

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題「VCP 蛋白質の機能修飾を介した
神経変性疾患の治療戦略の構築」

研究期間：平成 16 年 11 月 1 日～
平成 22 年 3 月 31 日

垣塚 彰
(京都大学大学院生命科学研究科、教授)

1. 研究課題名

VCP 蛋白質の機能修飾を介した神経変性疾患の治療戦略の構築

2. 研究概要

現在我が国は、世界最高レベルの医療制度を誇っているが、神経変性疾患に代表されるいわゆる難治性疾患（難病）に対しては、画期的といえる治療法の開発は遅々として進んでいない。今後超高齢化社会に突入するわが国において、認知症に代表される神経変性疾患を患う患者の急激な増加が予想され、今十分な対応策を講じておかなければ、今後予想される医療費と人的負担の膨大な増加は、わが国の存亡をも左右しかねない事態になることは確実である。この状況は多くの先進国にも当てはまるが、世界でもっとも顕著な高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、この分野の研究の推進ほど緊急かつ重要な科学政策はないとさえ言える。

神経変性疾患のみならず現在治療法がない難病に対する治療戦略を構築しようとする場合、同じ方法(薬剤)によってできるだけ多くの疾患を治療することが理想的である。そのためには、多くの疾患の病態の根幹となる共通メカニズムを解明し、そこを治療標的とすることが何より重要となる。神経変性疾患は疾患ごとに特有の障害部位を有し、症状があまりにも多岐にわたるため、多くの疾患に当てはまる発症の共通メカニズムは長く想定されることはなかった。我々は、神経変性疾患に共通する分子メカニズムの解明を目指し、90年代初頭から研究を開始した。そして 1994 年には、遺伝性脊髄小脳変性症である Machado-Joseph 病(MJD)の原因遺伝子の同定に成功し、MJD がハンチントン病(HD)と同じく原因遺伝子内のポリグルタミンをコードする CAG の繰り返し (CAG リpeat) 数が伸長することが遺伝子レベルでの原因であることを明らかにした。1996 年には MJD 蛋白質に由来する伸張したポリグルタミンが神経細胞内で凝集し、神経細胞の変性・細胞死を引き起こすことを実験的に見だし、MJD や HD と同じ遺伝子変異により発症する 9 つの遺伝性神経変性疾患を「ポリグルタミン病」と呼ぶことを提唱した。さらに、他の優性遺伝性神経変性疾患（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）においても、原因遺伝子から作られる異常な蛋白質が細胞内外で凝集・蓄積することによって神経細胞が変性に陥り脳から脱落していくことが主要な病態であることを提唱した。

神経変性疾患に認められる凝集物、例えばポリグルタミンの凝集物の病理的な意義として、凝集物自体が直接的に細胞に障害を与えたり、重要な細胞内因子をトラップして細胞毒性を果たすとの考えがある。我々は、これらの考えとは別に、異常蛋白質の蓄積・凝集に対して生体反応が起こり、それが行き過ぎた状態が神経変性を引き起こしているという立場で研究を進めている。即ち、異常蛋白質の蓄積が引き起こす細胞の生体応答（フィードバック機構）こそが共通のメカニズムであり、その解明が多くの神経変性疾患に適応する治療法の開発に繋がるものと考えている。

このようなフィードバック機構を想定した時、異常蛋白質の蓄積を認知するセンサー蛋白質の存在が推測できる。そこで、そのようなセンサー蛋白質の候補を見つける目的で、伸張したポリグルタミンに結合する蛋白質の同定を試みたところ、分子量約 100kDa の蛋白質を精製・同定することに成功した。この蛋白質は、VCP (valosin-containing protein) という名前で報告されていた AAA ファミリーに属する ATPase であった。続いて、VCP 蛋白質に対する抗体を作成し、VCP と種々の神経変性疾患で認められる変性蛋白質との細胞内での共局在を調べた。その結果、VCP は、HD や MJD の核内封入体やパーキンソン病などで認められるレビー小体、さらには運動ニューロン内の蛋白質凝集体との共局在が確認され、複数の神経変性疾患で病因蛋白質と考えられる変性蛋白を認識し、結合していることが判明した。さらに、ショウジョウバエを用いた遺伝学的なスクリーニングでポリグルタミンが引き起こす複眼変性を軽減する遺伝子として *ter94* 遺伝子（ショウジョウバエの VCP）遺伝子の機能低下変異を同定した。これらの結果から、同じ VCP 蛋白質が、異常蛋白質のセンサーとして働くのみならず、ポリグルタミンが引き起こす細胞変性・細胞死の実行蛋白質と働いていることが強く示唆された。さらに 2004 年には、前頭側頭型変性痴呆を伴う Inclusion Body Myopathy with Paget disease of bone and Frontotemporal Dementia (IBMPFD) と

いう優性遺伝病の原因遺伝子として VCP 遺伝子が同定され、疾患を引き起こす幾つかのミスセンス変異が明らかになった。さらに、我々は VCP 蛋白質がリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を強く受ける蛋白質であること、また、VCP の ATPase 活性が酸化を受けると容易に失活することなどを見いだしていた。

このような背景のもと、神経変性疾患の根幹となるフィードバック機構には VCP の機能修飾が強く関与するとの考えに至り、本研究を提案するに至った。即ち、本研究では、研究代表者がこれまでに開発してきた伸長したグルタミンリピート（ポリグルタミン）を発現させるトランスジェニックマウス・ショウジョウバエ及び培養神経細胞による神経変性疾患のモデルシステムを駆使して、これらのモデルにおける VCP の役割を解析することによって、神経変性疾患の根幹となるフィードバック機構の解明を目指すことを狙いとした。さらに、酵母やショウジョウバエの遺伝学を用いて、VCP 蛋白質の新たな機能や想定されるフィードバック機構に関わる他の蛋白質の同定と役割を解明すること、そして、得られた知見から、現在治療法のない神経変性疾患の治療及び発症予防のための全く新しい方法論（戦略）を開発するための基盤の構築を目指した。

本研究で明らかになった点は以下のように要約される。

- I. VCP 蛋白質の定常状態でのアミノ酸修飾を網羅的に解析し、報告のあった 4 ヶ所のセリンに加え、少なくとも新たに 10 個所のセリン、14 個所のスレオニン、6 個所のチロシンがリン酸化を受け、22 個所のリジンがアセチル化の翻訳後修飾を受けることを明らかにした。この内、16 個のアミノ酸修飾がこれまで機能が知られていない D2 α 領域(646~765 のアミノ酸に対応)とよばれる種間で良く保存された領域に集中していた。実際、この領域の Lys696 と Thr761 のアミノ酸を修飾模倣体や非修飾模倣体に置換すると VCP の ATPase 活性が変化することが判明し、我々は、これまで機能が全く解っていなかったこの D2 α 領域を VAR (VCP ATPase Regulatory) domain と呼ぶことを提唱した。
- II. VCP は、何も処理していない培養細胞では細胞質に均質に分布するが、ポリグルタミンの凝集を持つ PC12 細胞などの培養神経細胞では、VCP は凝集体と共局在することに加え、たとえポリグルタミンの凝集が細胞質にある場合でも、VCP が核に集積することを免疫染色法で見いだした。同様な核への集積は、ポリグルタミンを発現させたマウス小脳プルキンエ細胞、ショウジョウバエの複眼、そして、MJD の患者さんの神経細胞で確認できた。この VCP の核移行には VCP の Ser612、Thr613、Lys614 のアミノ酸修飾が関与していること、即ち、これらのアミノ酸修飾を模倣するアミノ酸に置換した VCP(DEQ)を PC12 細胞に発現させると VCP(DEQ)は核に局在するばかりか、神経突起の退縮と細胞体積の減少をしめした（この表現型を atrophic phenotype と呼ぶ）。この時、コアヒストンである H3 や H4 のアセチル化の低下を伴う転写機構の抑制とそれに引き続く全般的な蛋白質の合成抑制が引き起こされた。さらに、VCP の核移行を阻害した PC12 細胞やショウジョウバエの複眼では、ポリグルタミンによって引き起こされるそれぞれ atrophic phenotype と複眼の変性の抑制が観察され、どちらの場合もコアヒストンのアセチル化の低下も回復していた。これらの結果から、細胞質にポリグルタミンのような異常蛋白質が蓄積すると VCP はアミノ酸修飾を受け、その結果核に移行し、コアヒストンの脱アセチル化を伴う転写の抑制を引き起こし、蛋白質合成を抑制するというフィードバック機構が存在することが示された。遺伝子や環境などの変化で過剰に供給された異常蛋白質の蓄積が長く解消しないような場合には、このフィードバック機構が過度に働き、神経細胞の萎縮が生じることが推測される。すなわち、この本来神経細胞を異常蛋白質の蓄積から防御するためのフィードバック機構が、神経変性を引き起こす主要な要因の一つとなることが推測された。
- III. ポリグルタミンを発現させたショウジョウバエの複眼やマウス小脳プルキンエ細胞において、DiOC₆(3)という色素に対する著しい染色性の低下が観察された。ショウジョウバエの複眼をすり潰し、詳細な解析を行ったところ、ポリグルタミンの発現によって、フォスファチジルイノシトール(PI)、フォスファチジルコリン(PC)、フォスファチジルエタノールアミン(PE)、フォスファチジルセリン(PS)などのリン脂質のうち、PE と PC が全体量として明らかに減少していることが判明した。より詳細な解析により、ポリグルタミ

ンを発現させたショウジョウバエの複眼では、リノール酸(18:2)を含む幾つかのリン脂質が相対的に激しく減少していること、さらに、餌にリノール酸を加えて飼育した場合には複眼の変性に変化はなかったが、リン脂質を豊富に含む鶏卵抽出エキスを最も低下の激しかったリノール酸を2個含む PE(18:2/18:2)を餌に混ぜて与えた場合には、複眼の変性が有意に回復した。この時、ポリグルタミンの凝集体の量や大きさには際立った変化は観察されなかった。また、内在性 ter94 の核移行およびアセチル化ヒストンの低下にも際立った変化は観察されなかった。前述の解析結果と併せて考えると、ポリグルタミンの発現による病態には少なくとも2つの作用点、すなわち核における修飾 VCP が引き起こす作用と細胞膜におけるリン脂質の異常（含有量の低下と組成の変化）が存在することが示唆された。

IV. VCP は、ポリグルタミンの凝集体のみならずレビー小体などに共局在する。さらに、プロテアゾーム阻害剤によって形成されるアグレゾームにも集積することから VCP は、細胞内の凝集体に対して何かの積極的な働きを行っていると考え、その意義を培養細胞を用いて解析した。その結果、VCP は ATPase 活性を用いて、アグレゾームに代表される細胞内の凝集体を解体する機能があることが明らかになった。一方、VCP をノックダウンさせた細胞や ATPase 活性が低下した変異 VCP を発現させた細胞では、アグレゾームやポリグルタミンの凝集体が形成され難くなる。以上の結果は、VCP は、単に異常蛋白質を認識して結合するだけでなく、ATPase 活性によって細胞内の凝集体の形成と分解の双方を仲介している蛋白質であることを示している。次に、IBMPFD に同定された変異 VCP の解析を行った。解析したすべての IBMPFD-VCP は、ユビキチン化された蛋白質との結合能が亢進していること、その ATPase 活性が亢進していること、そして、アグレゾームやポリグルタミン等の凝集体形成能が亢進していることを見いだした。これらの変異 VCP は、単独でショウジョウバエの複眼に発現させても何も表現型を示さなかった。しかしながら、ポリグルタミンと共発現させるとポリグルタミン単独の場合に比べて顕著に複眼の変性を増強した。ところが培養細胞の場合と異なり、この時、ポリグルタミンの凝集体の数や大きさに明らかな変化は観察されなかった。すなわち、IBMPFD に同定された変異 VCP は、異常蛋白質と共存した時に、細胞の変性を増強する活性があること、そしてその主要な原因は ATPase 活性の上昇であることが示唆された。

V. VCP と物理的に相互作用する分子として PEX19 を同定した。PEX19 はペルオキシゾームへ膜蛋白を運搬することが知られている蛋白質である。そこで、ペルオキシゾームを含め細胞内小器官への蛋白質輸送と VCP の関係を解析した。その結果、VCP 及び PEX19 のノックダウン細胞では、カタラーゼが細胞質に蓄積することが判明し、VCP/PEX19 は複合体としてカタラーゼのペルオキシゾームへの輸送を担っていることが明らかになった。カタラーゼが細胞質に漏れ出ている VCP ノックダウン細胞では、basal level のみならず H₂O₂ などの ROS を産生する薬剤で処理した時の細胞内の ROS の量が劇的に減少することが観察された。VCP は ROS に出会うと主要な ATPase ドメイン内の 522 番目の Cys(Cys522)が酸化され、ATPase 活性が失活する。実際、VCP のノックダウンと同様なカタラーゼの細胞質への蓄積が、ATPase 活性をなくした VCP の過剰発現でも観察され、ROS を産生する薬剤で処理した細胞では、カタラーゼが細胞質に漏れ出てくる像が観察された。さらに、このカタラーゼの細胞質への漏出は、VCP の過剰発現で抑制された。これらの結果から、我々は細胞内酸化に対する以下のような新たなフィードバック機構の存在を提唱する。即ち、VCP は細胞内で ROS を感知するセンサー機能があり、VCP の Cys522 が酸化を受けるとカタラーゼをペルオキシゾームに運搬する機能が低下し、細胞質にカタラーゼが増加し ROS の分解が亢進する。その結果、ROS が減少し、細胞内の抗酸化物質の回復が進む、それに伴い VCP の Cys522 の酸化も徐々に解消し、VCP の ATPase 活性が回復すると共に、カタラーゼがペルオキシゾームに再び運搬されるようになる。IBMPFD の原因となるような ATPase 活性の上昇した VCP の元では、カタラーゼのペルオキシゾームへの運搬が過度に強くなり、結果として、ペルオキシゾーム以外の細胞質や核での ROS レベルが上昇し脳や筋肉では組織障害に繋がっている可能性が推測される。

VI. VCP 蛋白質の新たな機能を探る目的で2つの方法を用いて出芽酵母での遺伝学的解析

を行った。一つの方法では、VCP の発現がないと生育できない温度感受性株の樹立を行い、37°C（制限温度）では VCP の発現がないと生育できない温度感受性株を分離した。この株では、GPI10 という ER で GPI アンカーを形成するマンノシルトランスフェラーゼ遺伝子内のミスセンス変異が温度感受性の原因変異となっていることを突き止めた。この温度感受性株を VCP の発現がない状態で 37°C で飼育すると出芽の停止とそれに引き続いて DNA の過剰複製が生じることが判明し、VCP の発現によって出芽の回復と DNA の過剰複製の抑制が観察された。以上の結果から、VCP には、少なくとも酵母において、出芽の手助けと DNA の過剰複製を抑制する機能があることが示唆された。

もう一つの方法では、出芽酵母の VCP ホモログである Cdc48 の温度感受性株 (Cdc48-3) をレスキューする multi-copy suppressor の同定を行い、Rfu1 (Regulator of free ubiquitin chain 1) と名付けた遺伝子を同定した。遺伝学的解析及び生化学的解析から、Rfu1 は Doa4 と呼ばれる脱ユビキチン化酵素の活性を阻害する negative regulator であると結論した。細胞内のユビキチンは、モノマー (free Ub)、オリゴマー (Ub chain)、蛋白質に結合したコンジュゲイティドフォーム (conjugated Ub) の 3 つの形態で存在する。なかでも free Ub は直接ユビキチン化に利用されるため、その量は厳格に調整される必要がある。例えば heat shock 時には変性蛋白質の処理のために大量の free Ub が消費されるが、減少した free Ub がどのように補われるかはこれまで明らかになっていなかった。本研究で、heat shock により、Rfu1 の減少と Doa4 の増加が起こることによって、Ub chain から free Ub が供給されることが明らかになり、Ub chain が平常時では free Ub のリザーバーとしての役割を担うこと、そして、そのリザーバーからの free Ub の放出時に脱ユビキチン化酵素とその negative regulator のバランスをシフトすることで調節が行われていることを明らかにした。この調節機構は free Ub の量を維持するためのフィードバック機構と思われる。

