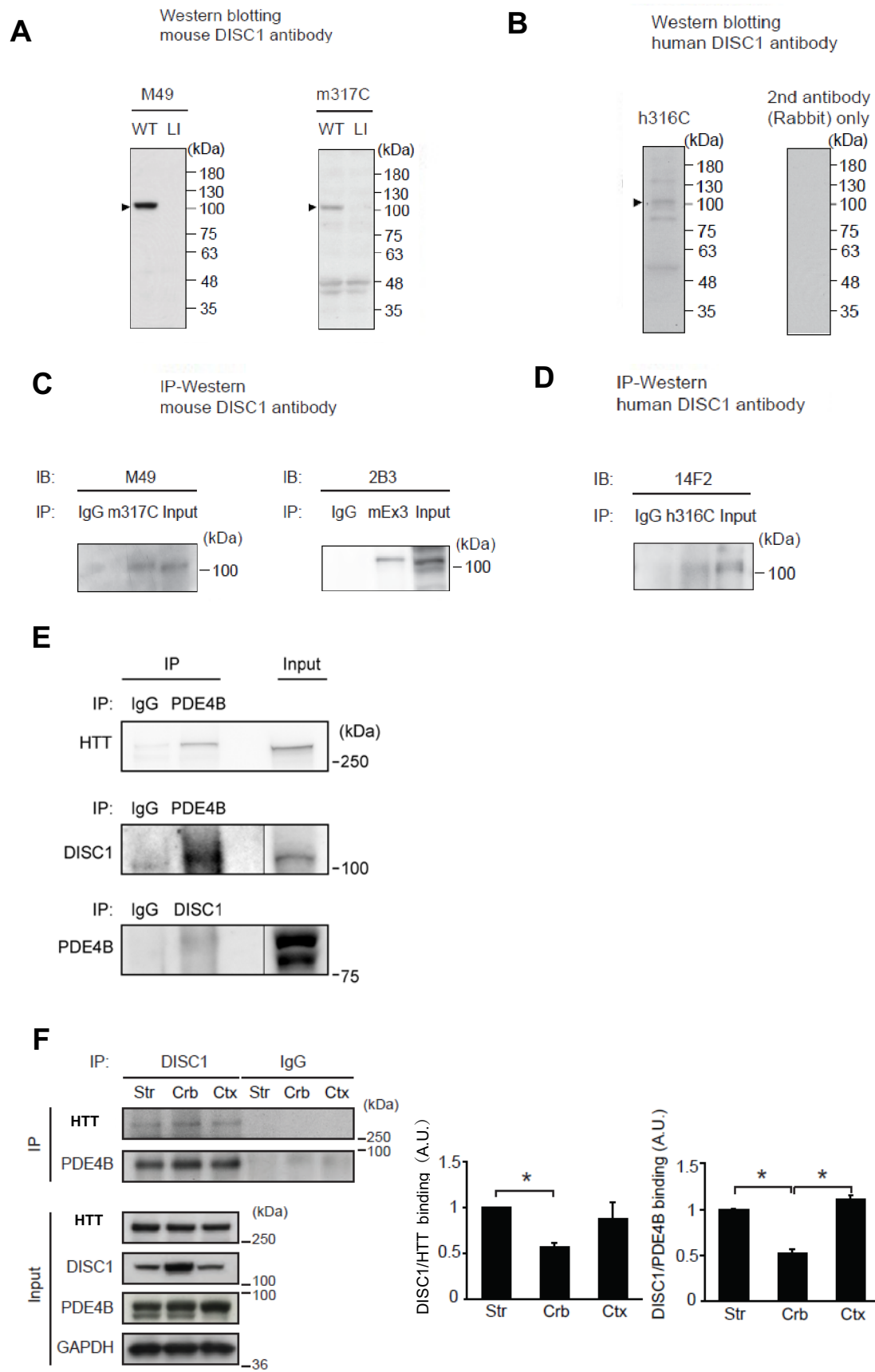


Fig. 4-2. Validation of mouse or human DISC1 antibodies used in this study. (A) Monoclonal or polyclonal anti-mouse DISC1 antibodies were validated by western blotting in wild-type (WT) and Disc1 Locus Impairment (LI) mouse cerebral cortex (Shahani *et al.*, 2015; Seshadri *et al.*, 2015) (B) A rabbit polyclonal anti-human DISC1 antibody was used for western blotting in human cerebral cortex. (C) Left: Co-immuno-precipitation with mouse brains by a mouse DISC1 m317C antibody, followed by immuno-blotting with a mouse DISC1 M49 antibody. Right: Co-immuno-precipitation with mouse brains by a mouse DISC1 mEx3 antibody (Ishizuka *et al.*, 2007; Shahani *et al.*, 2015; Seshadri *et al.*, 2015), followed by immunoblotting with a mouse DISC1 2B3 antibody (Shahani *et al.*, 2015). (D) Co-immunoprecipitation with human brains by a human DISC1 h316C antibody, followed by immunoblotting with a human DISC1 14F2 antibody (Ottis *et al.*, 2011). Arrowheads indicate full length DISC1. Representative immunoblots are shown from 2-3 independent sample sets. (E) Protein complex of HTT-DISC1-PDE4B in cerebral cortex of WT mice. Brain homogenates were immunoprecipitated by an anti-PDE4B (pan-PDE4B) or anti-DISC1 (mEx3) antibody or IgG control, followed by immune-blotting with an anti-HTT (MAB2144), anti-DISC1 (m317C), or anti-PDE4B (pan-PDE4B) antibody. Representative immunoblots are shown from 3 independent sample sets. (F) DISC1 binding to HTT and PDE4B was observed in distinct brain regions, and both DISC1 and HTT bind to PDE4B isoforms. Immunoprecipitation with an anti-DISC1 antibody (m317C) showed that the binding of DISC1 (M49) to HTT (MAB2166) and PDE4B (pan PDE4B) was observed in distinct brain regions such as striatum, cerebral cortex and cerebellum. Each interaction was more significant in striatum and cerebral cortex than cerebellum. *P<0.05.

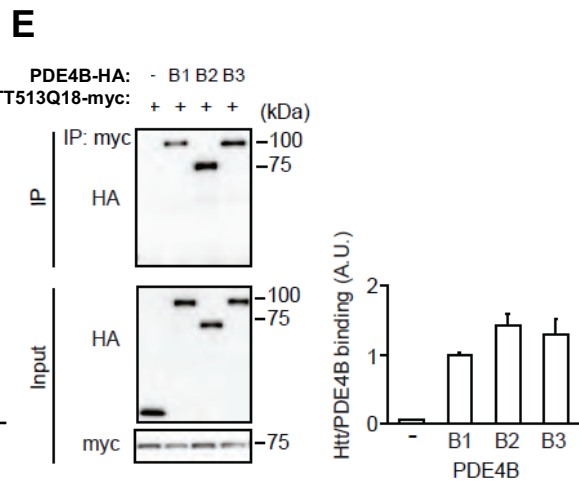
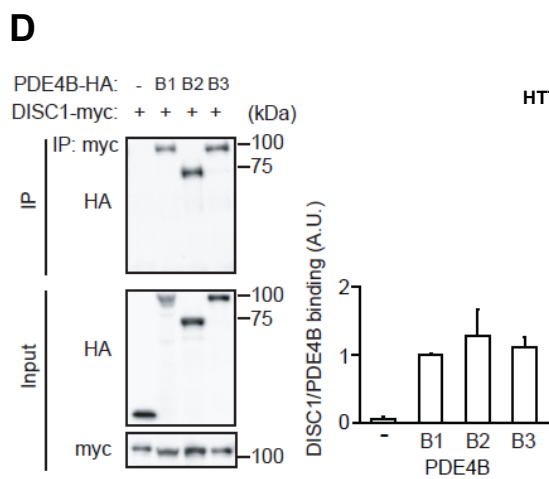
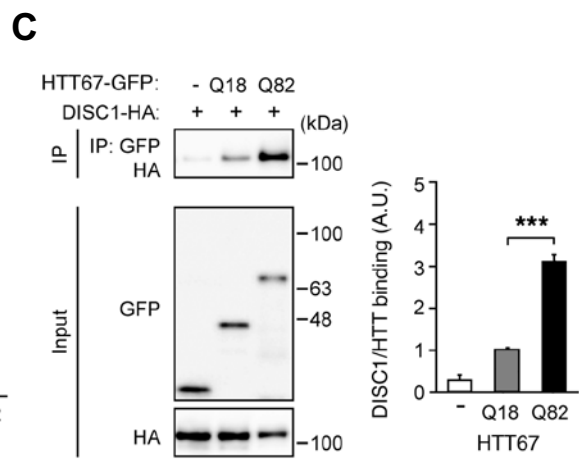
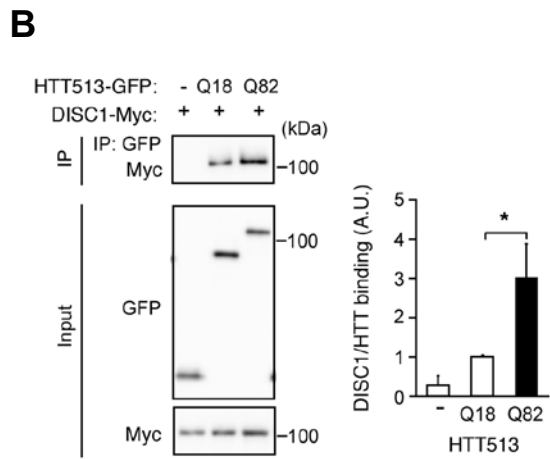
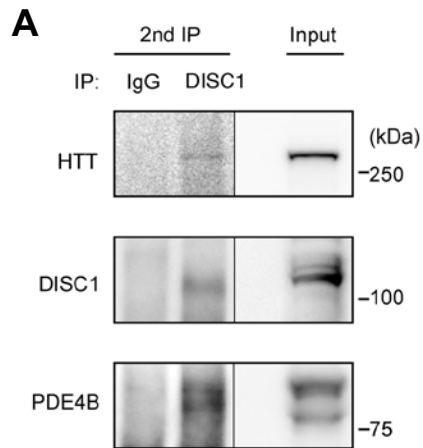


Fig.4-3 Formation of HTT-DISC1-PDE4B tertiary protein complex in cerebral cortex of WT mice. (A) Formation of HTT-DISC1-PDE4B tertiary protein complex was detected with sequential coimmunoprecipitation. Brain homogenates were immunoprecipitated by PDE4B antibody (pan-PDE4B) (1st IP), then the immunoprecipitates were immunoprecipitated by an anti-DISC1 (mEx3) antibody (2nd IP), followed by immunoblotting with an anti-HTT (MAB2166), anti-DISC1 (m317C), or anti-PDE4B (pan-PDE4B) antibody. Negative control was immunoprecipitated by IgG. Representative immunoblots are shown from 3 independent sample sets. (B) Binding of DISC1 to PDE4B isoforms in HEK293T cells by co-immunoprecipitation. (C) Binding of HTT to PDE4B isoforms in HEK293T cells by co-immunoprecipitation. Data represent mean + SEM (3 independent sample sets). P-values were determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc corrections. (D) Increased binding of HTT513 and DISC1 with expansion of polyQ (Q18 or Q82) in HEK293T cells by coimmunoprecipitation. Data represent mean + SEM (5 independent sample sets). *P < 0.05; 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc corrections. (E) Increased binding of HTT67 and DISC1 with expansion of polyQ (Q18 or Q82) in HEK293T cells by coimmunoprecipitation. Data represent mean + SEM (3 independent sample sets). ***P < 0.001; 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc corrections.

