

「脳を守る」

平11年度採択研究代表者

垣塚 彰

(京都大学大学院生命科学研究科 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

本研究は、神経変性の基本メカニズムを解明し、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。そのために、ポリグルタミン病をモデルにした実験系を樹立し、これら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基本原理を分子レベルで解明してきた。得られた実験結果を他の疾患と比較解析し、ポリグルタミン病のみならず、パーキンソン病などの神経変性疾患の発症にVCPと呼ばれるATPaseが鍵分子として機能しているとする考えを支持する証拠が蓄積しつつある。

2. 研究実施内容

垣塚グループ：

Machado-Joseph病の原因蛋白質を対象として、ポリグルタミン病の発症機構について分子解析を行い、以下の結果を得た。

1) MJD原因蛋白質のプロセシング活性を有する神経細胞株の選別と解析

我々は、Machado-Joseph病(MJD)発症の第1ステップを担うと考えられるMJD蛋白質を特異的にプロセシングする酵素を同定するために、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、MJD蛋白質を切断する活性の高いPC12細胞亜株を選別・樹立することに成功した。このPC12細胞亜株では、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、MJD蛋白質は200~250番目のアミノ酸の近傍で切断を受けると推測された。次に我々は、これらの細胞株、すなわちMJDプロセシング酵素活性のほとんど無い元の細胞とその活性が増強している細胞株から、mRNAを抽出し、DNAチップを用いた解析を行った。その結果、発現が大きく増加、減少している遺伝子がそれぞれ十数個ずつ存在することが明らかになった。現在、これらの全長cDNAを単離して、機能解析を進めている。

2) ポリグルタミンなどの異常蛋白質の蓄積を感知する蛋白質の同定と解析

細胞内には、変性蛋白を感知するセンサー蛋白質が存在するとの仮定のもと、そのような仮想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PIP-1(polyglutamine-interacting protein 1)をアフィニティ精製した。PIP-1に対して質量解析および蛋白質シークエンシングを行ったところPIP-1はVCP/p97と言う名前で報告されている6量体として働くAAA familyのATPaseであった。

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の核内封入体やパーキンソン病のLewy bodyとの共局在が確認され、ポリグルタミンのみならずA β や α -synuclein等の種々の変性蛋白質を認識・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2番目のATP結合領域の変異体(K524A)が細胞質に小胞体由来の巨大な空胞を多数形成した後、細胞死を誘導することを見出した。VCP (K524A)は、内在性のVCPと一緒に六量体を形成することが判明し、レコンビナントVCPを発現・精製後、そのATPase活性を測定したところ、VCP (K524A)は、ATPase活性をほとんど消失していることが明らかになった。VCP (K524A)が引き起こす表現型が、神経変性疾患の病理像、ポリグルタミンの発現やプロテアゾーム阻害剤で細胞を処理した時の表現型にきわめて似通っていることから、異常蛋白質と結合したVCP六量体はその結合に比例してATPase活性が低下し、その結果ドミナント・ネガティブ的に働くことが、神経変性疾患でのtoxic gain-of-functionの本体の一つであろうと推測された。

3) ドロソフィラの遺伝学を用いた神経細胞死に関与する遺伝子の同定・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、複眼の変性を引き起こすモデルショウジョウバエを樹立した。この複眼の変性は、p35等のcaspase阻害物質では抑制を受けず、caspase非依存性の細胞死であると考えられた。続いて、遺伝学的スクリーニングによって、遺伝子機能の変異が複眼の変性を抑制する遺伝子として、ter94 (ドロソフィラVCP) 遺伝子を同定した。複眼の変性の改善が最も顕著であったter94の変異体 (ter94²⁶⁻⁸) でも、ポリグルタミンの凝集には影響が見られず、VCPの変異体ではポリグルタミンの凝集からの細胞死シグナルがブロックされていることが示唆された。また、ter94の過剰発現でショウジョウバエの複眼の変性を認めた。このter94の過剰発現による変性も、ポリグルタミンと同様、caspase阻害因子では抑制されなかった。一方、両者の変性は、シャペロン活性を消失させたHsp70によって阻害された。以上の結果は、ポリグルタミンが引き起こすcaspase非依存性の細胞死シグナルはVCP/ter94から発し、それはシャペロン活性に非依存的にHsp70によって阻害されることを示している。