VII. 培養細胞の培地に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を加えるだけで、細胞内の RNA 合成（特に rRNA）を autoradiography で簡単に検出できることを見だし、この方法を VRS 法 (Visualization of RNA Synthesis method) と名付けた。いろいろな条件や試薬を加えた後 VRS 法で rRNA 合成を調べたところ、細胞をツニカマイシン (Tm)、サブシガルジン (Tg)、プロテアゾーム阻害剤 (PSI) で処理すると著しい rRNA の合成低下が引き起こされることが判明した。これらの薬剤に共通する作用として ER ストレス誘導が知られている。実際、ER 膜に存在する 3 つのセンサー蛋白質、IRE1 α 、PERK、ATF6 の内、PERK のノックダウンで Tm、Tg による rRNA の合成抑制が解除された。一方、PERK ノックダウン時でも PSI による rRNA の合成抑制の解除は起こらなかったが、PSI 処理時には、PERK の下流である eIF2 α のリン酸化が観察され、このリン酸化が Tm、Tg、PSI 処理時に共通する作用点であることが判明した。eIF2 α のリン酸化は翻訳抑制を引き起こすことが知られており、PSI 処理、サイクロヘキサミド処理、また eIF2 α のノックダウンによっても翻訳抑制がおり、同時に rRNA の合成抑制が生じることが判明した。この時、細胞内の ATP 量を測定すると ER ストレス時での ATP の減少を rRNA の合成抑制によって軽減していることが明らかになり、細胞が ATP を過剰に消費するようなストレス化では、rRNA の合成を低下させることで細胞内の ATP の低下を抑制するメカニズムが存在することが判明した。eIF2 α の Ser51 のリン酸化は、酸化ストレス、アミノ酸飢餓、ウィルス感染、紫外線を浴びた時等にも誘導される。即ち、生体は、ATP の消費を伴う多種多様なストレス存在下で eIF2 α のリン酸化を通して、翻訳抑制のみならず、rRNA の転写の抑制を誘導し、ATP の節約を行っていることが明らかになった。節約された ATP は、例えば ER ストレスの場合、シャペロンの機能、ER からの異常蛋白質の引き出し、ユビキチン化、プロテアゾームによる蛋白質分解などで有効に利用されるのであろう。本システムは、ATP を必要とするストレス時に ATP の減少を緩和するために生体が持っているフィードバック機構の一つであると考えられる。

VIII. リコンビナント VCP の ATPase 活性を指標に、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、1 μM 以下の IC₅₀ で VCP の ATPase 活性を阻害する物質を見出した。これらの物質をリード化合物として、新規化合物の合成を行った。

3. 研究構想

生物はいろいろな内的及び外的な環境の変化（ストレス）に巧みに対応することで、恒常性の維持を成し遂げている。これがストレス応答で、その中で最も普遍的に使われているシステムがフィードバック機構である。生物の進化を考えた時、本質的に生物が疾病のためのメカニズムを選択することはないと思われる。原型はあくまでも生物のためのメカニズムであるはずである。しかし、本来生物にとって有利であるはずのストレス応答機構であるが、時にその反応が過剰に起こることで、生物にとって返って不都合な状況が作り出されることがある。例えば、ウィルスや細菌感染時での免疫反応は、本来、生体を病原体から守るシステムであるが、過剰な免疫反応は体力の消耗を招き時に患者を死に至らしめる。我々は、多くの神経変性疾患の根底にある分子機構には、異常蛋白質の蓄積・凝集に対して生体が反応しているフィードバック機構があり、それが行き過ぎた状態が神経変性を引き起こしているという考えを基本として研究を行っている。本研究では、このフィードバック機構の中心に VCP という ATPase を位置づけ、神経変性疾患における VCP の役割の解明を主目的とした。この目的のため、神経変性疾患のモデルとしては、「ポリグルタミン病」を用い、我々が長年に渡り開発してきたポリグルタミンを発現させるトランスジェニックマウス・ショウジョウバエ及び培養神経細胞によるモデルシステムを駆使し、これらのモデルにおける VCP の役割を解析すること、LS/MS/MS を用い VCP の正常およびポリグルタミン病モデルでの VCP のアミノ酸修飾を同定しその意義を解明すること、ポリグルタミンなどの異常蛋白質の凝集体形成における VCP の役割を解明すること、VCP と相互作用する蛋白質を網羅的に解析すること、酵母やショウジョウバエの遺伝学的手法を用いて VCP と機能的に相互作用する分子の同定とその解析を計画した。VCP と相互作用する蛋白質の網羅的解析から VCP が PEX19 と協調してカタラーゼのペルオキシゾームへの輸送を制御することが判明したので、その意義を解明する実験を計画した。また、ポリグルタミン病のモデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン発現細胞で著しいリン脂質の減少が起こっていることを見いだしたので、このリン脂質の減少の意義を解明する実験を計画した。さらに、ストレス化での ATP 量の制御という視点から、rRNA の合成を簡便に解析する方法を開発し、ストレス下での ATP の節約における rRNA 合成抑制の意義を解明する実験を計画した。

具体的には、以下の実験を行った。

- I. VCP のアミノ酸修飾の解析
- II. VCP が担う異常蛋白質に対するフィードバック機構の解明
- III. ポリグルタミンの発現によって著減するリン脂質の解析
- IV. 凝集体形成における VCP の両面性機能の解明
- V. VCP が担う酸化解消フィードバック機構の解明
- VI. 酵母を用いた VCP と機能的相互作用をする新規機能蛋白質の解析
- VII. ストレス時での ATP の節約のためのフィードバック機構の解明
- VIII. VCP の ATPase 活性を制御する物質の同定

4. 研究実施内容

(1)実施の内容

I. VCP のアミノ酸修飾の解析

I-1. VCP の蛋白質構造

VCP は、ATPase のサブファミリーとして AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities)に属する。AAA に属する ATPase は、共通する構造として、ATP を結合する Walker A モチーフ(WA)、ATPase の加水分解に関わる Walker B モチーフ(WB)に加えて、それらの C 末部位によく似たアミノ酸配列からなる SRH(Second region of homology)領域をもつことを特徴とし(図 1)、この WA、WB と SRH 領域の協調作用で ATP を加水分解すると考えられている。VCP は、大きく 4 つの領域、N 末領域、D1 ATPase (D1)領域、D2 ATPase (D2)領域、C 末領域からなり、2 つの AAA family に特徴的な ATPase 領域を持つ(図 1)。その内、主要な ATPase 活性を担うのは D2 ATPase 領域と考えられている。2 つの ATPase 領域には ATPase

ドメインに続いて機能未知な α ヘリックスに富む領域が続き、それぞれ D1 α 、D2 α ドメインと呼ばれる(図 1)。N 末領域は、ユビキチンや変性蛋白を結合・認識する機能および Npl4、Ufd1、p47 などの co-factor との結合領域であることが示されている。

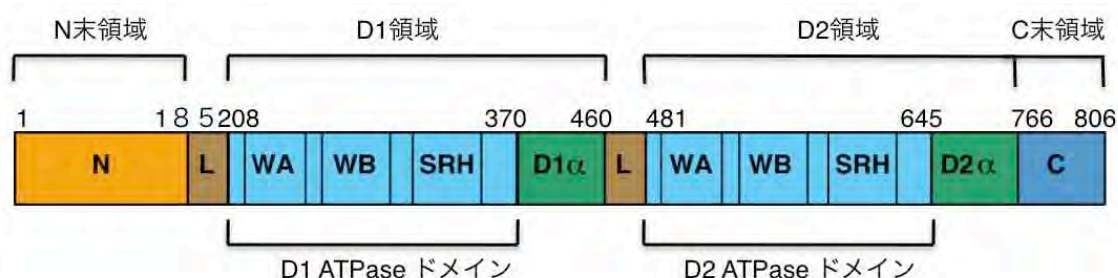


図 1. VCP の蛋白質構造の模式図

VCP 蛋白質は、N 末領域、2つの ATPase (D1 and D2) 領域と C 末領域から構成される。ATPase 領域には、Walker A モチーフ (WA)、Walker B モチーフ (WB) と second region of homology (SRH) からなる ATPase ドメインがあり、各 ATPase ドメイン (D1 and D2) から、それぞれ D1 α and D2 α ドメインと呼ばれる α -ヘリックスに富むドメインが続く。L: リンカードメイン。

I-2. VCP 内の新規アミノ酸修飾部位の同定

VCP の ATPase 活性を阻害もしくは活性化する物質をスクリーニングするためにバキュロウィルスを用いた発現系でリコンビナント VCP を大量に作成した。この VCP を 2 次元電気泳動法を用いて解析すると等電点の異なる複数のスポットとして観察された。そこで、それぞれのスポットを切り出し、MALDI-TOF 解析を行った。その結果、このリコンビナント VCP は幾つかの場所でリン酸化とアセチル化を受けていることが示唆された。VCP がアセチル化を受けるとの報告はこれまでになく、VCP のような細胞質に主に局在する蛋白質がアセチル化を受ける例はチュブリンなど一部の蛋白質にも見られるが、それほど一般的ではない。VCP のアミノ酸配列は種間で非常によく保存されており、例えば、ヒト、マウス、ラットでは完全に一致し、ヒトとショウジョウバエの間でも 84% のアミノ酸が一致する。さらに、このリコンビナント VCP に推測された修飾を受けるアミノ酸及びその周辺のアミノ酸配列は種間で良く保存されており、これらのアミノ酸修飾は、VCP の種を超えた多機能性に密接に関わっていることが推測された。そこで、FLAG タグの VCP をヒトの HEK293T 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降させた VCP のアミノ酸修飾の全容解明を目指した。これまでに、VCP 内の翻訳後アミノ酸修飾を受ける部位として、Ser7, Ser352, Ser746, Ser748, Ser784, Tyr805 が知られていたが、LC/MS/MS 法による質量解析を行った結果、これまでに同定されていた 4 個所のセリンに加え、少なくとも新たに 10 個所のセリン、14 個所のスレオニン、6 個所のチロシンがリン酸化を受け、22 個所のリジンが、アセチル化の翻訳後修飾を受けることが明らかになった。

これらの修飾アミノ酸の内、16 個が N-末端領域、15 個が D1 領域、29 個が D2 領域に同定された。C-末端領域は対応するペプチド自体が検出されず、イオン化が難しいことが推測された。D2 領域の内、16 個が D2 α 領域に集中していた。アセチル化修飾を受けるリジンには、WA 内の ATP の結合に必需の Lys251 と Lys524 が含まれており、これらのリジンが直接アセチル化を受けることで D1、D2 領域の ATPase 活性が失活する場合があることが示唆された。N-末端領域は、Ufd1 などのパートナー蛋白質の結合領域であるので、これらの修飾によってパートナーの使い分けが行われていることが予測される。一方、D2 α 領域の機能は不明であったが、D2 α 領域そのもの、さらには同定された修飾を受けるアミノ酸は、種間で非常によく保存されており、これらの修飾が種間を超えて VCP の機能修飾に関わることが予測された。実際、この領域の Lys696 と Thr761 のアミノ酸を修飾模倣体や非修飾模倣体に置換すると VCP の ATPase 活性が変化することが判明し、この領域のアミノ酸修飾によって VCP の ATPase 活性が調節されている可能性が示された。これらの結果から、我々は、これまで機能が全く解っていなかったこの D2 α 領域を VAR (VCP ATPase Regulatory)

domain と呼ぶことを提唱した。

I-3. VCP 蛋白質の Thr761 のリン酸化の解析

前述したように、Thr761 番目のスレオニンをリン酸化を模倣する酸性アミノ酸であるグルタミン酸もしくはアスパラギン酸に置換した VCP(T761E)、VCP(T761D)は、野生型に比べて 2~3 倍の ATPase 活性を示した。このような強い ATPase 活性をもつ VCP が存在するならば、おそらく何か特別な機能を担っていることが推測される。そこで、Thr761 をリン酸化スレオニンに置換したペプチドを合成し、このリン酸化を特異的に認識する抗体を作成し、細胞染色を行った。するとこの抗体は、間期ではセントロゾームを細胞分裂期にはスピンドルポールとミッドボディを特異的に染色した (図 2)。これらの結果は、リン酸化もしくはアセチル化を受けることによって VCP の ATPase 活性や局在がコントロールされている可能性を示唆している。即ち、VCP の多機能性は、たくさんのアミノ酸が修飾されることで発揮されることが強く推測される。

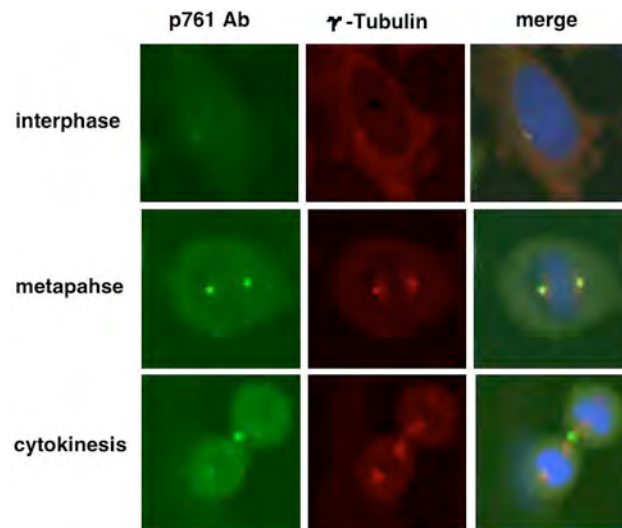


図 2. 761 番目の Thr のリン酸化を認識する抗体での細胞染色像

761 番目の Thr のリン酸化を認識する抗体は、増殖期にある HeLa 細胞で、間期ではセントロゾームを細胞分裂期にはスピンドルポールとミッドボディを特異的に染色した。

FLAG タグを付けた野生型 VCP と VCP(T761E)を培養細胞に発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降した後、抗ユビキチン抗体や VCP の co-factor である Ufd1、Npl4、p47 に対する抗体と一緒に落ちてきたこれらの蛋白質量を western blot で定量した。一緒に落ちてきたこれらの蛋白質の量は、両者でほとんど違いがなかった (後述)。次に、VCP(T761E)をショウジョウバエの複眼に発現させた。VCP(T761E)の単独発現では、複眼の変性を誘導することはなかった (後述)。一方、VCP(T761E)を全身で発現させたショウジョウバエは、野生型ショウジョウバエを全身で発現させた場合に比べて短命であることが明らかとなった (後述)。

II. VCP が担う異常蛋白質に対するフィードバック機構の解明

II-1. ポリグルタミンの発現とヒストンのアセチル化の低下

これまでに幾つかのグループが、ポリグルタミンの発現によりコアヒストンである H3 や H4 のアセチル化の低下を伴う転写機能の低下が引き起こされること、その時、ヒストンのアセチル化(HAT)活性をもつ CBP などの主要な転写 co-activator がポリグルタミンの凝集に巻き込まれることによって細胞全体で HAT 活性の低下が起こることを提唱していた。

同様な結果が観察されるかどうかを H3 の Lys9 / Lys14 のアセチル化、H4 の Lys5 のアセチル化を認識する抗体を用いて我々の実験系で検証した。例えば神経様細胞である PC12 細胞では、ポリグルタミンの発現によってこれら 2 つの抗体が認識するヒストン H3 と H4 のアセチル化の低下が観察された。しかしながら、このアセチル化の低下はブチレイトなど

のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤で正常細胞と同レベルまで復帰したことから、ポリグルタミンによって観察されるヒストンのアセチル化の低下は、HAT 活性の低下ではなくヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の活性の亢進によることが示唆された。ポリグルタミンを発現するマウス小脳プルキンエ細胞でも、同様な H4 のアセチル化の低下が観察されたが、H3 のアセチル化はあまり影響を受けていなかった。

培養細胞をより詳細に観察すると、ポリグルタミンの凝集を核に持つ細胞よりポリグルタミンの凝集を細胞質に持つ細胞の方が、かえってヒストンのアセチル化の低下が強く起こっている像が観察された(図 3)。次に、核移行シグナル(NLS)もしくは核排除シグナル(NES)を付加した 79 リピートのポリグルタミン(Q79)を PC12 細胞に発現させ、ヒストンのアセチル化の低下を観察した。すると、やはり、細胞質で凝集体が形成される NES-Q79 を発現させた時の方が、核で凝集体が形成される NLS-Q79 を発現させた時よりも多くの細胞でヒストンのアセチル化の低下が観察された。ヒストンのアセチル化の低下が観察された PC12 細胞では、神経突起の退縮が引き起こされるが、HDAC 阻害剤によってこの退縮は抑制できなかった。従って、ヒストンのアセチル化の低下は、マーカーとしては優れているが、病態の本体とは少し離れたものと考えられた。

