

蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病 に対する病態解明と創薬探索システムの確立

所 属：国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第五部
研究者：桃井 隆

研究要旨 立体構造異常蛋白の蓄積凝集が引き起こす神経疾患（パーキンソン病、ポリグルタミン病、ALS、プリオン病）などのコンフォメーション病と小胞体（ER）ストレスとの関係が注目されている。本研究は立体構造異常蛋白が示す蛋白分解酵素に対する抵抗性の仕組みを解析し、こうした異常蛋白の蓄積凝集が誘導するコンフォメーション病の病態の解明、および酵母、細胞、マウスの病態モデルを作製し、創薬探索システムを確立し、異常蛋白分解を促進する化合物の探索を目的としている。

分担研究者

- (1) 磯合 敦 旭硝子(株)中央研究所
- (2) 上田 正次 (株)ワイエス研究所
- (3) 日比野利彦 資生堂(株)
ライフサイエンス研究所
- (4) 今泉 和則 宮崎大学医学部
解剖学第一講座
- (5) 南 康文 東京大学大学院

A. 研究目的

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病、プリオン病などの多くの神経変性疾患は有効な治療法がなく、罹患すると患者及び家族に多くの悲劇をもたらす。特に、社会の急速な高齢化に伴うアルツハイマー病及びパーキンソン病の増加、硬膜移植に伴うクロイツフェルトヤコブ病の発症や狂牛病の発生などこの領域での病態解明と有効な治療法確立は社会的要請が大きい。これらの神経変性疾患における共通した脳内病変として、異常タンパク質が神経細胞中の細胞質や核内に蓄積することが挙げられる。異常タンパク質の排除機構の解明とそれを制御する戦略開発あるいは低分子化合物の開発ができれば、コンフォメーション病の病態解明と根本治療法開発に結びつく。

異常タンパク質が細胞内に蓄積すると小胞体の機能が障害され細胞死が誘導されることがよく知られている（小胞体ストレス細胞死）。

Unfolded 蛋白、変性蛋白などの ER での蓄積は、ER ストレスセンサーである Ire-1/PERK/ATF6 を介して unfolded protein response (UPR) により Bip/Grp78 などのシャペロン蛋白や発現を上昇させ折りたたみの正常化が図られ、eIF2 α のリン酸化を介して ATF4

が発現上昇し、また翻訳の停止が図られる。一方、修復できないタンパク質をユビキチン-プロテアゾーム系 (ERAD) に輸送するが、それでも処理できないときは、ER に局在するカスパーゼ 12 を介して小胞体ストレス細胞死 (ER ストレス細胞死) が誘導される。しかし、カスパーゼ 12 はマウスに存在するがヒトでは機能蛋白として発現せず、代わりに別のカスパーゼが関与していると考えられる。

また、一方で蓄積した変異蛋白凝集はユビキチン陽性の像を示すこと、オートファジー形成の阻害によりタンパクの凝集が促進すること、シャペロン蛋白の強発現により異常蛋白凝集が消失することが報告されている。こうしたことから、ユビキチン/プロテアゾームの分解系の抑制や変異蛋白のコンフォメーション異常により変異蛋白質が分解されずに蓄積する事が、多様な神経変性の一つの原因と考えられている。オートファジーは、細胞内の大規模な分解システムで、基本的には常に起こっている状態にあり、細胞質タンパク質やオルガネラの定常状態の代謝回転に働いていると考えられている。今日までにオートファジーの異常を伴う疾患がいくつか報告されているが、その疾患は神経・筋疾患に集中している。神経や筋細胞などの非分裂細胞では老廃物や不要物の処理は必須であり、バルク分解系が重要な役割を担っている。各種神経変性疾患ではこの防御機構が正常に作動せず、異常タンパク質の蓄積を増大させ、神経細胞死に至ると考えられている。

本研究では、培養細胞を用いて異常タンパク質の処理・排出機構を解明し、異常タンパク質蓄積による細胞死を防御・予防する戦略開発の礎を築くことにある。

こうした異常蛋白凝集は小胞体内と外でおこる。小胞体内の場合、小胞体分子シャペロンが誘導され小胞体内腔に蓄積した異常たんぱく質を折り畳むことで細胞死から防御する。本研究は、

1) ヒトコンフォメーション疾患における ER ストレス発生の分子機構と細胞死抑制の分子機構の解明。2) 異常タンパク質の処理・排出を活性化するのに必須の遺伝子の探索を目的としている。

また、ポリグルタミン凝集のように異常蛋白の凝集が小胞体外でおこる場合についても、異常蛋白凝集が誘導する細胞死と凝集抑制の分子機構について解析を目的として、3) 神経変性疾患で観察される空腔 Vacuole 形成がみられるオートファジックな細胞死にはどのような機構が働いているのかを解明するため、ポリグルタミンによるオートファジー形成についての解析。さらに、4) 細胞死の中核をなすカスパーゼ活性化の機構の解明、5) こうした機構を基礎としての疾患治療薬の開発、6) 治療のためのヒト疾患モデル動物の作製を目的とした。

