

「脳を守る」
平成11年度採択研究代表者

垣塚 彰

(京都大学 生命科学研究科 教授)

「神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発」

1. 研究実施の概要

本研究では、独自に開発した培養神経細胞及びトランスジェニックマウス・トランスジェニックショウジョウバエによる神経変性疾患（特にポリグルタミン病）のモデルシステムを用いて、現在治療法の全く無い神経変性疾患の治療及び発症予防のための新しい方法論を開発することを目指している。神経変性疾患は、その症状の多様性から疾患ごとに特有な分子機構に基づいて発症すると考えられてきたが、近年の分子解析の結果、多くの疾患に共通の分子機構が存在することが想定されはじめた。とすれば、一つの疾患モデルを徹底的に解析することにより、一見異なる複数の神経変性疾患に共通する神経細胞変性の分子機構を解明すること、さらに、その共通な部分を治療のターゲットとすることによって、複数の疾患を総括的に治療しうる画期的な治療法開発に繋がることを期待できる。そのために、神経細胞死における細胞死シグナル、生のシグナルを順次解明し、その知見をポリグルタミン病の疾患モデルの解析に応用する。そして、ポリグルタミン病のモデルシステムから見いだされた分子機構を別の疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症等）モデルで検討することによって、疾患間での分子機構の詳細な比較が可能となり、多くの神経変性疾患の総合的な理解・治療に向けて多大な貢献がもたらされると考えている。

2. 研究実施内容

<ポリグルタミン病解析グループ>

- (1) Machado-Joseph病 (MJD) の原因遺伝子産物の切断活性を示す神経細胞株の樹立

我々は、これまでに神経難病Machado-Joseph病 (MJD) の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞蹈病と同じく、原因遺伝子内のCAGの繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを明らかにした。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内のCAGの繰り返し配列が共通にポリグルタミンリピートに翻訳される。我々はこのことに着目し、伸長したポリグルタミンリピートを培

養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ることを見だし、また、マウスの小脳の神経細胞に発現させると小脳の神経細胞が変性・萎縮し小脳失調を示すことを明らかにしてきた。この結果は、ポリグルタミンが神経変性を引き起こす起因物質であることを示すとともに、全長蛋白から、伸長したポリグルタミンを含む部分蛋白質が切り出されることが、神経変性の第1ステップになることを示唆しており、我々は、この考えを「プロセッシングモデル」として提唱してきた。これまでの解析で、増殖性の強い細胞株では、長いポリグルタミンを有していても全長MJD蛋白(例えば79のポリグルタミンリピートを含むMJD79)の発現では、その表現型の変化や凝集性を示す細胞を同定することができなかった。我々は、MJD蛋白をプロセッシングする活性は非常に弱く、分裂に伴い蛋白量が2分される増殖性の細胞では、そのような活性が、もし存在しても、検出出来ないと考え、NGFによってポストミトティックなニューロン様細胞に分化誘導出来るPC12細胞について、NGF添加後にMJD79蛋白質を発現させ、数日間にわたって細胞を観察した。その結果、MJD79蛋白質を発現させた後、1週間から10日後にかけてポリグルタミンの凝集像を示す細胞が、約0.1%以下の頻度で存在することを見いだした。

上記の結果は、非常に頻度が低いPC12細胞には、MJD蛋白質を限定分解する細胞が含まれていることを示唆している。そこで、我々は、MJD蛋白質が切断された細胞で薬剤耐性遺伝子が発現するシステムを構築し、PC12細胞の亜株を選別することにより、切断活性の高い細胞株を選別・樹立することに成功した。このPC12細胞亜株は、MJD蛋白質の切断活性が親株に比べて300倍以上に亢進しており、実際にウエスタンブロッティング法で調べてみると、MJD蛋白は全長のバンドに加えて、さらに一本のポリグルタミンのN末側で切断を受けたと推測できるはっきりとしたバンドが検出された。一方、この細胞では、コントロールとして発現させたハンチントン舞蹈病蛋白質を限定分解する活性は有していないことが判明し、この限定分解の活性はMJD蛋白質に特異的であると考えられた。今後は、この細胞株を用いて、MJDプロセッシング酵素の同定を目指していく。

- (2) ポリグルタミンによる神経細胞変性に関わる蛋白質の生化学的な同定と解析
様々な神経変性疾患において、神経細胞死、変性蛋白の蓄積、細胞質の空胞化などの病理像が見られ、これらは神経変性疾患の共通のメカニズムを反映していると考えられる。この考えに基づくと、細胞には変性蛋白を認知するセンサー蛋白質が存在することが推測できる。そこで、そのようなセンサー蛋白質を同定する目的で、伸長したポリグルタミンを含むMJD蛋白質(MJD79)を用いて細胞抽出液から分子量約100kDaの蛋白質をアフィニティ精製することに

成功し、この分子をPIP-1(polyglutamine-interacting protein 1)と名付けた。精製したPIP-1のトリプシン分解産物に対してマスアナリシス法および蛋白シーケンスを行ったところPIP-1はVCP/p97と言う名前で報告されていたAAA+ familyのATPase蛋白質であった。

VCPはおおよそその構造がX線解析で解かれており、6量体を形成する。我々が行なった欠失変異体の解析でMJD79との相互作用には、N-末近傍の領域が必須であることが判明した。これらの点は、VCPを変性蛋白質に対するセンサーとした場合、以下のような新しい可能性を連想させるものである。すなわち、VCP6量体は異常蛋白質を認識する部位を6ヶ所有しており、6つの場所がどれだけ異常蛋白質で占拠されているかを自分自身で認知することによって、異常蛋白質の濃度を感知しうる可能性がある。これは、今までの受容体がりガンドを認識する方法として知られているものとは全くことなる、新しいセンサー蛋白質の作用機序である。今後、証明していきたい。

次にVCP蛋白質に対する抗体を作成し、VCPと変性蛋白質との細胞内での局在を調べた。その結果、VCPは、ハンチントン舞蹈病やMJDの核内封入体やLewy bodyとの共局在が確認され、種々の変性蛋白を認識・結合することが判明した。さらに、いろいろな場所に変異を導入したVCP変異体の発現実験から、VCPのATP結合領域の変異体が細胞質に巨大な空胞を形成した後、細胞死を誘導することを見出した。これらのことから、VCPは、単にいろいろな異常蛋白質を認識する分子であるだけでなく、種々の神経細胞変性における病態に深く関与する分子であると考えられた。これらの結果から、我々は、VCPを Vacuole Creating Proteinと呼ぶことを提唱する。今後、神経変性疾患におけるVCPの役割を詳細に解明していきたい。

(3) ショウジョウバエの遺伝学を用いた神経細胞死に関与する遺伝子群の同定・解析

ポリグルタミンが引き起こす細胞死のシグナル伝達に関わる遺伝子を同定する目的で、ショウジョウバエの複眼原基特異的プロモーターを使用し、ポリグルタミンを発現させたトランスジェニックショウジョウバエを作製した。このトランスジェニックショウジョウバエでは光受容体細胞と色素細胞の欠失、個眼の融合及び複眼の陥凹を伴う複眼の変性が観察された。続いて、染色体上の種々の欠失した領域をもつ変異体約200系統を用いてこのトランスジェニックショウジョウバエの遺伝的交差の解析を行い、複眼の変性を増強する系統と変性を抑制する系統を複数得た。続いて、これらの欠失領域に存在する個々の遺伝子に変異をもつ変異体を順次取得し、さらなる掛け合わせ実験を行った。その結果、ter94と呼ばれる遺伝子の機能が欠失した変異体で、複眼の変性が顕著

に抑制されることを見いだした。ter94遺伝子はまさにショウジョウバエのVCP遺伝子そのものであり、全く同じ遺伝子が、生化学的な精製法と遺伝学を用いたスクリーニングでともにポリグルタミンと関連する物質として同定されてきたことは驚きにたえない。これらの結果を総合的に解釈するとVCP蛋白質は細胞内に作り出される異常蛋白質を関知するセンサー蛋白質として働くのみならず、異常蛋白質が引き起こす細胞反応に直接関与する蛋白質であると考えられる。したがって、VCP蛋白質のさらなる機能解析を押し進めることで、神経が変性する過程の詳細な分子メカニズムと治療への足掛かりが得られるものと期待し、今後のCREST研究へと展開・発展させていきたい。

< 死のシグナル伝達解析グループ >

神経細胞死に関わる細胞内シグナル伝達機構としてのストレス感受性MAPキナーゼ系によるシグナル伝達機構を明らかにすることを目標として設定し、具体的にはストレス感受性MAPキナーゼ系分子としてのASK1の活性制御機構の解析、ならびにASK1ノックアウトマウスの作製・解析を行い、ストレス感受性MAPキナーゼ系シグナル伝達機構が、神経細胞死に関していかなる役割を果たしているかをASK1-MAPキナーゼ系を中心に解析した。

(1) ASK1活性化機構の解析。

ASK1-MAPキナーゼ系が様々なアポトーシス刺激によってどのようにして活性化されるかを検討するために、ASK1活性制御因子の結合部位をtwo-hybrid法、免疫沈降法等によって詳細にマッピングした。過去の研究成果からASK1活性制御機構の分子機構として、チオレドキシニンならびにTRAF2がそれぞれASK1の活性抑制因子ならびに活性化因子として機能していることが明らかになっていたが、今回の解析により、TNF-TRAF2系によるASK1の活性化機構においてはTRAF2とASK1の結合に先行してチオレドキシニンの不活性化ならびにASK1からの解離が誘導されることが明らかになった。

(2) ASK1-MAPキナーゼ系とNF- κ B経路のクロストーク。

two-hybrid法によるASK1結合蛋白質スクリーニングの結果、新たにTAK1がASK1に結合することが判明した。ASK1はTAK1ならびにTRAF6と直接結合し、IL-1依存性のTAK1-TRAF6複合体形成を阻害しすることによってIL-1誘導性のNF- κ B活性を負に制御することが判明した。

(3) ASK1-MAPキナーゼ系によるアポトーシス実行機構の解析。

ASK1によって誘導されるアポトーシス実行の分子機構を明らかにするために、構成的活性化型ASK1のアデノウイルスベクターを各種カスパーゼノックアウト細胞に発現させ、ASK1によるアポトーシスにおけるカスパーゼの必要性を検討したところ、カスパーゼ3ならびにカスパーゼ9は必要であるがカス

パーゼ 8 は必要ではないことが明らかとなり、またASK1がミトコンドリアからのチトクロームcの放出を誘導することから、ASK1は主にミトコンドリア依存性にカスパーゼを活性化してアポトーシスを誘導することが示唆された。

(4) ASK1-MAPキナーゼ系による分化誘導機構の解析。

アデノウイルスベクターを用い、培養ヒト表皮角化細胞やPC12細胞に構成的活性化型ASK1を発現させると、ASK1はその活性化の程度に応じてアポトーシスのみならず細胞分化を誘導しうることが明らかになった。さらに、p38MAPキナーゼ阻害剤を用いた実験等から、ASK1による細胞分化誘導は主にp38MAPキナーゼが活性化されることによるものであることが示唆された。

(5) ASK1ノックアウトマウスの作製と解析。

ASK1ノックアウトマウスを作製した。ASK1ノックアウトマウスは見掛け上異常を見せずに誕生・成育した。ASK1ノックアウトマウス由来のMEF細胞を用いてTNF、Fas、活性酸素 (H_2O_2) 等のASK1活性化刺激が細胞に及ぼす影響を検討したところ、ASK1^{-/-}-MEFはTNFならびに活性酸素によるアポトーシスに強い耐性をもつことが明らかになり、これまで主にドミナントネガティブASK1等を用いて解析されてきたASK1のプロアポトーティックな機能がノックアウトマウスでも確認された。一方、FasによるJNKならびにp38の活性化はASK1^{-/-}細胞において消失しているにもかかわらず、アポトーシスには耐性を示さなかったことから、FasによるアポトーシスはASK1-MAPキナーゼ系の活性化を必要としないことが示唆された。次にASK1^{-/-}細胞がTNFと活性酸素によるアポトーシスに耐性となる機序について検討したところ、ASK1^{-/-}細胞ではTNFと活性酸素によるJNKならびにp38の持続的活性化が特異的に消失していることが明らかになり、アポトーシス誘導におけるJNKならびにp38の持続的活性化の重要性が強く示唆された。

< 生のシグナル伝達解析グループ >

細胞の生存シグナルは、多様な死シグナル伝達の複数のプロセスを同時に抑制する。従って、生存シグナルの活性化によって効率的に様々な細胞死を抑制できることが期待される。本研究グループは生存シグナル伝達の分子機構を解析し、以下の結果を得た。

(1) PI 3 キナーゼ/Akt経路による細胞生存促進機構の検討

Aktは、様々な系で強力に生存を促進するキナーゼである。近年、Aktがアポトーシス誘導に関与するForkhead等の転写因子をリン酸化することが報告されている。本研究では、アポトーシス誘導に関与することが知られている転写因子Nur77が、Aktのターゲットのひとつであることを明らかにした。Aktは、Nur77のSer350をリン酸化することによって、Nur77の転写活性およびア

ポトシス誘導活性を抑制した。Aktによる Nur77のSer350リン酸化は、Nur77のDNA結合活性を抑制するとともに、Nur77の14-3-3結合を誘導し、転写活性の抑制を引き起こすことが示された。

カスパーは、アポトシスの実行に関わるプロテアーゼのファミリーである。カスパーはカスケードを構成しており、カスパー9はカスパーカスケードの起点に位置する分子である。種々のアポトシス刺激は、ミトコンドリアから cytochrome cの放出を促し、cytochrome cによるApaf-1/カスパー9複合体の活性化を誘導する。我々のグループは以前に、Aktがcytochrome cによるカスパーカスケードの活性化を抑制することを見いだしている。本研究においてAktがカスパー9の2つの部位を特異的にリン酸化し、カスパー9のApaf-1への結合能を抑制していることをはじめて示した。この結果は、Aktがミトコンドリアから下流のアポトシスシグナルを抑制する分子機構を説明するものである。

(2) 神経系前駆細胞の生存促進機構の解析

哺乳類の中樞神経系を構成する神経およびグリア細胞を生み出すのは、神経系前駆細胞（神経幹細胞）と呼ばれる多分化能・増殖能を持つ細胞集団である。この神経系前駆細胞は発生過程で細胞死を起こすことが示唆されており、人為的に細胞死を抑制したマウスでは過剰な神経を生じ脳の肥大奇形をまねく。よって神経系前駆細胞の未分化状態を維持しつつ適切な細胞数を保つことは個体発生の上で重要であり、その生死を制御するメカニズムが存在すると考えられる。我々はその生存を促進するシグナル伝達経路の解明を目的とし、マウス胎生11日目の神経上皮細胞の初代培養系を用いて解析を行った。神経系前駆細胞をin vitroで培養する際、bFGFやEGFなどの増殖因子が不可欠であるが、我々は培養系からこれらの増殖因子を除去することによりアポトシスを観察した。そこでbFGF受容体からいかなるシグナル伝達で生存を促進しているかを検討し、Akt経路とそれ以外の生存シグナル伝達が重要であることが明らかになった。増殖因子以外にも、細胞密度依存的な生存促進因子の存在が示唆され、細胞間相互作用に関わる分子Notchの生存促進効果が認められた。現在神経系前駆細胞におけるこれらの生存シグナル伝達メカニズムについて検討を進めている。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Maeda, H., Segawa, T., Kamoto, T., Yoshida, H., Kakizuka, A., Ogawa, O., & Kakehi, Y. : Rapid detection of candidate metastatic foci in the orthotopic inoculation model of androgen-sensitive prostate cancer cells introduced with green fluorescent protein. *The Prostate*, 45, 335-340 (2000)

Kakizuka, A. : Molecular mechanisms underlying neuronal cell death in polyglutamine diseases. *Neurochem. Res.*, 25, 990(2000)

Kamei, Y., Fujitani, Y., Ohizumi, H., Kawada, T., Miyoshi, M., & Kakizuka, A. Activation of the adaptive thermogenesis program in PGC- 1 transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, in revision(2001)

Yasuda, S, Hori, S., Maeda, H., Maeda, R., Gotoh, Y., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Kakizuka, A. : As₂O₃ treatment recruits Daxx and ASK 1 to re-organized PML bodies and activates the SEK 1 -JNK cell death kinase cascade in APL cells *Cell Death & Differentiation*, in revision(2001)