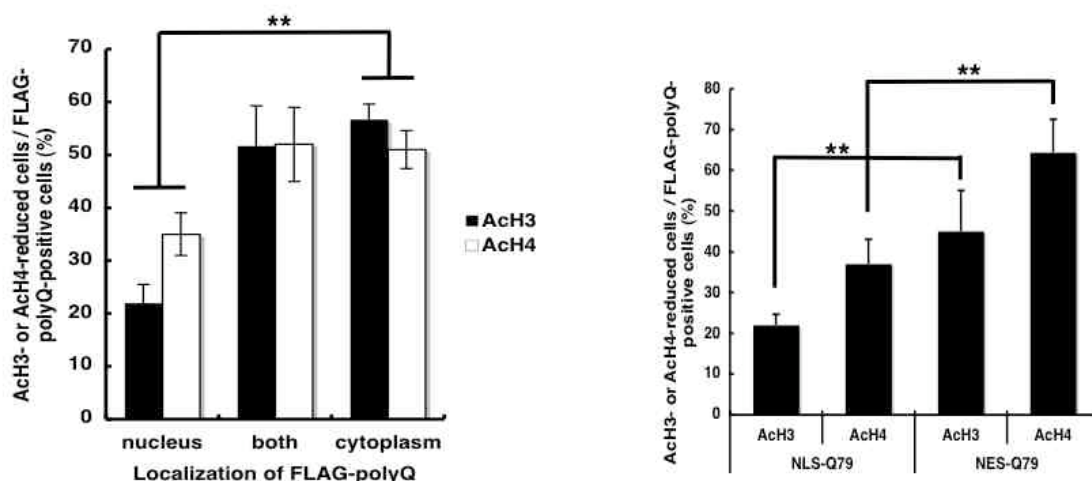


図 3. ポリグルタミンの発現場所とアセチル化ヒストンの低下

H3/H4 のアセチル化の低下を示す細胞は、核内にポリグルタミンの凝集をもつ細胞より細胞質にポリグルタミンの凝集をもつ PC12 細胞で、より高頻度に観察された。 $**p < 0.01$

これらの観察結果は、従来考えられているメカニズムではなく、ポリグルタミンのような異常な蛋白質が細胞（特に細胞質）に蓄積すると核に情報が伝わり、ヒストンの脱アセチル化を伴う転写機構の抑制が引き起こされるとの考えによく合致すると思われた（後述）。

II-2. VCP の核移行と新たな連続するアミノ酸修飾

VCP 蛋白質に対して免疫染色を行うとほとんどの細胞で細胞質が均質に染色される。一方、ポリグルタミンを発現させた PC12 細胞やマウス小脳プルキンエ細胞で VCP を免疫染色すると VCP はポリグルタミンの凝集体に強く局在する。

それに加えてポリグルタミンの凝集体を持つ細胞では、たとえポリグルタミンの凝集が細胞質にあっても VCP が核へ移行している細胞が頻繁に観察されることに気がついた(図 4)。同様に、ポリグルタミン病の一つである Machado-Joseph 病 (MJD) の患者さんの罹患部位の脳切片の染色を行うとポリグルタミンの凝集を持つ神経細胞で有意に VCP の核移行が確認され、ポリグルタミンの凝集を持つ神経細胞では、VCP の核移行が引き起こされていることが示唆された。即ち、VCP は前述した核への情報伝達を担う分子の候補としての性質を備えていると考えられた。

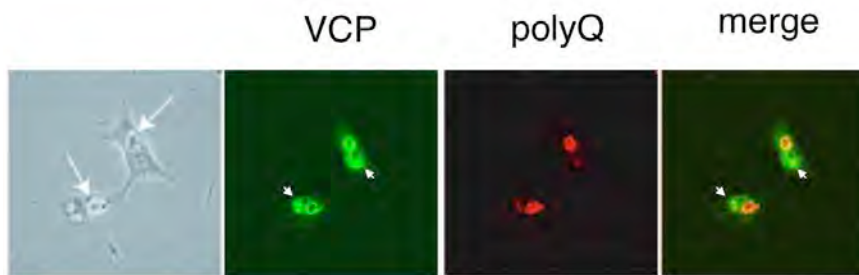


図 4. 神経細胞におけるポリグルタミンの凝集と VCP の局在

79 リピートのポリグルタミン(polyQ)(赤)を発現させた培養 PC12 細胞では、VCP(緑)は、ポリグルタミンの凝集に局在することに加え、核に移行する (矢頭)。

この VCP の核移行には VCP のアミノ酸修飾が関わると予測し、ポリグルタミンと FLAG タグの VCP を共発現させた細胞から VCP を回収し、LC/MS/MS 法による修飾アミノ酸の同定を行った。すると、伸長したポリグルタミンと共発現した場合に、VCP 内の哺乳動物で良く保存されている Ser612、Thr613、Lys614 がそれぞれリン酸化、リン酸化、アセチル化を受けていることが明らかとなった (図 5)。このような 3 つのアミノ酸の同時修飾は、細胞をプロテアゾーム阻害剤で処理した場合にも観察されたが、健常者の長さのポリグルタミンとの共発現では観察されなかったため、この修飾は異常蛋白質の蓄積と関連する修飾であることが示唆された。

	612 613 614
Human	EMDGMST KKNVFI
Rat	EMDGMST KKNVFI
Mouse	EMDGMST KKNVFI
Xenopus	EMDGM S I KKNVFI
Drosophila	EMDGMGA KKNVFI

図 5. ポリグルタミンの蓄積・業種に伴い修飾を受ける VCP 内のアミノ酸部位

II-3. 修飾模倣体による表現型

この修飾の意義を解析するために、修飾を模倣するアミノ酸置換を行った。例えば、Ser のリン酸化を模倣するアミノ酸として酸性アミノ酸であるアスパラギン酸(D)に、Thr のリン酸化を模倣するアミノ酸としてやはり酸性アミノ酸であるグルタミン酸(E)に、リジンのアセチル化を模倣するアミノ酸として中性アミノ酸であるグルタミン(Q)に、さらに、修飾を受けないアミノ酸としてアラニン (A) への置換をいろいろなコンビネーションで行い、PC12 細胞に発現させた。すると、3 つのアミノ酸を全て修飾模倣体に置換した VCP (以下 VCP(DEQ)と呼ぶ)を発現させた細胞では、VCP(DEQ)の核局在が 60%以上の細胞で観察された。さらに驚いたことに、VCP(DEQ)が核移行した細胞では、PC12 細胞の神経突起の退縮と細胞体の萎縮が観察された (図 6) (以下、この表現型を *atrophic phenotype* と呼ぶ)。

この時、VCP(DEQ)体の核移行によって、ヒストン H3 と H4 のアセチル化の低下が誘導されることが判明した。これらの観察結果は、まさに VCP が核への情報を伝達する分子であることを強く示唆している。

次に、単に VCP の核移行が重要なのか VCP の修飾体の核移行が重要なのかを調べるために、核移行シグナル(NLS)、核排除シグナル (NES) を野生型 VCP 及びいくつかの代表的な修飾模倣体に付加して PC12 細胞に発現させ、その表現型の観察を行った。その結果、野生型 VCP を NLS で強制的に核移行させてもヒストンのアセチル化の低下及び *atrophic phenotype* は全く誘導されなかった。一方、VCP(DEQ)に NES を付けて核に行かなくした場合も両者は全く誘導されなかった(図 6)。これらの結果から、Ser612、Thr613、Lys614 の 3 つのアミノ酸修飾を受けた VCP の核移行が、ヒストンのアセチル化の低下を伴う *atrophic*

phenotype の誘導に重要であることが明らかとなった。

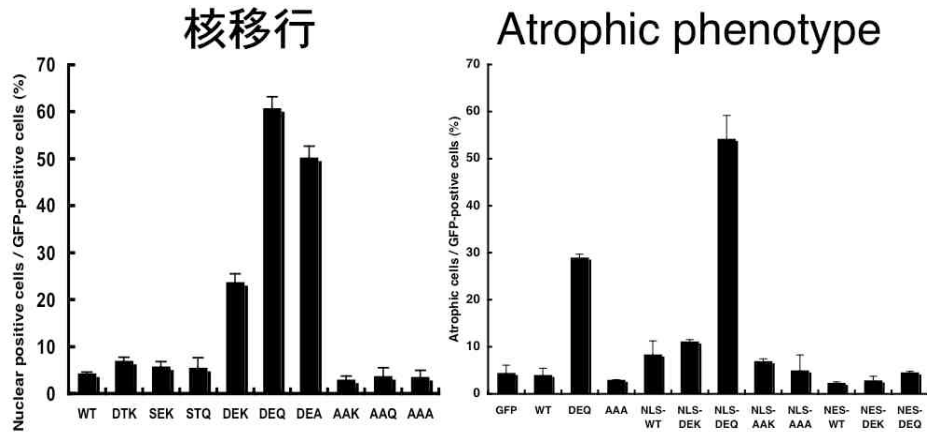


図 6. 野生型 VCP と修飾模倣体 VCP の核移行と atrophic phenotype の関係

II-4. VCP の核移行の阻害と atrophic phenotype の抑制

次に、VCP の核移行を阻害することで、ポリグルタミンの発現によって誘導されるヒストンのアセチル化の低下と atrophic phenotype の抑制を引き起こせないか検証した。多くのキナーゼでは、活性化に伴うリン酸化部位をアラニンに置換すると野生型に対してドミナントネガティブ体として働くことが示されている。VCP は 6 量体を形成することから、Ser612、Thr613、Lys614 を全てアラニンに置換した VCP(AAA)が野生型 VCP のポリグルタミンによる核移行を阻害する可能性を検証した。しかしながら、VCP(AAA)の過剰発現によってもポリグルタミン発現時での内在性 VCP の核移行を阻害することはできなかった。次に、NES を用いて内在性 VCP の核移行を阻害する実験を行った。野生型 VCP 及び VCP(AAA)は、NES を付与して細胞に過剰発現させると、ポリグルタミンによる内在性 VCP の核移行を阻害すること、さらにその時、ヒストンのアセチル化の低下と atrophic phenotype が共に抑制されることが判明した (図 7)。

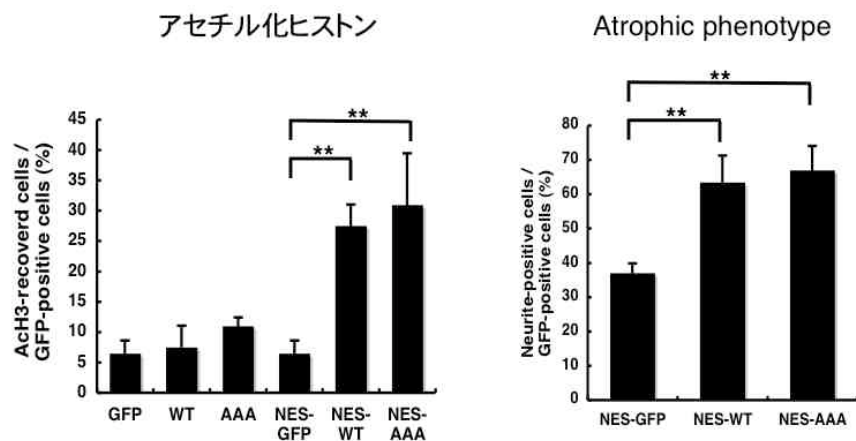


図 7. VCP の核移行の阻害によるヒストンの脱アセチル化と atrophic phenotype の抑制

ポリグルタミンを tet-off で発現させる PC12 細胞において NES-VCPs は、ヒストンの脱アセチル化及び atrophic phenotype を抑制した。** $p < 0.01$

我々が、ショウジョウバエの遺伝学的手法を用いて、ポリグルタミンが引き起こす神経変性の実行因子の候補として ter94(ショウジョウバエの VCP)を同定した時、ter94 をポリグルタミンと共発現させると複眼の変性が増強された。一方、哺乳動物の野生型 VCP をポリル

タミンと共発現させた場合には、複眼の変性が抑制されるという全く逆の表現型が観察され、この相違の起こる理由が長らく大きな謎であった。ter94 では、Lys614 にあたる Lys は保存されているが、Ser612、Thr613 に相当する Ser、Thr は別のアミノ酸に置き換わっている (図 5)。

そこで、PC12 細胞の結果とは必ずしも一致しないが、ショウジョウバエの細胞では、哺乳動物の VCP は ter94 の核移行に対して阻害的に働いていると想定し、その確認を行った。予想どおり、ショウジョウバエの複眼では、共発現させた VCP はポリグルタミンの発現によっても核移行しておらず、ヒストンのアセチル化の低下も抑制されていることが判明した。これらの実験結果から、ポリグルタミンが引き起こすヒストンのアセチル化を伴う atrophic phenotype の誘導には、VCP のアミノ酸修飾とそれに引き続く修飾 VCP の核移行が重要な役割を果たすことが示された(後述)。

II-5. 修飾 VCP による転写抑制と蛋白質の合成阻害

次に RNA ポリメラーゼ II によって転写されるプロモーターに対する VCP(DEQ)の影響を解析した。この実験では、VCP(DEQ)の発現ベクターと pomp-Luc などのルシフェラーゼを発現するベクターをコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ mRNA の発現を Northern blot で解析した。コントロールとして、RNA ポリメラーゼ I によって転写される rRNA のプロモーター下で Luc を発現する発現ベクターを用いた。その結果、VCP(DEQ)の発現によって、rRNA のプロモーターは影響を受けなかったが、CMV などの RNA ポリメラーゼ II によって転写されるプロモーターの活性は抑制された。また、この転写抑制は、atrophic phenotype と同様ブチレイトの添加によっては回復せず、やはり、ヒストンのアセチル化の低下は顕著な変化を示すマーカーではあるが、転写抑制に付随する表現型で、本質的なものではないことが再確認された。

次に全般的な RNA ポリメラーゼ II の転写抑制が atrophic phenotype を引き起こす分子メカニズムとして蛋白質の全般的な合成阻害を考え、それを確認する実験を行った。そのために、GFP を繋いだ野生型 VCP、VCP(AAA)、VCP(DEQ)を tet-off プロモーターの制御下で発現する PC12 細胞を樹立した。培地からテトラサイクリンを除くと、同調して GFP 融合 VCP をほぼ同じレベルで発現する細胞株を選択した。これまでの結果と同じように、VCP(DEQ)のみが核に移行し、神経突起の退縮と atrophic phenotype を示した。この時、S³⁵-Met/Cys で新規の蛋白合成量をモニターすると、VCP(DEQ)を発現する細胞のみで、経日的に新規の蛋白質合成が低下してくることが明らかになり、転写抑制に引き続いて誘導される新規の蛋白質合成の低下が、atrophic phenotype を引き起こす原因であると考えられた。

VCP(DEQ)体が引き起こす転写抑制の分子機構を探るため、VCP(DEQ)と相互作用する分子の網羅的解析を行った (産総研の夏目徹博士、家村俊一郎博士との共同研究)。具体的には、FLAG タグの VCP を HEK293 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、共沈してくる分子を全て質量解析で網羅的に同定するという方法である。コントロールとして用いた野生型 VCP と共沈する分子は以外と少なく、ほとんどのものがこれまで報告のある分子であったが、報告されている分子でもこのアッセイでは共沈してこないものも存在していた。一方、野生型 VCP とは相互作用しないが、VCP(DEQ)と相互作用する蛋白質を幾つか同定できた。その中には、importin が含まれており、VCP(DEQ)が核移行することを説明する結果が得られ、この方法が上手く働いていることが示唆された。これまで、VCP と相互作用する分子として HDAC6 が報告されているが、このアッセイでは HDAC6 は野生型 VCP とともに VCP(DEQ)とも共沈してこなかった。また、VCP(DEQ)の核移行によって、内在性 HDAC6 が核移行するような像は、培養細胞の免疫染色でも観察されなかった。現在、VCP(DEQ)と共沈降する分子の機能を順次 saran 等を用いて解析している。

これらの実験と平行して、ショウジョウバエの siRNA の発現ラインとポリグルタミンを複眼に発現するポリグルタミン病モデルショウジョウバエとの掛け合わせを行い、siRNA によってポリグルタミンによる複眼変性が抑制される遺伝子の検索を行った。その結果、複眼の症状が回復したラインの中には、ter94 の核移行が抑制されているもの、ter94 は核に移行しているがヒストンのアセチル化の低下が抑制されているもの、ter94 の核移行もヒストンのアセチル化の低下も回復していないものが同定されている。これらの遺伝子産物の