B. 研究方法

1) プラスミド、トランスフェクション、ウエスタンブロッティング

FLAG タグしたマウス OASIS の cDNA は、pCDNA3.1 + に挿入した。OASIS の欠失変異体である del156-OASIS と FLAG-OASIS (374) は、PCR によって作成した。ATF6・ATF6(373)・XBP-1・pGL3-short BiP promoter (-132)-luc・pGL3-middle BiP promoter (-304)-luc は、京都大学の森和俊博士より提供いただいた。pGL2-long BiP promoter (-366)-luc と p5xATF6GL3 は、それぞれ Yoshihiro Omori 博士 (東京大学) と Ron Prywes 博士 (コロネビア大学) から提供いただいた。ノザンブロッティングに使用した Rat GLAST cDNA は、C6 グリオーマ細胞によって抽出された RNA を RT-PCR で増幅して作成した。ヒト EDEM cDNA は、細川暢子博士 (京都大学) から提供いただいた。C6 グリオーマ細胞と HEK293T 細胞に対する発現ベクターのトランスフェクションは、Lipofectamine および Lipofectamine 2000 (Gibco BRL) を用いて行った。構成的に OASIS

を発現する細胞は、G418 (Gibco BRL) を用いて選択を行った。

マルトース結合タンパク質を融合したリコンビナント OASIS (アミノ酸 17-253) に対して作成したウサギ抗血清を ProtOn kit1 (Multiple Peptide Systems) を用いてアフィニティ精製した。抗 FLAG 抗体 (Eastman Kodak Company) ・抗 KDEL 抗体・抗 calnexin 抗体 (StressGen Biotechnologies) ・抗 PARP 抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY) は購入した。抗 ATF6 抗体は、森和俊博士より提供いただいた。

OASIS のウエスタンブロッティングは hot SDS で細胞を溶解し実験に供した。サンプルのタンパク濃度は Lowry assay (DC protein assay, Bio-Rad) によって計測し、タンパク量を等しくそろえて 10% SDS ポリアクリルアミドゲルに展開し常法に従ってウエスタンブロッティングを行った。

2) 低温損傷、免疫組織化学、in situ ハイブリダイゼーション

成体雄 ICR マウスに対して、ペントバルビタール麻酔投与下において、液体窒素で冷却しておいたリード・プローブを頭蓋に 1 分間接触させる低温損傷刺激を行った。損傷刺激の 7 日経過後にマウス脳を解剖し、低温槽において脳組織を 12mm の切片に切り出した。その切片を、in situ ハイブリダイゼーションや免疫組織化学に用いた。in situ ハイブリダイゼーションや免疫組織化学は、常法に従って行った。

3) 酵母の実験

3-1. 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を宿主とする誘導発現ベクター pTI1M5 (共同研究者からの供与) のインベルターゼ遺伝子プロモーター (グルコース飢餓により転写が誘導される) 下流にヒト由来 PA28 γ cDNA の翻訳領域を導入して誘導発現コンストラクトを作製し、分裂酵母に形質転換する。

3-2. PA28 γ の核移行シグナルと考えられている KKRR (a. a. 85-88) を AAAA に改変した cDNA (NLS-: 野生型は NLS+ と呼ぶ) を核移行しないネガティブコントロールとして使う目的から、上記の誘導発現ベクターに導入する。

3-3. PA28 γ を形質転換した酵母を培養し、養液中のグルコース濃度及び細胞増殖 (OD660) を経時的に測定しながらサンプリングし、

PA28 γ のタンパク質発現をウェスタンブロッティングにより解析し、発現誘導の条件検討を行なう。

3-4. 酵母に発現させた PA28 γ がオリゴマー（本来、PA28 γ はヘプタマー）になっているかどうかをネイティブ電気泳動の後、ウェスタンブロッティングにより検証する。

3-5. 酵母の中における PA28 γ (NLS+及びNLS-) の細胞内局在、即ち、核に移行したかどうかを細胞分画により検証する。Zymolyase 処理により細胞壁を分解してスフェロプラストにした後、ダウンスホモジナイザーで破碎し、20,000 x g、20 分の遠心により、核 (ppt) と細胞質 (sup) に分画する。

3-6. 当初の研究計画にはなかったが、ヒト PA28 γ の NLS+ 及び NLS- を pcDNA3-Flag 及び pcDNA3-myc に導入して (Flag または myc のタグが付いた PA28 γ が発現される)、COS7 細胞或いは、PA28 γ 遺伝子をノックアウトした MEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞にトランスフェクトする。