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感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 (特に空胞形成とcaspase非依存性の細胞死) に直接関与する蛋白質であると考えられた。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、さらには、治療への足掛かりを得ることができると考えている。

一條グループ：

多様な神経変性疾患において神経細胞死誘導に比較的共通のメカニズムとして注目される小胞体ストレスシグナル伝達経路におけるASK1-MAPキナーゼ系の役割の解析を中心に研究を行い、以下の結果を得た。

1) 小胞体ストレス誘導性細胞死におけるASK1の役割

蛋白質が正しい構造をとるように折りたたまれること(folding)は、細胞内においてその蛋白質が正常に機能する上で必須である。そのfoldingが行われる場である小胞体での異常蛋白質の蓄積は、小胞体ストレスとして感知され、様々な細胞内反応を引き起こす。本年度我々は、小胞体膜上の受容体であるIRE1が、アダプター分子TRAF (TNF receptor associated factor) 2を介してASK1を活性化することを見いだした。ASK1ノックアウト由来線維芽細胞ならびに神経細胞を用いて小胞体ストレス感受性を検討したところ、ASK1が小胞体ストレス誘導性細胞死に必須の因子であることを突きとめた。

2) ポリグルタミン発現による小胞体ストレス誘導

テトラサイクリン誘導系を用いたPC12細胞のポリグルタミン過剰発現系において、polyQ79が小胞体ストレスを引き起こすこと、ならびにASK1-MAPキナーゼ経路を活性化することを明らかにした。

3) ポリグルタミン発現によって誘導される神経細胞死におけるASK1の役割

アデノウイルスベクターに導入したポリグルタミンの過剰発現系を用い、ASK1ノックアウト由来神経細胞でのポリグルタミン感受性を検討したところ、ASK1がポリグルタミン誘導性神経細胞死に必須の因子であることが示唆された。

以上の結果から、ASK1-MAPキナーゼ系が神経変性疾患治療のためのターゲット分子として極めてユニークかつ有力な候補分子であることが示唆された。

後藤グループ：

1) 神経系前駆細胞の生存促進機構の解析

神経系前駆細胞の生死制御機構についてはその重要性にも関わらず殆ど不明であった。本研究グループは、Notchが神経系前駆細胞の細胞密度依存性の生存促進を誘導することを見いだした。興味深いことに、この生存促進効果には、Notchによる分化抑制に重要なRBP-J/HES 経路は必要ないことが分かった。そこで次にNotchの変異体を用い、Notchのどの部位が生存促進に重要かを検討したところ、RAMドメインが必要であることが明らかになった。また、活性型Notchの発現により、生存促進型Bcl-2ファミリーメンバーのBcl-2およびMc1-1の発現が誘導されることも示された。NotchによるBcl-2, Mc1-1の発現にもNotchのRAMドメインが必要であった。現在更にBcl-2, Mc1-1の神経系前駆細胞の生存における役割について検討中である。

2) PI3キナーゼ/Akt経路による細胞生存促進機構の検討

Aktがp53を抑制するメカニズムについて検討したところ、p53の分解を誘導するユビキチンリガーゼMdm2を、Aktが直接にリン酸化し活性化することが明らかになった。AktによるMdm2のリン酸化部位(Ser186)はin vivoの生存促進的な条件下でリン酸化されているこ

