

ポリコーム群タンパク複合体の構造と機能

分担研究者 古関明彦 千葉大学大学院発生生物学教授

研究要旨

我々は今までに、既知のほ乳類ポリコーム群である Mel-18、Ring1B や Mph1 に結合する因子として、Mph2、SCMH1、p53BP3、YAF2、スプライセオソーム結合タンパク (SAP155) などを明らかにしてきた。今回、Mph2、SCMH1、SAP155 を欠損するマウスとそれらに対する抗体の作出に成功した。Mph2 と SAP155 は、ポリコーム複合体に属するタンパクと共に免疫共沈され、また、ノックアウトマウスではホメオチック変異が見られたことから、ポリコーム群として機能することが強く示唆された。また、ほ乳類ポリコーム群の発ガンへの寄与を明らかにするシステムを作成するために、Mel-18 変異を p53 欠損マウスに導入すると、胸腺腫の発生を強く促進することが明らかになった。今まで、Mel-18 は発ガンを促進すると考えられていたが、抑制的に作用するか、または未知の機序を介して作用することが示唆された。

A. 研究目的

本研究は、発がんの過程におけるがん細胞におけるポリコーム遺伝子群の役割を明らかにするために、細胞死の抑制の過程におけるポリコーム群遺伝子産物の作用機序の解析を行う。また、我々は哺乳類ポリコーム群タンパクがセントロメア近傍に強く局在することを最近見出し、染色体の高次構造との関連を改めて示唆

した。哺乳類ポリコーム群遺伝子産物によるヘテロクロマチン化などの染色体の高次構造の変化を介した発がんの過程を明らかにする。

B. 研究目標

- 1) ポリコーム群遺伝子産物が構成するタンパク複合体の構造と機能調節の分子機序を明らかにする。
- 2) ポリコーム群タンパク複合体の標

的となる遺伝子座を明らかにする。

3) p53BP3 と SCMH1 の機能発現機序とポリコーム群タンパク複合体への作用機序を明らかにする。

C. 結果と考察

1) ポリコーム群タンパク複合体の構造と機能の解析

い) SCMH1、p53BP3、YAF2 は、ポリコーム複合体のコンポーネントか？

新たに同定した SCMH1、p53BP3、YAF2 が、Mel-18、Mph1、Mph2、Ring1B、Bmi-1 と共通の複合体にふくまれているか否かを検定する。現在までに、リコンビナント SCMH1、p53BP3、YAF2 タンパクに対する抗血清の作成に成功している。また、Mel-18、Mph1、Mph2、Ring1B、Bmi-1 のそれぞれに対する抗体を用いて、それらが共通のタンパク複合体に含まれていることを示してきた。

ろ) マウス 11.5 日胚尾芽長鎖 cDNA ライブラリを用いた DNA アレイの作成

Mel-18/Bmi1 二重欠失マウスの尾芽における異常を系統的に明らかにしていくために、尾芽 cDNA ライブラリを用いた DNA アレイの作成を試みている。現在、個々のクロンの末端配列を決定している。

は) Mel-18 と p53 の相互作用

p53 においても、頻繁に胸腺腫が発症することは、よく知られているが、Mel-18 変異は、その p53 欠損マウスで見られる胸腺腫発症を著しく亢進させることを明らかにした。このことは、Mel-18 変異が発ガンシグナルを形成する可能性と、Mel-18 を含むタンパク複合体が p53 とタンパクレベルで作用する可能性を示唆していると考えられる。

2) ポリコーム群タンパク複合体による標的遺伝子群の発現調節の解析 (Hox クラスターにおける Mel-18 結合領域同定の試み)

染色体上の Mel-18 結合領域を明らかにするために、クロマチン DNA と Mel-18 の複合体の免疫共沈を試みた。パラフォルムアルデヒドを用いて、マウス 11.5 日胚を固定し、超音波処理によりクロマチン DNA/Mel-18 複合体を可溶化した。約 1kB の断片として可溶化する条件を明らかにした。セシウム濃度勾配を用いて、フリーのタンパク、クロマチン DNA/タンパク複合体、フリーのクロマチン DNA を分画したところ、Mel-18 と Bmi-1 と Bmi-1 遺伝子産物は、クロマチン DNA/タンパク複合体の分画にのみ存在することが明らかになった。これとは対照的に、Mel-18 と Bmi-1 のインターラクターである Ring1B は、クロマチンに結合してい