哺乳動物細胞での役割に興味もたれる。

II-6. 細胞質に蓄積した異常蛋白質に対するフィードバック機構

生体内で異常な状態が作られた時、生体はそのような異常状態を解消するための応答反応を引き起こし（ストレス応答）、異常な状態を解消しようとする。このようなストレス応答の中心となるメカニズムがフィードバック機構である。例えば、ERに異常な蛋白質が蓄積した時、細胞は異常蛋白質の量を軽減するために、翻訳抑制、シャペロンの誘導、ERAD(ER-associated protein degradation)と呼ばれる異常蛋白質の分解系の亢進を行う。このようなERでの反応はUPR(unfolded protein response)と総称される。一方、細胞質に異常な蛋白質が蓄積した時にどのようなフィードバック機構が働くかは、ほとんど解明されていない。我々が見いだしたポリグルタミンの蓄積時に誘導されるVCPの修飾を介した転写の抑制による翻訳抑制機構は、細胞質の異常蛋白質を軽減させるためのフィードバック機構の存在を解明したものと考えている。異常蛋白質の蓄積が一過性である場合、このフィードバック機構によって、さらなる異常蛋白質の供給が防がれるため、細胞内のオートファジーやプロテアソームなどの蛋白質分解系によって、異常蛋白質は徐々に減少していくと思われる（図8）。しかしながら、遺伝的な要因や何らかの環境要因で異常蛋白質の蓄積・凝集が長く継続した場合、長期に渡る蛋白質の合成阻害が生じるものと思われる（図8）。この状態に、さらにオートファジーやプロテアソームなどの分解系の亢進が加われば、細胞内の蛋白質量の減少は益々加速され、それが細胞の萎縮（atrophic phenotype）を引き起こすことは容易に推測できる。即ち、このフィードバックシステムによる長期間にわたる新規蛋白質の合成阻害が、異常蛋白質の蓄積がもたらす神経細胞萎縮を作り出す上での中心となる生体反応であると考えられる。

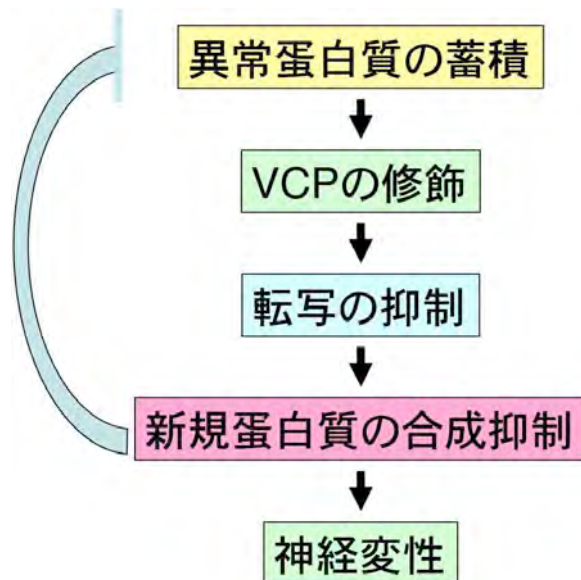


図8. VCPによる異常蛋白質の蓄積に対するフィードバック機構

III. ポリグルタミンの発現によって著減するリン脂質の解析

ポリグルタミンの発現やVCPの核移行に伴い、ERの形態等に変化が起こる可能性を考え、ERを染めると報告のあるDiOC₆(3)という色素でポリグルタミンを発現させたショウジョウバエの複眼の染色を行った。驚いたことに、ポリグルタミンの発現によって、ERの形態の変化というより、染色輝度の著しい低下が観察された。同様な輝度の低下は、ポリグルタミンを発現させたマウス小脳プルキンエ細胞でも観察され、種をこえた反応であると思われる。即ち、細胞にポリグルタミンが凝集・蓄積するとDiOC₆(3)と結合する物質の著しい量の低下が引き起こされることが示唆された。

DiOC₆(3)は lipophilic な性質を持っているので、ショウジョウバエの複眼をすり潰し、lipophilic なフラクションを薄層クロマトで展開した後、DiOC₆(3)で染色を行った。その結果、幾つかのリン脂質と思われるスポットが DiOC₆(3)で染色された。その中で、泳動位置から、フォスファチジルコリン(PC)とフォスファチジルエタノールアミン(PE)に相当するスポットが、ポリグルタミンの発現によって明らかに減少していることが判明した。

次に LC/MS を用いて減少しているリン脂質の組成の解析を行った。野生型の複眼と比べ、ポリグルタミンを発現させた複眼で、PE(34:2), PE (36:4), PI (36:4), PC (34:2), PS (36:2), PS (38:4), PC (34:2)の減少が相対的に著しいことが判明した。さらに、MS/MS を行った結果、ポリグルタミンの発現によって減少するこれらのリン脂質すべてにリノール酸(18:2)が含まれていることが判明した。

これらのリン脂質の低下が病態に果たす役割を解析するために、これらのリン脂質を豊富に含む餌を与えることで、複眼の変性が回復しないかを検討した。40mg/ml の濃度でステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)、さらに、同濃度でリン脂質を豊富に含む卵黄抽出物を餌に加えてポリグルタミン病のモデルショウジョウバエに与えた。ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸を与えた場合には、複眼の変性に変化は認められなかったが、リン脂質を豊富に含む餌を与えることで、複眼の変性が回復した。さらに、最も低下の激しかったリノール酸を2個含む PE(18:2/18:2)を 2mg/ml の濃度で餌に混ぜて与えた場合にも、複眼の変性が有意に回復した。変性が軽減した複眼では、リン脂質の組成が完全ではないが回復していることが確認できた (図 9)。

以上の結果は、ポリグルタミンの発現時に観察されたリン脂質異常は、神経変性の結果引き起こされる付随的な現象ではなく、神経変性の原因となる病態を作り出す変化であることを示している。

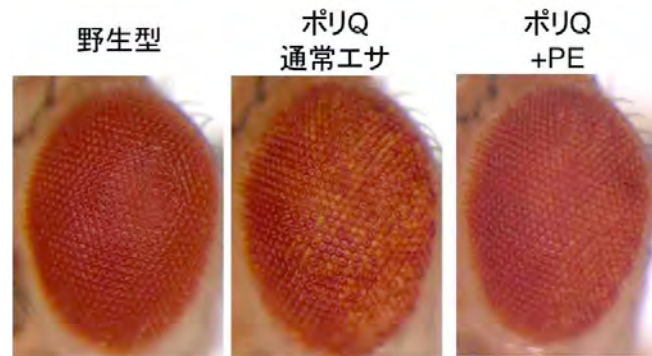


図 9. リノール酸含有フォスファチジルエタノールアミン(PE)投与による複眼の回復

次に複眼の変性が軽減した時のポリグルタミンの量、内在性 ter94 の局在、ヒストンのアセチル化の解析を行った。その結果、ポリグルタミンの凝集体の量や大きさには際立った変化は観察されなかった。また、内在性 ter94 の核移行およびアセチル化ヒストンの低下にも際立った変化は観察されなかった。前述の VCP(DEQ)の解析結果と併せて考えると、ポリグルタミンの発現による病態には少なくとも2つの作用点、すなわち核における修飾 VCP が引き起こす転写の抑制と細胞膜におけるリン脂質の異常 (含有量の低下と組成の変化) が存在することが示唆された。おそらくこのリン脂質の低下も何らかのフィードバック機構の結果の一端を見ているものと推測される。どのような生体応答の結果を見ているかは、いまのところ不明であるが、ヒトにおける神経変性疾患の病態・治療法を考える上で重要な手がかりになるものと思われる。

IV. 凝集体形成における VCP の両面性機能の解明

IV-1. 異常蛋白質を細胞内から除去する VCP の機能解析

VCP は、ポリグルタミンの凝集体のみならず、パーキンソン病やある種の認知症に認められるレビー小体や筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスに認められる SOD1 の凝集体に共局在する。さらに、プロテアゾーム阻害剤によって形成されるアグレゾームにも集積する。

これらの知見から VCP は、細胞内の凝集体に対して、何か積極的な働きを行っている可能性を考え、以下の実験を行った。

まず、細胞をプロテアゾーム阻害剤で処理し、細胞内にアグレゾームを形成させる。次に、プロテアゾーム阻害剤を除くのと同時に VCP-GFP をトランスフェクションによって発現させ、GFP シグナルをトレースすることによって、細胞内の VCP の挙動とアグレゾームの運命を経時的に観察した。その結果、野生型 VCP は、すでにできあがっているアグレゾームに集積していくことが判明し、VCP が単に凝集に巻き込まれている訳ではないことが示唆された。その後 VCP が集積したアグレゾームが経時的に消失し、その間 VCP はアグレゾーム上に留まっていることが判明した。一方、ATPase 活性が低下した VCP(K251A) も同様にアグレゾームに集積することが観察されたが、この場合、アグレゾームの消失が遅延することが判明し、VCP はその ATPase 活性を用いてアグレゾームに代表される細胞内の凝集体を解体する機能があることが示めされた。

次に、VCP をノックダウンさせた HeLa 細胞で、プロテアゾーム阻害剤によって細胞内に蓄積したユビキチン陽性の蛋白質がどのような運命をたどるかについて解析を行った。HeLa 細胞をプロテアゾーム阻害剤で処理すると、ユビキチン陽性の蛋白質がトライトン可溶性分画及び不溶性分画の両方に蓄積してくる。その後、培養液からプロテアゾーム阻害剤を除去すると観察されたユビキチン陽性蛋白質の蓄積は時間の経過と共に解消される。しかしながら、VCP をノックダウンさせた HeLa 細胞では、プロテアゾーム阻害剤で処理しなくてもユビキチン陽性の蛋白質の蓄積がみられた。このようなユビキチン陽性蛋白質は、プロテアゾーム阻害剤によってさらに蓄積が増強され、プロテアゾーム阻害剤を除去後もそれらの蛋白質の細胞内からの消失が著しく遅延することが明らかになった。以上の 2 つの実験から、VCP はその ATPase 活性を用いて細胞内に蓄積した（ユビキチン陽性）蛋白質を細胞から除去するという重要な活性、即ち aggregate clearance activity があることが示唆された。

IV-2. Unfoldase としての VCP の機能解析

細胞内で異常に折り畳まれた蛋白質を正常な折り畳みに修復する酵素は unfoldase と呼ばれ、大腸菌には ClpX とよばれる unfoldase が存在する。しかしながら、ほ乳動物細胞にははっきりとした unfoldase と認知されている蛋白質は同定されていない。上記の実験で、VCP には凝集蛋白質を除去する活性があることが判明したので、次に VCP が unfoldase としての機能をもつ可能性を検証する目的で以下の実験を行った。細胞にルシフェラーゼをトランスフェクションし、細胞抽出液に 45 度 15 分間の heat shock を与えてルシフェラーゼを失活させ、ルシフェラーゼ活性の回復を経時的に調べた。この時、VCP のノックダウンした細胞と VCP のノックダウンした細胞に野生型 VCP もしくは VCP(K251A) を戻した細胞間で比較した。その結果、ノックダウンした後野生型 VCP を過剰発現させた HeLa 細胞、何も処理しない HeLa 細胞、VCP をノックダウンした HeLa 細胞、VCP をノックダウンした後 VCP(K251A) を発現させた細胞の順にルシフェラーゼ活性の回復が観察された。以上の結果から、VCP はその ATPase 活性を用いて unfoldase として作用すること、即ち、VCP は哺乳動物での unfoldase 活性を担う蛋白質であることが示された。

以上 2 つの結果から、VCP の unfoldase 活性と aggregate clearance activity を共に増強させる薬剤を開発することができれば、種々の神経変性疾患に認められる異常蛋白質の蓄積・凝集を細胞から除去する方法に繋がることが期待される。

IV-3. 凝集体形成における VCP の役割の解析

前述のように VCP 蛋白質は、ポリグルタミンの凝集体やレビー小体など、神経変性疾患の罹患部位の神経細胞内に観察される細胞内凝集体に共局在を示す。一方、VCP をノックダウンさせた細胞や ATP 活性を失った変異 VCP を発現させた細胞では、細胞内のトライトンによる可溶性分画と不溶性分画の両方にユビキチン陽性の蛋白質が蓄積することを見いだした。さらにこのような細胞では、プロテアゾーム阻害剤で処理したり、ポリグルタミンを発現させた場合には、細胞内に蓄積するユビキチン陽性の蛋白質やポリグルタミン総量が増加するにも関わらず、凝集体が形成され難くなる。そこで我々は、VCP と GFP の

融合蛋白質を発現させてから、細胞をプロテアゾーム阻害剤で処理し、GFP シグナルをタイムラプスの蛍光顕微鏡でトレースした。その結果、細胞内にまず小さな凝集体様の構造をとる GFP のスポットが数カ所現れ、それが時間の経過とともに一ヶ所に集まる像が観察された。このような像は、ATPase 活性を消失させた変異 VCP-GFP の発現では観察される頻度が著しく減少した。VCP のノックダウンさせた細胞の表現型と併せて、VCP は異常蛋白質を認識・結合した後、自身の ATPase 活性を使って細胞内に小さな凝集体を形成し、さらにこれらの凝集体を一ヶ所に集めて所謂アグレゾームのような塊の蛋白質凝集体を形成する作用を担う活性、即ち aggregate-forming activity を持つことが示唆された。VCP は、前述したように N-末部分に結合する co-factor を使い分けることで機能を発揮することが知られている。そこで、この凝集体の形成に、既存の VCP の co-factor が関与しているかどうかを co-factor をノックダウンすることで検討した。その結果、VCP co-factor の内、Ufd1 と Npl4 が凝集体の形成に深く関与していることを見いだした（後述）。

IV-4. IBMPFD に同定された 変異 VCP の機能解析

IBMPFD (**I**nclusion **B**ody **M**yopathy with **P**aget disease of bone and **F**ront-temporal **D**ementia) と呼ばれる優性遺伝で中年以降に封入体を持つ筋症と Paget 型の骨粗鬆症と前頭側頭葉型の痴呆を示す疾患の原因遺伝子として VCP 遺伝子が同定され(2004 年)、患者では、VCP 蛋白質のコーディング領域にミスセンス変異が見つかった。この疾患の最も特徴的な病理像は、筋肉細胞内に認められる rimmed vacuole と呼ばれる縁取られた封入体の存在であり、それを囲む縁や封入体の内部が抗 VCP 抗体で強く染色される。この封入体の内部には、A β , α -synuclein, リン酸化された tau 蛋白質, ユビキチン化を受けた蛋白質凝集体が染色されることが知られていた。これら全ては神経変性疾患に見られる典型的な蓄積蛋白質であり、かつ、VCP と結合することが我々によって明らかにされた蛋白質である。また、IBMPFD の患者で前頭側頭葉型の痴呆を示す患者の脳の罹患部位では、顕著な神経細胞の脱落があり、残存神経細胞内には、抗 VCP 抗体と抗ユビキチン抗体で染色される凝集体が存在する。

そこで、IBMPFD の原因となる変異 VCP の性質の解析を行った。IBMPFD の原因となる VCP の変異として初期に報告された、(R95G) (R155C) (R155H) (R155P) (R191Q) (A232E) の 6 つの変異を FLAG タグを付けた野生型 VCP に導入し、野生型 VCP とそれぞれの変異 VCP (以下 IBMPFD-VCP と呼ぶ) を培養細胞に発現させ、その発現量と細胞内局在を抗 FLAG 抗体による western blot 及び免疫染色法でそれぞれ比較した。その結果、発現量、細胞内局在ともに野生型と変異 VCP で明らかな違いは認められなかった。次に、これらの IBMPFD-VCP の ATPase 活性を測定したところ、VCP(A232E)の ATPase 活性を最高に、全ての変異 VCP で ATPase 活性の上昇が認められた (図 10)。文献によると、(A232E)変異をもつファミリーの症状がもっとも重いとあり、この ATPase 活性の上昇度との相関は重要なものと考えてられた (後述)。

