

「脳を守る」

平成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。その結果、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可能性を支持する証拠が蓄積してきた。すなわち、ポリグルタミンの発現によって、パーキンソン病の場合と良く似て酸化ストレスが誘導されること、酸化ストレスによってVCPのATPase活性が顕著に抑制されること、ATPase活性を失ったVCPはER ストレスと神経細胞死を誘導することが明らかになった。一方、VCP蛋白質は、酸化修飾以外にもリン酸化やアセチル化を受けてそのATPase活性の調節を受けることが判明した。すなわち、VCPの酸化、リン酸化、アセチル化をコントロールすることで、神経変性疾患の治療・予防に繋がる可能性が生じて来たと考えている。

2. 研究実施内容

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発症機構について分子解析を行い以下の結果を得た。

1) ポリグルタミンの発現と酸化誘導

パーキンソン病などの神経変性疾患の発症に酸化ストレスが関与することが古くから提唱されている。我々がこれまでに樹立したテトラサイクリンを培地から除くとポリグルタミン(Q79)を誘導発現させることができるPC12細胞において、ポリグルタミンの発現によって活性酸素種(ROS)が生じる可能性をROS感受性色素CM-H2DCFDAを用いて解析した。その結果、ポリグルタミンの発現誘導後、CM-H2DCFDAシグナルの亢進した細胞集団が有意に増加することがFACS を用いた解析で明らかになった。また、このと

き、ポリグルタミンの凝集部位と一致してCM-H2DCFDAシグナルが生じていることが蛍光顕微鏡で観察された。

2) 酸化ストレスによるVCP蛋白質の機能修飾

上述のように神経変性疾患の発症に酸化ストレスが関与する可能性が提唱されて久しいが、酸化の標的となる鍵分子が同定されていないためにこの可能性は実験的に検証されていない。我々は、いろいろな神経変性疾患の発症に深く関与していると想定しているVCPこそが、これまで長らく探索されてきた神経変性疾患と酸化ストレスをつなぐ鍵分子であると考え、VCPのATPase活性が酸化ストレスによって影響を受けるか否かを検討した。その結果、 H_2O_2 、ジアミドなどの酸化剤によってVCPのATPase活性が速やかに低下することを見出した。また、この活性の低下はDTT処理で回復した。しかしながら、例えば10mMの H_2O_2 および100 μ Mのジアミドで37度10分間処理するとVCPのATPase活性は完全に消失したが、そのような強い失活の場合はDTTによる回復は観察されなかった。

次にこのような酸化により修飾を受けるVCP内のアミノ酸を同定するため、酸化処理をしたリコンビナントVCPをトリプシンで分解後、そのペプチド断片に対してLC/MSを用いた質量解析を行った。VCP蛋白質には12個のシステイン残基が存在するが、そのうちの3つのシステインが明らかな酸化修飾を受けることが判明した（それぞれcys69、cys77、cys522）。次に、それらのシステインを酸化修飾を受けないアミノ酸に置換した変異体（レコンビナント）を作成した。未処理の状態では、個々の変異体のATPase活性には差が見られなかったが、酸化処理に対して、cys522の変異体のみがATPase活性の低下をほとんど引き起こさなかった。このcys522は多細胞生物のVCPで高度に保存されているが、酵母などの単細胞生物では保存されていない。実際、出芽酵母のVCP(Cdc48)は、ほ乳動物のVCPに比べて、酸化処理に対して抵抗性であった。以上の結果は、多細胞生物のVCP蛋白質は酸化・還元によってATPase活性の調節を受けていることを示唆している。

3) VCP蛋白質のリン酸化・アセチル化による機能修飾

上記の酸化修飾以外に、VCPがアミノ酸修飾を受けている可能性を検証するために、質量分析計を駆使してVCP蛋白質の質量解析を行った。その結果、リン酸化を受ける可能性のある20ヶ所のセリンと10ヶ所のスレオニン、アセチル化を受ける可能性のある15ヶ所のリジンと同定した。続いて、リン酸化を模倣するセリンをアスパラギン酸もしくはグルタミン酸に変えた変異VCP（例えばS765D、S282D、S761E）やアセチル化を起さないようにした変異体（例えばK696R）、アセチル化を模倣するリジンをアラニンに変えた変異VCP（例えばK696A）をヴァキュロウィルスの高発現系で作成し、そこから変異VCP蛋白質を精製し、そのATPase活性を測定した。その結果、761番目のセリンのリン酸化模倣体であるS761EのATPase活性が顕著に上昇していた。一方、696番目のリジンを同じ塩基性アミノ酸でアセチル化を受けないアルギニンに変えたK696Rでは、ATPase活性がほとんど消失していること、そして、そのアセチル化模倣体であるK696A

では、ATPase活性が野生型以上に回復していることが判明した。282番目、761番目、765番目のセリン、696番目のリジンとそれらの周囲のアミノ酸は種を超えてほとんど同一であることから、VCP蛋白質はリン酸化・脱リン酸化、アセチル化・脱アセチル化によって、そのATPase活性の調節を受ける蛋白質であると結論された。