3-7. 酵母及び COS7 細胞或いは、MEF 細胞における PA28 γ の細胞内局在を細胞免疫染色により調べる。酵母については PA28 γ 抗体 (ウサギ) と Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体、哺乳類細胞については Flag 抗体 (マウス) と Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体、または myc 抗体 (ウサギ) と Alexa594 標識抗ウサギ IgG 抗体を使い、蛍光顕微鏡により観察する。

3-8. PA28 γ (NLS+) 誘導発現コンストラクトまたは、(ネガティブコントロールとして) 空のベクター (pTI1M5) を形質転換した酵母を同一条件で培養し、経時的にサンプリングし、ウェスタンブロッティングにより PA28 γ タンパク質の発現を確認した後、常法により mRNA を精製する。

3-9. 精製した RNA にオリゴdT プライマーを加え、逆転写酵素を用いた PCR により Cy3 或いは Cy5 標識を導入した cDNA を合成し、スライドガラス上の DNA マイクロアレー (共同研究者からの供与) にハイブリダイズする。GenePix 4000B を用いたスキャンを行なった後、GenePix Pro 4.0.1.17 により解析する。

4) オートファジー形成の検出

オートファジーの検出には、LC3 抗体を用いた免疫ブロット法により解析を行った。

C2C5 細胞、Atg5+/+MEF 細胞および Atg5-/-MEF 細胞は EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入し、ラパマイシンまたは 3-メチルアデニンを添加し、時間を追って細胞を集めた。集めた細胞は、1% Triton X-100/PBS 溶液で懸濁し、その遠心上清確間を 12% SDS-アクリルアミドゲルにて泳動し、ニトロセルロースフィルターにブロッティングした。抗体と反応させた後、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラビットイムノグロブリンを用い、発色液で反応させた。

5) 細胞染色法

EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入した C2C5 細胞、Atg5+/+MEF 細胞および Atg5-/-MEF 細胞を 2% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、LC3 抗体およびカスパーゼ 12 活性型特異的認識抗体 (anti-m12D341) を用いた免疫染色法を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

6) DNA ラダーの検出

C2C5 細胞は EGFP-Tag を付加したポリグルタミンを導入し、ラパマイシンまたは 3-メチルアデニンを添加し、時間を追って細胞を集めた。集めた細胞は、lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 20mM EDTA, 1% Triton X-100) で懸濁し、遠心上清を RNAse A 処理、proteinase K 処理をし、フェノクロ処理後、DNA をエタノール沈澱にて回収した。回収した DNA は、1.8% のアガロースゲルにて泳動し、ラダーを検出した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトの DNA 解析、ヒト生体試料の使用はなかったため特別な配慮は行わなかった。組換え DNA 実験に関しては、規定に基づき申請し承認された。酵母を用いた発現系を用いており、発現させるタンパク質もヒト由来ではあるものの、既に研究に利用された多くの実績があることから、倫理面での特段の配慮は必要ないと判断した。実験動物を使用する実験においては、動物愛護上の配慮を行い、学内に設置された倫理委員会に諮った上で研究を行った。

C. 研究成果

I. 新規小胞体ストレスセンサーOASIS (今泉)

グリア細胞が小胞体ストレスに対し神経細胞などよりも抵抗性があり、異常タンパク質の排除・分解のシステムが成熟・特殊化している。アストロサイトに特異的に発現する新規小胞体ストレスセンサーOASIS の同定に成功した。

I-1) アストロサイトに発現する新規小胞体ストレスセンサーOASIS

データベースサーチによって新規の小胞体ストレスセンサーの同定を試みた。膜貫通型でかつbZIPドメインを持つか、あるいはキナーゼドメインを持つような小胞体ストレスセンサーとしての構造的特徴を有する遺伝子をピックアップしたところ、ATF6 とよく似た構造を有するいくつかの膜貫通型bZIP転写因子(以下OASIS)を見出した(図1)。

I-2) OASIS は小胞体ストレスに応答して膜内切断を受ける

OASIS はストレスのない状態では約 80 kDa の全長型で存在するが、小胞体ストレスを負荷すると時間依存的に 55 kDa および 50 kDa の断片が産生される。小胞体ストレス以外の刺激を行ってもこの断片は全く観察されないことから、確かに ATF6 と同じように OASIS は小胞体ストレスに応答して膜内切断を受けることがわかった。さらに S1P サイトに点変異を与えた OASIS 変異体は 55 kDa 断片の産生がなくなることから、小胞体ストレスによって出現する 2 つの断片のうち 55 kDa 断片は S1P 酵素によって切断されることも明らかになった。OASIS の膜貫通領域には C 末端側にプロリン残基があり、ATF6 や SREBP にもよく似た部位にプロリンが存在している。またこのプロリン残基は ATF6 および SREBP の S2P による切断に重要であることも示唆されている。OASIS の膜内に存在するプロリンに点変異を与えてみると、小胞体ストレス時に観察される 50 kDa 断片が完全に消失した。つまり膜内切断はこのプロリン残基を認識して S2P によって生じることがわかった。以上の所見をまとめてみると、OASIS は小胞体ストレス時に S1P の存在するゴルジに一旦運び込まれ、膜貫通部位近傍に存在する S1P サイトで第一段階目の切断を受け、その後、膜内で S2P によって切断さ