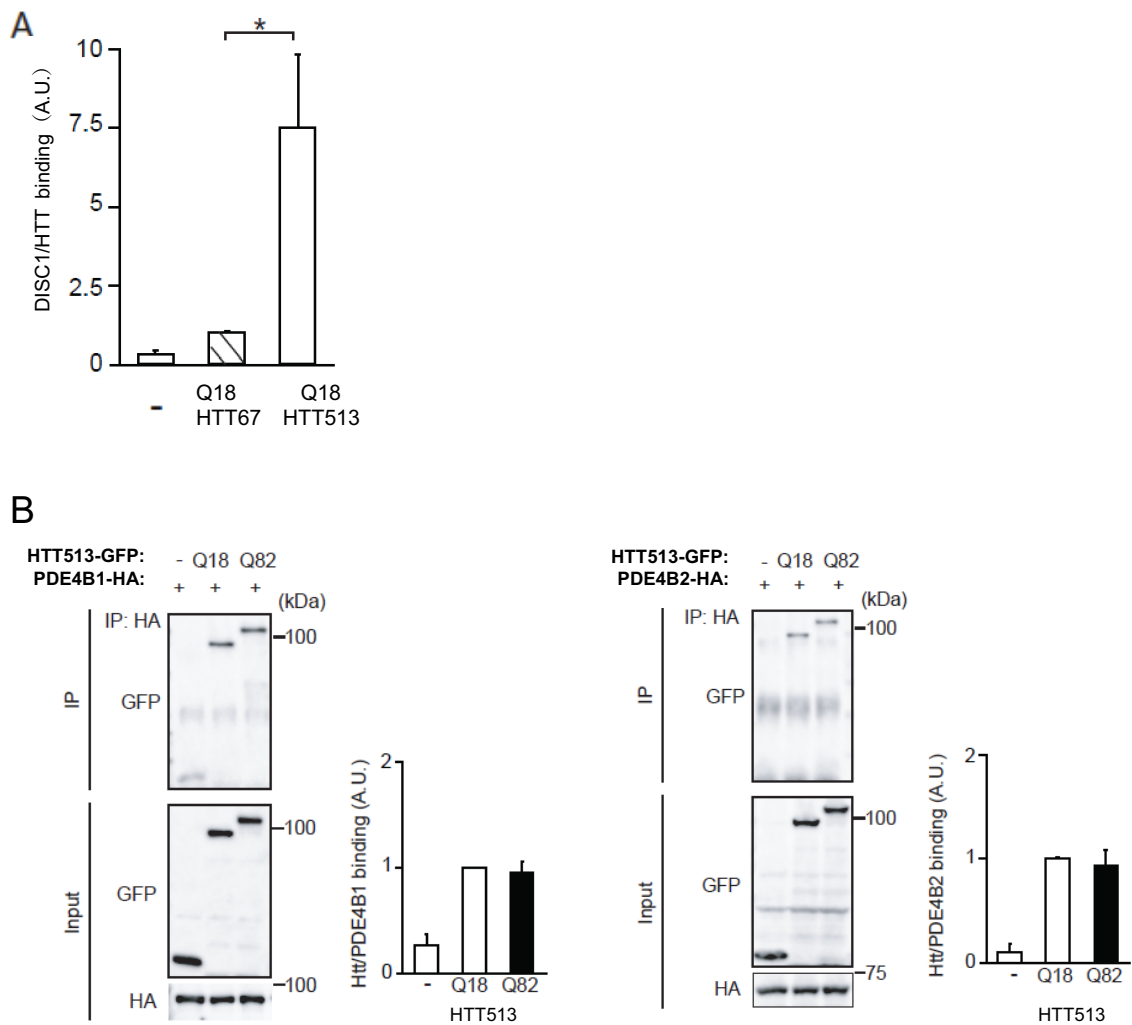


Fig. 4-4. DISC1 binding to HTT513 was increased, compared to that to HTT67, and polyQ expansion in HTT had no effects on its binding to PDE4B isoforms. (A) Increased binding of DISC1 with HTT513, compared to that with HTT67, in HEK293T cells by co-immunoprecipitation. * $P < 0.05$. (B) No change in binding of HTT513 with PDE4B isoforms by polyQ expansion in HTT in HEK293T cells by co-immunoprecipitation. Data represent mean + SEM (3 independent sample sets). P-values were determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc corrections.

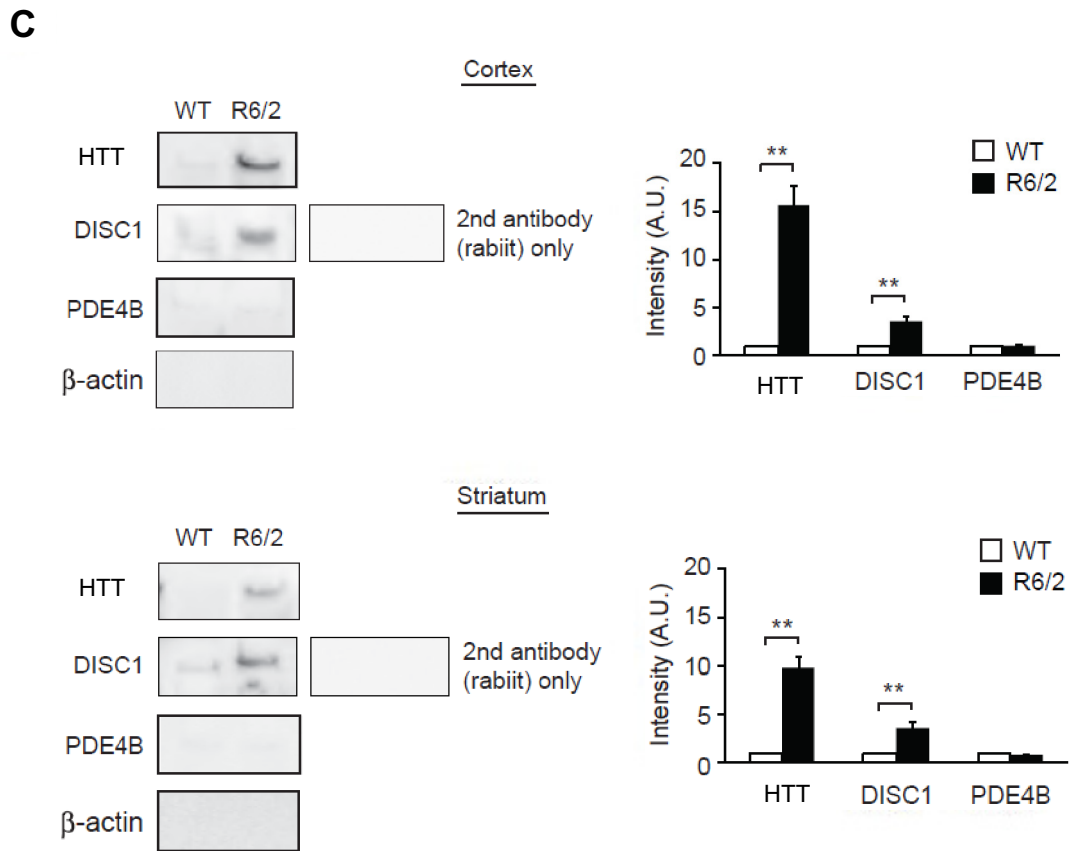
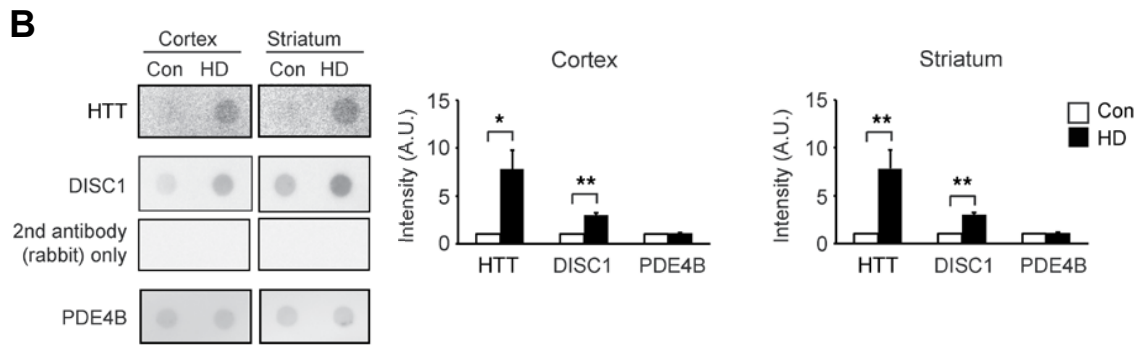
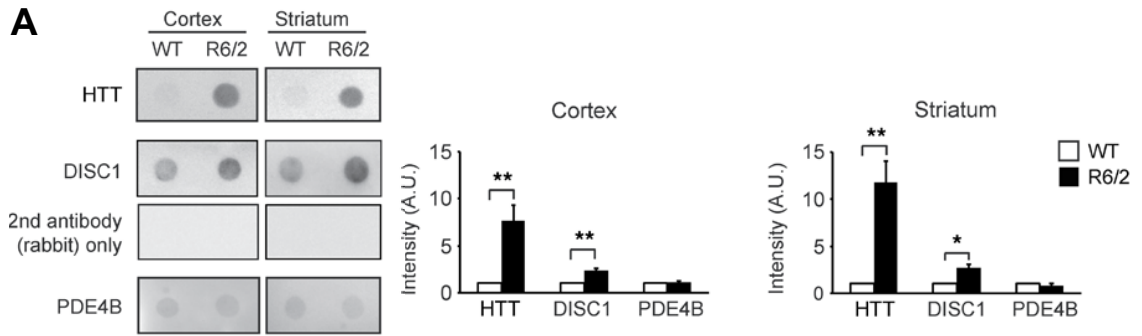


Fig. 4-5. DISC1, but not PDE4B, is sequestered into insoluble HTT aggregates in HD.

(A) Filter trap assay with homogenates of cerebral cortex or striatum from 12-week-old R6/2 mice showed significantly increased levels of HTT (EM48) (top) and DISC1 (m317C) (middle) but not PDE4B (pan-PDE4B) (bottom) in the SDS-resistant fraction, compared with those from WT mice. A negative control with rabbit secondary antibody alone is also shown (middle). Data represent mean + SEM. *P < 0.05, **P < 0.01; unpaired 2-tailed t test. n = 3 per group.

(B) Filter trap assay with homogenates of cerebral cortex or striatum showed significantly increased levels of HTT (EM48) (top) and DISC1 (h316C) (middle) but not PDE4B (pan-PDE4B) (bottom) in the SDS-resistant fraction from HD patients (HD), compared with those from controls (Con). A negative control with rabbit secondary antibody alone is also shown (middle). Data represent mean + SEM. *P < 0.05, **P < 0.01; unpaired 2-tailed t test. n = 3 per group.

(C) Immunoreactivities of DISC1 (m317C) and HTT (EM48), but not that of PDE4B (pan PDE4B), in total homogenates (in 2% SDS) from cerebral cortex (upper) or striatum (lower) in R6/2 mice were observed on the top of the gel. No immunoreactivity of DISC1, HTT, or PDE4B was detected in wild-type (WT) mice. β -actin is a loading control. Data represent mean + SEM. **P < 0.01; Unpaired two tailed t-test. n=3 per group. A negative control with rabbit secondary antibody alone was also shown.

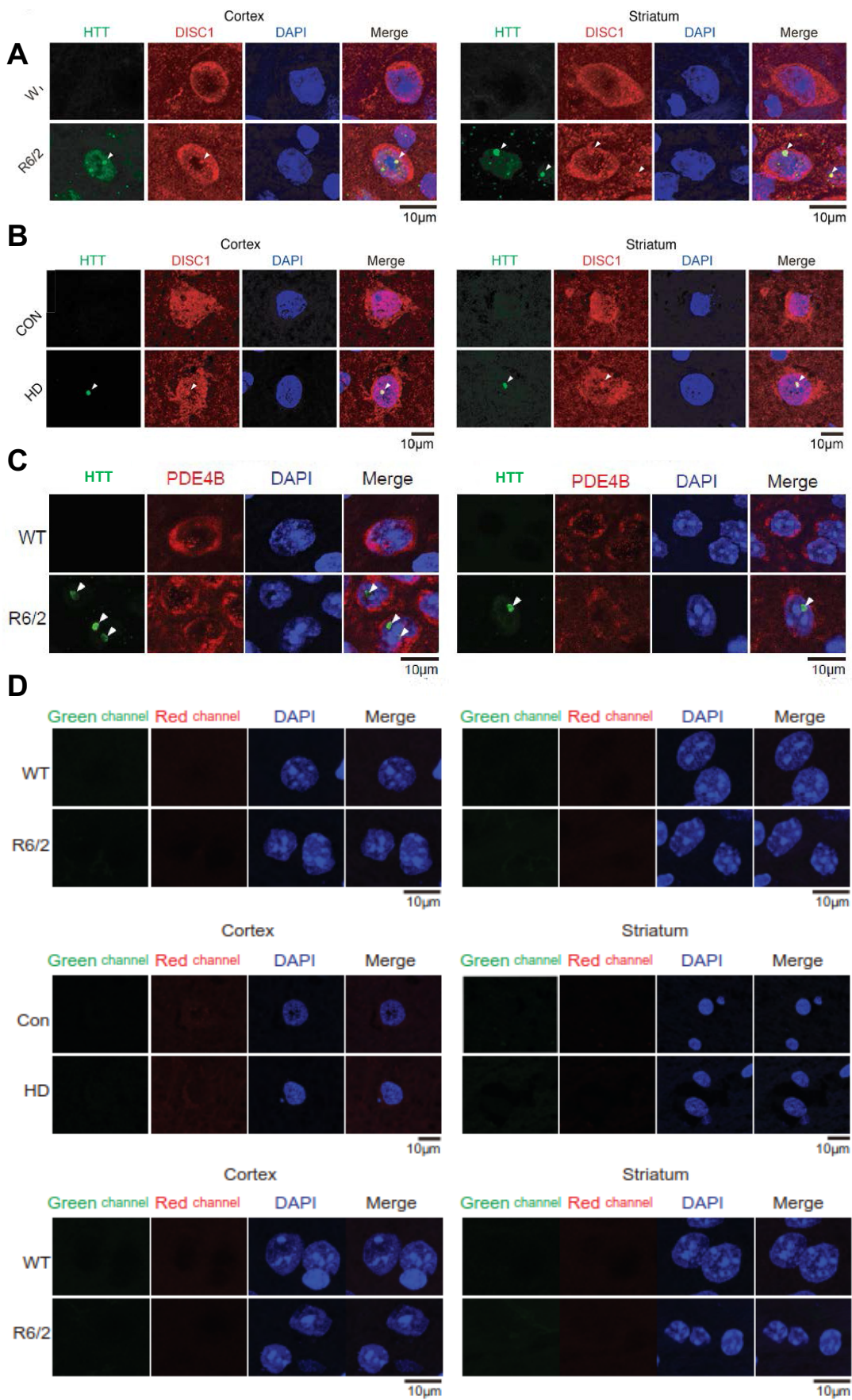


Fig. 4-6. DISC1, but not PDE4B, is sequestered into insoluble HTT aggregates in HD.

