

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700437

研究課題名（和文） 神経細胞死を誘導する IPAS の分子細胞生物学な機能解析とノックアウトマウスの作製

研究課題名（英文） Functional analysis on the molecular and cellular biology of IPAS which induces neuronal cell death and production of its knockout mouse

研究代表者

鳥居 暁 (TORII SATORU)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：10444001

研究成果の概要（和文）：

IPAS の細胞死制御機構の解析を行った結果、IPAS はミトコンドリアにおいて Bcl-x_L などの生存促進性の Bcl-2 ファミリータンパク質と結合することがわかり、ミトコンドリア脱共役剤の CCCP 依存的に PINK1 および Parkin と結合しユビキチン化され分解をうけることがわかった。*in vivo*での神経細胞死における IPAS の生理機能の解明のため、IPAS ノックアウトマウスの作製を行いキメラマウスの作製まで完了した。

研究成果の概要（英文）：

As a result of the analysis about regulatory mechanism of IPAS-induced cell death, we have shown that IPAS was bound to pro-survival Bcl-2 family proteins, such as Bcl-x_L. Furthermore, IPAS was bound to PINK1 and Parkin in a mitochondria uncoupler, CCCP-dependent manner, leading to ubiquitination and degradation of IPAS. To elucidate the physiological function of IPAS in neuronal cell death *in vivo*, we performed the production of IPAS knockout mouse. We have already obtained IPAS chimera mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：細胞内情報伝達、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

本研究で主な研究対象として解析する IPAS (Inhibitory PAS domain protein) はそもそも、低酸素応答の転写抑制因子として発見された。低酸素応答機構では、HIF-1α とそのファミリー分子が重要な基本因子であることがわかっている。通常酸素濃度において HIF-1 α はプロリン残基を HIF-プロリン水酸化酵素 (PHD) によって水酸化される。水酸化された HIF-1 α は pVHL と相互作用した後にポリユビキチン化され、26S プロテアソーム依存的にタンパク質分解される。それに対して低酸素状態 やコバルトイオンによって、HIF-1 α は安定化し、核内に

移行して Arnt と結合し HRE 配列を介して、TH やエリスロポエチン、VEGF などの標的遺伝子の転写を活性化する。IPAS は核内において Arnt と競合して HIF-1α とヘテロダイマーを形成し、HIF-1 の HRE 配列への結合を阻害することで転写活性化能を抑制していることが既に示されている。

IPAS は、転写因子 HIF-1 α と相互作用することから、その機能は核内のみで発揮されるものと思われていた。ところが、申請者の詳しい解析の結果、IPAS は核だけでなく細胞質のミトコンドリアにおいて強く局在することがわかった。さらに、免疫沈降法と FRET を用いた解析から、IPAS はミトコンド

リアで Bcl-x_L と結合し、その機能を阻害することでミトコンドリアの凝集と細胞のアポトーシスを引き起こすという予想外の機能があることが判明した。この機能と局在には IPAS の C 末側の配列が重要であることがわかった。また siRNA を用いた実験から IPAS はコバルト投与による酸化ストレス依存的な神経細胞死において必須の役割を担うことがわかった。

IPAS は中枢神経の小脳で恒常的に発現することが既に示されていた。また IPAS は申請者の以前の研究において、酸化ストレスや NF-kappaB 経路依存的に発現誘導が起こることがわかっていた。パーキンソン症を引き起こす薬剤の MPTP (メチルフェニルテトラヒドロピリジン) は血液脳関門を構成するグリア細胞内において MPP⁺ に変換後に神経細胞内のミトコンドリアの複合体 I を阻害し神経変性の原因となる酸化ストレスの発生と NF-kappaB の活性化を引き起こすことが知られていた。このため、IPAS とパーキンソン症との関連を解析するために申請者が予備実験を行ったところ、MPTP によって中脳黒質周辺の組織で IPAS の発現上昇が起こることがわかった。