れる。免疫染色で OASIS の細胞内局在を観察すると、通常は小胞体に存在するが、サブシガルジンなどの薬剤で細胞を処理すると、すみやかにその免疫反応は小胞体からゴルジ、さらには核に移っていく(図1)。小胞体ストレス時の挙動から OASIS は新規の小胞体ストレスセンサーである可能性が強く示唆された。核内に移行する N 末端側には CRE/ATF ファミリーに共通して存在する bZIP ドメインが含まれる。おそらく核内で特定遺伝子の転写調節領域に結合して遺伝子転写に働くことが考えられる。

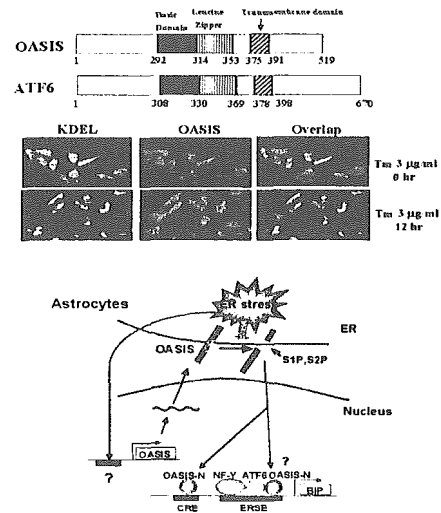


図1. 新規小胞体ストレスセンサーOASISの構造と活性化

OASIS および ATF6 のドメイン構造。OASIS の免疫染色。OASIS を構成的に発現する C6 グリオーマ細胞に 1 μM サブシガルジン (TG) で刺激した。無刺激のときは、OASIS は核周辺に免疫陽性反応が得られ、小胞体分子シャペロンである GRP78/BiP を染める抗 KDEL 抗体と完全にオーバーラップする。TG 刺激後 OASIS は核に強い免疫反応が認められるようになる。OASIS (374) は OASIS の細胞質ドメインのみを発現するプラスミド。この場合、核にのみ免疫反応が観察される。小胞体ストレスが負荷されると OASIS が転写レベルで誘導される。翻訳された OASIS は S1P および S2P によって 2 段階切断を受け小胞体から切り離され核内に移行する。核内では BiP などの遺伝子上流に存在する CRE および ERSE に作用し、それら遺伝子の転写を促進する。

I-3) OASIS のターゲット遺伝子

小胞体ストレスの際に転写レベルで誘導される遺伝子はその上流に ERSE (ER stress responsive element) あるいは CRE (cyclic-AMP response element) 配列を有することが知られている。OASIS がこのようなシス配列に作用

するか否かをリポーターアッセイおよびゲルシフトアッセイで調べた。その結果、OASIS は ERSE にも CRE にも作用しリポーター活性を上昇させることが分かったが、ATF6 が主に ERSE に作用するのにに対して OASIS は CRE に優勢的に作用する特徴を持っていた。ゲルシフトアッセイでは CRE 配列に直接結合することが確認できた。一方、ERSE に対しては直接結合の確認はできなかった。OASIS が ERSE に直接結合するためには何らかの補助因子が必須で今回のアッセイ系にはその因子が欠如していた可能性もある。

このように OASIS が ATF6 と同じように小胞体内の情報を核内に伝えるトランスジューサーの機能をするのがわかったが、小胞体内に蓄積した異常タンパク質を感知するセンサーとしての機能を果たして持っているのだろうか？センサータンパク質として知られる IRE1、PERK、ATF6 はいずれもその管腔ドメインに BiP と結合できる活性をもち、BiP との結合/解離がセンシングに重要な役割を担っている。OASIS の場合は今のところ BiP との結合は証明できていない。OASIS のセンサーとしての機能は BiP との結合/解離を含め今後さらに詳細に検討する必要がある。

I-4) OASIS はアストロサイトにおける小胞体ストレス抵抗性を高める

小胞体ストレスを起こさない刺激、例えばスタウロsporin 刺激などでは OASIS 発現細胞はコントロールと同じようにアポトーシスを起こしたが、小胞体ストレスを誘導するサブシガルジンやツニカマイシン刺激によるアポトーシスに対して抵抗性を示すようになった。逆に OASIS の siRNA を用いてアストロサイトの OASIS 発現をノックダウンさせ、その後 BiP の発現変化と細胞死に対する効果を見てみた。まず OASIS をノックダウンさせると BiP の誘導は小胞体ストレス後 6 時間目ぐらいまではコントロール細胞と同じような挙動を示すが、それ以降は明らかにコントロールレベルよりも発現が減少していた。OASIS が小胞体ストレスに応答して転写・翻訳された後、UPR シグナルを活性化することを考えると、この BiP の発現変化は予想したとおりの結果と言える。つまり、小胞体ストレスがアストロサイトに負荷されると、まずは ATF6 を介し