(A) Immunostaining of frozen sections of cerebral cortex (left) or striatum (right) demonstrated that DISC1 was colocalized with intranuclear inclusions of mutant HTT in 12-week-old R6/2 mice. Green, HTT (EM48); red, DISC1 (m317C); blue, DAPI (the nucleus). Arrowheads show intranuclear inclusions. Scale bar: 10 μ m. n = 3 per group. (B) Immunostaining of paraffin sections of cerebral cortex (left half) or striatum (right half) in HD patients (HD) and human controls (Con) was performed with anti-HTT (EM48) (green, left) and anti-DISC1 (h316C) (red) antibodies. Nucleus was stained by DAPI (blue). Merged images are shown on the right. Arrowheads show intranuclear inclusions. Scale bar: 10 μ m. n = 3 (Con), 6 (HD). (C) Immunostaining of frozen sections of cerebral cortex (left) or striatum (right) demonstrated that PDE4B was not colocalized with intranuclear inclusions of mutant HTT in 12-week-old R6/2 mice. Green, HTT (EM48); red, PDE4B (pan PDE4B); blue, DAPI (the nucleus). Arrowheads show intranuclear inclusions. Scale bar, 10 μ m. n=3 per group. (D) Negative controls for immunohistochemistry with no primary antibodies: upper, corresponding to Fig. 4-6A (n=3 per group); middle, corresponding to Fig. 4-6B [n=3 (Con), 6 (HD)]; bottom, corresponding to Fig. 4-6C (n=3 per group).

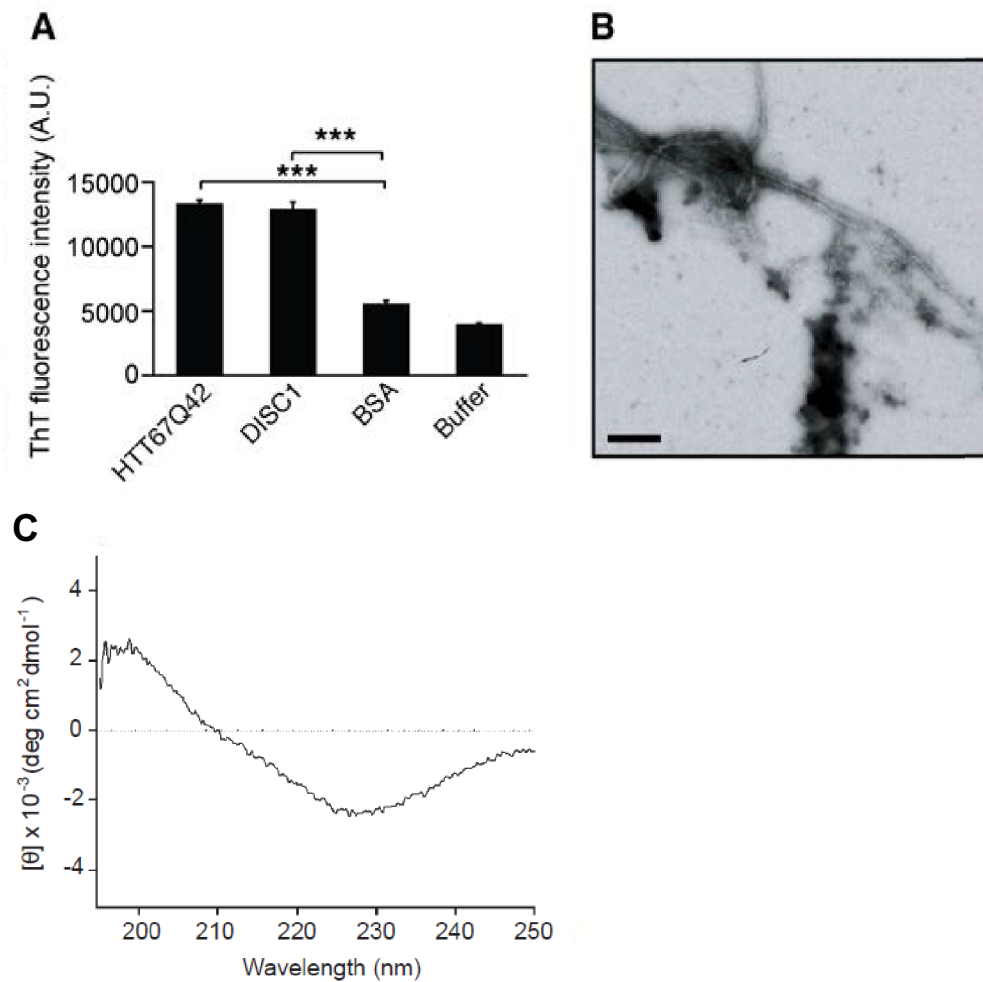


Fig. 4-7. Aggregation of intrinsically aggregation-prone DISC1 is accelerated by cross-seeding with polyQ-expanded mutant HTT. (A) Thioflavin T (ThT) fluorescent intensities of spontaneous DISC1 and HTT67Q42 aggregates were significantly higher than those of BSA aggregates. Data represent mean + SEM (4 independent sample sets). *** $P < 0.001$; 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc corrections. (B) Fibrillar morphology of typical DISC1 aggregates shown by transmission electron microscopy. Scale bar: 100 nm. A representative image is shown from 3 independent samples. (C) A Far-UV CD spectrum of DISC1 aggregates showed a negative peak at 228 nm, indicating the presence of β -sheet-rich structures. Representative data is shown from 2 independent samples.

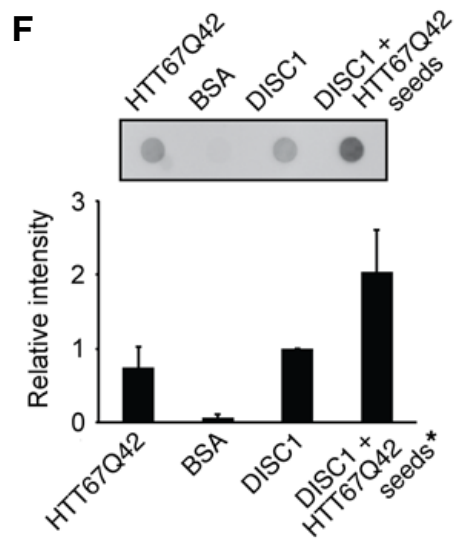
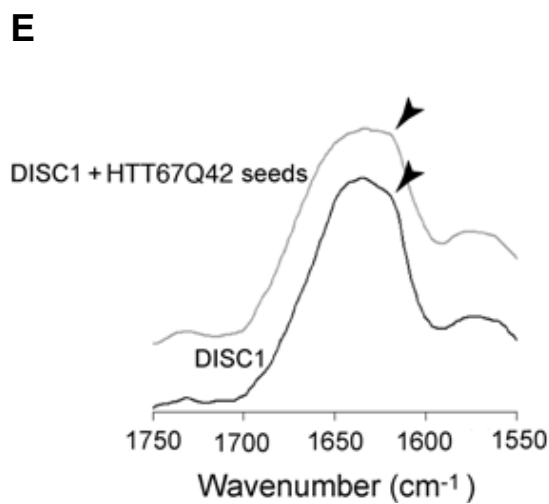
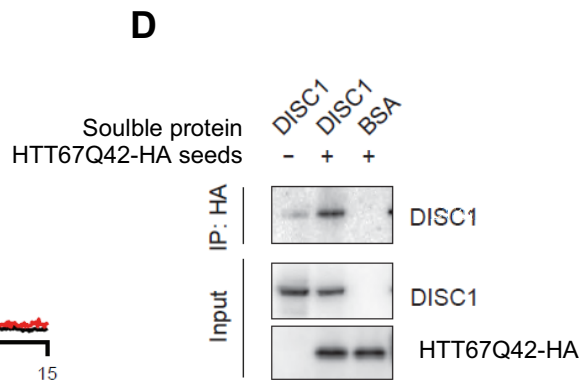
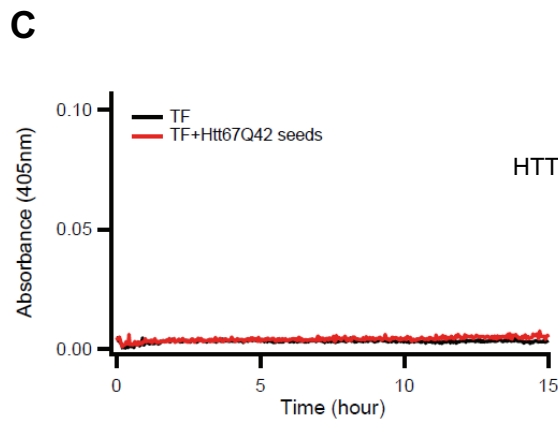
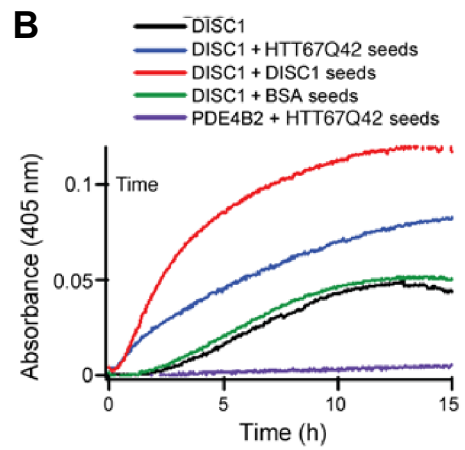
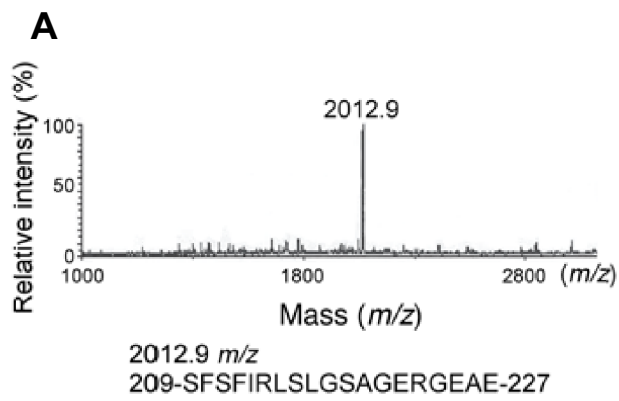
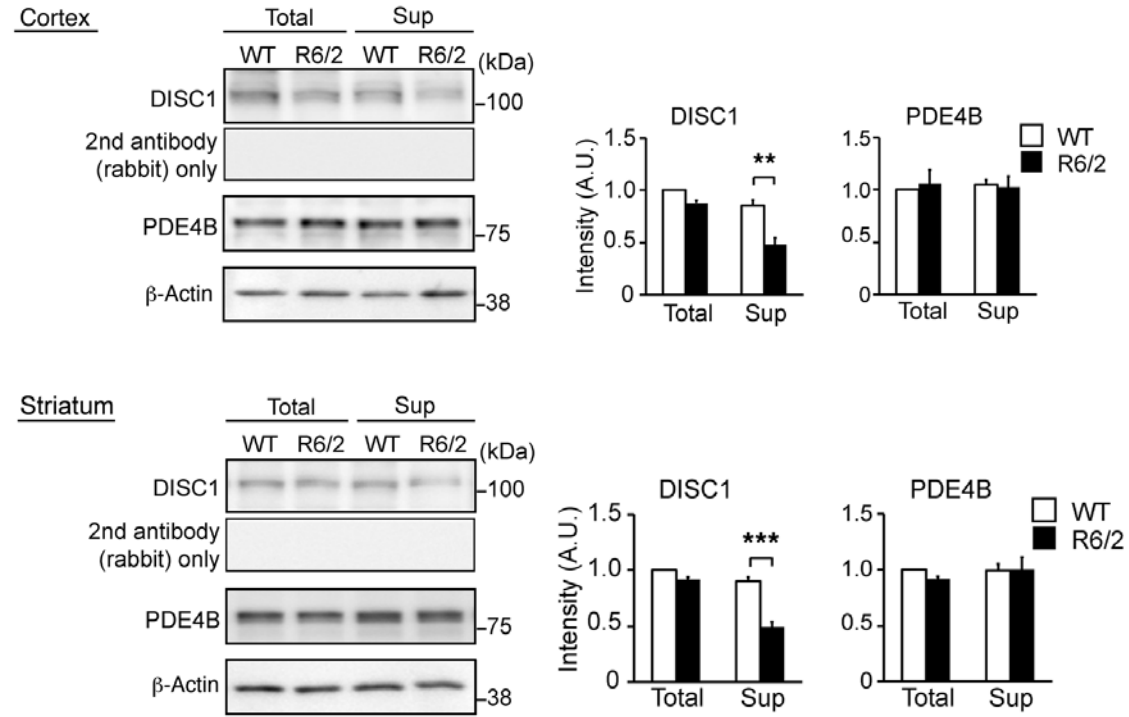
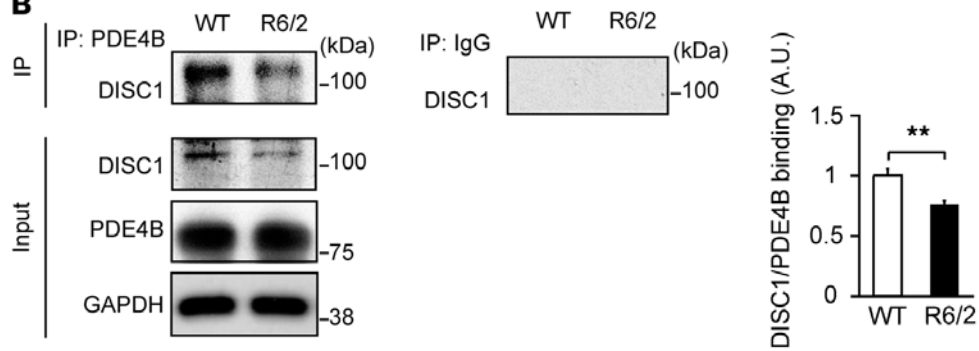