る分画だけではなく、結合していない分画にも含まれることが明らかになった。Ring1B も、Hox クラスターの転写制御に寄与することを明らかにしているので、クロマチン結合型の Ring1B が、Mel-18 と Bmi-1 と複合体を構成してポリコーム複合体として機能することが示唆された。Mel-18 と免疫共沈されてくるクロマチン DNA に含まれる Hox クラスターの頻度を Hoxb7/b8/b9 に焦点を絞って系統的に検索している。

3) p53BP3 と SCM1 の機能発現機序とポリコーム群タンパク複合体への作用機序の解析

い) 現在までに、Mph2 と SCM1 を欠損するマウスを作成し、それらの表現型の解析を行っている。また、すでに存在している Mel18、Mph1、Mph2、Bmi-1 を欠損したマウスとの交配を進めている。p53BP3 については、現在までに、相同組み換え体の作成に成功している。また、YAF2 については、まだ相同組み換え体は得られていない。

ろ) 155kDa スプライセオソーム結合タンパク(SAP155)によるポリコーム複合体機能の調節

Mel-18 と Ring1B のインターラクターとして同定した SAP155 は、マウス胚においても構成的に Mel-18 と Ring1B に結合していることが明らか

になった。SAP155 を欠損したマウスは、8細胞期におこるコンパクションを維持できず、それ以上に発生は進まない。SAP155 と Mel-18 や Mph1 二重ヘテロ接合体では、それぞれのヘテロ接合体では観察されないホメオチック変異が中軸骨格系で観察された。また、クロマチン結合分画にも SAP155 が見られたことから、一部の SAP155 はポリコーム複合体のコンポーネントとしても作用する可能性が示された。

D.発表

1.Ito, K., Karasawa,M., Kawano,T. , Akasaka,T. , Koseki,H., Akutu,Y. , Kondo,E. , Sekiya,S. , Sekikawa,K. , Harada,M. , Yamashita,M. , Nakayama,T. and Taniguchi,M. Involvement of decidual V α 14 NKT cells in abortion. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97 : 740-744 (2000)

2.Honma,N., Koseki,H. , Akasaka,T., Nakayama,T., Taniguchi, M. Serizawa,I., Akahori,H., Ozawa,M.,and Mikayama,T. Deficiency of the macrophage migration inhibitory factor gene has no significant effect of indotoxaemia. Immunology. 100:84-90 (2000)

3.Takahashi,Y., Koizumi, K., Takagi A., Kitajima,S., Inoue,T., Koseki,H., Saga,Y.

- Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nature genetics* 25:390-396 (2000)
4. Atsuta, T., Fujimura, S., Moriya, H., Vidal, M., Akasaka, T., Koseki, H. Production of Monoclonal Antibodies against Mammalian Ring 1B Proteins. *Hybridoma* (in press) (2000).
5. Sudo, H., Tonegawa, A., Arase, Y., Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Moriya, H., Wilting, J., Christ, B., and Koseki, H. Inductive signals from the somatopleure mediated by bone morphogenetic proteins are essential for the formation of the sternal component of avian ribs. *Dev. Biol.* (in press) (2000)
6. Isono, K., Abe, K., Tomaru, Y., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y. and Koseki, H. Molecular cloning, genetic mapping, and expression of the mouse Sf3b1 (SAP155) gene for the U2 snRNP component of spliceosome. *Mammalian Genome* (in press) (2000)
7. Koizumi, K., Nakajima, M., Yuasa, S., Saga, Y., Sakai, T., Kuriyama, T., Shirasawa, T. and Koseki, H. The role of Presenilin1 during somite segmentation. *Development* (in press) (2001)
8. Fukamachi, H., Fukuda, K., Suzuki, M., Furumoto, T., Ichinose, M., Shimizu, S., Tsuchiya, S., Horie, S., Shiokawa, K., Suzuki, Y., Saito, Y., Watanabe, K., Taniguchi, M., and Koseki, H. Mesenchymal transcription factor FKH6 controls gastric epithelial development and differentiation. *BBRC* (in press) (2000)
9. Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H. Mice doubly deficient for the Polycomb-Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development* (in press) (2001)