て UPR を活性化させ(初期応答)、その後 OASIS による二段階目のサバイバルシグナルの活性化(後期応答)というフェーズ依存的な応答系が成り立っているであろう。次に OASIS siRNA を処理した後のアストロサイトにおける小胞体ストレス抵抗性を調べてみると、確かに細胞死は増強されていた。スタウロsporin 刺激で起こるアポトーシスには何ら変化は認められないことから、OASIS をノックダウンさせると小胞体ストレスにのみ抵抗性を減弱させてしまうことが明らかとなった。

II. リフォールディングとプロテアソーム活性化因子 PA28 (南)

タンパク質の立体構造(コンフォメーション)はそれ自身の機能発現を保証するものであるから、タンパク質の正しいフォールディング(=ポリペプチド鎖が折り畳まれること)が細胞にとって非常に重要であることは言うまでもないが、そればかりか、出来損ないのタンパク質はフォールディング途中のタンパク質や不安定な構造を有するタンパク質など、他のタンパク質に結合して凝集し、いわゆるコンフォメーション病の原因ともなる。

そこで、タンパク質のフォールディングを監視し、制御しているのが分子シャペロンである。しかし、それでも上手く行かない場合、その不良品タンパク質を速やかに除去する必要があり、それを担っているのがプロテアソームである。

II-1) 酵母における PA28 γ の細胞内局在
PA28 γ の発現及び細胞内局在を細胞の免疫染色により検証することにした。その結果、NLS+ では PA28 γ 抗体染色と核の DAPI 染色が良く一致し、核への局在が証明された。一方、NLS- では、細胞質の抗体染色が顕著であるものの、核内も染色されており、核に移行していることが判明した(図2)。

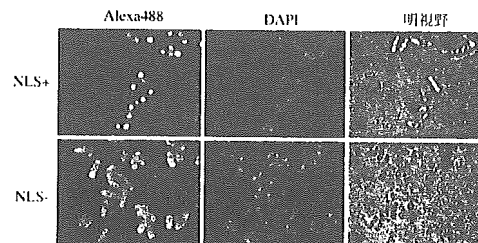


図2 PA28 γ の局在

II-2) MEF 細胞 (PA28 $\gamma^{-/-}$) における PA28 γ の細胞内局在

Flag タグを付けた NLS+ は全て核に移行したが、NLS- は、酵母の場合と同じように、細胞質だけでなく核にも存在していた。ところが、興味深いことには、myc タグを付けた NLS- では、核の染色が抜けている像が認められた。

PA28 γ の分子量は約 30Kd であり、モノマーであれば、自由拡散により核に移行できると考えられる。一方、Flag タグの分子量は 1Kd であるのに対し、myc タグのそれは 6Kd であり、その差が myc タグ付きの PA28 γ モノマーの核移行を妨げる原因であると仮定すると肯ける結果である。従って、ヒト PA28 γ の a. a. 85-88 (KKRR) が NLS であると判断された。

III. オートファジー形成と ER ストレス (磯合、桃井)

III-1) オートファジー形成制御によるポリグルタミン凝集と細胞死の制御

オートファジー形成制御によりポリグルタミン凝集やポリグルタミン凝集による細胞死が制御されるかどうか検討した。C2C5 細胞に polyQ72 を発現させ、オートファジー形成促進剤のラパマイシンとオートファジー形成抑制剤の 3-メチルアデニンを添加したところ、ラパマイシンを添加した細胞ではブロッキングにおいて、カスパーゼ 12 の活性化が抑制され、細胞死 (DNA ラダー) も抑制された。一方、3-メチルアデニンを添加した細胞ではブロッキングにおいて、カスパーゼ 12 の活性化が促進し、細胞死 (DNA ラダー) も促進した。そこで細胞染色によりポリグルタミンの凝集率をおよびカスパーゼ 12 の活性化率を観察したところ、ラパマイシンを添加した細胞ではポリグルタミンの凝集率と共にカスパーゼ 12 の活性化率も減少した。一方、3-メチルアデニンを添加した細胞ではポリグルタミンの凝集率と共にカスパーゼ 12 の活性化率も上昇した。

III-2) ポリグルタミンによるオートファジー誘導

オートファジーは細胞内分解機構の一つで、細胞質成分をリソソームで分解するために細胞質成分をリソソームに運搬するシステムである。不要になった細胞質蛋白質やオルガネラ