上述したように、VCP は自身の ATPase 活性を使って凝集体を分解する能力と形成する能力をもつ。そこで、これらの IBMPFD-VCP の凝集体形成に関わる活性を野生型 VCP、ATPase 活性が亢進した VCP(T761E)、ATPase 活性が欠失した VCP(K251A)や VCP(K524A)と比較した。その結果、野生型と比べて、プロテアゾーム阻害剤及びポリグルタミンの発現によって形成される凝集体の頻度が、調べたすべての IBMPFD-VCP 及び VCP(T761E) で亢進しており、逆に ATPase 活性を欠失した VCP(K251A)及び VCP(K524A)で低下していることが明らかになった (図 10)。次にこれらの IBMPFD-VCP を培養細胞に発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降を行い、共沈してくる蛋白質を western blot で解析したところ、すべての IBMPFD に同定された変異 VCP は、Ufd1, Npl4 及びユビキチン化された蛋白質との結合能が増強していることが判明した。また、このアッセイで Ufd1 もしくは Npl4 を siRNA でノックダウンすると共沈してくるユビキチン化された蛋白質が減少したので、IBMPFD-VCP とユビキチン化された蛋白質との結合は、Ufd1/Npl4 複合体を介するものと推測された。

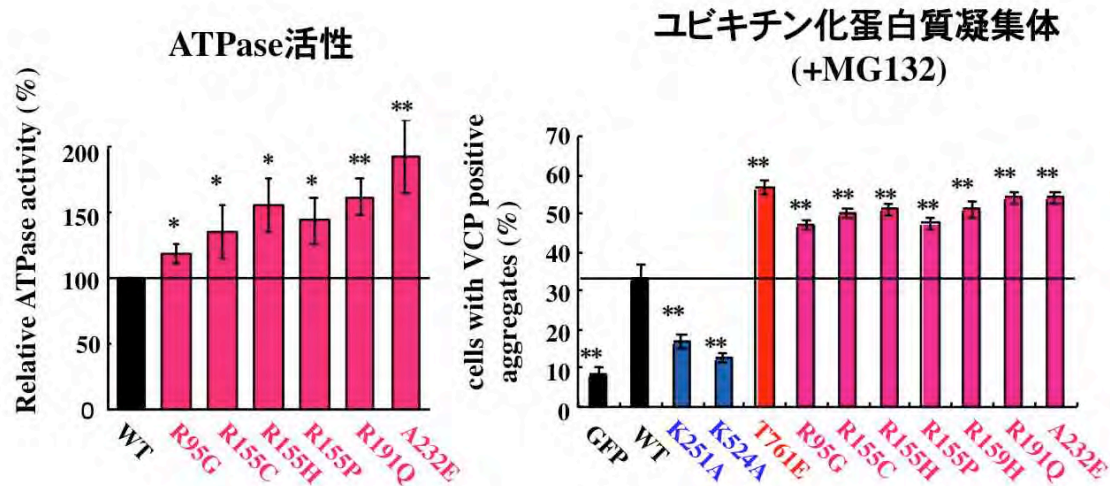


図 10. IBMPFD-VCP での ATPase 活性の上昇と aggregate-forming 活性の上昇
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

これらの IBMPFD-VCP は、VCP(T761E)と同様、単独でショウジョウバエの複眼に発現させても何も表現型を示さなかった。しかしながら、IBMPFD-VCP 及び VCP(T761E)は、ポリグルタミンと共発現させるとポリグルタミン単独の場合に比べて、顕著に複眼の変性を増強した (図 11)。ところが培養細胞の場合と異なり、この時、ポリグルタミンの凝集体の数や大きさに明らかな変化は観察されなかった。すなわち、IBMPFD に同定された変異 VCP は、異常蛋白質と共存した時に、細胞の変性を増強する活性があること、そしてその主要な原因は ATPase 活性の上昇であることが示唆された。

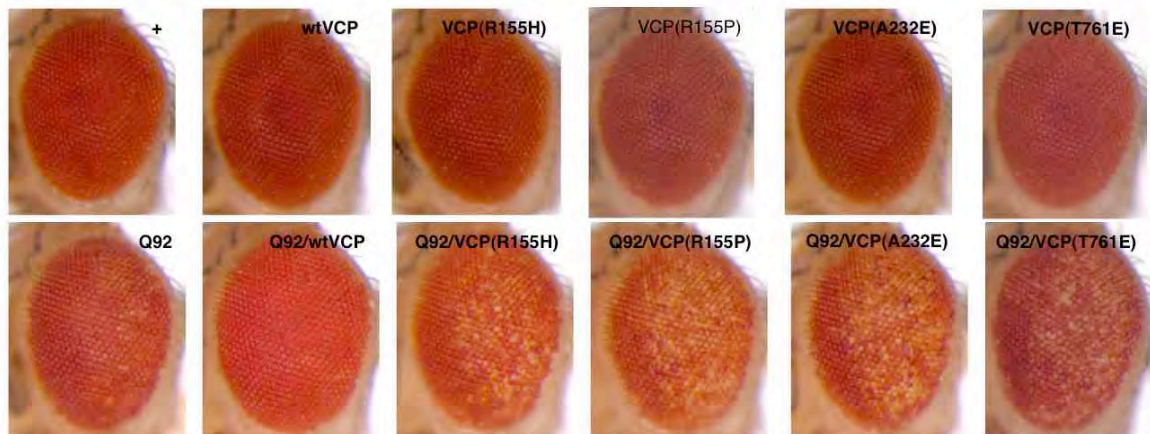


図 11. ATPase 活性の上昇した VCP によるポリグルタミンによる複眼の変性の増悪

V. VCP が担う酸化解消フィードバック機構の解明

V-1. カタラーゼ輸送と VCP

VCP と物理的な相互作用をする分子を網羅的に同定する実験 (前述) で、ペルオキシゾームへ膜蛋白質を運搬すると考えられている PEX19 が同定された。野生型 VCP と PEX19 との結合は非常に弱いことから、おそらく PEX19 との結合を促すような VCP のアミノ酸修飾が存在するものと思われる。これまで、VCP 蛋白質は ER から不良蛋白質を細胞質に抜き出してプロテアゾームに運ぶ ERAD を担う ATPase であることが示されていた。この結果から、VCP 蛋白質がペルオキシゾームなどの細胞内小器官へ蛋白質を運ぶ活性を担っている可能性を考え、ペルオキシゾームのみならず、いろいろな細胞内小器官への蛋白質輸送と VCP の関わりを解析することにした。

いろいろな細胞内小器官局在シグナルを付加した GFP 蛋白質を恒常的に発現する HeLa

細胞を樹立し、VCP の siRNA で処理した時の GFP 蛋白質の局在の観察を行った。すると、予想とは少し違ったが、GFP-KANL がペルオキシゾームから細胞質に漏れ出ている像が VCP ノックダウン細胞で観察され、同じ像が PEX19 のノックダウンでも観察された。この細胞質に GFP-KANL が漏れ出ている像は、蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキシミドの存在下で減少したので、新規に合成された GFP-KANL のペルオキシゾームへの輸送に障害が起きていること、即ち、VCP と PEX19 が協調的に働き、GFP-KANL をペルオキシゾームに運ぶことに関与していることが示唆された。

KANL は、ペルオキシゾーム局在シグナルの中で蛋白質の C 末端部分に存在する 1 型ペルオキシゾーム局在シグナルの亜系である。典型的な 1 型シグナルは、SKL であり、それと比べて KANL は弱い局在シグナルと考えられており、唯一カタラーゼの C 末部分に存在する。

そこで、VCP および PEX19 のノックダウンでカタラーゼの局在に変化が生じるかどうかを免疫染色で観察した。その結果、GFP-KANL と同様、VCP および PEX19 のノックダウンでカタラーゼが細胞質に漏れ出ている像が観察され、カタラーゼのペルオキシゾームの局在に VCP および PEX19 が重要な働きを果たすことが示唆された。

V-2. VCP の ATPase 活性とカタラーゼの局在

カタラーゼは ROS の消去、特に H_2O_2 を H_2O と O_2 に分解する。そこで次に我々は、カタラーゼが細胞質に漏れ出ている VCP ノックダウン細胞の ROS の量を、ROS に反応して蛍光を発する H_2DCFDA を用いて測定した。すると VCP ノックダウン細胞では、basal level のみならず H_2O_2 などの ROS を産生する薬剤で処理した時の細胞内の ROS の量が劇的に減少することが観察された。我々の以前の実験で、VCP は ROS に出会うと D2 ATPase ドメイン内の WA に存在する Cys522 が酸化され ATPase 活性が失活することを示した。実際、VCP のノックダウンと同様なカタラーゼの細胞質への蓄積が、ATPase 活性をなくした VCP の強発現でも観察された。さらに、ROS を産生する薬剤で処理した細胞では、GFP-KANL とカタラーゼが細胞質に漏れ出てくる像が観察された。一方、このカタラーゼの細胞質への漏出は、VCP の過剰発現で抑制された。

V-3. VCP による酸化制御機構

以上の結果から、我々は新たな細胞内酸化に対するフィードバックメカニズムとして以下のモデルを提唱する (図 12)。即ち、VCP は細胞内で ROS を感知するセンサー機能があり、VCP の 522 番目の Cys が酸化を受けるとカタラーゼをペルオキシゾームに運搬する機能が低下し、細胞質にカタラーゼが増加し、ROS の分解が亢進する。その結果、ROS が減少し、細胞内のグルタチオン等の抗酸化物質の回復が進む。それに伴い VCP の 522 番目の Cys の酸化も徐々に解消し、VCP の ATPase 活性が回復すると共に、カタラーゼがペルオキシゾームに再び運搬されるようになる。

これまでに、細胞の老化に伴い細胞内の ROS level が増加すること、そしてその時、カタラーゼが細胞質に局在してくることが知られていたが、その分子機構は不明であった。一方、出芽酵母、アラビドシス、線虫には、細胞質に存在するカタラーゼとペルオキシゾームに局在するカタラーゼとを持っていることが知られており、これらの生物では、カタラーゼは細胞質とペルオキシゾームの両方で必要とされている。出芽酵母では、VCP の Cys522 に相当する位置のアミノ酸は Thr であり酸化を受けない。即ち、出芽酵母では、VCP の酸化によってはカタラーゼの局在を変化させることができず、その代わりに、細胞質にもう一つのカタラーゼを必要としたと推測される。実際、出芽酵母では、ペルオキシゾームのカタラーゼを破壊すると増殖抑制が引き起こされる。一方、哺乳動物などの高等動物では、ROS を細胞内シグナルとして積極的に利用していることが報告されており、細胞質に恒常的にカタラーゼを置くことは、このような ROS シグナルには不都合となる。しかし、過剰な ROS の消去にはカタラーゼは細胞質にあった方が好ましく、ROS の程度に応じてカタラーゼの局在を変化させるための方策として、VCP が用いられるようになったものと推測される。

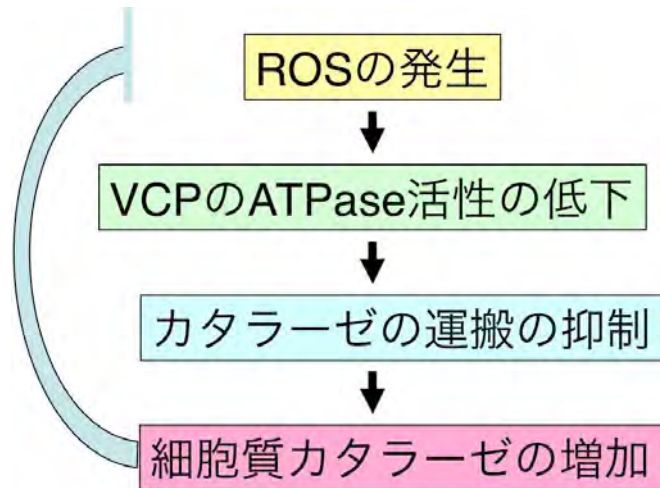


図 12. VCP による ROS 蓄積に対するフィードバック機構

ATPase の活性が亢進した VCP(T761E)を全身で発現させたショウジョウバエは短命になる。一方、IBMPFD の原因となる変異 VCP は、調べたかぎり全てでその ATPase の活性が亢進していた。また、多くの腺癌・扁平上皮癌で VCP の発現の亢進が見られる。おそらくこれらの機能亢進型 VCP や野生型であっても VCP の発現亢進時では、カタラーゼのペルオキシゾームへの運搬が過度に強くなり、結果として、ペルオキシゾーム以外の細胞質や核での ROS レベルが上昇し、脳や筋肉では組織障害に、癌細胞ではさらなる悪性化に繋がっていることが推測される。

VI. 酵母を用いた VCP と機能的相互作用をする新規機能蛋白質の解析

VI-1. DNA の過剰複製を抑制する新規分子の同定

VCP 蛋白質の新たな機能を探る目的で 2 つの方法を用いて出芽酵母での遺伝学的解析を行った。一つの方法では、VCP 蛋白質の発現でレスキューされる温度感受性株を分離することを試みた。まず、Gal4 プロモーター下で VCP を発現する出芽酵母株を樹立し、この酵母に EMS 処理を行い DNA 変異を導入した。そして、25°C (許容温度) では生育できるが、37°C (制限温度) では VCP の発現がないと生育できない温度感受性株の樹立を行った。約 15,000 株のスクリーニングを行い、1 株だけではあるが、37°C では VCP の発現がないと生育できない温度感受性株を分離した。さらに、プラスミッドレスキュー法でこの原因遺伝子を同定し、GPI10 という ER で GPI アンカーを形成するマンノシルトランスフェラーゼの 469 番目のグリシンをグルタミン酸に変化させる G から A へのミスセンス変異を同定し、これが温度感受性の原因変異となっていることを突き止めた。

この温度感受性株を VCP の発現がない状態で 37°C で培養すると GPI10 蛋白質は ER 内で凝集すること、そして増殖阻害の原因として出芽の停止とそれに引き続いて DNA の過剰複製が生じることが判明した。一方、VCP の発現がある状態で 37°C に移した時にも、GPI10 蛋白質は ER 内で凝集した状態であるにもかかわらず出芽の回復と DNA の過剰複製の抑制が観察された。以上の結果から、VCP によるレスキューは GPI10 の凝集阻害ではなく、VCP には、少なくとも酵母において出芽の手助けと DNA の過剰複製を抑制する機能があることが示唆された。GPI10 のような ER 蛋白質に DNA の過剰複製を制御している活性があることは驚きであったが、この温度感受性株に PIGB (ヒトの GPI10) を発現させると DNA の過剰複製が部分的にはあるが抑制されたので、PIGB にも DNA の過剰複製を制御する活性が内在している可能性が示された。GPI10、PIGB、VCP が DNA 過剰複製の制御に関わるという知見は、これまで示唆すらされておらず、これらの分子がどのように DNA の過剰複製を制御しているのかを明らかにすることは、全く新しい DNA の過剰複製の制御機構の解明に繋がるものと思われる。

VI-2. 細胞内のユビキチンプロファイルを調節する分子の同定

もう一つの方法では、出芽酵母の VCP ホモログである Cdc48 の温度感受性株(Cdc48-3)をレスキューする multi-copy suppressor の同定を行った（東京都臨床研木村洋子博士との共同研究）。スクリーニングの結果、Cdc48 自身をコードする遺伝子断片に加え、哺乳動物の脱ユビキチン化酵素と少しだけ似た 200 アミノ酸残基からなる機能未知の分子をコードする遺伝子断片が multi-copy suppressor として同定された。以下の解析結果からこの分子を Rfu1(Regulator of free ubiquitin chain 1)と名付けた。ユビキチンは細胞内では、モノマー(free Ub)、オリゴマー (Ub chain)、蛋白質に結合したコンジュゲイティドフォーム(conjugated Ub)の3つの形態で存在する。Rfu1 の機能欠失株では、Ub chain が減少し、代わりに free Ub の増加が観察された。Cdc48-3 Δ Rfu1 では、上記の Ub プロファイルに加えて、conjugated Ub の著しい増加を認め、さらなる温度感受性の増強を示した。逆に Rfu1 過剰発現株では、free Ub の減少と Ub chain の増加が観察され、Cdc48-3+ Rfu1 では Ub chain の増加と conjugated Ub の減少を認めた。 Δ Rfu1 の Ub プロファイルは、報告されている脱ユビキチン化酵素の一つである Doa4 の欠失型 (Δ doa4) の Ub プロファイルと正反対であり、Doa4 の過剰発現株の Ub プロファイルは Δ Rfu1 の Ub プロファイルとそっくりであることを実験で明らかにした。そして、他の遺伝学的解析及び生化学的解析から、Rfu1 は Doa4 の脱ユビキチン化酵素の活性を阻害する negative regulator であると結論した。一方、Cdc48 の増殖に関わる機能は細胞内のユビキチン化された蛋白質の量に影響を受けていることが示唆された。