Fig. 4-8. Characterization of in vitro DISC1 aggregates. (A) MALDI-TOF mass spectrum of DISC1 aggregates digested by proteinase K identified a major mass peak at 2,012.9 m/z corresponding to residues 209-227 in DISC1 as the core of DISC1 aggregates. Representative data are shown from 3 independent samples. (B) Aggregation of DISC1, which was monitored by the absorbance (turbidity) at 405 nm, was significantly accelerated by the HTT67Q42 aggregate seeds but not by BSA aggregates. No aggregation of PDE4B2 was observed in the presence of HTT67Q42 aggregate seeds. Representative data are shown from 3 independent sample sets. (C) Aggregation of trigger factor (TF) in the absence or presence of Htt67Q42 aggregate seeds was monitored by the absorbance (turbidity) at 405 nm. No acceleration of TF aggregation was observed. Representative data is shown from 2 independent sample sets. (D) Co-aggregation of HTT67Q42 seeds and DISC1 monomer. DISC1 or BSA monomer was incubated in the presence or absence of HTTQ42-HA seeds (10% mol/mol). The resulting aggregates were immunoprecipitated with anti-HA beads and immunoblotted by an anti-DISC1 h316C polyclonal antibody. Representative immunoblots are shown from 3 independent sample sets. (E) FT-IR spectra revealed that the DISC1 aggregates formed in the presence of HTT67Q42 aggregate seeds (gray) contained more intermolecular β -sheet structures (arrowheads) than did spontaneously formed DISC1 aggregates (black). Representative data are shown from 4 independent sample sets. (F) The DISC1 aggregates formed in the presence of HTT67Q42 aggregate seeds showed higher resistance to 2% SDS than spontaneously formed DISC1 aggregates in the filter trap assay with Sypro Ruby staining. The asterisk indicates that 10% of the signal intensity of HTT67Q42 amyloid is subtracted from that of DISC1-HTTQ42 coaggregates for correction of the signal intensity. Data represent mean + SEM (4 independent sample sets). One-way ANOVA was used for statistical analysis.

A



B



C

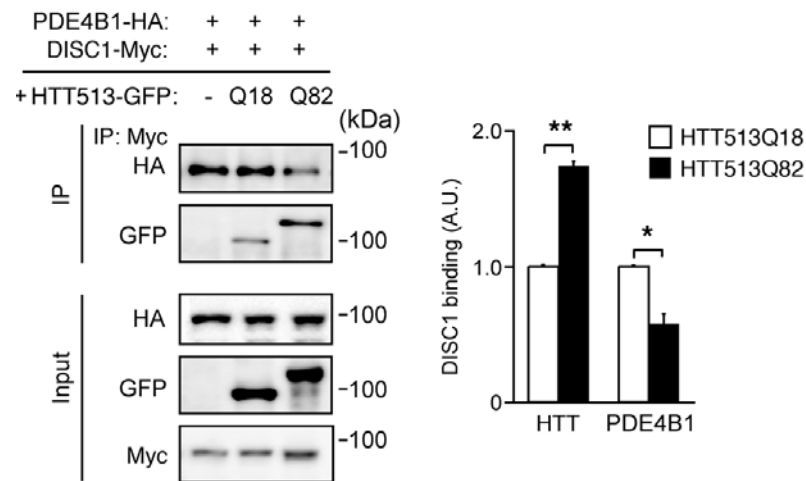
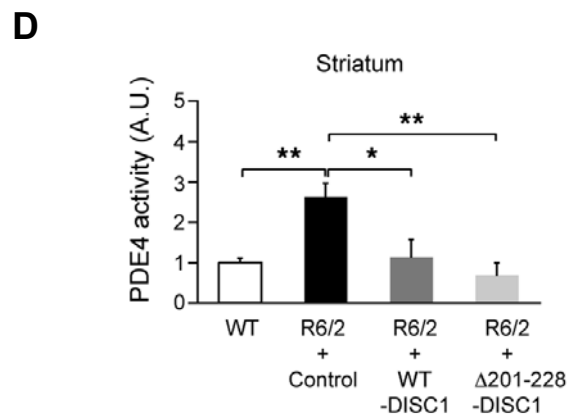
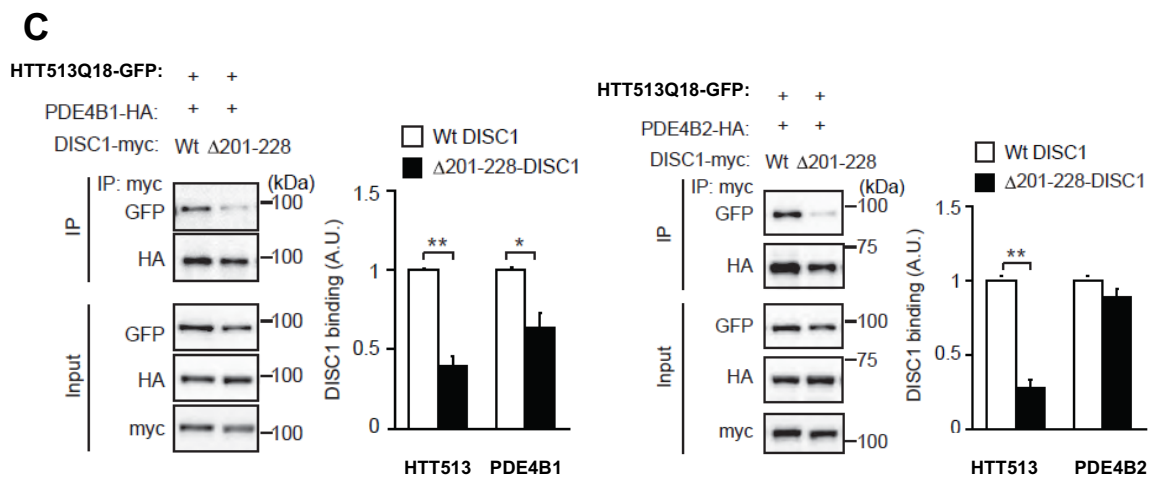
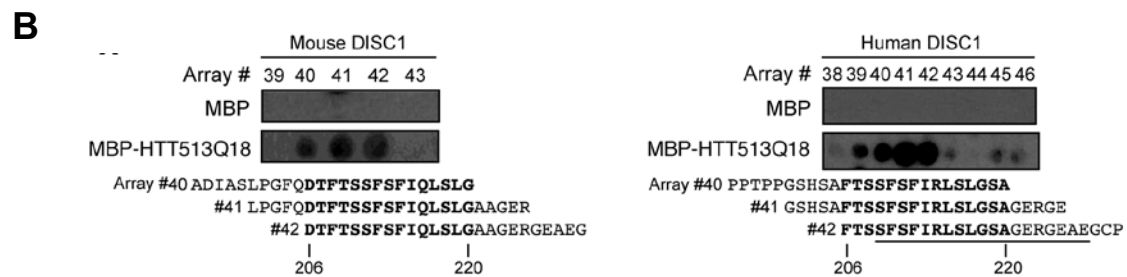
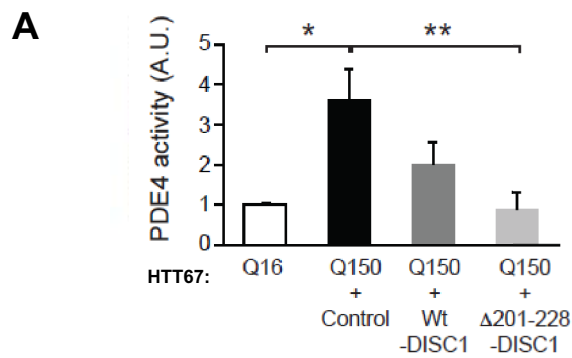


Fig. 4-9. The amount of DISC1-PDE4 complex was reduced by decreased soluble DISC1 levels in R6/2 mice. (A) Soluble DISC1 but not soluble PDE4B levels in supernatant fractions (Sup) were reduced in cerebral cortex (top) and striatum (bottom) from 12-week-old R6/2 mice, compared with those from WT mice. Total DISC1 and PDE4B levels in total homogenates (Total) were not changed between WT and R6/2 mice. β -Actin is a loading control. An m317C anti-DISC1 antibody was used to detect DISC1, and a negative control with rabbit secondary antibody alone is also shown. Data represent mean + SEM. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; unpaired 2-tailed t test. $n = 3$ per group. (B) The amount of DISC1-PDE4B complex in 12-week-old R6/2 mouse brains was decreased compared with that in WT brains. Immunoprecipitation was performed by an anti-pan-PDE4B antibody, followed by immunoblotting with anti-DISC1 antibody (D27). GAPDH is a loading control and used for normalization of the IP data. Data represent mean + SEM. $**P < 0.01$; unpaired 2-tailed t test. $n = 5$ per group. (C) Exogenous addition of HTT513Q82, but not HTT513Q18, significantly reduced DISC1-PDE4B interactions in HEK293T cells. Lysates of the cells overexpressing GFP alone (-), HTT513Q18-GFP (Q18), or HTT513Q82-GFP (Q82) were added to lysates of the cells overexpressing DISC1-Myc and PDE4B1-HA. Mixtures were processed for immunoprecipitation with an anti-c-Myc antibody, followed by immunoblotting. Data represent mean + SEM (3 independent sample sets). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; unpaired 2-tailed t test.