を脂質膜が包み込み、オートファゴソームと呼ばれるオルガネラが形成され、これがリソソームと融合する事により、不要物は分解、再利用される。ポリグルタミンによるオートファジー形成について検討した。酵母 Atg8p (Apg8p) のホモログである LC3 は細胞質遊離型の LC3-I で存在し、オートファジー形成のシグナルが入ると C 末端側に脂質修飾を受けて、膜結合型の LC3 (LC3-II) に変換されるとオートファゴソームに局在することが知られている。オートファジー形成の機構を LC3 の膜結合型 (LC3-II) への変換を指標として解析を行った。C2C5 細胞に polyQ72 をトランスフェクション後、48 時間でオートファゴソーム結合型の LC3-II が検出された。免疫染色では polyQ72 凝集を示す細胞で粒状の LC3 が観察されたが、凝集の見られない polyQ11 の細胞や何もトランスフェクションしていない細胞では観察されなかった。

III-3) オートファジー形成とポリグルタミン凝集と細胞死の関係について

オートファジー形成は Atg5/12/16 を介して LC3-I が LC3-II へと変換され、膜に結合し、隔離膜からオートファゴソームが形成され、リソソームと融合し分解が起こる事で完了する。オートファゴソーム形成必須遺伝子 Atg5 の欠損細胞ではオートファゴソームが形成されず、オートファジーによる蛋白質分解が起こらない。この Atg5 欠損細胞に polyQ72 を発現させたところ、LC3-II は検出されず (図 3A)、免疫染色でも粒状の LC3 は観察されなかった。また細胞染色によりポリグルタミンの凝集率をおよび

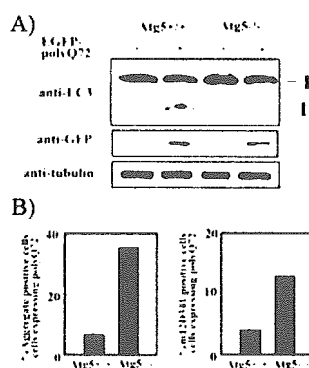


図 3. オートファジーはポリグルタミン凝集を抑制し、ER ストレス細胞死を阻止する。

カスパーゼ 12 の活性化率を正常 (Atg5^{+/+}MEF) 細胞と比較すると、Atg5 欠損細胞では polyQ72 の凝集率が上昇し、カスパーゼ 12 の活性化率が促進していた (図 3B)。

IV) 疾患モデルマウスの作成 (上田)

Foxp2 遺伝子はトリヌクレオチドリピートを持つ cDNA として、ヒト脳の cDNA ライブラリーからクローニングされた。その後、常染色体優性遺伝形式の遺伝型を有する家族性重症言語障害の家系において、Foxp2 遺伝子座の点座、あるいは forkhead domain の一残基のアミノ酸置換を伴う変異が家族性重症言語障害の原因であることが示された。この家系に存在する Foxp2 遺伝子座の変異を導入したノックインマウスを作製することを目的とした。そこで、マウス Foxp2 遺伝子座のコード領域にヒト由来の変異を導入した ES 細胞株を樹立するため、標的遺伝子の遺伝子情報、遺伝子ターゲティングストラテジー、およびターゲティングベクターの構築について検討した。

V) ER ストレスとヒト細胞におけるカスパーゼ活性化 (桃井)

カスパーゼは哺乳類で 12-14 種類が存在するが、細胞死のシグナルにより上位に位置するイニシエーターカスパーゼ (カスパーゼ 8, 9) が活性化されると、下位に位置するエフェクターカスパーゼ (カスパーゼ 3) が切断され活性化され、いわゆるカスパーゼカスケードを介して細胞死がおこる。様々な細胞死のシグナル伝達経路としてミトコンドリアは関与している。すなわち、チトクローム c のミトコンドリアから細胞質への流出により、細胞死の実行と担うシステインプロテアーゼであるカスパーゼ 9 が活性化される。

一方、最近では細胞死の一因として、細胞小器官の一つである小胞体 (Endoplasmic Reticulum: ER) におけるストレス刺激が知られおり、シャペロンによる構造の修復が十分でない場合や、ユビキチンプロテアソーム分解系である小胞体関連分解系 (ERAD) による分解が十分されないとマウスでは ER に局在するカスパーゼ 12 が ER ストレス刺激により活性化され、細胞死を誘導する。しかし、カスパーゼ 12 はヒトでは機能していないことから、相同性の高い他のカスパーゼの探索が必要とされた。