細胞内のユビキチンのなかでも free Ub は直接ユビキチン化に利用されるため、その量は厳格に調整される必要がある。例えば heat shock 時には変性蛋白質の処理のために大量の free Ub が消費されるが、減少した free Ub がどのように補われるかはこれまで明らかになっていなかった。そこで、heat shock 時の Rfu1 と Doa4 の蛋白量を western blot で解析した。すると heat shock により、Rfu1 の減少と Doa4 の増加が起こっていることが明らかになった。もちろんこの両者の関係だけで heat shock 時の Ub プロファイルの全てを説明することはできないが、本研究で、細胞内の Ub プロファイルが脱ユビキチン化酵素とその negative regulator のバランスで調節されていること、さらに、これまで細胞内の役割が定かではなかった Ub chain が、heat shock 時等で free Ub を大量に必要とする時のために、平常時ではそのリザーバーとしての役割を担うこと、そして、そのリザーバーからの free Ub の放出時にも脱ユビキチン化酵素とその negative regulator のバランスをシフトすることで調節が行われていることを明らかにした。この調節機構は、free Ub の量を維持するためのフィードバック機構と思われる。

VII. ストレス時での ATP の節約のためのフィードバック機構の解明

VII-1. VRS 法(Visualization of RNA Synthesis method)の開発

rRNA は、蛋白合成の場となるリボゾームの主要な部品である。一方、その合成時には、非常にたくさんの ATP などの重要なリボヌクレオシド三リン酸を消費する。一般に UTP などのリボヌクレオシド三リン酸は、親水性が強く、脂質 2 重膜を通過しないと考えられており、培養細胞での rRNA のラジオアイソトープラベリングには使われていない。しかしながら、HeLa 細胞などの細胞培養のメディウムに 20 μ Ci の $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{UTP}$ を加え、30 分培養後 RNA を回収したところ、RNA がラジオラベルされていることが判明した。アガロース電気泳動後、ラベルされた RNA をオートラジオグラフィーで可視化すると、経時的にまず rRNA の前駆体がラベルされ、それが 28S、18S、5.8S の rRNA へ成熟していく過程を検出することができた (図 13)。試した全ての細胞で $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{UTP}$ を用いて、rRNA をラジオラベルすることができたので、細胞には少なくとも UTP を細胞内に取り込み、RNA 合成に利用するシステムが存在することが判明した。我々はこの rRNA の合成を検出方法を VRS 法 (Visualization of RNA Synthesis method)と呼ぶことにした。

VII-2. ER ストレス時での rRNA の合成抑制

多くのストレス時には ATP が必要とされるので、ストレス時には rRNA の合成低下が引き起こされると考え、いろいろな条件や試薬を加えた後、VRS 法で rRNA 合成の低下が起こっていないかを調べた。すると、培養細胞をツニカマイシン(Tm)、サブシガルジン(Tg)、

プロテアゾーム阻害剤(PSI)で処理すると著しい rRNA の合成低下が引き起こされることが判明した (図 13)。これらの薬剤に共通する作用として ER ストレス誘導が知られている。実際これらの薬剤処理で ER ストレスマーカーの CHOP の発現誘導が起こっていた。

ER ストレスは、ER 膜に存在する 3つのセンサー蛋白質、IRE1 α , PERK, ATF6 によって認識され、それぞれが ER ストレスを解消するシグナル (UPR: unfolded protein response) を発することが知られている。そこで、この ER ストレスによる rRNA の合成抑制がどのセンサー蛋白質の下流に位置するかを解明する目的で、それぞれのセンサー蛋白質に対する siRNA で該当蛋白質をノックダウンし、ER ストレスによる rRNA の合成抑制の有無を解析した。その結果、PERK のノックダウンで Tm、Tg による rRNA の合成抑制が解除された。一方、PERK ノックダウン時でも PSI による rRNA の合成抑制の解除は起こらず、PSI による経路は PERK 以外にも存在することが示唆された (図 13)。

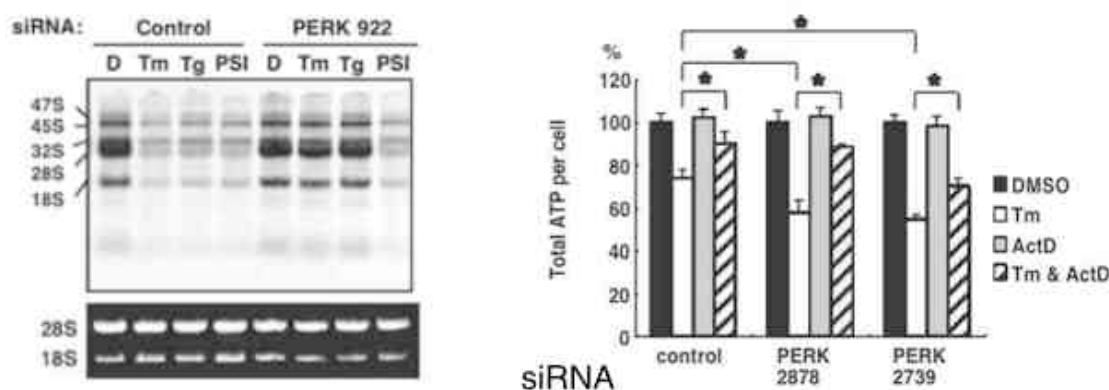


図 13. ER ストレス時における rRNA の合成抑制と細胞内 ATP レベルの維持

培養細胞をツニカマイシン(Tm)、サブシガルジン(Tg)、プロテアゾーム阻害剤(PSI)で処理すると著しい rRNA の合成低下が VRS 法で観察され、その内、Tm と Tg による rRNA の合成低下は PERK のノックダウンで解消された (左図)。一方、Tm 処理時には細胞内の ATP 量の減少がおり、その減少は PERK のノックダウンでさらに亢進した。その時、アクチノマイシン D(ActD)で rRNA の合成を抑制することで、ATP 量の減少を軽減させることができた (右図)。* $p < 0.05$

VII-3. 翻訳抑制と rRNA の合成抑制

PERK の下流では、CHOP の誘導と eIF2 α の Ser51 のリン酸化が知られている。CHOP のノックアウトマウスからの MEF (阪大審良静男教授より供与) でも、Tm、Tg による rRNA の合成抑制が観察されたので、この rRNA の合成抑制に CHOP は関与しないことが判明した。一方、PERK ノックダウン時にでも、PSI 処理時には、eIF2 α の Ser51 のリン酸化が観察され、このリン酸化が Tm、Tg、PSI 処理時に共通する作用点であることが明らかになった。eIF2 α のリン酸化は翻訳抑制を引き起こすことが知られている。実際、PSI 処理でも細胞全体で翻訳抑制が生じていること、さらに、よく知られている翻訳抑制剤であるサイクロヘキサミド処理でも rRNA の合成抑制が誘導されること、また、eIF2 α のノックダウンによっても、翻訳抑制がおりその時やはり rRNA の合成抑制が生じることが判明した。これらの結果は、恒常的な rRNA の転写には非常に半減期が短い (もしくはユビキチン化によって制御される) 蛋白質が関与しており、翻訳抑制によって、この蛋白質が消失もしくは rRNA の転写機構から乖離する可能性が推測された。

VII-4. ストレス時での rRNA の合成抑制の意義

最後に、rRNA の転写の抑制が ATP の節約になっているかどうかを検証した。細胞を 24 時間 Tm 処理後、細胞あたりの ATP の量を測定したところ ATP の低下が観察された。PERK をノックダウンした細胞では、コントロールの細胞に比べて、さらなる ATP の低下が観察された。この時、Tm 存在下でみられる rRNA の合成阻害と同程度の効果を示す濃度のアク

チノマイシン D (ActD : RNA polymerase I の阻害剤) を添加しておく、細胞内の ATP 量の減少が有意に抑制された (図 13)。一方、ER ストレスをかけていない細胞では、同じ濃度の ActD の添加でさらなる ATP 量の増加は観察されなかった。

これらの結果は、細胞が ATP を過剰に消費するようなストレス化では、rRNA の合成を低下させることで細胞内の ATP の低下を抑制するメカニズムが存在することを示している (図 14)。eIF2 α の Ser51 のリン酸化は、ER ストレス以外でも、酸化ストレス、アミノ酸飢餓、ウイルス感染、紫外線を浴びた時等にも誘導されることが報告されている。即ち、生体は、ATP の消費を伴う (ATP を必要とする) 多種多様なストレス存在下で、eIF2 α の Ser51 のリン酸化を通して、翻訳抑制のみならず、rRNA の転写の抑制を誘導し ATP の節約を行っていることが明らかになった。節約された ATP は、例えば ER ストレスの場合、シャペロンの機能、ER からの異常蛋白質の引き出し、ユビキチン化、プロテアゾームによる蛋白質分解などで有効に利用されるのであろう。本システムは、ATP を必要とするストレス時に ATP の減少を緩和するために生体が持っている、フィードバック機構の一つであると考えられる (図 14)。

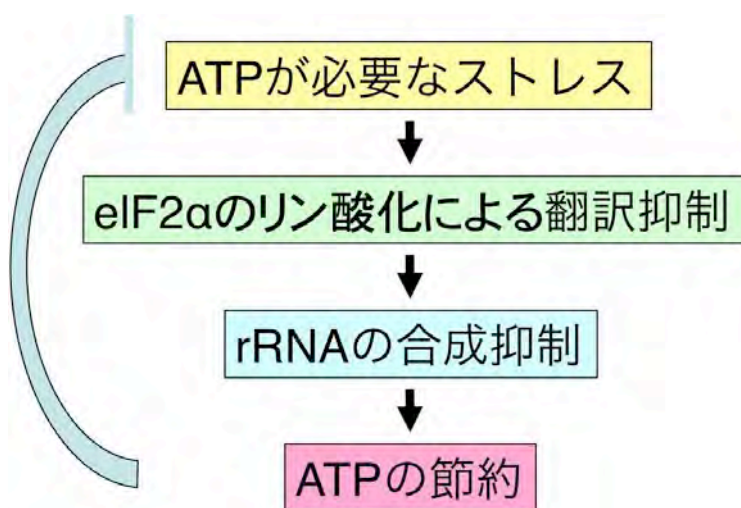


図 14. rRNA 合成抑制による ATP 節約のためのフィードバック機構

VIII. VCP の ATPase 活性を制御する物質の同定

当初は、VCP の ATPase 活性を増強させる化合物と阻害する化合物の両方の開発を目指した。しかしながら、解析したすべての IBMPFD-VCP で、ATPase 活性の上昇が共通に認められたこと、ter94 (ショウジョウバエの VCP) の機能が低下したショウジョウバエでは、ポリグルタミンによる複眼の変性が抑制され、さらに、ATPase 活性の上昇した VCP の発現によって、ショウジョウバエの寿命が短くなることやポリグルタミンによる神経変性が増強されることが判明した。これらのことから、我々は VCP 阻害剤の方がより有効であると考え、リコンビナント VCP の ATPase 活性を指標に VCP 阻害剤のスクリーニングを行った。

まず、ある種の植物エキスを VCP の阻害活性が含まれることを見いだしたので、この分子を精製・同定することを試みた。第一段階として、Silica column に対して移動相としてクロロホルムを用いた固相抽出を行い、第二段階では、CV の順相 column に対して移動相としてジクロロメタンを用いた HPLC、第三段階で RP18 の逆相 column に対して移動相としてアセトニトリルを用いた HPLC、第四、第五段階では、C18 の逆相 column に対して移動相としてアセトニトリルを用いた HPLC を行い、VCP の ATPase 活性を阻害する成分を精製することに成功した。この一連の操作を繰り返し、約 1.5 mg の精製物を得、得られた物質に対して NMR による構造解析により、この物質の構造を決定することができた。残念ながら、構造は非常に複雑で、簡単に合成できるようなものではなかった。

一方、平行しておこなった低分子化合物のスクリーニングで、リコンビナント VCP の

ATPase 活性を 1 μ M 以下の IC₅₀ で阻害する物質を見出した。これらの物質をリード化合物として、新規化合物の合成を行った。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本研究では、神経変性疾患の発症メカニズムを異常蛋白質の蓄積・凝集に対する生体応答（フィードバック機構）の過剰反応と位置づけ解析を行った。そのメカニズムの最初の段階である異常蛋白質の認識に関わる蛋白質として同定した VCP は、細胞内の異常な蛋白質に単に結合するだけでなく、細胞の状況に応じて、異常蛋白質を解きほぐす **unfoldase** としての活性、異常蛋白質を凝集体として集める活性、また、そのような凝集体を解きほぐす活性を持っていることが判明し、細胞内の異常な折り畳みをした変性蛋白質の状態をコントロールする重要な働きを担っていることが明らかになった。一方、近年になって VCP のミスセンス変異が優性遺伝性の多臓器疾患 **IBMPFD** の原因となることが判明し、患者の病変部位である骨格筋・神経細胞では、VCP 抗体で認識される蛋白質の凝集体を有していることが報告された。我々の解析で、この **IBMPFD** を引き起こす変異 VCP は、凝集体を形成する活性が増加していること、その時 **co-factor** である **Ufd1/Npl4** との親和性が增强することによってユビキチン化された蛋白質との結合が增强していることが明らかになった。さらに全ての変異 VCP では、ATPase 活性の亢進があり、この ATPase 活性の亢進度合いと臨床的な重篤度との相関、さらに、ショウジョウバエでの寿命や複眼の変性の增强作用から、**IBMPFD** の本質的な病態には、変異 VCP の ATPase 活性の亢進が強く関連していることが示唆された。

フィードバック機構での VCP の役割を想定するヒントとなったのが、VCP 内で少なくとも 60 ケ所という非常に多くのアミノ酸が修飾を受けることが判明したことにある。また、VCP による凝集体形成を解析している時に異常蛋白質が蓄積している神経細胞で、VCP の核移行を見いだしたことにある。解析の結果 VCP には、上記の異常蛋白質の状態をコントロールする機能に加え、自身で処理できる量を超えた異常蛋白質が細胞内（特に細胞質）に蓄積した場合には、**Ser612**、**Thr613**、**Lys614** のアミノ酸の修飾がおこり、VCP は核に移行して **H3/H4** のコアヒストンの脱アセチル化を伴う全般的な転写の抑制を誘導し、その結果、蛋白質の合成抑制を行うというフィードバック機構を担う働きがあることを見いだした。このフィードバック機構は、細胞質への更なる異常蛋白質の供給を抑制するという機能を担うが、この抑制が長期に渡ると全般的な蛋白質の供給が減少し、細胞機能の抑制、さらには神経細胞の萎縮が引き起こされると考えられる。すなわち、長期に渡りこのフィードバック機構が働くことが、神経細胞の萎縮・変性、さらには細胞死を引き起こすものと推測される。実際、ショウジョウバエのポリグルタミンによる複眼の変性で、内在性の **ter94**（ショウジョウバエの VCP）の核移行を阻害することで複眼の変性が回復した。

研究を開始した時には全く予期しなかったこととして、ポリグルタミンの凝集を持つ細胞で、リン脂質の著しい減少が起こっていることが見いだされた。この減少は、ショウジョウバエの複眼のみならずマウス小脳プルキンエ細胞でも見いだされ、種をこえた現象である。ショウジョウバエでは、とくに **PE(18:2/18:2)** の減少が著しく、驚いたことにこの **PE** を餌で補充するだけで、複眼の変性がある程度回復した。すなわち、このリン脂質異常は、神経変性の結果引き起こされる付随的な現象ではなく、神経変性の原因となる病態を作り出す変化であると考えられた。また、この時 **ter94** の核移行やヒストンの脱アセチル化の回復は観察されず、このリン脂質の減少は、核でのイベントとは独立の現象であることが示唆された。これもおそらく何らかのフィードバック機構の現れと思われるが、その実態は不明である。一つの可能性としては、リン脂質に含まれる脂肪酸が、ATP の供給元として利用されていることが考えられる。

我々は以前の研究で、VCP の **Cys522** が酸化を受けると VCP の ATPase 活性が失われることを見いだしていた。本研究で VCP と相互作用する蛋白質として **PEX19** が同定され、そして VCP/PEX19 が強調してカタラーゼのペルオキシゾームへの輸送を担っていることが判明したことが、細胞内の ROS を処理する新たなフィードバック機構の解明に繋がった。即ち、VCP の **Cys522** が酸化を受けるとカタラーゼをペルオキシゾームに運搬する機能が低下し、

細胞質にカタラーゼが増加し、ROS の分解を亢進させるというフィードバック機構の存在が明らかとなった。IBMPFD を引き起こす VCP やいろいろな進行癌で認められる VCP の発現亢進が、カタラーゼの過度のペルオキシゾームへの輸送を引き起こし、このフィードバック機構を破綻させていることが推測される。

