

機関番号：11401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591334
 研究課題名（和文）誘導型遺伝子改変マウスによるケラチン病に対する蛋白フォールディング調整療法の創生
 研究課題名（英文）Establishment of remodeling technologies for protein misfolding in keratin disorders using an inducible transgenic mouse model
 研究代表者：真鍋 求（MANABE MOTOMU）
 秋田大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：30138309

研究成果の概要（和文）：

我々は本研究課題において、ケラチン病における蛋白フォールディング異常の分子基盤を解明するため、野生型および変異ケラチン遺伝子を導入したマウス由来の角化細胞を解析した。その結果、変異ケラチンを強制発現させても、内在ケラチンは球状の形態を取らず、またアポトーシスも誘導されないことが判明した。導入遺伝子をさらに解析したところ、変異ケラチン遺伝子の一部が切断されていることを示唆する所見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

In this grant program, we attempted to elucidate the molecular mechanisms of protein misfolding in keratin disorders. The transgenic mouse studies showed that mutated keratins cause neither collapse of keratins or apoptosis in cultured keratinocytes. These findings may be because of the DNA break of transgene in a certain point.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ケラチン・分子シャペロン・蛋白フォールディング・細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) ケラチンは細胞質内に蜘蛛の巣状に分布する細胞骨格タンパクであり、細胞の形態維持に重要な役割を果たしている。しかし、ケラチン遺伝子の変異によって発症するいわゆるケラチン病ではケラチンが線維状高次構造を構築する際に重要な役割を果たしている領域に変異が存在する (Manabe M: Jan Med Ass

J 49: 508-513, 2004)。そのためケラチンの線維構築が破綻し、本来細胞骨格タンパクとして持っている細胞の形態を維持する作用が脆弱となるため、細胞が軽微な外力により破壊されることが本症の発症機序として推察されてきた。

(2) では点突然変異を持つケラチンが発現

すると細胞内ではいかなる変化が起こるのか？そしてこの変化を如何にして阻止するか？これらはケラチンの異常と病態形成を結び付ける重要な課題であるとともに、臨床研究の究極の目的である治療法の開発に直接関わるものである。この疑問に明解な解答を与えるためには、点突然変異を挿入したケラチン遺伝子を培養細胞に発現させるのが最も効果的な方法であろう。

(3) そこで我々の研究室では、変異ケラチンの凝集が角化細胞の動態に及ぼす影響を観察することを目的として、ケラチン病の細胞モデルを確立した (Yoneda K et al.: J Biol Chem 279: 7296-7303, 2004)。その結果、細胞質に生じたケラチン凝集塊は①20S プロテアソームを抑制することにより ER ストレスを介してカスパーゼ 4 を活性化、また②TNF α の産生を亢進させ、オートクリン・パラクリン作用によりカスパーゼ 8 を活性化、などの二つの経路によりアポトーシスを誘導する③抗 TNF α 抗体がアポトーシスを抑制することなどが判明した。以上の所見は、ケラチン病においては変異ケラチンの凝集塊が「細胞内蛋白質の品質管理(quality control)」に障害を来し、アポトーシスを誘導することを示唆するものであり、我々はケラチン病がアルツハイマー病などフォールディング病 (folding disease) に属するという斬新な概念を提唱した。

(4) 蛋白質は細胞内で合成された後、正しい立体構造を形成してはじめて機能することができる。しかし何らかの理由で立体構造がおかしくなった不良品蛋白質は、単に機能を果たせないだけでなく、時にはアミロイド線維やプリオン線維のように秩序ある凝集体を形成し、これが細胞にとって毒となったり、病態を引き起こしたりする。そこで細胞機能を正常に保つために、不良品蛋白質を適切に発見・処理する品質管理システムが細胞には備わっている。

小胞体は分泌蛋白質や細胞膜蛋白質の生合成の入り口にあたる細胞内小器官であるが、大量の蛋白質を取り扱うために、特に堅牢な品質管理システムが発達している。変性した蛋白質が小胞体内に蓄積するという異常事態が発生した場合には、小胞体内でセンサー分子が不良品を検出し、以下の3つの応答反応を行う：(1)小胞体シャペロンを誘導して、変性蛋白質の立体構造の修復に努める、(2)翻訳を抑制して、変性蛋白質がそれ以上小胞体内へ送り込まれないようにする、(3)変性蛋白質をユビキチン化し、26Sプロテアソームという分解マシンにより除去する。(4)アポトーシスを誘導し、異常事態がこれ以上周辺に波及しないようにする。