知的所有権の取得状況
 該当する知的所有権はありません。

プレセニン1 遺伝変異はアミロイド老人斑の A β 42 成分だけでなく A β 40 成分の沈着も亢進する。

分担研究者 森 啓 大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨 アルツハイマー病主要原因遺伝子プレセニン1は APP からアミロイド蛋白を産生する γ プロテアーゼと考えられており、家族性変異によりアミロイド蛋白、特に A β 42 成分の産生亢進が確立している。今回、PS-1 変異を示す家族性疾患脳組織の直接分析により、A β 42 成分と A β 40 成分が沈着亢進していることが明らかとなった。A β 40 成分への効果は晩発性アルツハイマー病の危険因子でもあるアポリポ蛋白 e4 のアレル効果ではなくプレセニン1の多様な機能の1つであることが示唆された。

A. 研究目的

<目的>老人斑構成成分であるアミロイド蛋白は線維化しやすい性質をもつ。特に A β 42 成分は初期沈着成分として病因にとって重要であり、その量変化は鍵反応と考えられている。一方、A β 40 成分はアミロイド沈着形成にとって後期に寄与する成分であり、アポリポ蛋白に関連して脳内に蓄積すると考えられている。最近になり、遺伝性（家族性）アルツハイマー病（AD）の原因遺伝子産物がプレセニンであることが明らかにされ、その突然変異も脳内の A β 42 を増加させることが報告された。これらのことから、A β 42 の増加をもたらす代謝機序の解明が、アルツハイマー病の予防、治療法の確立に必須であると考えられている。アルツハイマー病（AD）原因遺伝子産物プレセニン1（PS1）はアミロイド前駆体タンパク質（APP）代謝に関与し、A β 産生を制御していることが知られている。

特に、A β 42 への促進効果は培養細胞での結果だけでなく、脳組織での病変でも確認されている重要な作用である。しかしながら A β 42 だけでは APP のロンドン型変異である APP717 でも同じく A β 42 高進効果があり PS1 変異との区別がつかない。臨床的には、PS1 変異家系を持つ患者の発症があるかに早いことは、多くの臨床証例で経験されていることであり、A β 42 への単純効果だけでは説明ができない。本研究では、PS1 変異を持つ家族性 AD の脳組織を A β 42 と A β 40 を識別する抗体を用いて、免疫染色した結果を画像処理することによって得られた結果を解析した。