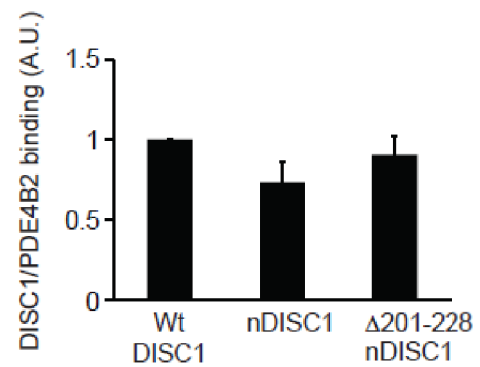
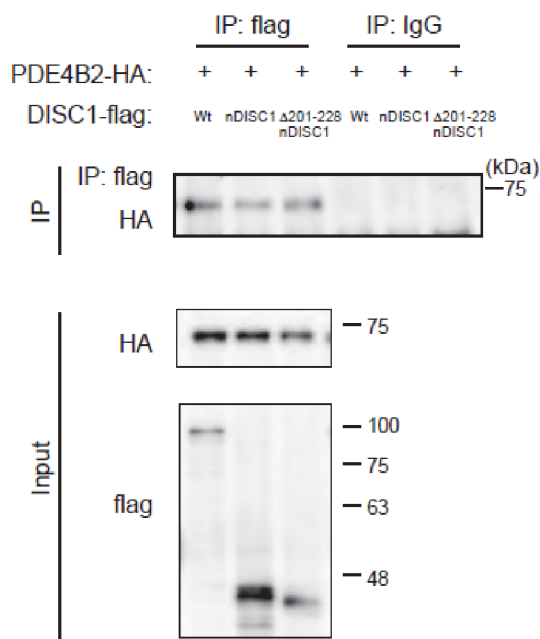
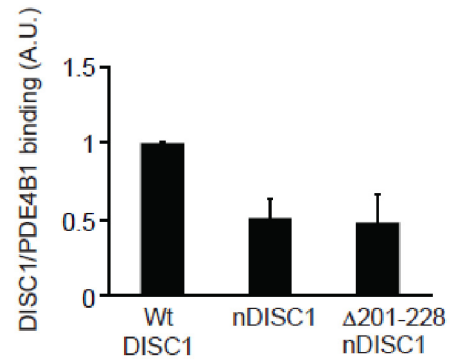
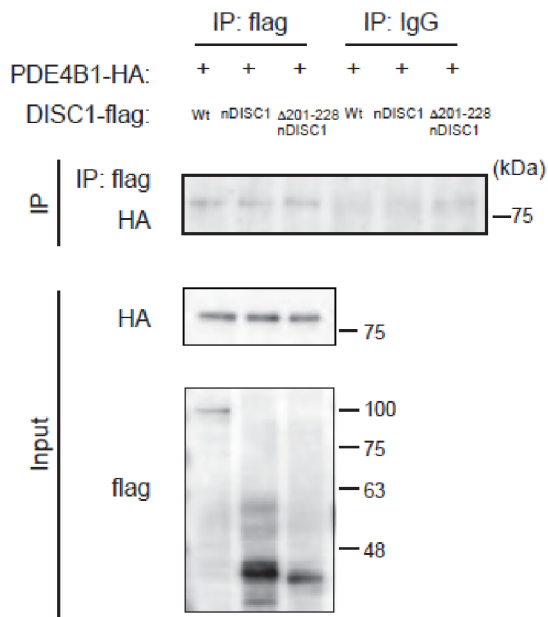
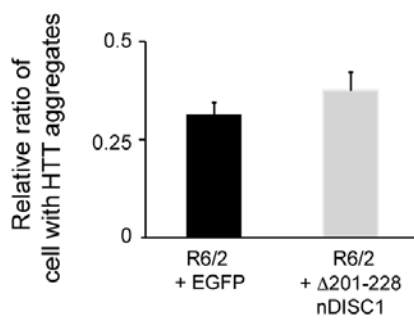
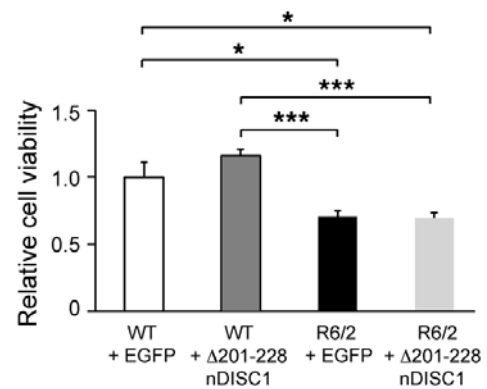
E**F****G**

Fig. 4-10. Aberrantly enhanced PDE4 activity was normalized by exogenous DISC1 expression, and deletion mutant DISC1 lacking residues 201-228 showed significantly reduced binding with HTT513Q18 but maintained interactions with PDE4B. (A) Aberrant augmentation of PDE4 activity in neuro2a cells at 5 days after the induction of HTT67Q150-EGFP was ameliorated with a transient co-expression of wild-type (Wt) or deletion mutant DISC1 lacking the binding site for HTT (Δ 201-228-DISC1). Data represent mean + SEM (5 independent sample sets). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc corrections. (B) The 25-mer peptides #40-#42 (residues 194-228 for mouse DISC1 [left], residues 196-230 for human DISC1 [right]) in DISC1 showed binding to maltose-binding protein (MBP)-HTT513Q18 (bottom) but not MBP alone (top) on peptide array. A black line corresponds to the core region of aggregates, which was identified by limited proteolysis and mass spectrometry (see Fig. 4-8A). Representative data are shown from 3 and 2 independent samples for mouse and human DISC1, respectively. (C) Deletion mutant DISC1 lacking residues 201-228 showed a decrease in binding with HTT513Q18, but still maintained interactions with PDE4B isoforms, PDE4B1 (left) and PDE4B2 (right), in HEK293T cells. Data represent mean + SEM (3 independent sample sets). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Unpaired two tailed t-test. (D) Aberrant augmentation of PDE4 activity in striatum of R6/2 mice was normalized with WT or Δ 201-228-DISC1. Data represent mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc corrections. $n = 6, 3, 3,$ and 3 for WT, R6/2 + Control, R6/2 + WT-DISC1, and R6/2 + Δ 201-228-DISC1 mice, respectively. (E) N-terminal domain (amino acid residues 1-316) of mouse DISC1 lacking the binding region for HTT (Δ 201-228-nDISC1) maintained interactions with PDE4B. Co-immunoprecipitation experiments showed that Δ 201-228-nDISC1 maintained interactions with PDE4B isoforms, PDE4B1 (upper) and PDE4B2 (lower), in HEK293T cells. Data represent mean + SEM (3 independent sample sets). Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA. (F) The number of cells with EM48-positive HTT aggregates was not affected by expression of Δ 201-228-nDISC1 in striatum of mice at 12 weeks. Data represent mean + SEM. Unpaired 2-tailed t test was used for statistical analysis. $n = 3$ per group. (G) The number of NeuN-positive neurons was not affected by expression of Δ 201-228-nDISC1 in striatum of mice at 12 weeks. Data represent mean + SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc corrections. $n = 4, 4, 6,$ and 5 for WT + EGFP, WT + Δ 201-228-nDISC1, R6/2 + EGFP, and R6/2 + Δ 201-228-nDISC1 mice, respectively.

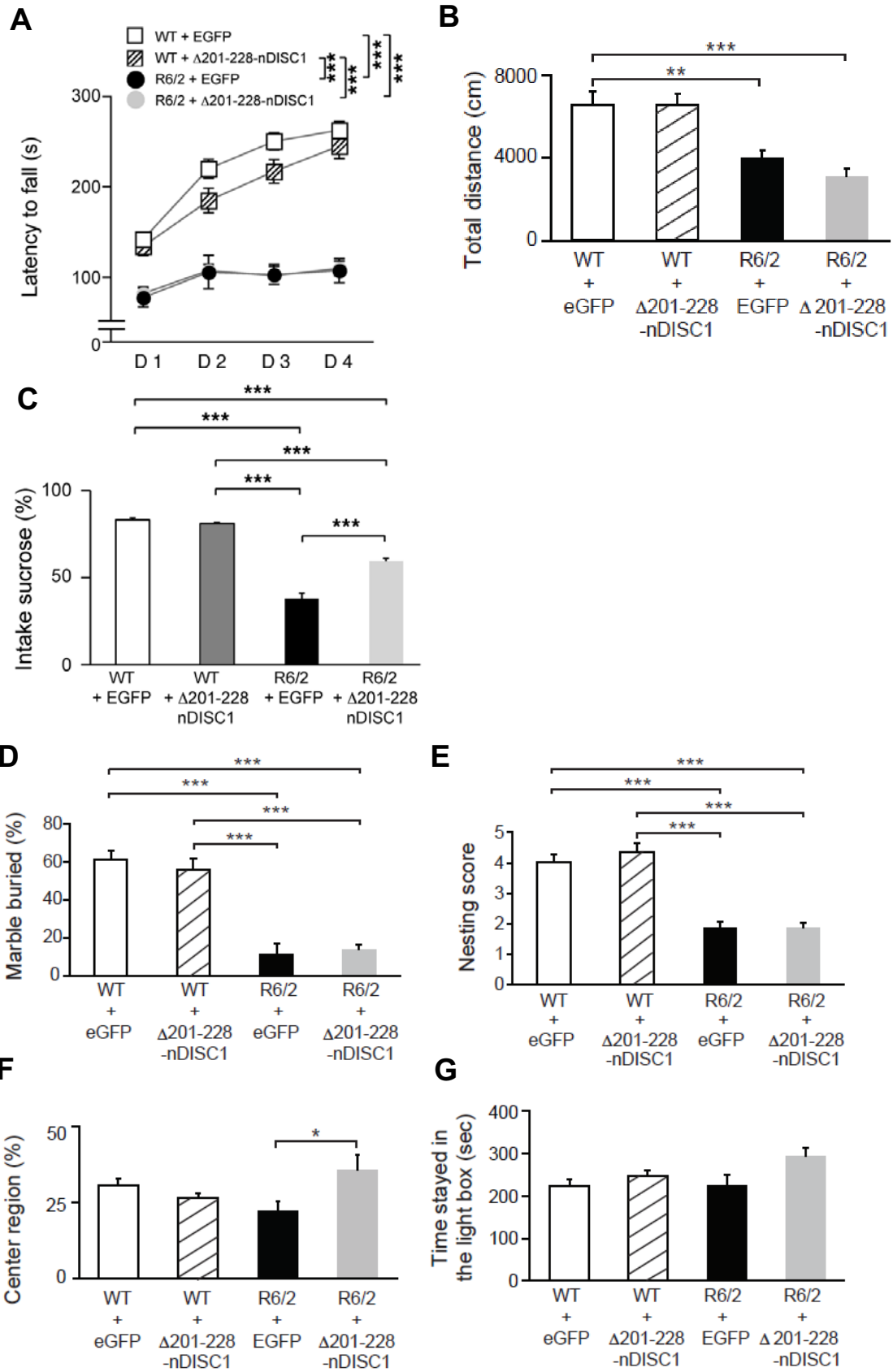


Fig. 4-11. Aberrantly enhanced PDE4 activity and reduced sucrose preference in R6/2 mice are recovered by exogenous DISC1 expression. (A) The impairment of motor function of R6/2 mice was not rescued by expression of $\Delta 201-228$ -nDISC1. The latency to fall off the rotarod was examined in mice at 9 weeks. Data represent mean \pm SEM. *** $P < 0.001$; 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc corrections. $n = 17, 16, 8,$ and 8 for WT + EGFP, WT + $\Delta 201-228$ -nDISC1, R6/2 + EGFP, and R6/2 + $\Delta 201-228$ nDISC1 mice, respectively. (B) The locomotor activity of R6/2 mice was not affected by expression of $\Delta 201-228$ -nDISC1. Total distance moved in the open field test was measured in mice at 8 weeks. $n=15, 15, 18, 17$ for WT+EGFP, WT+ $\Delta 201-228$ -nDISC1, R6/2+EGFP, R6/2+ $\Delta 201-228$ -nDISC1 mice, respectively. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (C) Reduced sucrose preference in R6/2 mice was rescued by expression of $\Delta 201-228$ -nDISC1. The sucrose intake was measured in mice at 9 weeks. Data represent mean + SEM. *** $P < 0.001$; 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc corrections. $n = 17, 16, 17,$ and 20 mice for WT + EGFP, WT + $\Delta 201-228$ -nDISC1, R6/2 + EGFP, and R6/2 + $\Delta 201-228$ -nDISC1 mice, respectively. (D) Marble burying defects in R6/2 mice were not rescued by $\Delta 201-228$ -nDISC1 expression. The marble burying test was performed in mice at 8 weeks. $n=15, 16, 16, 22$ for WT+EGFP, WT+ $\Delta 201-228$ -nDISC1, R6/2+EGFP, R6/2+ $\Delta 201-228$ -nDISC1 mice, respectively. *** $P < 0.001$. (E) Deficits of nest building behaviors in R6/2 mice were not rescued by $\Delta 201-228$ -nDISC1 expression. The nesting behavior was examined in mice at 8 weeks. $n=19, 17, 18, 18$ for WT+EGFP, WT+ $\Delta 201-228$ -nDISC1, R6/2+EGFP, R6/2+ $\Delta 201-228$ -nDISC1 mice, respectively. *** $P < 0.001$. (F) The anxiety levels in R6/2 mice were reduced by expression of $\Delta 201-228$ -nDISC1. The time spent in a center region in the open field test was measured in mice at 8 weeks. $n=15, 15, 18, 17$ for WT+EGFP, WT+ $\Delta 201-228$ -nDISC1, R6/2+EGFP, R6/2+ $\Delta 201-228$ -nDISC1 mice, respectively. * $P < 0.05$. (G) The anxiety levels in R6/2 mice were examined by the dark/light transition test. The time spent in the light box was measured in mice at 8 weeks. $n=18, 24, 19, 25$ for WT+EGFP, WT+ $\Delta 201-228$ -nDISC1, R6/2+EGFP, R6/2+ $\Delta 201-228$ -nDISC1 mice, respectively. Data represent mean + SEM. P-values were determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc corrections.