現在、同定した修飾アミノ酸と類似アミノ酸をもつVCPや酸化修飾を受けないVCPをショウジョウバエの複眼に発現させ、これらのハエとポリグルタミンを複眼に発現させたショウジョウバエとの交配を行い、変異VCPの複眼の変性に対する効果を観察している。ショウジョウバエの複眼の変性を回復させるVCPの変異体が同定された場合、同じ変異VCPを発現させるトランスジェニックマウスを作成し、ポリグルタミン病のみならずパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)マウスとの交配を行い、VCPの機能修飾によって神経変性疾患モデルマウスを治療できる可能性を検証する予定である。すなわち、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。

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：

細胞の生存及び死のシグナル伝達機構について分子解析を行い、以下の結果を得た。

1) Akt及びJNKの生存および死のシグナル伝達における役割の解析

細胞の生死は細胞自身が内包する死のシグナル伝達と生のシグナル伝達という拮抗する2つの生化学的活性の微妙なバランスの上に成り立っているという考えに基づき、死のシグナル伝達と生のシグナル伝達に関わるAkt及びJNKが、神経変性の過程でどのように関わるかを培養細胞モデルを用いて解析を行い、以下の結果を得た。

生のシグナルに関与するAktのターゲットを探索し、p53のユビキチンリガーゼであるMdm2がAktにより直接にリン酸化され活性化されるという結果をこれまでに得ていたが、さらにリン酸化されたMdm2が別の因子もユビキチン化するかを検討した。その結果、Aktによってリン酸化されたMdm2が新たに細胞周期に関与する転写因子をユビキチン化する事を見いだした。この因子はDNA損傷などによるアポトーシス誘導に必須の役割を果たすことからAkt-Mdm2経路がこの因子をユビキチン化し分解する事が生存促進に貢献している可能性が考えられる。

また、ポリグルタミンの関与するタンパク質凝集体にJNK経路の上流キナーゼが局在し細胞死に貢献しているという垣塚らのデータや、アミロイドbetaペプチド凝集体による神経死にJNK活性化が必要であるという私達のデータから、JNK経路の神経変性における重要性が示唆されている。そこでJNKによる細胞死誘導におけるターゲットについても探索を行った。その結果、JNKが14-3-3を直接リン酸化することを見いだした。

このリン酸化によって14-3-3とBaxの解離が起こり、これによってBaxがミトコンドリアに移行してミトコンドリアの膜透過性の上昇を引き起こす事が明らかになった。Baxはアポトーシス誘導の鍵分子であるが、本研究によりその活性制御機構の重要な一端が明らかになったと考えている。

今後、AktおよびJNKの生死制御機構を更に解析し、その知見を基に、神経変性疾患に伴う細胞死を抑制する手段の開発を目指していきたい。

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) ポリグルタミンの発現と酸化誘導
 - 2) 酸化ストレスによるVCP蛋白質の機能修飾
 - 3) VCP蛋白質のリン酸化・アセチル化による機能修飾

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：生と死のシグナル伝達機構の解析
 - 1) Akt及びJNKの生存および死のシグナル伝達における役割の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

（垣塚グループ）

- Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, H., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K.I. (2004) Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J.* 23: 659-669.
- Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., & Kakizuka, A. (2003) PGC-1 β /ERRL1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 12378-12383.
- Kobayashi, T., & Kakizuka, A. (2003) Molecular analyses of Machado-Joseph disease. *Cytogenet. Genome Res.* 100: 261-275.
- Kimura, Y., & Kakizuka, A. (2003) Polyglutamine diseases and molecular chaperones. *IUBMB Life* 55: 337-345.
- Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A. & Okamoto, K. (2003) Vacuole-creating

protein in neuro-degenerative diseases. *Neurosci. Lett.* 343: 77-80.

(後藤グループ)

- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 23: 1889-1899.
- Miyagi, S., Saito, T., Mizutani, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., Iwama, A., Nakauchi, H., Masui, S., Niwa, H., Nishimoto, M., Muramatsu, M. & Okuda, A. (2004) The sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct multipotent stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 24: 4207-4220.
- Higuchi, M., Onishi, K., Masuyama, N. & Gotoh, Y. (2003) The phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses neurite branch formation in NGF-treated PC12 cells. *Genes Cells* 8: 657-669.
- 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., Ogihara, 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.
- Sakoda, H., Gotoh, Y., Katagiri, H., Kurokawa, M., Ono, H., Onishi, Y., Anai, M., Ogihara, T., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Abe, M., Shojima, N., Kikuchi, M., Oka, Y., Hirai, H. & Asano, T. (2003) Differing roles of Akt and SGK in glucose metabolism, DNA synthesis and oncogenic activity. *J. Biol. Chem.* 278: 25802-25807.
- Katome, T., Obata, T., Matsushima, R., Masuyama, N., Cantley, L.C., Gotoh, Y., Kishi, K., Shiota, H. & Ebina, Y. (2003) Use of RNA-interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/PKB-isoforms in insulin actions. *J. Biol. Chem.* 278: 28312-28323.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：3件（研究期間累積件数：8件）