B. 研究方法

表1に示した孤発性 AD16例、APP717型変異家族性 AD6例、PS1変異家族性 AD23例を用いた。

表1 アルツハイマー病脳組織の症例と老人斑構成成分 (Aβ42 と Aβ40) の密度と面積における定量結果

subjects	mutation site	onset	duration	sex	Apo E type	area (%)		density (/mm ²)	
						Aβ40	Aβ42	Aβ40	Aβ42
141/93	E120K	42	13	M	(3-3)	0.4±0.04	5.88±1.1	8.09±2.3	81.9±23.1
23/94	M139V	69	8	M	(3-4)	2.36±0.8	6.24±2.5	15.1±5.56	83.4±38.3
293/93		35	7	M	(3-4)	0.42±0.1	10.7±2.2	9.42±2.22	78.8±9.3
236/91	I143F	55	6	F	(3-3)	1.31±0.3	8.51±0.8	21.9±2.2	69.1±9.4
95-124	M146L	45	6	M	(3-3)	0.25±0.04	2.38±1.4	3.20±0.92	25.8±19.3
R16039		40	13	F	(3-3)	1.48±0.2	9.59±2.5	25.1±2.87	70.9±14.1
3098	H163R	51	11	F	(3-4)	1.83±0.2	4.12±0.2	36.7±2.13	102.2±9.0
305	A246E	50	10	M	(2-3)	1.11±0.1	3.18±0.7	10.7±0.77	43.6±16.4
306		50	6	M	(3-4)	0.45±0.0	2.60±0.5	7.25±3.5	14.7±1.08
40-95		43	23	F	(3-3)	0.17±0.0	1.10±0.1	1.29±0.23	22.5±12.0
6662		50	8	M	(3-3)	3.05±0.9	4.87±1.4	21.1±7.49	32.6±3.39
7463		41	11	F	(3-4)	2.99±1.1	8.56±3.4	32.8±7.01	50.0±12.9
77156		50	13	M	(3-3)	2.94±1.2	8.24±2.8	69.6±36.7	77.1±19.2
95,9		-	-	M	(3-3)	0.84±0.0	6.8±0.27	7.07±0.37	84.3±7.86
L971		52	15	F	(3-4)	0.86±0.4	4.12±0.8	7.85±1.71	83.2±42.6
6531	L286V	53	8	M	(3-4)	1.40±0.5	5.10±2.3	8.62±4.64	37.0±10.5
2576	exon9 deletion	45	19	M	(3-4)	4.91±1.0	4.72±0.8	47.6±9.07	60.9±8.59
283/92		42	19	F	(2-3)	0.27±0.0	3.27±0.7	4.72±1.08	26.7±7.48
89-26	C110Y	46	9	M	(2-3)	3.12±0.5	5.23±0.7	29.8±6.07	46.3±8.78
92-83		42	5	M	(3-3)	0.76±0.2	4.05±0.3	8.89±2.63	48.6±10.1
93-23		51	8	M	(3-3)	0.48±0.4	7.01±1.7	7.23±4.11	69.2±11.5
93-127		56	25	F	(3-3)	0.51±0.1	3.23±0.4	4.44±1.67	46.0±6.05
L96-3		45	15	F	(3-3)	8.28±2.8	10.6±2.1	51.7±12.5	82.8±14.3
APP case									
211/95	APP ^{wt} (val-gly)	38	21	M	(3-3)	0.90±0.3	4.94±0.5	13.0±4.3	53.7±10.1
25/94	APP ^{wt} (val-ile)	49	6	F	(3-4)	1.10±0.3	4.41±0.6	26.6±7.95	77.5±9.8
51/97		55	7	F	(3-3)	0.20±0.1	7.52±1.3	8.56±3.29	86.7±13.1
K181		47	8		(4-4)	1.62±0.5	5.97±1.5	11.7±3.86	47.4±27.9
185-93		-	-	M	(3-3)	0.24±0.0	5.05±2.0	7.03±2.89	78.4±45.5
238/96		59	10	F	-	0.19±0.0	3.41±1.4	6.32±0.86	43.6±18.6

各検体は、いずれもパラフィン包埋した組織をキシレンによる脱パ

ラフィン処理し、アルコール浸水処理をほどこしたものを既報に従い、蟻酸処理を実施した。PS1 変異家族性 AD 脳組織は表 1 にしめしたアミノ酸点変異型とエクソン 9 欠失型を含む。

PS-1、APP、孤発性 AD の平均死亡年齢（標準偏差を括弧内に示す）は、各々48.3 (7.2)才、49.6 (8.0)才、60.4 (9.4)才である。各平均罹患年数は、各々11.5 (5.6)才、10.4

(4) 染色結果は、Hewlett Packard ScanJet 4C/Tによって、画像ファイルとしてデジタル化したものを、Adobe 社の Photoshop (3.0 J)を用いてファイル化する。老人斑以外の血管性アミロイド沈着は、画像上で削除し、老人斑のみを NIH ソフトウェアによる画像処理を実施した。

(5) 統計処理は、SAS による GLM 処理による多変数解析を実施した。なお、本分析については、ボストン大学医学部のファーラー教授（遺伝学プログラム）に全面的にご協力いただいた。

