



## Salbutamol inhibits ubiquitin-mediated survival motor neuron protein degradation in spinal muscular atrophy cells

NUR IMMA FATIMAH HARAHAP

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6711号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006711>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2613 号	氏名	NUR IMMA FATIMAH HARAHAP
論文題目 Title of Dissertation	<p>Salbutamol inhibits ubiquitin-mediated survival motor neuron protein degradation in spinal muscular atrophy cells</p> <p>サルブタモールは、脊髄性筋萎縮症細胞における、ユビキチンを介した SMN 蛋白分解を阻害する</p>		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	<p>勾坂 敏朗</p> <p>古屋 敏智之</p>	
	副査 Vice-examiner	<p>宇田 嘉史</p>	
	副査 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

### 【背景】

脊髄性筋萎縮症（以下 SMA）は、頻度の高い小児運動ニューロン病である。SMA は 3 つの臨床型に分類される。1 型は生後 6 ヶ月までに発症する急性・重症型である。2 型（中間型）は生後 18 ヶ月までに発症する中等症型である。3 型は 18 ヶ月以降に発症する軽症型である。SMA は常染色体劣性遺伝疾患であり、5 番染色体上の SMN1 遺伝子が責任遺伝子である。95% 以上の患者において SMN1 遺伝子の欠失、残りの患者に SMN1 遺伝子内変異が認められる。現在、SMA は、SMN 蛋白の発現低下あるいは機能低下によって引き起こされる疾患であると理解されている。

SMN2 遺伝子は SMN1 遺伝子と相同で同じ蛋白をコードしているが、SMN1 遺伝子とはスプライシングが異なり、エクソン 7 をスキップした転写産物や、機能をもたない蛋白を産生することが多い。そのため、SMN2 遺伝子が存在していても、SMN1 遺伝子異常による SMA 発症を阻止できない。近年、SMA の治療戦略として SMN2 遺伝子の利用が考えられている。SMN2 遺伝子転写産物の発現増加、スプライシング修正によって SMA が治療できると考えられるようになっている。

### 【目的】

SMA 治療薬候補としてサルブタモールが報告されている。サルブタモールは気管支拡張剤としてよく用いられる  $\beta$ 2-アドレナリン作動薬である。サルブタモールが SMA 患者細胞において SMN 蛋白を増加させる。その機序としては、SMN2 遺伝子転写産物の発現を増加させ、かつスプライシングを修正するためと考えられてきた。しかし、この機序を確かめる研究は少なく、その研究報告の根拠は弱いように思われた。そこで、本研究では、サルブタモールが SMN 蛋白を増加させる機序を解明することを目的とした。

### 【方法・結果】

#### 【サルブタモールは SMN 蛋白量を増加させる】

SMA 患者線維芽細胞（SMN1 遺伝子は完全に欠失し、SMN2 遺伝子が 3 コピー残存している）に、各種濃度のサルブタモール（0.005, 0.05, 0.5  $\mu$ M）を添加し、36 時間経過を観察したが、明らかな SMN2 遺伝子転写産物の発現変動は認められなかった。しかし、サルブタモール用量依存的に、SMN 蛋白量の増加が認められた。このことより、サルブタモールには、SMN2 遺伝子転写産物の調節を介さないで、SMN 蛋白量を増加させる機序が存在するものと思われた。

#### 【PKA 阻害剤は、サルブタモールによる SMN 蛋白量増加を抑制する】

$\beta$  2-アドレナリン受容体の下流蛋白である PKA が SMN2 蛋白量に及ぼす影響を知るために実験を行った。SMA 患者線維芽細胞に、サルブタモール (0.5  $\mu$ M) と PKA 阻害剤 (14-22 amide cell-permeable, myristoylated : 1 mM) を添加したところ、サルブタモールの効果は完全に抑制され、SMN2 蛋白量の増加は認められなくなった。このことより、サルブタモールによる SMN 蛋白量の増加には、PKA の働きが必須であることが明らかになった。

#### 【サルブタモールは、SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する】

HeLa 細胞にサルブタモール (20  $\mu$ M) を添加し、免疫沈降法を用いて、ユビキチン化 SMN 蛋白を検出した。この際、ユビキチン化 SMN 蛋白の検出を容易にするために、プロテオソーム阻害剤である MG-132 も用いた。サルブタモールは HeLa 細胞のユビキチン化 SMN 蛋白の割合を減少させていたことから、サルブタモールが SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する機序が考えられた。

#### 【脱ユビキチン化阻害剤は、サルブタモールによる SMN 蛋白量増加を抑制する】

SMA 患者線維芽細胞に、サルブタモール (0.5  $\mu$ M) と脱ユビキチン化阻害剤 (PR-619 : 10  $\mu$ M) を添加したところ、サルブタモールの効果は有意に抑制され、SMN2 蛋白量の増加が有意に抑制された。このことより、SMA 患者線維芽細胞におけるサルブタモールによる SMN 蛋白量の増加は、ユビキチン化の抑制であることが明らかになった。

#### 【結語】

本研究により、サルブタモールがPKA 経路を介してSMN蛋白のユビキチン化を抑制することを明らかにした。本研究成果は、SMAの治療戦略としてSMN蛋白の分解を調節するという方向性があることを示唆しており、新しいSMA治療法の開発につながる重要な基礎的知見になると考えられる。