ヒトカスパーゼは 12 種類存在するが、これらの遺伝子をクローニングし、細胞内局在を調べた。小胞体マーカーである KDEL で染色した結果、これらの中でカスパーゼ 4, 5 が小胞体に局在していた。カスパーゼ 4, 5 は CARD 領域を持ち、マウスカスパーゼ 12 と同様な構造であることからマウスカスパーゼ 12 に変わるヒトカスパーゼに値する可能性が示唆された。小胞体誘導試薬によってカスパーゼ 4 が活性化するか否かについて検討を行った。ツニカマイシン、サプリガルジン、ブレフェルジンを追加した結果、時間経過とともに全長の約 50 kDa のバンドの消失が観察された。このことから、カスパーゼ 4 は小胞体ストレスにより活性化されており、マウスカスパーゼ 12 に対応するヒトカスパーゼである可能性が強く示唆された。

VI) 皮膚コンフォメーション病とカスパーゼ 14 活性化 (目比野)

カスパーゼ 14 は皮膚に特異的に局在し、角化層で活性化するカスパーゼとして知られているが、その活性化の機構と意義は依然不明である。そこで活性化に必要な切断点を明らかにする目的で、ヒト皮膚角化層より活性化したカスパーゼ 14 を精製し、活性化断片である 17 KDa (Large subunit)、11 KDa (Small subunit) のバンドを切り出し、N 末端より 5 残基までのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーで測定した。その結果、Large subunit の N 末端は、SLEEE であり、Arg⁵-Ser⁶ の間で切断されていることが明らかとなった。また、泳動後のゲルからバンドを切り出し、ゲル内消化後、MALDI-TOF/MS により質量分析を行い、C 末端の推定を行なったところ、Asp¹⁴⁶ を C 末端とするペプチドの理論値と一致した。Small subunit の N 末端は、KDSPQ であり、Ile¹⁵²-Lys¹⁵³ の間で切断を受けていることが示された。

D. 考察

小胞体ストレスが各種の神経変性疾患の発症に深く関連することが数多く報告されてきている。疾患治療法開発のためには小胞体ストレス応答の全貌解明とその制御法の確立が今後の課題である。特に細胞種特異的ストレスセンサーが細胞ごとに見つかってくれば、より特異的に効果を示す薬の開発につながる。

例えば、黒質ドーパミン神経細胞のストレスセンサーだけを活性化できれば、他の神経細胞に影響を与えることなく、ターゲット細胞のみに小胞体ストレス応答が活性化でき、パーキンソン病で傷害される神経細胞をストレスから守ることができるようになる。

小胞体ストレス研究では克服しなければならない問題がもうひとつある。神経変性疾患発症と小胞体ストレスとの関連性を示唆する知見は、いずれも *in vitro* レベルの解析から得られたものである。実際に脳内で生じる小胞体ストレスがそれら疾患の発症に寄与するかは未だ証明されていない。さらに小胞体ストレス自体ヒトの脳でいつ、どの神経細胞で起こり、どの程度細胞にダメージを与えているかも全く理解されていない。今後は細胞レベルの研究から一步踏み込み、生体内で小胞体ストレスがどのように時間空間的制御を受け、神経細胞の生死に影響を与えているのかを解明しなければならない。このような *in vivo* の解析を行うことにより、神経変性疾患の発症機序の全貌が解明されることを期待したい。こうした研究成果を踏まえ、次年度は以下のような研究を予定している。

I. 酵母、細胞系を用いて異常蛋白分解促進する化合物を探索する。

1) 変異蛋白を発現した酵母、細胞を用いて、i) ER ストレスセンサー機能の活性化、ii) 異常立体構造をときほぐすシャペロン機能の活性化、iii) 小胞体排出分解機構 (ユビキチン/プロテアゾーム系) の活性化し、異常蛋白の分解を促進する化合物を化合物ライブラリーから探索する。酵母系での探索を1次探索系とし、有効な化合物の2次探索として細胞系を用いる。

2) オートファジーに関連する Atg8(LC3)、Atg12 遺伝子に焦点をあて、これら遺伝子の発現調節をする ER ストレスシグナル経路を明らかにする。また Atg8(LC3)、Atg12 遺伝子発現あるいはオートファジー形成を欠損する酵母、細胞系を作製し、オートファジーの異常蛋白の分解、凝集に対する効果を解析する。

II. モデル Tg (ノックイン) マウスの確立

FoxP2 のモデルマウス以外にも、

3) 変異 SOD1, 伸長ポリグルタミン、変異糖鎖転移酵素やさまざまなパーキンソン病原因遺伝子変異を発現するノックイン Tg マウスの作製を順次おこない。作製されたノックイン Tg マウスから、その病態を解析し、疾患モデルとなりうるか否かを検討する(桃井、上田)。

4) シャペロンや蛋白分解 (オートファジー、ユビキチン/プロテアゾーム系) に関与する蛋白を発現する Tg マウスを作製する。

E. 結論

1) 本研究により新規小胞体ストレスセンサー OASIS の同定に成功し、アストロサイトが小胞体ストレスに対し抵抗性を示す原因が OASIS の発現によることを明らかにした。また、プロテアゾームの活性化因子が分子シャペロンとして蛋白発現を調節していることが明らかになった(今泉、南)。