C. 研究成果

(1) 各組織における免疫染色により、従来発表されてきたように、家族性 AD では、早期沈着性アミロイド成分である Aβ42 の高進が重ねて確認された。さらに、PS1 変異型脳組織では Aβ40 の高進も見られた（表 2）が、各個別の例では、部位別、あるいは、罹患年数別による差異が考えられた。この可能については、分析した脳組

才、11.7(4.4) 才である。

(2) アポ E ゲノム型は、組織から抽出した DNA を鋳型として既報に従い PCR、HhaI 消化し、電気泳動によって決定した。

(3) 各組織の免疫染色は、老人斑を構成する Aβ40 と Aβ42 を特異的に認識する BA-27、BC-05 モノクローナル抗体を一次抗体として、使用し、アビジン・ビオチン法による増感染色法を採用した。

織部位を側頭葉を主として分析対象として選択することで対応した。履歴年数は各症例の平均をとったところ、PS1 が特に長いことではないことが明らかであり、長い罹病期間による Aβ40 促進効果ではない（表 1）。さらに、アポ E アレル e4 による Aβ40 沈着促進効果が疑われるが、PS1 全症例のアポ E アレル型を調査検討した結果、ほとんどの PS1 症例が e3/e3 であり、アレル e4 による Aβ40 沈着促進効果が PS1 症例に有意に関連している統計的証拠はなく、むしろ危険因子アポ E と PS1 は独立して作用していることが示唆された。

(2) PS1 変異部位による Aβ40 沈着促進効果については、PS1 症例総数が各部位について、統計学的に十分な数に達していないので、結論的なことは言えないが、PS1 切断点あるいは欠失変異部位近傍であるエクソン 9 領域における変異で最も顕著に見られた。

表 2 老人斑アミロイド成分への PS1、APP 変異の作用

Group	n	mean density (std)/mm ²		mean area	
		Aβ40	Aβ42	Aβ40	Aβ42
(std)%					

PS-1	23	19.1 (18.0)	57.5 (24.6)	1.7 (1.9)	5.6 (2.7)
APP717	6	12.2 (7.5)	64.0 (19.1)	0.7 (0.6)	5.2 (1.4)
Spordic	14	8.6 (4.8)	40.4 (14.9)	0.7 (0.9)	3.3 (1.3)

D. 考察

PS1 変異の生物学的意義に関しては、A β 42 成分の高進が繰り返し強調されてきたものの、A β 成分への作用については多くの議論がない。さらに、脳内沈着への効果という点では、調査対象となる家族性 AD 症例数の少なさから統計学的視点での議論が可能ではなかった。本研究により、可溶性アミロイド成分の細胞外分泌では見られない PS1 作用が A β 42 ばかりでなく、A β 40 へも及ぼすことが明らかになった。さらに PS1 の効果が変異部位別に観察されたことは、PS1 分子内の異なったドメイン機能の存在を示唆するものと考えられる。事実、PS1 結合蛋白は、 β カテニン、フォドリン、ニカストリン、ABP-280 など多岐にわたる分子が同定されてきている。これらのことは、PS1 が γ セクレターゼ活性だけを有する単純な膜内蛋白質分解酵素というより、複雑な膜複合体を形成している証拠が蓄積しつつある。今後は、APP からアミロイド蛋白両成分の生成だけでなく、脳内沈着の分子機構に焦点が移行していくことにより、脳内病理カスケードの分子機構が明らかにされると思われる。