今後これらの蛋白フォールディング異常に対する細胞応答機構の全容が解明されれば、種々の疾患の治療に有効な、まったく新しい方法論が確立されていくのではないかと期待されている。

2. 研究の目的

(1) ケラチン病における蛋白フォールディング異常の全貌を解明し、新規治療法を探索する上での技術的問題点は、変異ケラチンを発現する細胞ではアポトーシスが誘導されるため、継代して細胞を培養できないことである。これを克服するためには、ある条件下においてのみ一過性に変異ケラチンを発現する細胞を作成する必要がある。

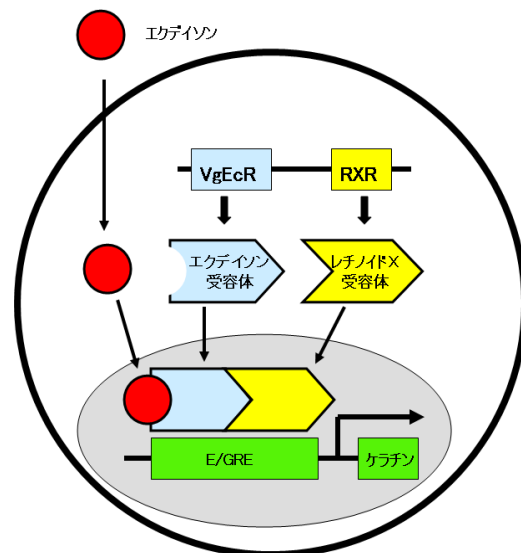
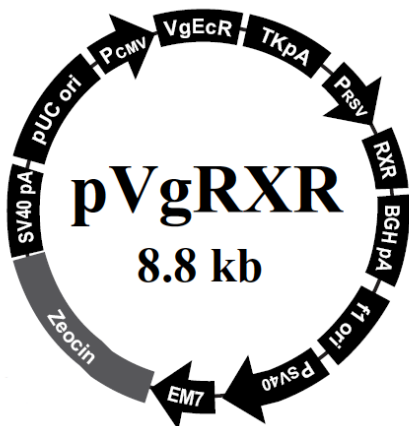
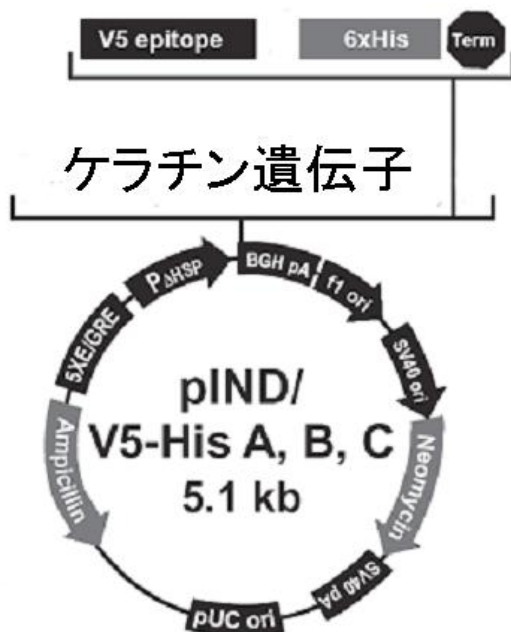
(2) そこで我々は Ecdysone Inducible Mammalian Expression システムを導入した誘導型遺伝子改変マウスを作成する。このマウスの生物学的特性を解析していくことにより、変異ケラチン凝集塊は如何にして：①蛋白質の品質管理を担当する分子群と対応するのか？②TNF α の産生を亢進させ、アポトーシス関連分子を活性化させるのか？③小胞体シャペロン調節剤や抗 TNF α 中和抗体は *in vivo* でもケラチン病の病態形成を阻止するか？などの魅力的な疑問に答えることが出来よう。