と、またこの部位をAlaに置換したMdm2はp53ユビキチン化活性・p53分解促進活性が顕著に消失しておりAktによる活性化を受けないことも示された。

3. 研究実施体制

垣塚グループ

- ① 研究分担グループ長：垣塚 彰（京都大学大学院・生命科学研究科・教授）
- ② 研究項目：ポリグルタミン病の分子解析
 - 1) MJDの原因蛋白質のプロセッシング活性を有する神経細胞株の選別と解析
 - 2) ポリグルタミンなどの異常タンパク質の蓄積を感知する蛋白質の同定と解析
 - 3) ドロソフィラの遺伝学を用いた神経細胞死に関する遺伝子の同定・解析

一條グループ

- ① 分担グループ長：一條 秀憲（東京大学大学院・薬学研究科・教授）
- ② 研究項目：死のシグナル伝達機構の解析
 - 1) 小胞体ストレス誘導性細胞死におけるASK1の役割
 - 2) ポリグルタミン発現による小胞体ストレス誘導
 - 3) ポリグルタミン発現によって誘導される神経細胞死におけるASK1の役割

後藤グループ

- ① 研究分担グループ長：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
 - 1) 神経系前駆細胞の生存促進機構の解析
 - 2) PI3キナーゼ/Akt経路による細胞生存促進機構の検討

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

（垣塚グループ）

- Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., & Kakizuka, A. (2002) Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 9: 264-273.
- Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., & Kakizuka, A. (2002) Unequal crossing-over in unique PABP2 Mutations: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Archives Neurology* 59: 474-477.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Dev.* 16:1345-1355.

- Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., & Fujita, T. (2002). Circumvention of chaperone requirement for aggregate formation of a short polyglutamine tract by the co-expression of a long polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 277:37536-37541.
- Kobayashi, T., Tanaka, K., Inoue, K. & Kakizuka, A. (2002) Functional ATPase activity of p97/VCP is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 47358-47365.
- (一條グループ)
- Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K. & Ichijo, H. (2002) Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid. Redox Signal*, 4: 415-425.
- Tobiume, K., Saitoh, M. and Ichijo, H. (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J. Cell. Physiol.*, 191: 95-104.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. & Miura, M. (2002) Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.*, 4: 705-710.
- Matsuura, H., Nishitoh, H., Takeda, K., Matsuzawa, A., Amagasa, T., Ito, M., Yoshioka, K. & Ichijo, H. (2002) Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway: a new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *J. Biol. Chem.*, 277: 40703-40709.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Dev.* 16:1345-1355.
- Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A. & Ichijo, H. (2002) Phosphorylation and Inactivation of Mcl-1 by c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 277: 43730-43734.
- Takeda, K. & Ichijo, H. (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. (review) *Genes Cells*, 7: 1099-1111.
- Gilot, D., Loyer, P., Corlu, A., Glaise, D., Lagadic-Gossmann, D., Atfi, A., Morel, F., Ichijo, H. & Guguen-Guillouzo, C. (2002) Liver protection from

apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J. Biol. Chem.*, 277: 49220-49229.

- Jibiki, I., Hashimoto, S., Maruoka, S., Gon, Y., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Horie, T. (2002) Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates nitric oxide-induced activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167: 856-861.
- Saeki, K., Kobayashi, N., Inazawa, Y., Zhang, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Saeki, K., Isemura, M., Yuo, A. (2002) Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem. J.*, 368: 705-720.

(後藤グループ)

- Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamaguchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K. & Kato, S. (2003) Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat. Cell Biol.* 5: 224-230.
- Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogiwara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Abe, M., Shojima, N., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. & Asano, T. (2003) Three Mitogen-Activated Protein kinases inhibit Insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinology* 17: 487-497.
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2003) Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 277: 21843-21850.
- Tsuruta, F., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2002) The PI3K-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277: 14040-14047.
- Shinohara, M., Terada, Y., Iwamatsu, A., Shinohara, A., Mochizuki, N., Higuchi, M., Gotoh, Y., Ihara, S., Nagata, S., Itoh, H., Fukui, Y. & Jessberger, R. (2002) SWAP-70 is a guanine nucleotide exchange factor that mediates signaling of membrane ruffling. *Nature* 416: 759-763.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：5件）