E. 結論 PS1 の家族性変異は、A β 1-42 だけでなく、A β 1-40 の脳内沈着を促進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

- 1) Arawaka, S., Usami, M., Sahara, N., Schellenberg, G.D., Lee, G., & Mori, H. (1999) *NeuroReport* 10 (5): 993-997
The tau mutation (val337met) disrupts cytoskeletal networks of microtubules
- 2) Sekijima, Y., Kametani, F., Tanaka, K., Okochi, M., Usami, M., Mori, H., Tokuda, T., Ikeda, S. (1999) *Neurosci. Lett.* 267 (2):121-124
Presenilin-1 exists in the axoplasm fraction in the brains of aged Down's syndrome subjects and non-demented individuals
- 3) Maruyama, K., Usami, M., Kametani, F., Tomita, T., Iwatsubo, T., Saido, T.C., Mori, H., and Ishiura, S. (2000) *Int. J. Molecular Medicine* 5: 269-273
Molecular interactions between presenilin and calpain: Inhibition of m-calpain protease activity by presenilin-1, 2 and cleavage of presenilin-1 by m-, m-calpain
- 4) Lippa, C.F., Schmidt, M.L., Nee, L.E., Bird, T., Nochlin, D., Hulette, C., Mori, H. Lee, V.M-Y., and Trojanowski, J.Q. (2000) *Neurology* 54: 100-104
AMY plaques in familial AD; Comparison with sporadic Alzheimer's disease
- 5) Sahara, N., Tomiyama, T., and Mori, H. (2000) *J. Neurosci. Res.* 60(3): 380-387
Missense point mutations of tau to segregate with FTDP-17 exhibit site-specific effects on microtubule structure in COS cells: A novel action of R406W

mutation

6) Tamaoka, A., Miyatake, F., Matsuno, S., Ishii, K., Nagase, S., Sahara, N., Ono, S., Mori, H., Wakabayashi, K., Tsuji, S., Takahashi, H. & Shoji, S. (2000) *Neurology* 54: 2319-2321
Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease

7) Ishii, K., Lippa, C., Tomiyama, T., Miyatake, F., Ozawa, K., Tamaoka, A., Hasegawa, T., Fraser, P.E., Shoji, S., Nee, L.E., Pollen, D.A., St. George-Hyslop, P.H., Ii, K., Ohtake, T., Kalaria, R.N., Rossor, M.N., PLantos, P.L., Cairns, N.J., LFarrer, L.A., and Mori, H. (2001) *Neurobiology of Aging* (in press)
Distinguishable effects of Presenilin-1 and APP717 mutations on amyloid plaque deposition

総説

- 1) 新井哲明、森 啓 (2000) カレントセラピー 18 (4), 629-632.
特集：アルツハイマー病をめぐる最近の諸問題
神経原線維変化とタウ蛋白
- 2) 石黒幸一、森 啓(2000) 臨床精神医学講座 S9, 319-332
タウとそのリン酸化、タウ遺伝子の突然変異
- 3) 小坂 理、森 啓(2000) 現代医療 32 (9), 2263-2268
タウ蛋白の変異と痴呆性疾患
- 4) 森 啓 (2000) KEY WORD 精神[第2版], 138-139. (樋口輝彦、神庭重信、染矢俊幸、宮岡 等、編集), (株) 先端

端医学社
アポ E4

2. 学会発表

(2 a) 国内学会

- 1) 詫間 浩, 富山 貴美, 森 啓 (2000) 第19回日本痴呆学会 (口演) (かずさアカデミアパーク, 千葉市, 9月28~29日)
ヒトならびに齧歯類におけるタウ・アイソフォームの発現：種および発達過程における異同

(2 b) 国外学会

- 1) Tomiyama, T., Furiya, Y., Takuma, H. & Mori H. (2000) 30th Annual meeting of Society for Neuroscience (November 4-9, Morial Convention Center, New Orleans, Los Angeles, USA)
A hypothetical mechanism of ApoE-mediated Ab deposition in Alzheimer's disease
- 2) Takuma, H., Tomiyama, T. & Mori H. (2000) 30th Annual meeting of Society for Neuroscience (November 4-9, Morial Convention Center, New Orleans, Los Angeles, USA)
Isoforms changes of tau protein in development and species
- 3) Tamaoka, A., Miyatake, F., Matsuno, S., Ishii, K., Shoji, S., Sahara, S. & Mori H. (2000) 30th Annual meeting of Society for Neuroscience (November 4-9, Morial Convention Center, New Orleans, Los Angeles, USA)
Apolipoprotein E (apoE) allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease (AD)

G. 知的所有権の取得状況

該当する知的所有権はありません。