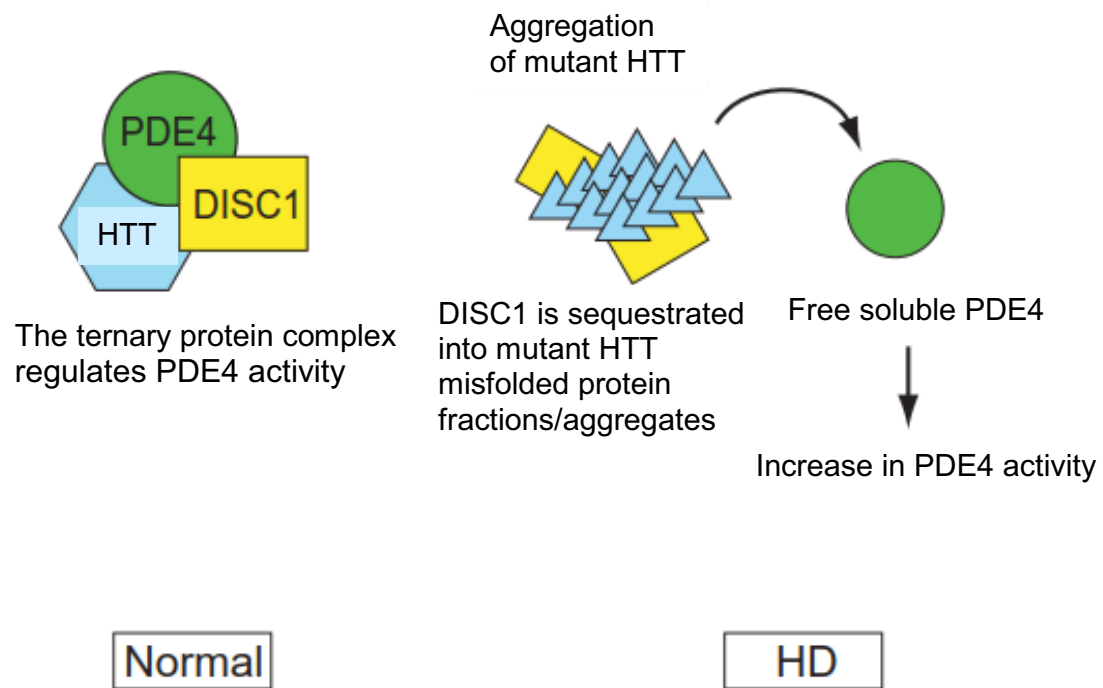


Fig. 4-13. Model for the ternary protein complex consisting of HTT, DISC1 and PDE4. The ternary protein complex of HTT, DISC1 and PDE4 is impaired by co-aggregation of DISC1 into polyQ-expanded mutant HTT misfolded protein fractions/aggregates, releasing functional PDE4, which increases PDE4 activity and possibly affects non-motor functions.

第五章 総括

神経細胞におけるタンパク質の凝集および蓄積は、様々な神経変性疾患を引き起こす。凝集の原因は酵素切断部位の変異や疎性アミノ酸の連続した配列の異常伸長など疾患遺伝子により異なるが、形成される凝集体は不溶性で、蓄積する過程で他のタンパク質の生理活性を阻害する (Davies *et al.*, 1997; DiFiglia *et al.*, 1997; Ordway, *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2002)。本研究では、致命的な進行性の神経変性疾患であるハンチントン病 (HD) において形成される不溶性の凝集体に関して、異なる観点から疾患治療に大きな貢献をもたらす分子機構の解明および治療効果の病理学的評価を行った。第二章では、HD の神経症状発症後の病因遺伝子の発現調節による治療効果を検討した。HD ではモデルマウスおよびヒトにおいて脳線条体における萎縮が顕著に認められるため (Vonsattel and DiFiglia, 1998; Thomas, 2006)、すでに神経症状を発症しているモデルマウスの線条体に局所的に外因性 shRNA を導入し、発現を誘導した。shRNA 発現部位では病因遺伝子由来のタンパク質形成が阻害され、新たな凝集体の形成が阻害されただけでなく既存の凝集体の減少が見られた。また、HD モデルマウスにおいて抑制されるいくつかの遺伝子の発現についても、shRNA 導入により発現量の改善が見られた。神経疾患は遺伝子診断をしていない場合や孤発性の神経疾患の場合、発症前からの治療は不可能であることから、発症後における遺伝子治療の検討を行った本研究は非常に有意義である。この成果より、発症後における RNAi 導入が治療戦略の一つとして有効である可能性を示唆した。第三章では、HD の病理的症狀における部位特異性に注目し、凝集体の構造の違いによる毒性の違いを明らかにした。酵母や哺乳類のプリオンでは、タンパク質の構造の多型が異なる表現型を表すことが知られており、特に酵母プリオンは温度環境の変化によって凝集体形成の構造の違いを誘導することができ、さらにこの構造の違いが凝集体の性質の違いおよび細胞毒性の違いを引き起こすことが証

明されている (Tanaka *et al.*, 2006)。プリオン病同様 HD の疾患症状は多岐にわたり、この異なる表現型を示すメカニズムの解明が必須であった。本研究は脳の部位によって異なる HD の病理症状について、変異 HTT 発現による関連遺伝子の相互作用の変化や発現量の違いだけではなく、変異 HTT そのものの立体構造が異なることを証明した (Fig. 3-11)。また、凝集した変異 HTT はシードとなって、その後形成される可溶性変異 HTT タンパク質の凝集を促進させることを示した。また、新たに形成される可溶性変異 HTT タンパク質が、シード存在下ではシードの立体構造を鋳型として同様の立体構造をとることから、変異 HTT がプリオン様の性質を持つことが示唆された (Fig. 3-11)。この性質を利用し、変異 HTT 凝集を毒性の低い立体構造に誘導することで細胞毒性を低下させることが可能になることを期待する。既出の研究では凝集体の形成を抑制、阻害する化学物質等の検討がなされてきたが、毒性の低い立体構造を持つ凝集体の形成を誘導する手法も選択肢の一つに加えることができることを示した。第四章では HD の疾患症状の一つである精神症状の発症機構について、変異 HTT 凝集体の関与を含めた分子メカニズムを明らかにした。HTT と相互作用する DISC1 は統合失調症の関連因子の一つであり (Brandon and Sawa, 2011; Johnstone *et al.*, 2011; Narayan *et al.*, 2013), DISC1 は精神症状発症に関与する PDE4 と相互作用することが知られている (Millar *et al.*, 2005; Murdoch *et al.*, 2007; Carlyle *et al.*, 2011)。変異 HTT 凝集体が同じく凝集性を持つ DISC1 とより強く結合することにより、DISC1 と結合していた PDE4 が HTT-DISC1-PDE4 複合体から解離されることを明らかにし、この遊離 PDE4 が精神症状を引き起こしていることを示唆した。さらに、外因性 DISC1 の発現導入により PDE4 の遊離を阻害することによって、精神症状を緩和することに成功した。

これらの知見は、変異 HTT の凝集体形成が、HD の疾患症状発症に多様なメカニズムを介して関与していることを明らかにした。また、それぞれの作用機序に適応した治療戦略が、疾患症状の緩和もしくは改善させる可能性を示唆した。

謝辞

本研究を終えるにあたり，論文作成に終始懇切なる御指導を戴きました信州大学農学部動物発生遺伝学研究室 小野珠乙教授に深く感謝申し上げます。

本論文の副査としてご指導いただきました，信州大学農学部 平松浩二教授，鏡味裕教授，米倉真一准教授，静岡大学農学部 笹浪 知宏准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり，長い間幅広い研究分野での実験について基礎からご指導いただきました理化学研究所脳科学総合研究センタータンパク質構造疾患研究チームリーダー 田中元雅博士に謹んで謝意を捧げます。

本研究を遂行するにあたり，ご指導いただきました理化学研究所脳科学総合研究センター構造疾患研究チームリーダー（現同志社大学病態脳科学分野認知記憶加齢部門教授）貫名信行博士，自治医科大学血液学講座教授（現東京大学医科学研究所附属病院長）小澤敬也博士，自治医科大学血液学講座講師（現日本医科大学大学院医学研究科教授）岡田尚巳博士，**Johns Hopkins** 大学 澤明教授，石塚公子博士に厚く御礼申し上げます。

論文作成においてご理解ご助言いただきました帝京大学医学部解剖学講座 萩原治夫教授に感謝申し上げます。

実験についてご指導ご協力いただき，支えてくださった理化学研究所 タンパク質構造疾患研究チームの皆様，理化学研究所構造神経病理研究チームの皆様，自治医科大学血液学講座の皆様，論文作成においてご理解ご助言いただきました帝京大学医学部解剖学講座の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に，常に励まし勇気づけてくれた夫と子供たち，そして基礎となる学生時代を支えてくれた父母に感謝の意を表します。

引用文献

- An M.C., Zhang N., Scott G., Montoro D., Wittkop T., Mooney S., Melov S. and Ellerby L.M. (2012). Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11(2):253-263.
- Arnsten A.F., Wang M.J. and Paspalas C.D. (2012). Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* 76(1):223-239.
- Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S., Segal M.R. and Finkbeiner S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431(7010):805-810.
- Atkin T. and Kittler J. (2012). DISC1 and the aggresome: a disruption to cellular function? *Autophagy* 8(5):851-852.
- Balch W.E., Morimoto R.I., Dillin A. and Kelly J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319(5865):916-919.
- Bates G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 361(9369):1642-1644.
- Bence N.F., Sampat R.M. and Kopito R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292(5521):1552-1555.
- Bolger G.B., Baillie G.S., Li X., Lynch M.J., Herzyk P., Mohamed A., Mitchell L.H., McCahill A., Hundsrucker C., Klussmann E., Adams D.R. and Houslay M. D. (2006). Scanning peptide array analyses identify overlapping binding sites for the signalling scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1, in cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Biochem. J.* 398(1):23-36.
- Boxall R., Porteous D.J. and Thomson P.A. (2011). DISC1 and Huntington's disease – overlapping pathways of vulnerability to neurological disorder? *PLoS One* 6(1): e16263.
- Brandon N.J. and Sawa A. (2011). Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1. *Nat. Rev. Neurosci.* 12(12):707-722.
- Brandon N.J., Handford E.J., Schurov I., Rain J.C., Pelling M., Duran-Jimeniz B., Camargo L.M., Oliver K.R., Beher D., Shearman M.S. and Whiting P.J. (2004). Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Mol. Cell Neurosci.* 25(1):42-55.
- Burgin A.B., Magnusson O.T., Singh J., Witte P., Staker B.L., Bjornsson J.M., Thorsteinsdottir M., Hrafnisdottir S., Hagen T., Kiselyov A.S., Stewart L.J. and

- Gurney M.E. (2010). Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nat Biotechnol.* 28(1):63-70.
- Burger C., Gorbatyuk O.S., Velardo M.J., Peden C.S., Williams P., Zolotukhin S., Reier P.J., Mandel R.J. and Muzyczka N. (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.* 10(2):302-317.
- Campbell R.E, Tour O, Palmer A.E, Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A. and Tsien R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(12):7877-7882.
- Carlyle B.C., Mackie S., Christie S., Millar J.K. and Porteous D.J. (2011). Coordinated action of DISC1, PDE4B and GSK3 β in modulation of cAMP signalling. *Mol. Psychiatry* 16(7):693-694.
- Chen M., Ona V.O., Li M., Ferrante R.J., Fink K.B., Zhu S., Bian J., Guo L., Farrell L.A., Hersch S.M., Hobbs W., Vonsattel J.P., Cha J.H. and Friedlander R.M. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6(7):797-801.
- Chen S., Bertheliev V., Hamilton J.B., O'Nuallain B. and Wetzel R. (2002). Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* 41(23):7391-7399.
- Chien P., Weissman J.S. and DePace A.H. (2004). Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu. Rev. Biochem.* 73:617-656.
- Chimon S., Shaibat M.A., Jones C.R., Calero D.C., Aizezi B. and Ishii Y. (2007). Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's beta-amyloid. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(12):1157-1164.
- Cheung Y.F., Kan Z., Garrett-Engele P., Gall I., Murdoch H., Baillie G.S., Camargo L.M., Johnson J.M., Houslay M.D. and Castle J.C. (2007). PDE4B5, a novel, super-short, brain-specific cAMP phosphodiesterase-4 variant whose isoform-specifying N-terminal region is identical to that of cAMP phosphodiesterase-4D6 (PDE4D6). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322(2):600-609.
- Conti M. and Beavo J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 76:481-511.
- Cramer H., Warter J.M. and Renaud B. (1984). Analysis of neurotransmitter metabolites and adenosine 3',5'-monophosphate in the CSF of patients with extrapyramidal motor disorders. *Adv. Neurol.* 40:431-435.