(3) この研究はこれまで掘み所の無かったケラチン病を含むフォールディング病の病態解明と新規治療法の開発に有用であり、この分野における従来の研究を大きく発展させることが予想される。特に慢性関節リウマチに対して最近認可された抗 TNF α 抗体製剤がアポトーシスを抑制することが証明されれば、フォールディング病の新規治療法を探索する上で画期的な成果となろう。

3. 研究の方法 (下図参照)

(1) Ecdysone 誘導型変異ケラチン発現 vector と遺伝子改変マウスの作成

ケラチン 14 をコードする遺伝子に点突然変異を導入した遺伝子改変マウスを作成するため、まず overlapping PCR の手法を用いて、ケラチン 14 遺伝子 (ジョンホプキンス大の Pierre Coulombe 先生より提供) の 125 番目のアルギニン (Arg-125) をシステインに置換 (Arg-125 \rightarrow Cys) する。こうして得られた変異ケラチン 14 遺伝子および野生型ケラチン 14 遺伝子を AatII および DraIII を用いて、可能な限りベクター DNA 部分を除去する。



レチノイド X レセプターとエクデインレセプターより形成されるヘテロダイマーにポナステロン A (エクデイン同族体) が結合し、pIND/V5-His ベクターに存在するエクデインレスポンスエレメントに結合することにより、その下流域に組み込まれている Wt および Mut K14 の転写が開始される。pIND/V5-His ベクターから発現される蛋白質にはタグ (His tag および V5 tag) が付着するので、抗 V5 抗体を用いてその発現を免疫組織学的に確認する。

遺伝子改変マウスの角化細胞を培養し、ポナステロン A を培養液中に添加すると、変異ケラチンが発現する。その結果、小胞体シャペロン群やユビキチンリガーゼなどの蛋白質の品質管理に関与する分子群が活性化され、やがてアポトーシスが誘導されることが予想される。そこで、これら機能分子群の動態を PCR および免疫ブロットにより解析する。

さらに秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門で、これらの DNA 溶液を C57BL/6 マウス受精卵の前核中に注入し、仮親の卵管内へ移植を行う。約 3 週間後に生まれたマウスは、それから約 4 週間後に離乳させる。上記の遺伝子が導入された Fo マウスが得られていることを PCR 法などにより解析する。

(2) 変異ケラチンの発現によりアポトーシスを誘導する。

pVgRXR ベクターには、レチノイド X レセプターとエクデインレセプターをコードする 2 個の遺伝子が組み込まれている。

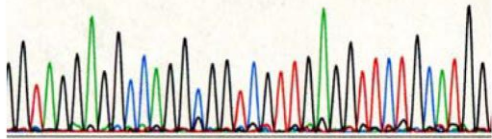
4. 研究成果

(1) 導入遺伝子における変位の確認 (下図参照)

作成した遺伝子改変マウスに意図した変異が導入されていることを確認するため、Direct Sequence を実施した。その結果、R125C マウスの K14 遺伝子の Arg125 が Cys に置き換わっていることが確認された。

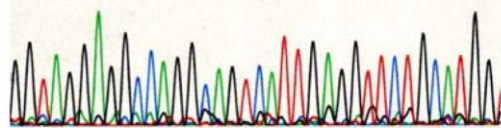
WT reverse

Y S A L Arg(R) D N L N Q M
3' - C CAT CCT CCG GTC CGC CAG CAA CTC CAA GAC GTA CC - 5'
GGTAGGAGGCCAGCGCTCGTTGAGGTTCTGCATGG
133 144 155 166



R125C reverse

Y S A L Cys(C) D N L N Q M
3' - C CAT CCT CCG GTC CGT CAG TAA CTC CAA GAC GTA CC - 5'
GGTAGGAGGCCAGGCATTCATTGAGGTTCTGCATGG
133 144 155 166