これらの VCP が関与する 2 つのフィードバック機構に加え、ストレス時での ATP を節約するための新たなフィードバック機構の存在を明らかにすることができた。ほとんど注目されていないが、rRNA の合成には非常にたくさんの ATP が使用される。我々は、培養細胞の培養液に[α - 33 P]UTP を加えるだけで、新規合成された rRNA を簡単にラジオリベルできることをみだし、この方法を VRS 法(Vⁱsualization of R^NA S^ynthesis method)と名付けた。VRS 法での解析の結果、細胞が ATP を過剰に消費するようなストレス化、例えば ER ストレス時には、rRNA の合成を低下させることで細胞内の ATP の低下を抑制するメカニズムが存在することが判明した。この時、eIF2 α の Ser51 のリン酸化によって引き起こされる翻訳抑制が重要な働きをすることを明らかにした。eIF2 α の Ser51 のリン酸化は、ER ストレス以外でも、酸化ストレス、アミノ酸飢餓、ウィルス感染、紫外線を浴びた時等にも誘導されることが報告されている。即ち、生体は、ATP の消費を伴う（ATP を必要とする）多種多様なストレス存在下で、eIF2 α の Ser51 のリン酸化による翻訳抑制を通して、rRNA の転写の抑制を誘導し ATP の節約を行っていることが明らかになった。

この他にも出芽酵母を用いた遺伝学的なスクリーニングから、VCP と機能的な相互作用をする蛋白質の同定を試み、ER 蛋白質である GPI10 が出芽や DNA の過剰複製に関与していること、細胞内のユビキチンプロファイルの制御に重要な働きをしている蛋白質を同定することができた。

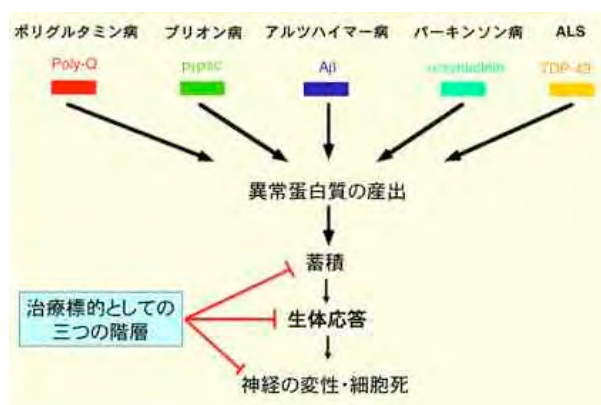


図 15. 神経変性疾患に想定される発症機構と治療標的としての3つの階層

本研究により、神経変性疾患の発症過程に以下の3つの階層を想定することの重要性が再確認できたと考えている。即ち、一番上の階層には「異常蛋白質の蓄積・凝集」が、2番目の階層には「生体応答」が、そして3番目の階層には「神経細胞の変性・細胞死」が位置づけられる（図 15）。

では、この考えに基づけばどのような治療戦略が考えられるのであろうか？ 本研究で行った VCP の機能調節という点からは、まず、1 番上の階層での VCP の unfoldase 活性と凝集体を解体する活性を特異的に増強する方法（薬剤）の開発が考えられる。2 番目の階層では、VCP 修飾の阻害、VCP の核移行の阻害、そして転写抑制を解除する方法、atrophic phenotypes を抑制する方法の開発が重要であり、また、減少するリン脂質を補うことも重要であると考えられる。3 番目の階層の具体的な標的は依然不明であるが、本研究により、細胞内の ATP レベルを維持することの重要性が示唆されたものと考えている。それぞれの階層を標的とした治療戦略を考案し、たとえその一つ一つの効果が限られていたとしても、その組み合わせによって神経細胞を多面的に守ることで、複数の神経変性疾患を総括的に治療することに繋がるものと期待される。一方、修飾 VCP が引き起こす転写抑制の分子機構の解明、ポリグルタミンが引き起こすリン脂質減少の分子機構の解明など、今後明らか

にしなければならない課題も生まれた。さらなる解析で、新たな治療標的を明らかにすること、さらにはこれらの標的をコントロールできる薬物の開発を目指して、今後も神経変性疾患などの難病を治療するための研究を継続したいと考えている。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

神経変性疾患の発症原因として最初のステップに異常蛋白質の蓄積を位置づける考えは広く浸透してきた。近年になり、細胞内の蛋白質の品質管理機構として、従来からのシャペロン系、ユビキチン-プロテアソーム系に加え、オートファジー系が注目されるようになってきた。これは、オートファジーを活性化させるラパマイシンが培養細胞やショウジョウバエでポリグルタミンなどの異常蛋白質の凝集を軽減させることやオートファジーを脳特異的に機能できなくしたノックアウトマウスで神経細胞内にユビキチン陽性の封入体と神経変性疾患に特有の症状を示すことが示されたこと等による。代表的なオートファジー活性化剤であるラパマイシンは脳血液関門を通過することができず、ヒトに応用するために他の薬剤の開発が試みられている。ユビキチン-プロテアソーム系を活性化する薬剤の開発もこれからの課題である。

凝集体の形成に VCP が重要な役割を果たすことも広く浸透してきた。VCP 以外では、ヒストン脱アセチル化酵素の 1 つである HDAC6 が凝集体を形成する過程に関わることが示されており、VCP と HDAC6 が物理的に相互作用し、協調的に作用することも提唱されている。しかし、我々のこれまでの解析では、この相互作用は検出できていない。この相互作用にも何らかの VCP のアミノ酸修飾が必要なかもしれない。HDAC6 はオートファジーの誘導にも関わることが示され、近年、VCP もオートファジーの誘導に必須の因子であることが提唱された。VCP の細胞内の蛋白質の品質管理や異常蛋白質のコントロールにおける役割の重要性は確立しつつあり、本研究で示したような VCP の unfoldase としての作用や凝集体を解体する作用の活性化、さらには VCP を介してオートファジーを活性化することができるなら、これらの方法は細胞内の異常蛋白質の蓄積を軽減させる重要な戦略になると考えられる。

一方、凝集体自体の病態における意義については、神経を守るための保護的作用ではないかとの議論が依然続いている。しかしながら、神経変性疾患、特にポリグルタミン病に対する治療戦略としては、凝集体の除去・軽減を狙った 1 番上の階層をターゲットとしたものが主流となっている。具体的には、前述したオートファジーの活性化に加え、シャペロン蛋白質の誘導、ポリグルタミンの凝集を阻害するペプチドや低分子化合物の検索、siRNA による原因遺伝子産物の発現抑制、凝集体除去に関わる蛋白質をレンチウィルスを用いて脳に導入すること等が動物実験で試みられている。いろいろなポリグルタミン病モデルに対するこれまでの治療実験で、少なくとも凝集体を増やすことで治療効果を示したものは報告されていない。また、我々の解析で、IBMPFD の原因となる変異 VCP では凝集体を作る活性の亢進が観察されており、これは凝集体が増悪因子であるとの考えに合致している。ポリグルタミン病の中でも SBMA に関しては、ポリグルタミンを含む原因蛋白質が男性ホルモン受容体であることを利用し、前立腺癌の治療に用いられている LH-RH アナログによる生化学的去勢や Hsp90 の作用を修飾する 17-DMAG で治療効果が期待されている。これらの方法が他のポリグルタミン病やパーキンソン病、ALS、アルツハイマー病の治療にまで効果が拡大するかどうかに興味を持たれる。

第 2 番目の階層である生体応答に関して、VCP を中心的に考えているのは、現在はまだ我々の研究グループに限られる。転写の抑制が起こっていることに関しては長らく提唱されており、我々の解析からも長期に渡る転写抑制がもたらす蛋白質の合成抑制が重要な生体応答として位置づけられた。しかし、従来の考えは、生体応答としてではなく、凝集体が CBP などの重要な転写因子をトラップして利用できなくなることが病態として想定されており、メカニズムとしては、ヒストンのアセチル化酵素(HAT)の活性低下が提唱されている。しかしながら、我々の解析では、HDAC の機能亢進と考える方がデータに合致している。ヒストンのアセチル化を回復させるためにブチレイトなどの HDAC 阻害剤を用いたところショウジョウバエやマウスモデルに対し、治療効果があったとする報告もある。たしかに、ブチレイトの添加はヒストンのアセチル化の低下を劇的に回復させるが、実際には、

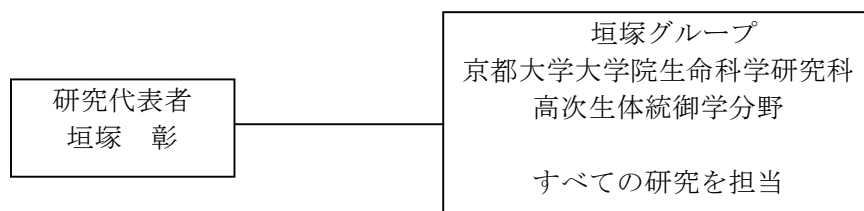
転写の回復作用も神経突起の退縮を抑制する作用も観察されない。ヒストンの脱アセチル化は転写抑制のマーカーとしては優れているが、病態との関わりとしてはあまり本質的な変化ではないと思われる。転写の抑制は、パーキンソン病やアルツハイマー病でも示唆されており、多くの神経変性疾患に共通する治療標的となり得るかもしれない。ここを治療標的とするなら、前述したように、VCP 修飾の阻害、VCP の核移行の阻害、そして転写抑制を直接解除する方法、atrophic phenotypes を抑制する方法の開発が重要であると思われる。

本研究により、おそらくこの2番目の階層に位置すると思われる生体応答にリン脂質の低下が浮上した。これまで、多くの脳神経疾患の症状を改善させる目的で DHA(Docosahexaenoic acid)や EPA (Eicosapentaenoic acid)などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA : polyunsaturated fatty acid) の投与が試みられている (PUFA を治療に用いるのははっきりとした根拠は不明)。最近、ハンチントン病の患者に対する大がかりな臨床試験が行われたが、残念ながら際だった治療効果は観察されなかった。直接比較することは難しいかもしれないが、我々のショウジョウバエモデルでの研究で、リノール酸(18:2)の大量投与では全く効果がなかったポリグルタミンによる複眼変性の軽減が、少量の PE(18:2/18:2)の投与によって観察されたことから、PUFA ではなくリン脂質の投与に治療効果が認められるかもしれない。有効な治療戦略としては、修飾 VCP の核での作用とリン脂質の膜での低下の両方をコントロールすることを考える必要があると思われる。

神経変性疾患の病態で最も共通性の高い部分は、3番目の階層の神経細胞変性・細胞死であり、神経細胞死を防ぎ、遅らせる戦略の構築が極めて重要であると考えられる。古くは BDNF などの神経増殖因子や近年の caspase 阻害剤等で神経細胞死を防ぐ試みに大きな期待が持たれた時期があった。しかしながら、培養神経でみられる神経細胞死の多くが caspase 阻害剤に非感受性であり、しかも、caspase 以外の具体的な分子標的が見つからないこと、また、多くの神経変性疾患の疾病モデル、特にマウスモデルにおいて、神経細胞死が観察され難いため、モデルを使った検証が上手くいかないこと等から、現在、神経細胞死を防ごうとする試みは手詰まり状態となっている。我々のショウジョウバエのポリグルタミン病モデルの研究から、修飾 VCP の核での作用とリン脂質の膜での低下という少なくとも2つのイベントが最終的な複眼の変性に深く結びついていることが判明した。神経細胞死は、ショウジョウバエの方がマウスより観察が容易であるので、現在行っている複眼の変性を修飾する遺伝子スクリーニングから、具体的な神経細胞死の分子メカニズムの詳細が解明できることを期待している。また、最近示された遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物の PINK1 と PARKIN が協調してミトコンドリアの機能維持に関わっていること、いろいろなストレス下で rRNA の合成を抑制して ATP を節約していること、IBMPFD の病態に VCP の ATPase 活性の上昇が深く関与すること、さらには、ほとんどの細胞機能が ATP によって支えられていることなどを考え合わせると、細胞内の ATP 量をコントロールする薬剤の開発も神経細胞死の抑制に対して1つの重要な治療戦略になり得ると思われる。

6. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

①垣塚グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
垣塚 彰	京大・院・生命	教授	研究の総括	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
堀 清次	京大・院・生命	講師	治療薬の開発	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
大泉 宏	京大・院・生命	助教	疾患治療モデルの解析	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
小林 妙子	京大・院・生命	博士研究員	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
安田 邦彦	京大・院・生命	博士研究員	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
前田 良太	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
平野 朋子	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
野口 昌克	京大・院・生命	博士研究員	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
加藤 成芳	京大・院・生命	研究員	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
森 千穂	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
福士 順平	京大・院・生命	院生（博士）	疾患治療モデルの解析	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
東前 直樹	京大・院・生命	院生（博士）	疾患動物の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
大沼 洋平	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連遺伝子の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
小池 雅昭	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
宮澤 晴久	京大・院・生命	院生（修士）	治療薬の開発	平成 16 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
嶋田 深志	京大・院・生命	院生（修士）	治療薬の開発	平成 16 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
佐藤 みず穂	京大・院・生命	院生（修士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
鎧坂 将史	京大・院・生命	院生（博士）	疾患動物の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
萬野 篤	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 21 年 3 月
中谷 恵美	京大・院・生命	院生（修士）	治療薬の開発	平成 16 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
村上 克洋	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連遺伝子の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 21 年 3 月
大滝 佳代	京大・院・生命	院生（博士）	治療薬の開発	平成 16 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
高田 尚寛	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連遺伝子の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 21 年 3 月

岡本 暁彦	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
石井百々子	京大・院・生命	チーム事務員	研究事務	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
黒岩 圭子	JST（京大）	実験助手	グループの実験補助	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
林 綾子	京大・院・生命	実験補助	器具の洗浄	平成 16 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
大久保裕介	京大・院・生命	院生（修士）	治療薬の開発	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
野村 礼	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
渡辺 亜紀	京大・院・生命	院生（修士）	治療薬の開発	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
兼森 祥子	京大・院・生命	院生（修士）	治療薬の開発	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
本橋 康弘	京大・院・生命	院生（修士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
濱口 まり子	京大・院・生命	院生（修士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
藤代 昌彦	京大・院・生命	院生（修士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
橋本 章史	京大・院・生命	院生（修士）	疾患治療モデルの解析	平成 19 年 4 月～ 平成 21 年 3 月
一戸 勇弦	京大・院・生命	院生（博士）	疾患治療モデルの解析	平成 19 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
佐々木千代美	京大・院・生命	院生（博士）	疾患治療モデルの解析	平成 19 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
福浜 悦子	京大・院・生命	チーム事務員	研究事務	平成 19 年 11 月～ 平成 22 年 3 月
宮澤 遙	京大・総合人間	学部生	疾患関連蛋白質の解析	平成 20 年 3 月～ 平成 22 年 3 月
戸田 聡	京大・工・物工	学部生	疾患関連蛋白質の解析	平成 20 年 3 月～ 平成 21 年 3 月
河合 裕子	京大・院・生命	院生（修士）	疾患モデルの解析	平成 20 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
齊藤 大允	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 20 年 6 月～ 平成 22 年 3 月
池田 華子	京大・院・医	助教	疾患治療モデルの解析	平成 21 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
田中 喬	京大・院・生命	院生（修士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 21 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
中山 慎平	京大・院・生命	院生（修士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 21 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
杉山 悠真	京大・院・生命	院生（修士）	疾患モデルの解析	平成 21 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
佐上 聖	京大・院・生命	院生（修士）	疾患治療モデルの解析	平成 21 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
笹岡 紀男	京大・院・生命	院生（博士）	疾患関連蛋白質の解析	平成 21 年 4 月～ 平成 22 年 3 月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 21 年 10 月 24 日	第 82 回日本生化学会 シンポジウム「ストレス応答の新機軸」	神戸国際 会議場	約 100 名	紫外線、熱、重金属などの物理化学的ストレス、あるいは、ウイルス、細菌などの生物学的ストレスに代表される環境ストレスに対し、細胞は多彩なシグナル伝達機構を駆使することによって適応し、恒常性を維持しようとする。基礎生物学的観点からは、細胞がどのようにしてストレスを感知し（ストレスセンシング）、適切なシグナル伝達経路を活性化して（ストレスシグナル）、様々な生物学的反応（ストレスレスポンス）を誘導するのか、それぞれのステップに於ける正確な分子機構の解明が極めて重要である。一方、ストレスに対するシグナル伝達機構の破綻が、癌、神経変性、アレルギー、糖尿病等、多様な疾患の原因となることが分子レベルで明らかになりつつある。本シンポジウムでは、生理的、病理的な状態での多様なストレス応答の実態とその制御という視点からストレスシグナル研究の最前線を議論した。
平成 20 年 11 月 11 日	BMB2008 シンポジウム「神経変性疾患関連遺伝子検索と機能解析」	神戸国際 会議場	約 300 名	今後、超高齢化社会に突入するわが国において、認知症を代表とする神経変性疾患を患う患者の急激な増加が予想されるが、有効な治療法はまだ見つかっていない。しかしながらこの十数年間の研究で、神経変性疾患の発症には、脳・神経系での異常な蛋白質の蓄積が引き起こす生体反応が深く関与していることが明らかになってきた。したがって、そのような生体反応に関わる分子メカニズムを解明することが治療へ向けての糸口を得る最短距離と考えられる。このような視点から、本シンポジウムでは、「神経変性疾患関連遺伝子検索と機能解析」と銘打って、いろいろな神経変性疾患の原因遺伝子の機能解析のみならず、発症に関与する生体反応に関わる可能性のある遺伝子の同定・解析結果を広く議論をおこなった。
平成 19 年 2 月 5 日・6 日	生体応答システムとしての細胞死	京都大学医学・生命科学 研究棟	約 30 名	細胞死は細胞が生きていく上での終焉として考えられていたが、細胞死が次の世代へのバトンを渡す役目として機能していることなどが最近明らかになってきた。このことは細胞が死に至るまでの過程やその意義にはただ単なる終焉を迎えるだけというわけではないことを示唆するものである。これまでの細胞死に関する多くの研究は、いかにして細胞死が誘導されるのかというメカニズムを明らかにすることが主流を占めており、多くの因子が