- Craufurd D. and Snowden J. (2002). Neuropsychological and neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. In: Bates G., Harper P., Jones L. Huntington's Disease. 3rd ed. pp.62-94. Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
- Crook Z.R. and Housman D. (2011). Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? *Neuron* 69(3):423-435.
- Cummings C.J., Mancini M.A., Antalffy B., DeFranco D.B., Orr H.T. and Zoghbi H.Y. (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1, *Nat. Genet.* 19(2):148-154.
- Davies S.W., Turmaine M., Cozens B.A., DiFiglia M., Sharp A.H., Ross C.A., Scherzinger E., Wanker E.E., Mangiarini L. and Bates G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90(3):537-548.
- DeMarch Z., Giampà C., Patassini S., Bernardi G. and Fusco F.R. (2008). Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 30 (3):375-387.
- DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P. and Aronin N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277(5334):1990-1993.
- Di Prospero N.A. and Fischbeck K.H. (2005). Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nat. Rev. Genet.* 6(10):756-765.
- Dobson C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426 (6968):884-890.
- Doi H., Mitsui K., Kurosawa M., Machida Y., Kuroiwa Y. and Nukina N. (2004). Identification of ubiquitin-interacting proteins in purified polyglutamine aggregates. *FEBS Lett.* 571(1-3):171-176.
- Dompierre J.P., Godin J.D., Charrin B.C., Cordelières F.P., King S.J., Humbert S. and Saudou F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J. Neurosci.* 27(13):3571-83.
- Duman R.S. (2002). Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol Psychiatry.* 7(suppl 1): S29-S34.
- Dunah A. W., Jeong H., Griffin A., Kim Y. M., Standaert D. G., Hersch S.M., Mouradian M. M., Young A.B., Tanese N. and Krainc D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296(5576):2238-2243.
- Eisenberg D., Nelson R., Sawaya M.R., Balbirnie M., Sambashivan S., Ivanova M.I., Madsen A.Ø. and Riek C. (2006). The structural biology of protein aggregation

- diseases: Fundamental questions and some answers. *Acc. Chem. Res.* 39(9):568-575.
- Eisenberg D. and Jucker M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148(6):1188-1203.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411(6836):494-498.
- Fatemi S. H., King D. P., Reutiman T. J., Folsom T. D., Laurence J. A., Lee S., Fan Y. T., Paciga S. A., Conti M. and Menniti F. S. (2008). PDE4B polymorphisms and decreased PDE4B expression are associated with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 101(1-3):36-49.
- Ferrante R. J., Kubitus J. K., Lee J., Ryu H., Beesen A., Zucker B., Smith K., Kowall N. W., Ratan R. R., Luthi-Carter R. and Hersch S. M. (2003). Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J. Neurosci.* 23(28):9418-9427.
- Ferrante R. J., Andreassen O. A., Jenkins B. G., Dedeoglu A., Kuemmerle S., Kubitus J. K., Kaddurah-Daouk R., Hersch S. M. and Beal M. F. (2000). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 20(12):4389-4397.
- Giadalevitz T., Ben-Zvi A., Ho K.H., Brignull H.R. and Morimoto R.I. (2006). Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* 311:1471-1474.
- Giampa C., Middei S., Patassini S., Borreca A., Marullo F., Laurenti D., Bernardi G., Ammassari-Teule M. and Fusco F.R. (2009). Phosphodiesterase type IV inhibition prevents sequestration of CREB binding protein, protects striatal parvalbumin inter-neurons and rescues motor deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 29(5):902-910.
- Gines S., Seong I.S., Fossale E., Ivanova E., Trettel F., Gusella J.F., Wheeler V.C., Persichetti F. and MacDonald M.E. (2003). Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12(5):497-508.
- Gusella J.F. and MacDonald M.E. (2000). Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 1(2):109-115.
- Haass C. and Selkoe D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(2):101-112.
- Harper J.D. and Lansbury P.T. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's

disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66:385-407.

- Hamburg H., Trossbach S.V., Bader V., Chwiesko C., Kipar A., Sauvage M., Crum W.R., Vernon A.C., Bidmon H.J. and Korth C. (2016). Simultaneous effects on parv-albumin-positive interneuron and dopaminergic system development in a transgenic rat model for sporadic schizophrenia. *Sci Rep.* 6:34946.
- Harper S.Q., Staber P.D., He X., Eliason S.L., Martins I.H., Mao Q., Yang L., Kotin R.M., Paulson H.L. and Davidson B.L. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(16):5820-5825.
- Harrison P.J. and Weinberger D.R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* 10(1):40-68
- Hasuwa H., Kaseda K., Einarsdottir T. and Okabe M. (2002). Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett.* 532(1-2):227-230.
- Hayashi-Takagi A., Takaki M., Graziane N., Seshadri S., Murdoch H., Dunlop A.J., Makino Y., Seshadri A.J., Ishizuka K. and Srivastava D.P. (2010). Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat. Neurosci.* 13(3):327-332.
- Hickey M.A., Reynolds G.P. and Morton A.J. (2002). The role of dopamine in motor symptoms in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 81(1):46-59.
- Hockly E., Richon V.M., Woodman B., Smith D.L., Zhou X., Rosa E., Sathasivam K., Ghazi-Noori S., Mahal A., Lowden P.A., Steffan J.S., Marsh J.L., Thompson L.M., Lewis C.M., Marks P.A., Bates G.P. (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*100(4):2041-2046.
- Hodges A., Strand A.D., Aragaki A.K., Kuhn A., Sengstag T., Hughes G., Elliston L.A., Hartog C., Goldstein D.R., Thu D., Hollingsworth Z.R., Collin F., Synek B., Holmans P.A., Young A.B., Wexler N.S., Delorenzi M., Kooperberg C., Augood S.J., Faull R.L., Olson J.M., Jones L. and Luthi-Carter R. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* 15(6):965-977.
- Houslay M.D. and Adams D.R. (2003). PDE4 cAMP phosphodi-esterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J.* 370(pt 1):1-18.
- Houslay M.D., Schafer P. and Zhang K.Y. (2005). Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov. Today* 10(22):1503-1519.

- Houslay M.D. (2010). Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem. Sci.* 35(2):91-100.
- Huston E., Lumb S., Russell A., Catterall C., Ross A.H., Steele M.R., Bolger G.B., Perry M.J., Owens R.J. and Houslay M.D. (1997). Molecular cloning and transient expression in COS7 cells of a novel human PDE4B cAMP-specific phosphodiesterase, HSP-DE4B3. *Biochem. J.* 328(pt 2):549-558.
- Ishizuka K., Chen J., Taya S., Li W., Millar J.K., Xu Y., Clapcote S.J., Hookway C., Morita M., Kamiya A., Tomoda T., Lipska B.K., Roder J.C., Pletnikov M., Porteous D., Silva A.J., Cannon T.D., Kaibuchi K., Brandon N.J., Weinberger D.R. and Sawa A. (2007). Evidence that many of the DISC1 isoforms in C57BL/6J mice are also expressed in 129S6/SvEv mice. *Mol Psychiatry* 12(10):897-899.
- Ishizuka K., Kamiya A., Oh E.C., Kanki H., Seshadri S., Robinson J.F., Murdoch H., Dunlop A.J., Kubo K, Furukori K, Huang B., Zeledon M., Hayashi-Takagi A., Okano H., Nakajima K., Houslay M.D., Katsanis N. and Sawa A. (2011). DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature* 473(7345):92-96.
- Ismail A.A. and Mantsch H.H. (1992). Salt bridge induced changes in the secondary structure of ionic polypeptides. *Biopolymers* 32(9):1181-1186.
- Jana N.R., Tanaka M., Wang G. and Nukina N. (2000). Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 9(13):2009-2018.
- Johnstone M., Thomson P.A., Hall J., McIntosh A.M., Lawrie S.M. and Porteous D.J. (2011). DISC1 in schizophrenia: genetic mouse models and human genomic imaging. *Schizophr. Bull.* 37(1):14-20.
- Kandel E.R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol. Brain* 5:14.
- Klement I.A., Skinner P.J., Kaytor M.D., Yi H., Hersch S.M., Clark H.B., Zoghbi H.Y. and Orr H.T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 95(1):41-53.
- Kodali R. and Wetzel R. (2007). Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17(1):48-57.
- Kotliarova S., Jana N.R., Sakamoto N., Kurosawa M., Miyazaki H., Nekooki M., Doi H., Machida Y., Wong H.K., Suzuki T., Uchikawa C., Kotliarov Y., Uchida K., Nagao Y., Nagaoka U., Tamaoka A., Oyanagi K., Oyama F. and Nukina N. (2005). Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine-EGFP fluorescent aggregates. *J. Neurochem.* 93(3):641-653.

- Karpuj M.V., Becher M.W., Springer J.E., Chabas D., Youssef S., Pedotti R., Mitchell D. and Steinman L. (2002). Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat. Med.* 8(2):143-149.
- Krishnan R. and Lindquist S.L. (2005). Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature* 435(7043):765-772.
- Kvajo M., McKellar H., Drew L.J., Lepagnol-Bestel A.M., Xiao L., Levy R.J., Blazeski R., Arguello P.A., Lacefield C.O., Mason C.A., Simonneau M., O'Donnell J.M., MacDermott A.B., Karayiorgou M. and Gogos J.A. (2011). Altered axonal targeting and short-term plasticity in the hippocampus of Disc1 mutant mice. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 108(49): E1349-E1358.
- Labbadia J. and Morimoto R.I. (2013). Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem. Sci.* 38(8):378-385.
- Luthi-Carter R., Strand A., Peters N.L., Solano S.M., Hollingsworth Z.R., Menon A.S., Frey A.S., Spektor B.S., Penney E.B., Schilling G., Ross C.A., Borchelt D.R., Tapscott S.J., Young A.B., Cha J.H. and Olson J.M. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9(9):259-1271.
- Landles C. and Bates G.P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5(10):958-963.
- Lee W.C., Yoshihara M. and Littleton J.T. (2004). Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a Drosophila model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(9):3224-3229.
- Leliveld S.R., Bader V., Hendriks P., Prikulis I., Sajnani G., Requena J.R., Korth C. (2008). Insolubility of disrupted *-in-schizophrenia 1* disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease. *J. Neurosci.* 28(15):3839-3845.
- MacKenzie S.J. and Houslay M.D. (2000). Action of rolipram on specific PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms and on the phosphorylation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in U937 monocytic cells. *Biochem. J.* 347(pt 2):571-578.
- Malavasi E.L., Ogawa F., Porteous D.J. and Millar J.K. (2012). DISC1 variants 37W and 607F disrupt its nuclear targeting and regulatory role in ATF4-mediated transcription. *Hum. Mol. Genet.* 21(12):2779-2792.
- Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M., Cozens B., Harper A., Hetherington C., Lawton M., Trottier Y., Lehrach H., Davies S.W. and Bates G.P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive

neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87(3):493-506.