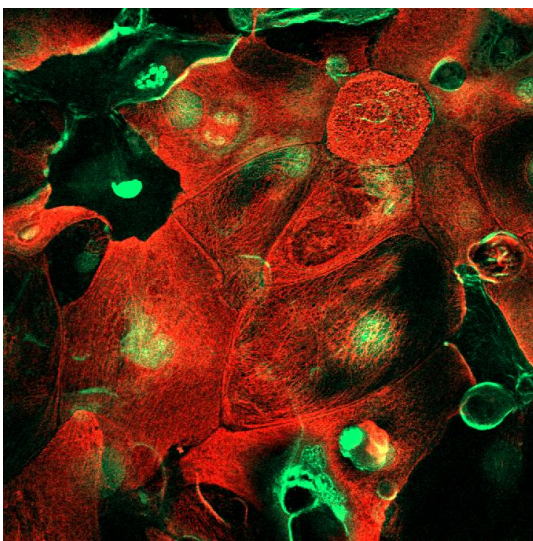


(2) 変位ケラチンが内在性ケラチン構築に及ぼす影響 (下図参照)

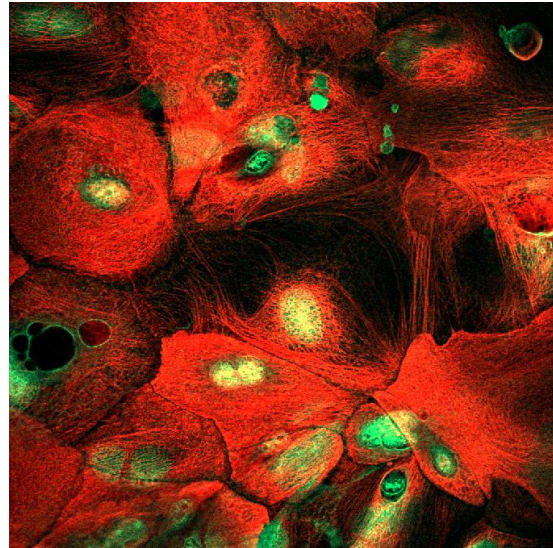
変異ケラチン・マウス (R125C) より得られた角化細胞に muristerone を加え (Mu+)、変位ケラチンを強制発現させたところ、加えなかった場合 (Mu-) と比べてケラチン構造に変化は無かった。