				そのシグナル経路に関与することが明らかになってきた。そこで今後は細胞死という現象をその生物学的な意義をふまえて、これまでとは異なる視点から捉えられれば、全く新しい研究分野として広げることができるのではないだろうか、と考えた。この集会で、この可能性について討議を行った。
平成 17 年 12 月 9 日	第 28 回分子生物学会ワークショップ「蛋白質のフォールディング / プロセッシングによる細胞機能調節とその破綻」	ホテル日航博多	約 300 名	細胞のいろいろな機能を担う蛋白質が正しく働くためには、正しいコンフォメーション（高次構造）に折りたたまれ、正しい場所に運ばれて機能しなければならない。さらに、これらの過程には、蛋白質のプロセッシングが深く関与する場合がある。本ワークショップでは、蛋白質のフォールディング・プロセッシング研究の現状をそれらの機能破綻（疾患）という視点から取り上げた。発表は、6 題の指定演題に加え、神経変性疾患や脂質代謝調節など、これらの現象に関する分子解析の研究成果に付いて応募した一般応募から 6 題を採択した。
平成 17 年 10 月 17 日 - 10 月 18 日	生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能と病態における意義」	生理学研究所	約 60 名	細胞死の分子メカニズムが詳しく研究され、その素過程に関わる分子が徐々に明らかにされてきた。現在はそれぞれの分子がどのように生理機能に関わるかということに加え、ガンや神経変性疾患のような病態での役割が注目されるようになってきた。我が国の細胞死研究はその初期から高いレベルにあり、細胞死実行過程の研究では世界をリードする成果が多く出されてきた。一方、神経変性疾患における細胞死の分子解析でも世界をリードする研究者を多数輩出するにいたっている。このような状況で、精力的に細胞死研究を行っている研究者が一同に会し、その分子機構と生理学的意義に関して研究交流の場をもつことは非常に意義のあることと考え、本研究会を行った。

(2) 招聘した研究者等

氏 名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Anthony Oro, M.D., Ph.D. (Associate Professor: Stanford University)	セミナー	京都	平成 20 年 5 月 16 日
Henry Sucov, Ph.D. (Associate Professor: University of South California)	セミナー	京都	平成 19 年 11 月 12 日

8. 発展研究による主な研究成果

(1)論文発表 (英文論文 20 件 邦文論文 22 件)

原著論文

1. Muguruma, K., Nishiyama, A., Ono, Y., Miyawaki, H., Eri Mizuhara, E., Hori, S., Kakizuka, A., Obata, K., Yanagawa, Y., Hirano, T., & Sasai, Y. Ontogeny-recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells. **Nat Neurosci** in press, 2010.
- 2. Manno, A., Noguchi, N., Fukushi, J., Motohashi, Y., & Kakizuka, A. Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins that cause inclusion body myopathy with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. **Genes Cells** 15:911-922, 2010, 10.1111/j.1365-2443.2010.01428.x
- 3. Koike, M., Fukushi, J., Ichinohe, Y., Higashimae, N., Fujishiro, M., Sasaki, C., Yamaguchi, M., Uchihara, T., Yagishita, S., Ohizumi, H., Hori, S., & Kakizuka, A. Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. **J Biol Chem** 285:21736-21749, 2010, 10.1074/jbc.M109.099283
- 4. Okamoto, A., Koike, M., Yasuda, K., & Kakizuka, A. Maintaining ATP levels via the suppression of PERK-mediated rRNA synthesis at ER stress. **Biochem Biophys Res Commun** 394:42-47, 2010, 10.1016/j.bbrc.2010.02.065
5. Shintani, T., Yamazaki, F., Katoh, T., Umekawa, M., Matahira, Y., Hori, S., Kakizuka, A., Totani, K., Yamamoto, K., & Ashida, H. Glucosamine induces autophagy via an mTOR-independent pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 391:1775-1779, 2010, 10.1016/j.bbrc.2009.12.154
6. Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T., Sasakawa, C. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. **Nat Cell Biol** 11:1233-1240, 2009, 10.1038/ncb1967
- 7. Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., Tanaka, K. An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. **Cell** 137:549-559, 2009, 10.1016/j.cell.2009.02.028
8. Mori-Konya, C., Kato, N., Maeda, R., Yasuda, K., Higashimae, N., Noguchi, M., Koike, M., Kimura, Y., Ohizumi, H., Hori, S., & Kakizuka, A. p97/valosine-containing protein (VCP) is highly modulated by phosphorylation and acetylation. **Genes Cells** 14:483-497, 2009, 10.1111/j.1365-2443.2009.01286.x
9. Nomura, R., Suzuki, Y., Kakizuka, A., & Jingami, H. Direct detection of the interaction between recombinant soluble extracellular regions in the heterodimeric metabotropic gamma-aminobutyric acid receptor. **J Biol Chem** 283:4665-4673, 2008, 10.1074/jbc.M705202200
- 10. Kobayashi, T., Manno, A., and Kakizuka, A. Involvement of valosin-containing protein (VCP)/p97 in the formation and clearance of abnormal protein aggregates. **Genes Cells** 12:889-901, 2007, 10.1111/j.1365-2443.2007.01099.x
11. Matsushita, H., Scaglioni, P.P., Bhaumik, M., Rego, E.M., Cai, L.F., Majid, S.M., Miyachi, H., Kakizuka, A., Miller, W.H. Jr., Pandolfi, P.P. In vivo analysis of the role of aberrant histone deacetylase recruitment and RAR alpha blockade in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. **J Exp Med** 203:821-828, 2006, 10.1084/jem.20050616
12. Kitami, M.I., Kitami, T., Nagahama, M., Tagaya, M., Hori, S., Kakizuka, A., Mizuno, Y., & Hattori, N. Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation. **FEBS Lett** 580: 474-478, 2006, 10.1016/j.febslet.2005.12.044
13. Wang, Y.A., Shen, K., Ishida, Y., Wang, Y., Kakizuka, A., & Brooks, S.C. Induction of murine leukemia and lymphoma by dominant negative retinoic acid receptor alpha. **Mol Carcinog** 44, 252-261, 2005, 10.1002/mc.20144
14. Noguchi, M., Takata, T., Kimura, Y., Manno, A., Murakami, K., Koike, M., Ohizumi, H., Hori, S., & Kakizuka, A. ATPase activity of Valosin-containing protein (VCP) is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved 522nd cysteine residue in Walker A motif. **J Biol Chem** 280: 41332-41341, 2005, 10.1074/jbc.M509700200
15. Chou, A.H., Yeh, T.H., Kuo, Y.L., Kao, Y.C., Jou, M.J., Hsu, C.Y., Tsai, S.R., Kakizuka, A., & Wang, H.L. Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-x(L). **Neurobiol Dis** 21: 333-345, 2005,

- 10.1016/j.nbd.2005.07.011
16. Liao, W.L., Wang, H.F., Tsai, H.C., Chambon, P., Wagner, M., Kakizuka, A., Liu, F.C. Retinoid signaling competence and RARbeta-mediated gene regulation in the developing mammalian telencephalon. **Dev Dyn** 232:887-900, 2005, 10.1002/dvdy.20281
 17. Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T.S., Kakizuka, A., & Jingami, H. - alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **J Biol Chem** 279:51376-51385, 2005, 10.1074/jbc.M500901200
 18. Goti, D., Katzen S.M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N. A, Copeland, N. G., Kakizuka, A., Sharp, A. H., Ross, C. A., Mouton, P. R., & Colmer V. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brain of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. **J Neurosci** 24:10266-10279, 2004, 10.1523/JNEUROSCI.2734-04.2004
 19. Ishigaki, S., Nozomi Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Tohru Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., Gen Sobue, G. Physical and functional interaction between dorfins and valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. **J Biol Chem** 279:51376-852004, 2004, 10.1074/jbc.M406683200

総説

1. 垣塚 彰 「神経変性疾患と VCP」 *Clinical Neuroscience* 中外医学社 27:964-965, 2009.
2. 垣塚 彰 「神経変性疾患における異常タンパク質の凝集と除去に関する VCP」 *生体の科学 医学書院* 60: 579-581, 2009.
3. Kakizuka, A. Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. Trans.* 36:105-108, 2008, 10.1042/BST0360105
4. 垣塚 彰、小池雅昭 「神経変性疾患に関わる蛋白質の種々の修飾」 *蛋白質・核酸・酵素* 52:768-773, 2007.
5. 垣塚 彰 「神経変性疾患と核」 *蛋白質・核酸・酵素* 51:2269-2273, 2006.
6. 野口昌克、垣塚 彰 「神経変性疾患と小胞体ストレス」 *医学のあゆみ* 216: 4033-4039, 2006.
7. 大泉 宏、垣塚 彰 「PGC 1 ファミリーと糖・脂質代謝」 *内分泌・糖尿病科* 23, 40-47, 2006.
8. 垣塚 彰 「ポリグルタミン病」 *脳神経外科速報* 15: 543~549.2005.
9. 垣塚 彰 「コンフォメーション病」 *細胞工学* 23: 1394-1399, 2004.
10. 垣塚 彰 「神経変性疾患と細胞死」 *実験医学* 22: 1585-1589, 2004.
11. 亀井康富、垣塚 彰 「肥満のモデル動物—新たな抗肥満モデル、ERRL1マウス」 *現代医療* 36: 1881-1886, 2004.
12. 堀 清次、垣塚 彰 「ポリグルタミン病における創薬標的」 *蛋白質・核酸・酵素* 49: 1118-1121, 2004.
13. 垣塚 彰、森 正敬 「フォールディング病としての神経変性疾患とオルガネラ病」 *蛋白質・核酸・酵素* 49: 1077-1085, 2004.

著書

1. 垣塚 彰 「ヒトの分子生物学」 *分子生物学* 第2版 (編集: 柳田光弘、西田栄介、野田 亮) 東京科学同人 261-273, 2009.
2. 垣塚 彰 「ポリグルタミン病」 *脳神経科学 イラストレイテッド 改訂第2版* (編集: 森 寿、真鍋俊也、渡辺雅彦、岡野栄之、宮川 剛) 羊土社 312-319, 2006

辞書・用語集

1. 垣塚 彰 「核内封入体」キーワード: 蛋白質の一生 (編集: 遠藤斗志也、小椋 光、永田和宏、森 和俊、田口秀樹、吉田賢右) *蛋白質・核酸・酵素* 53: 918, 2008.
2. 垣塚 彰 「神経変性疾患」キーワード: 蛋白質の一生 (編集: 遠藤斗志也、小椋 光、永田和宏、森 和俊、田口秀樹、吉田賢右) *蛋白質・核酸・酵素* 53: 953, 2008.

3. 垣塚 彰 「ハンチントン病」キーワード：蛋白質の一生（編集：遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森 和俊、田口秀樹、吉田賢右）蛋白質・核酸・酵素蛋白質・核酸・酵素 53: 983, 2008.
4. 垣塚 彰 「ポリグルタミン病」キーワード：蛋白質の一生（編集：遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森 和俊、田口秀樹、吉田賢右）蛋白質・核酸・酵素蛋白質・核酸・酵素 53: 1002, 2008.
5. 垣塚 彰 「マシヤド・ジョセフ病」キーワード：蛋白質の一生（編集：遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森 和俊、田口秀樹、吉田賢右）蛋白質・核酸・酵素蛋白質・核酸・酵素 53: 1006, 2008
6. 垣塚 彰 「Lewy 小体」キーワード：蛋白質の一生（編集：遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森 和俊、田口秀樹、吉田賢右）蛋白質・核酸・酵素蛋白質・核酸・酵素 53: 1069, 2008
7. 垣塚 彰 「MJD1 遺伝子」医学書院医学大事典 pp244l. 2008
8. 垣塚 彰 「MJD1 蛋白質」医学書院医学大事典 pp244m. 2008

(2) 口頭発表

①学会

国内 64 件（内英語 4 件），海外 5 件

②その他

国内 32 件（内英語 14 件），海外 2 件

(3) 特許出願（SORST 研究の成果に関わる特許（出願人が JST 以外のものを含む））

	件数
国内出願	9
海外出願	0
計	9

(4) その他特記事項

第 82 回日本生化学会大会優秀プレゼンテーション賞受賞：小池雅昭「神経変性疾患に関わる VCP の翻訳後修飾とその機能：Modifications of VCP via Abnormal Protein Accumulation lead to Neuronal Cell Atrophy and Neurodegeneration」第 82 回日本生化学会年会 平成 21 年 10 月 24 日 神戸国際会議場

優秀ポスター賞受賞：Masaaki Koike “Modifications of VCP via abnormal protein accumulation lead to neuronal cell atrophy and neurodegeneration.” ”The 5th NTU-Kyoto-U mini-symposium on molecular and cellular biology. May 23, 2009. Raku-yu Kaikan, Kyoto, Japan.

9. 結び

我々のSORST研究が平成16年にスタートしてより、あっという間に5年の歳月が経過した。その間、多くの方の協力と励ましに支えていただいたことに心より感謝している。当時、ほとんど注目されなかったVCPというATPaseがポリグルタミンに関連する分子として生化学的な精製と遺伝学的なスクリーニングで同時に私の目の前に出現した。この分子の調節機構が、神経変性疾患のみならず、生命を支える重要な役割を担っているとの信念で始めた本研究であるが、VCPが関わる2つの新しいフィードバック機構に加え、rRNAの合成抑制を介したATP節約のフィードバック機構の存在を明らかにすることができた。また、ポリグルタミンの発現によってリン脂質の著しい低下

が引き起こされ、それが病態に関わることを見いだせたことも将来の神経変性疾患の治療戦略を考える上で大きなヒントになったと思っている。我々の研究が多くの学生の興味を引きつけていることは疑いの余地がなく、毎年、50人ほどの修士希望者がラボ見学に訪れる。これらの若い力をいかに伸ばし、独自性・独創性の高い研究を担う研究者に育てることの難しさを日々感じている。

今後は、これまで培ってきた神経変性疾患の分子標的やシーズ化合物を用いたモデル動物の治療、さらにはヒトを対象とした臨床研究へと本研究を継続・発展させて行きたい。これからは、これまでのような潤沢な研究費の元という訳にはいかないが、新しい治療薬を切望している患者さんの期待に応えるため、苦難の道かもしれないが、何としても治療薬の開発を成し遂げたいと思っている。JSTには、是非とも神経変性疾患に限らず、難治性疾患の治療を目指した研究を継続してサポートするプログラムを準備いただくことを心よりお願いしたい。

末筆となりましたが、暖かく見守っていただいた吉田光昭研究統括、私からの無理な要求にいつも快く応えていただいた似鳥嘉昭技術参事を始めとする「SORST」事務所の方々、科学技術振興機構本部の多くの方々のご支援・ご協力にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