本研究は、サルブタモールが脊髄性筋萎縮症細胞の SMN 蛋白量を増加させる機序を研究したものであるが、従来、ほとんど知られていなかったサルブタモールと SMN 蛋白ユビキチン化との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

## 学位論文の内容要旨

### Salbutamol inhibits ubiquitin-mediated survival motor neuron protein degradation in spinal muscular atrophy cells

サルブタモールは、脊髄性筋萎縮症細胞における、ユビキチンを介した SMN 蛋白分解を阻害する

NUR IMMA FATIMAH HARAHAP

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

疫学

指導教員：西尾 久英 教授

## 目的

【SMAについて】 脊髄性筋萎縮症(以下 SMA)は、頻度の高い小児運動ニューロン病である。SMA は 3 つの臨床型に分類される。1 型は生後 6 ヶ月までに発症する急性・重症型である。2 型(中間型)は生後 18 ヶ月までに発症する中等症型である。3 型は 18 ヶ月以降に発症する軽症型である。

【責任遺伝子：SMN1 遺伝子について】 SMA は常染色体劣性遺伝疾患であり、5 番染色体上の SMN1 遺伝子が責任遺伝子である。95%以上の患者において SMN1 遺伝子の欠失、残りの患者に SMN1 遺伝子内変異が認められる。現在、SMA は、SMN 蛋白の発現低下あるいは機能低下によって引き起こされる疾患であると理解されている。

【相同遺伝子：SMN2 遺伝子を利用する治療戦略について】 SMN2 遺伝子は SMN1 遺伝子と相同で同じ蛋白をコードしているが、SMN1 遺伝子とはスプライシングが異なり、エクソン 7 をスキップした転写産物や、機能をもたない蛋白を产生することが多い。そのため、SMN2 遺伝子が存在していても、SMN1 遺伝子異常による SMA 発症を阻止できない。近年、SMA の治療戦略として SMN2 遺伝子の利用が考えられている。SMN2 遺伝子転写産物の発現増加、スプライシング修正によって SMA が治療できると考えられるようになったのである。

【SMA 治療薬候補：サルブタモールについて】 サルブタモールは気管支拡張剤としてよく用いられる  $\beta$  2-アドレナリン作動薬である。これまでに、サルブタモールが SMA 患者細胞において SMN 蛋白を増加させることが報告されている。その機序としては、SMN2 遺伝子転写産物の発現を増加させ、かつスプライシングを修正するためと考えられてきた。しかし、この機序を確かめる研究は少なく、その研究報告の根拠は弱いように思われた。そこで、研究者らは、サルブタモールが SMN 蛋白を増加させる機序を解明するために、SMA 患者線維芽細胞、HeLa 細胞を用いて実験を行った。

## 方法・結果

【サルブタモールは SMN 蛋白量を増加させる】 SMA 患者線維芽細胞 (SMN1 遺伝子は完全に欠失し、SMN2 遺伝子が 3 コピー残存している) に、各種濃度のサルブタモール (0.005, 0.05, 0.5  $\mu$ M) を添加し、36 時間経過を観察したが、明らかな SMN2 遺伝子転写産物の発現変動は認められなかった。しかし、サルブタモール用量依存的に、SMN 蛋白量の増加が認められた。このことより、サルブタモールには、SMN2 遺伝子転写産物の調節を介さないで、SMN 蛋白量を増加させる機序が存在するものと思われた。

【PKA 阻害剤は、サルブタモールによる SMN 蛋白量増加を抑制する】  $\beta$  2-アドレナリン受容体の下流蛋白である PKA が SMN2 蛋白量に及ぼす影響を知るために実験を行った。SMA 患者線維芽細胞に、サルブタモール (0.5  $\mu$ M) と PKA 阻害剤 (14-22 amide cell-permeable, myristoylated : 1 mM) を添加したところ、サルブタモールの効果は完全に抑制され、SMN2 蛋白量の増加は認められなくなった。このことより、サルブタモールによる SMN 蛋白量の増加には、PKA の働きが必須であることが明らかになった。

【サルブタモールは、SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する】 HeLa 細胞にサルブタモール (20  $\mu$ M) を添加し、免疫沈降法を用いて、ユビキチン化 SMN 蛋白を検出した。この際、ユビキチン化 SMN 蛋白の検出を容易にするために、プロテオソーム阻害剤である MG-132 も用いた。サルブタモールは HeLa 細胞のユビキチン化 SMN 蛋白の割合を減少させていたことから、サルブタモールが SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する機序が考えられた。

【脱ユビキチン化阻害剤は、サルブタモールによる SMN 蛋白量増加を抑制する】 SMA 患者線維芽細胞に、サルブタモール (0.5  $\mu$ M) と脱ユビキチン化阻害剤 (PR-619 : 10  $\mu$ M) を添加したところ、サルブタモールの効果は有意に抑制され、SMN2 蛋白量の増加が有意に抑制された。このことより、SMA 患者線維芽細胞におけるサルブタモールによる SMN 蛋白量の増加は、ユビキチン化の抑制であることが明らかになった。

### 結論

【サルブタモールは、PKA 経路を介して SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する】 研究者は、サルブタモールによる SMN 蛋白増加の機序には、PKA 経路を介して SMN 蛋白ユビキチン化を抑制する経路があることを見出した。

【新しい SMA 治療戦略の方向性を示す】 この発見は、SMA の治療戦略として、SMN 蛋白の分解を調節するという方向性があることを示唆している。