また、野生型マウス (WT) でも、同様の所見を得た。

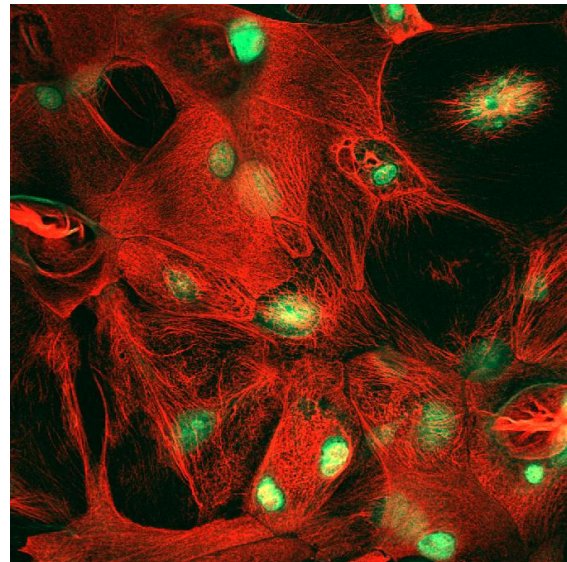
R125C: Mu+



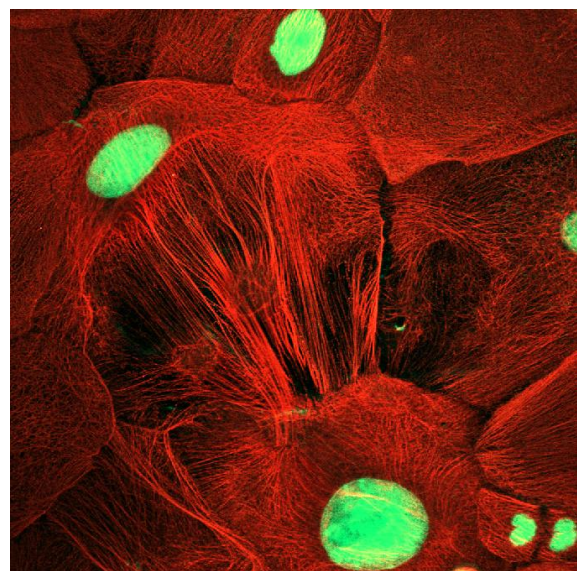
R125C: Mu-



WT: Mu+

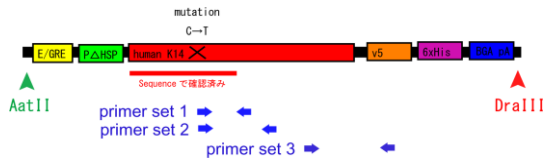


WT: Mu-

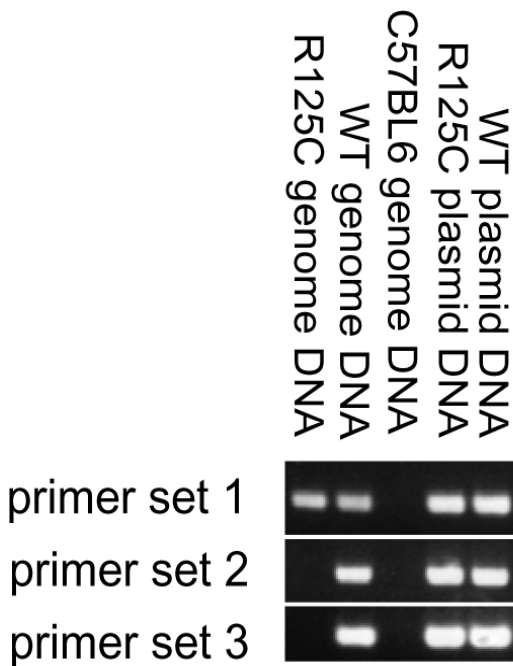


(3) 変異ケラチンの発現 (下図参照)

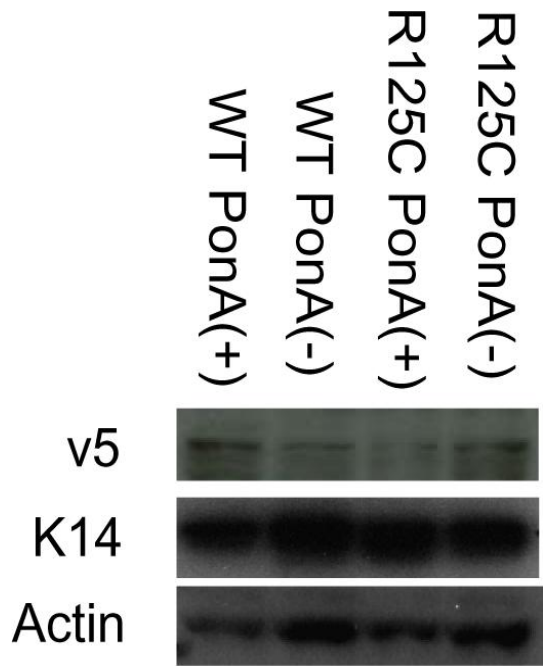
R125C において、変異ケラチンが十分に発現していることを確認するため、3 set の primer を作成した。



これらのprimerを用いて、導入された変異ケラチン遺伝子断片の全長をGenome PCRにより解析したところ、R125C マウスのK14 トランスジーン上において、Direct sequense 法で変異が確認された部位より3' 側 (v5 部位を含む) で一部遺伝子が増幅されなかった。此に対して、プラスミドでは増幅されていることより、導入された変異遺伝子は何らかの理由で一部が切断されているものと推察された。



さらに、R125C マウスより得た培養角化細胞では、ポナステロン (PonA) 添加してもv5 陽性の変異ケラチン蛋白が発現していないことを免疫プロットにより確認した。それに対して、WT マウスではPonA 添加時にv5 蛋白の発現している。



(4) 以上の所見より、変異ケラチン 14 遺伝子を含むDNA断片の一部に変異が導入され、その結果、発現した変異ケラチン mRNA が細胞内で直ちに消化されるため、蛋白レベルで十分量的の変異ケラチンが発現していないことが判明した。そのため、R125C マウスより得た培養角化細胞において、内在性ケラチンが球状の形態を取らず、アポトーシスも誘導されなかったものと推察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 真鍋 求

(秋田大学・大学院医学系研究科・教授)

研究者番号：30138309

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 河村 七美

(秋田大学・医学部・助教)

研究者番号：70323152