2) 異常蛋白凝集が誘導する ER ストレスにより発現増大する遺伝子を酵母、細胞のマイクロアレイを用いて解析した結果、これまでに、ポリグルタミン (72 リピート) の凝集と ER ストレス誘導剤であるタブシガラジン、およびツニカマイシンは、細胞のオートファジー形成に関与する LC3 (酵母の Atg8 の哺乳類ホモログ) や LC3-I から LC3-II の変換に関与する Atg12 遺伝子の発現を転写レベルで制御していることが明らかになった(磯合、桃井)。

3) ポリグルタミン病、パーキンソン病などの疾患原因遺伝子であるヒト変異遺伝子を導入した(ノックイン)疾患モデルマウスの作製を Red/ET 方法を用いて開始した(桃井、上田)。

4) カスパーゼ 14 の活性化に必要な切断点を明らかにした(日比野)。

F. 研究発表

論文発表

主任研究者

桃井 隆

1) Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. J Chem Neuroanat. 2004 28:101-105 (Review)

2) Ganguly A, Oo TF, Rzhetskaya M, Pratt R, Yarygina O, Momoi T, Kholodilov N, Burke RE.

CEP11004, a novel inhibitor of the mixed lineage kinases, suppresses apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 8, 8469-8480, 2004.

3) Yoneda K, Furukawa T, Zheng YJ, Momoi T, Izawa I, Inagaki M, Manabe M, Inagaki N. An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to tumor necrosis factor alpha-mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex. *J Biol Chem.* 279, 7296-7303, 2004.

分担研究者

日比野 利彦

1) T. Hibino, T., Nishiyama. Role of transforming growth factor- β 2 in the human hair cycle.

J. Dermatol. Sci. 35, 9-18, 2004 (Review)

2) T, Soma., T. Hibino. Dominant Bcl-2 expression during telogen-anagen transition phase in human hair. *J. Dermatol. Sci.* 36, 183-185, 2004

今泉 和則

1) Kondo, S., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Tatsumi, K., Wanaka, A., & Imaizumi, K. OASIS, a CREB/ATF family member, modulates the UPR signaling in astrocytes. *Nature Cell Biology*, 2005 (in press)

南 康文

1) Terasawa, K., Minami, M., Minami, Y. Constantly Updated Knowledge of Hsp90. *J. Biochem.*, in press

2) Murata, S., Minami, M., Minami, Y. Purification and assay of chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP. *Methods Enzymol.* 2005 (in press)

2. 学会発表

主任研究者

桃井 隆

1) 桃井隆、高鹿依子、藤田恵理子、第一回革新脳科学 COE シンポジウム、コンフォメーション病における小胞体が制御する細胞死とオートファジ形成の機構、金沢、2005年1月

分担研究者

日比野 利彦

1) C. Katagiri, K. Kadoya, J. Nakanaishi and T. Hibino. Increased expression of squamous cell carcinoma antigen protects keratinocytes from UV-induced cell death: critical role of SCCA as a natural inhibitor of the stress kinase JNK/SAPK. The Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Providence, RI, April 28-May 1, 2004. (Abstract in *J. Invest Dermatol.* 122, 470A, 2004)

2) 片桐千華、門谷久仁子、仲西城太郎、日比野利彦 「SCCAはケラチノサイトにおけるUV誘導アポトーシスを抑制する」 日本研究皮膚科学会、2004年4月

3) 片桐、仲西城太郎、日比野利彦 「セルピン Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) の新たな役割: SCCAはJNKを介してUV誘導アポトーシスを抑制する」 日本分子生物学会、2004年12月

今泉 和則

1) Imaizumi, K. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. 16th International Congress of the IFAA Kyoto, 2004

2) Imaizumi, K & Tohyama, M. Endoplasmic reticulum stress and neuronal death in Alzheimer disease. ISN symposium Neuro2004 Osaka, 2004.

3) Kondo S, Murakami T, Wnaka A, & Imaizumi K. The regulation of unfolded protein response by OASIS, a transmembrane bZIP transcription factor, in astrocytes. BioScience2004 Glasgow UK, 2004.

4) 近藤慎一、村上智彦、和中明生、今泉和則: 新規小胞体ストレスセンサー-OASISの機能解析、第47回日本神経化学会 大阪 (2004)

5) Murakami, T., Kondo, S., & Imaizumi, K. OASIS, an astrocyte-specific ER stress sensor, is processed by the same proteases that process ATF6. Society for Neuroscience Washington, DC, 2004.

6) Murakami, T., Kondo, S., & Imaizumi, K. OASIS, an ER stress transducer in

astrocytes, is processed in response to ER stress by the same proteases that process ATF6. 27th Annual Meeting of the MBSJ Kobe, 2004.

G. 健康危機情報

なし

H. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし