

「脳を守る」

平成 11 年度採択研究代表者

垣塚 彰

(京大生命科学研究科 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す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踏病と同じく、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踏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 とい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関知しうる可能性がある。これは、今までの受容体がリ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、ハンチントン舞踏病や 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、チオレドキシシンならびに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シンの不活化ならびに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- $\kappa$ 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 複合体形成を阻害することによって IL-1 誘導性の NF- $\kappa$ 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)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<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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) PI3 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ー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。

カスパーゼは、アポトーシスの実行に関わるプロテアーゼのファミリーである。カスパーゼはカスケードを構成しており、カスパーゼ9はカスパーゼカスケードの起点に位置する分子である。種々のアポトーシス刺激は、ミトコンドリアから cytochrome c の放出を促し、cytochrome c による Apaf-1/カスパーゼ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 によるカスパーゼ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 がカスパーゼ9の2つの部位を特異的にリン酸化し、カスパーゼ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ー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ーシスを観察した。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. 研究実施体制

垣塚グループ<ポリグルタミン病解析グループ>

### ① 研究分担グループ長名

垣塚 彰(京都大学生命科学研究科高次生体統御学分野、教授)

### ② 研究項目

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

一條グループ<死のシグナル伝達解析グループ>

### ① 研究分担グループ長名

一條 秀憲(東京医科歯科大学医歯学総合研究科、教授)

② 研究項目

死のシグナル伝達機構の解析

後藤グループ<生のシグナル伝達解析グループ>

① 研究分担グループ長名

後藤 由季子(東京大学分子細胞生物学研究所、助教授)

② 研究項目

生のシグナル伝達機構の解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

<ポリグルタミン病解析グループ>

- 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. : As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment recruits Daxx and ASK1 to re-organized PML bodies and activates the SEK1-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)

<死のシグナル伝達解析グループ>

- Gelezianus, 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. : Rap1 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. : ASK1-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. : ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports*, 2, 222-228 (2001)

<生のシグナル伝達解析グループ>

(2) 特許出願

国内出願 0 件

海外出願 1 件