垣塚 彰 ヒト疾患の遺伝的解析からのアプローチ:神経変性疾患 蛋白質・核酸・酵素 45, 792-797(2000)

垣塚 彰 ポリグルタミン病発症の分子機構 脳21 3, 165-170(2000)

垣塚 彰 遺伝性神経変性疾患の分子解析 北野紀要 45, 42-60(2000)

垣塚 彰 優性遺伝性運動失調症の発症機構 神経研究の進歩 44, 993-998 (2000)

垣塚 彰 ポリグルタミン病とポリグルタミン凝集の分子メカニズム 神経難病の分子機構 (石浦章一編) 183-191 (2000)

Takeda, K., Hatai, T., Hamazaki, S., Nishitoh, H., Saitoh, M., & Ichijo H. : Apoptosis Signal- regulating Kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 Cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 9805-9813 (2000)

Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Kyriakis, J.M. : Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)by tumor necrosis factor receptor- associated factor 2(TRAF2) requires prior dissociation of the ASK 1 inhibitor Thioredoxin. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 2198-2208(2000)

Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H., & Bazenet, C.E. : Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c- Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 196-204(2000)

Hatai ,T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H., & Takeda, K. : Execution of ASK 1 -induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J. Biol. Chem.*, 275, 26576-26581(2000)

Cai, Y., Zhang, C., Nawa T., Aso, T., Tanaka, M., Oshiro, S., Ichijo, H., & Kitajima, S. : Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH2 terminal kinase and promoter response

element. Blood, 96, 2140-2148 (2000)

Mochida, Y., Takeda, K., Saitoh, M., Nishitoh, H., Amagasa, T., Ninomiya-Tsuji, j., Matsumoto, K., & Ichijo, H. : ASK1 inhibits IL-1-induced NF- κ B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. J. Biol. Chem., 275, 32747-32752 (2000)

Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H., & Greene W.C. : HIV-1 nef inhibits ASK1-dependent death signaling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. Nature, 410, 834-838 (2001)

Sayama, K., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Yamasaki, K., Sawada, Y., Sun, L., Yamanishi, K., Ichijo, H., & Hashimoto, K. : Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. J. Biol. Chem., 276, 999-1004 (2001)

Sawada, Y., Nakamura, K., Doi, K., Takeda, K., Tobiume, K., Saitoh, M., Morita, K., Komuro, I., Kurt De Vos, Sheetz, M., & Ichijo, H. : Rap 1 is Involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase. J. Cell Sci. 114, 1221-1227 (2001)

Noguchi, K., Kokubu, A., Kitanaka, C., Ichijo, H., & Kuchino, Y. : ASK 1 -signaling promotes c-Myc protein stability during apoptosis. Biochem Biophys Res Commun., 281, 1313-1320 (2001)

Cho, S.-G., Lee, Y., Park, H.-S., Ryoo, K., Kang, K., Park, J., Eom, S.-J., Kim, M., Chang, T.-S., Choi, S.-Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.-S., Lee, M.-J., Kim, S., Ichijo, H., & Choi, E.-J. : Glutathione s-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) J. Biol. Chem., 276, 12749-12755 (2001)

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., & Ichijo, H. : ASK 1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. EMBO reports, 2, 222-228 (2001)

森田圭一、一條秀憲 セリン・スレオニンキナーゼを介したアポトーシス制御機構
医学のあゆみ 194, 314-318 (2000)

松沢 厚、一條秀憲 神経細胞におけるアポトーシス制御因子とその制御機構
生体の科学 51, 266-272 (2000)

一條秀憲 : (初耳辞典) Apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1) 生体の科学 51, 343 (2000)

後藤由季子、高橋良輔 細胞死の分子メカニズム - 多様性への理解 -
Molecular Medicine, 37, 384-390 (2000)

- 鶴田文憲、増山典久、後藤由季子 生存シグナルとアポトーシスシグナルのクロス
トーク 実験医学, 18, 1384-1390 (2000)
- 浦 誠司、後藤由季子 PI 3 K-Akt経路のシグナル伝達 現代科学、増刊37, 95-103
(2000)
- 森 靖典、後藤由季子 サバイバルシグナルとアポトーシス - 生のシグナル: Akt
を中心に - Apoptosis Watch for Cancer Chemotherapy, 3, 14-15 (2000)