- Mao Y., Ge X., Frank C.L., Madison J.M., Koehler A.N., Doud M.K., Tassa C., Berry E.M., Soda T., Singh K.K., Biechele T., Petryshen T.L., Moon R.T., Haggarty S.J. and Tsai L.H. (2009). Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 β -catenin signaling. *Cell* 136(6):1017-1031.
- Mastakov M.Y., Baer K., Kotin R.M. and During M.J. (2002). Recombinant adeno-associated virus serotypes 2- and 5-mediated gene transfer in the mammalian brain: quantitative analysis of heparin co-infusion, *Mol. Ther.* 5(4):371-380.
- McCaffrey A.P. and Kay M.A. (2002). RNA interference Gene Therapy: A story of mice and men. *Gene Ther.* 9(23):1563.
- Menniti F.S., Faraci W.S. and Schmidt C.J. (2006). Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(8):660-670.
- Millar J.K., Pickard B.S., Mackie S., James R., Christie S., Buchanan S.R., Malloy M.P., Chubb J.E., Huston E., Baillie G.S., Thomson P.A., Hill E.V., Brandon N.J., Rain J.C., Camargo L.M., Whiting P.J., Houslay M.D., Blackwood D.H., Muir W.J. and Porteous D.J. (2005). DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* 310(5751):1187-1191.
- Mukhopadhyay S., Krishnan R., Lemke E.A., Lindquist S. and Deniz A.A. (2007). A natively unfolded yeast prion monomer adopts an ensemble of collapsed and rapidly fluctuating structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104(8):2649-2654.
- Murdoch H., Mackie S., Collins D.M., Hill E.V., Bolger G.B., Klussmann E., Porteous D.J., Millar J.K. and Houslay M.D. (2007). Isoform-selective susceptibility of DISC1/phosphodiesterase-4 complexes to dis-sociation by elevated intracellular cAMP levels. *J. Neurosci.* 27(35):9513-9524.
- Nagai Y., Inui T., Popiel H.A., Fujikake N., Hasegawa K., Urade Y., Goto Y., Naiki H. and Toda T. (2007). A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14(4):332-340.
- Nagaoka U., Kim K., Jana N.R., Doi H., Maruyama M., Mitsui K., Oyama F. and Nukina N. (2004). Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J. Neurochem.* 91(1):57-68.
- Narayan S., Nakajima K. and Sawa A. (2013). DISC1: a key lead in studying cortical development and associated brain disorders. *Neuroscientist* 19(5):451-464.
- Niwa M., Cash-Padgett T., Kubo K.I., Saito A., Ishii K., Sumitomo A., Taniguchi Y., Ishizuka K., Jaaro-Peled H., Tomoda T., Nakajima K., Sawa A. and Kamiya A. (2016). DISC1 a key molecular lead in psychiatry and neurodevelopment: No-

More Disrupted-in-Schizophrenia 1. *Mol. Psychiatry* 21(11):1488-1489.

- Nucifora L.G., Wu Y.C., Lee B.J., Sha L., Margolis R.L., Ross C.A., Sawa A. and Nucifora F.C.Jr. (2016). A mutation in NPAS3 that seg-regates with schizophrenia in a small family leads to protein aggregation. *Mol. Neuropsychiatry* 2(3):133-144.
- Nollet M., Le Guisquet A.M. and Belzung C. (2013). Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. *Curr. Protoc. Pharmacol.* Chapter 5: Unit 5.65. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- O'Donnell J.M. and Zhang H.T. (2004). Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol. Sci.* 25(3):158-163.
- Ohhashi Y., Ito K., Toyama B.H., Weissman J.S. and Tanaka M. (2010). Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nat. Chem. Biol.* 6(3):225-230.
- Okada T., Shimazaki K., Nomoto T., Matsushita T., Mizukami H., Urabe M., Hanazono Y., Kume A., Tobita K., Ozawa K. and Kawai N. (2002). Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Methods Enzymol.* 346:378-393.
- Okada T., Nomoto T., Yoshioka T., Nonaka-Sarukawa M., Ito T., Ogura T., Iwata-Okada M., Uchibori R., Shimazaki K., Mizukami H., Kume A. and Ozawa K. (2005). Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum. Gene Ther.* 16(10):1212-1218.
- Ordway J.M., Tallaksen-Greene S., Gutekunst C.A., Bernstein E.M., Cearley J.A., Wiener H.W., Dure L.S. 4th., Lindsey R., Hersch S.M., Jope R.S., Albin R.L. and Detloff P.J. (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91(6):753-763.
- Orr H.T. and Zoghbi H.Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 30:575-621.
- Ottis P., Bader V., Trossbach S.V., Kretzschmar H., Michel M., Leliveld S.R. and Korth C. (2011). Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: recruitment of dysbindin to cell-invasive disrupted-in-schizophrenia 1 aggregates. *Biol. Psychiatry* 70(7):604-610.
- Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke W.J., Strittmatter J.R. and Greenamyre J.T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 5(8):731-736.
- Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M. and Finch J.T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U S A. 91(12):5355-5358.

- Peters-Libeu C., Newhouse Y., Krishnan P., Cheung K., Brooks E., Weisgraber K. and Finkbeiner S. (2005). Crystallization and diffraction properties of the Fab fragment of 3B5H10, an antibody specific for disease-causing polyglutamine stretches. *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61(Pt 12):1065-1068.
- Petkova A.T., Leapman R.D., Guo Z., Yau W.M., Mattson M.P. and Tycko R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* 307(5707):262-265.
- Poças G.M., Branco-Santos J., Herrera F., Outeiro T.F. and Domingos P.M. (2015). α -Synuclein modifies mutant huntingtin aggregation and neurotoxicity in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 24(7):1898-1907.
- Poirier M.A., Li H., Macosko J., Cai S., Amzel M. and Ross C.A. (2002). Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J. Biol. Chem.* 277(43):41032-41037.
- Pouladi M.A., Graham R.K., Karasinska J.M., Xie Y, Santos R.D., Petersén A. and Hayden M.R. (2009). Prevention of depressive behaviour in the YAC128 mouse model of Huntington disease by mutation at residue 586 of huntingtin. *Brain* 132(Pt 4):919-32.
- Ralph G.S., Radcliffe P.A., Day D.M., Carthy J.M., Leroux M.A., Lee D.C., Wong L.F., Bilsland L.G., Greensmith L., Kingsman S.M., Mitrophanous K.A., Mazarakis N.D. and Azzouz M. (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.* 11(4):429-433.
- Ren P.H., Lauckner J.E., Kachirskaia I., Heuser J.E., Melki R. and Kopito R.R. (2009). Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat. Cell Biol.* 11(2):219-225.
- Rodriguez-Lebron E., Denovan-Wright E.M., Nash K., Lewin A.S. and Mandel R.J. (2005). Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol. Ther.* 12(4):618-633.
- Ross C.A. and Poirier M.A. (2005). Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(11):891-898.
- Saito A., Taniguchi Y., Rannals M.D., Merfeld E.B., Ballinger M.D., Koga M., Ohtani Y., Gurley D.A., Sedlak T.W., Cross A., Moss S.J., Brandon N.J., Maher B.J. and Kamiya A. (2016). Early postnatal GABAA receptor modulation reverses deficits in neuronal maturation in a conditional neurodevelopmental mouse model of DISC1. *Mol. Psychiatry* 21(10):1449-1459.

- Sanchez I., Mahlke C. and Yuan J. (2003). Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421(6921):373-379.
- Saudou F. and Humbert S. (2008). The biology of Huntington's disease. *Handb. Clin. Neurol.* 89:619-629.
- Saudou F., Finkbeiner S., Devys D. and Greenberg M.E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95(1): 55-66.
- Sawamura N., Ando T., Maruyama Y., Fujimuro M., Mochizuki H., Honjo K., Shimoda M., Toda H., Sawamura-Yamamoto T., Makuch L.A., Hayashi A., Ishizuka K., Cascella N.G., Kamiya A., Ishida N., Tomoda T., Hai T., Furukubo-Tokunaga K. and Sawa A. (2008). Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly. *Mol. Psychiatry* 13(12): 1138-1148, 1069.
- Sawamura N., Sawamura-Yamamoto T., Ozeki Y., Ross C.A. and Sawa A. (2005). A form of DISC1 enriched in nucleus: altered subcellular distribution in orbitofrontal cortex in psychosis and substance/alcohol abuse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(4):1187-1192.
- Serpell L.C., Berriman J., Jakes R., Goedert M. and Crowther R.A. (2000). Fiber diffraction of synthetic α -synuclein filaments shows amyloid-like cross- β conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(9):4897-4902.
- Seshadri S., Faust T., Ishizuka K., Delevich K., Chung Y., Kim S.H., Cowles M., Niwa M., Jaaro-Peled H., Tomoda T., Lai C., Anton E.S., Li B. and Sawa A. (2015). Interneuronal DISC1 regulates NRG1-ErbB4 signalling and excitatory-inhibitory synapse formation in the mature cortex. *Nat. Commun.* 6:10118.
- Seshadri S., Khurana R. and Fink A.L. (1999). Fourier transform infrared spectroscopy in analysis of protein deposits. *Methods Enzymol.* 309:559-576.
- Shahani N., Seshadri S., Jaaro-Peled H., Ishizuka K., Hirota-Tsuyada Y., Wang Q., Koga M., Sedlak T.W., Korth C., Brandon N.J., Kamiya A., Subramaniam S., Tomoda T. and Sawa A. (2015). DISC1 regulates trafficking and processing of APP and A β generation. *Mol. Psychiatry* 20(7):874-879.
- Scherzinger E., Lurz R., Turmaine M., Mangiarini L., Hollenbach B., Hasenbank R., Bates G.P., Davies S.W., Lehrach H. and Wanker E.E. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90(3):549-558.
- Schurov I.L., Handford E.J., Brandon N.J. and Whiting P.J. (2004). Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol. Psychiatry* 9 (12):1100-1110.

- Shorter J. and Lindquist S. (2005). Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 6(6):435-450.
- Soda T., Frank C., Ishizuka K., Baccarella A., Park Y.U., Flood Z., Park S.K., Sawa A. and Tsai L.H. (2013). DISC1-ATF4 transcriptional repression complex: dual regulation of the cAMP-PDE4 cascade by DISC1. *Mol. Psychiatry* 18(8):898-908.
- Suzuki G., Shimazu N. and Tanaka M. (2012). A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. *Science* 336(6079):355-359.
- Takashima N., Odaka Y.S., Sakoori K., Akagi T., Hashikawa T., Morimura N., Yamada K. and Aruga J. (2011). Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking *Lrrtm1*, a gene associated with schizophrenia. *PLoS One* 6(7): e22716.
- Takimoto E., Champion H.C., Li M., Belardi D., Ren S., Rodriguez E.R., Bedja D., Gabrielson K.L., Wang Y. and Kass D.A. (2005). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 11(2):214-222.
- Tanaka M., Collins S.R., Toyama B.H. and Weissman J.S. (2006). The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442(7102):585-589.
- Tanaka M., Machida Y., Niu S., Ikeda T., Jana N.R., Doi H., Kurosawa M., Nekooki M. and Nukina N. (2004). Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 10(2):148-154.
- Tanaka M., Machida Y., Nishikawa Y., Fujisawa T. and Nukina N. (2003). Formation of quasi-aggregates during fibrilization of polyglutamine proteins. *J. Biol. Chem.* 278(36):34717-34724.
- Tessier P.M. and Lindquist S. (2009). Unraveling infectious structures, strain variants and species barriers for the yeast prion [PSI⁺]. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(6):598-605.
- Thomas E.A. (2006). Striatal specificity of gene expression dysregulation in Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 84(6):1151-1164.
- Toyama B.H., Kelly M.J., Gross J.D. and Weissman J.S. (2007). The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature* 449(7159):233-237.
- Trossbach S.V., Bader V., Hecher L., Pum M.E., Masoud S.T., Prikulis I., Schable S., de Souza Silva M.A., Su P., Boulat B., Chwiesko C., Poschmann G., Stühler K., Lohr K.M., Stout K.A., Oskamp A., Godsave S.F., Müller-Schiffmann A., Bilzer T., Steiner H., Peters P.J., Bauer A., Sauvage M., Ramsey A.J., Miller G.W., Liu F., Seeman P., Brandon N.J., Huston J.P. and Korth C. (2016).

Misassembly of full-length Disrupted-in-Schizophrenia 1 protein is linked to altered dopamine homeostasis and behavioral deficits. *Mol. Psychiatry* 21(11):1561-1572.

- Trottier Y., Lutz Y., Stevanin G., Imbert G., Devys D., Cancel G., Saudou F., Weber C., David G., Tora L., Agid Y., Brice A. and Mandel J.L. (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 378(6555):403-436.
- Tyedmers J., Mogk A. and Bukau B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(11):777-788.
- Van Raamsdonk J.M., Pearson J., Rogers D.A., Bissada N., Vogl A.W., Hayden M.R. and Leavitt B.R. (2005). Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 14(10):1379-1392.
- Vonsattel J.P. and DiFiglia M. (1998). Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57(5): 369-384.
- Wang Y.L., Liu W., Wada E., Murata M., Wada K. and Kanazawa I. (2005). Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA, *Neurosci. Res.* 53(3):241-249.
- Wang G.H., Mitsui K., Kotliarova S., Yamashita A., Nagao Y., Tokuhiko S., Iwatsubo T., Kanazawa I. and Nukina N. (1999). Caspase activation during apoptotic cell death induced by expanded polyglutamine in N2a cells. *Neuroreport.* 10(12):2435-2438.
- Xia H., Mao Q., Eliason S.L., Harper S.Q., Martin I.H., Orr H.T., Paulson H.L., Yang L., Kotin R.M. and Davidson B.L. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.* 10(8):816-820.
- Yamamoto A., Lucas J.J. and Hen R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101(1):57-66.
- Yang W., Dunlap J.R., Andrews R.B. and Wetzel R. (2002). Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum. Mol. Genet.* 11(23):2905-2917.
- Yu J.Y., DeRuiter S.L. and Turner D.L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(9):6047-6052.