神経変性疾患の中でもパーキンソン病は 10 万人当たり約 100 人の発症率を持つ代表的な疾患の一つであり、近年のように平均寿命が延長した社会においては人々の QOL を低下させる重大な要因だと考えられ治療法の開発が急務であると言える。近年、パーキンソン病の原因遺伝子の解明が急速に進むと同時に、酸化ストレスとミトコンドリア機能障害が原因として注目を集めている。ミトコンドリアの凝集、融合は内因的な酸化ストレスを抑制するための防衛機構として起こるが、損傷を起こしたミトコンドリアを選択的に取り除くことができない緊急事態である。このような異常状態は、パーキンソン症の発症と深く関連しており、パーキンソン病に関わる遺伝子 (Parkin 等) の正常型はミトコンドリアの分裂を促進することで異常になったミトコンドリアを除去しようとする。ミトコンドリア選択的なオートファジーの解明が行われるにつれてこの細胞内小器官の注目度が現在増しており、まさに今大きく発展している研究対象である。そのような研究分野において、動的制御の新たな調節因子を発掘し解明することは、未解明な点が多く残されているこの分野に対して研究発展の推進力を与えるという大きな意義を持つことが考えられた。

また、低酸素抑制因子 IPAS のさらなる解析は、「酸化ストレス」と「低酸素」という一見して逆の生命現象を繋げる新たな分子間ネットワークを築くことが考えられた。IPAS は Bcl-2 でなく Bcl-x_L 特異的に結合し

作用することから、今まで Bcl-2 との差が明確に定義されにくかった Bcl-x_L の固有の機能を明らかにすることができると予測できた。ノックアウトマウスの作製は、パーキンソン症とその際の神経細胞死への IPAS の関与の解明という研究全体の中心命題の完遂を与えることが期待でき、そして次なる疾患治療薬の開発というステージにおいて、多くの重要な知見をもたらすと考えられた。

このような経緯を踏まえ、パーキンソン症を起こすような酸化ストレス下において、IPAS が発現誘導されミトコンドリアにおいて Bcl-x_L に結合し、細胞のアポトーシスが起こればパーキンソン症の一因となっている可能性を考慮し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究過程を踏まえて、本研究において、

- (1) 神経細胞死における IPAS の細胞死制御機構の解析を行うこと
- (2) IPAS ノックアウトマウスを作製することで *in vivo* での神経細胞死における IPAS の生理機能の解明すること

を目的とする。上記二点の目的を達成するために明らかにする点は以下の4点である。

- 1) 低酸素応答抑制因子とアポトーシス促進因子という二面性を持つ IPAS の制御機構の解明
- 2) IPAS と Bcl-x_L 間の結合領域、結合様式の解明
- 3) IPAS ノックアウトマウスを用いた MPTP などの処理による IPAS の神経細胞死への関与の解明
- 4) IPAS ノックアウトマウスを用いた自然環境かでの IPAS の神経細胞死への関与の解明

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するための工夫として、以下の手法で研究を進める。「培養細胞を用いた、IPAS の分子細胞生物学的な機能解析」と「ノックアウトマウスを用いた、神経細胞死に対する IPAS の生理機能の解析」という大きな二つの枠組みに分け、実験を行う。「培養細胞を用いた、IPAS の分子細胞生物学的な機能解析」においては、PC12 細胞などの哺乳類培養細胞において、細胞内のシグナル伝達経路を活性化する薬剤やたんぱく質を用いて、IPAS の機能や局在の変化を細胞染色、免疫沈降法、FLIM-FRET 法などを用いて解析する。「ノックアウトマウスを用いた、神経細胞死に対する IPAS の生理機能の解析」では IPAS の細胞死に関わるエキソンだけを欠失した単純 Null のノックアウトマウスを作

製し、MPTP 投与を行い中脳黒質の細胞死への効果を RT-PCR、Western blotting、*in situ* ハイブリダイゼーション法、免疫組織化学法などの方法で解析する。

4. 研究成果

(1) IPAS は生存促進性の Bcl-2 ファミリータンパク質の中でも特に Bcl-x_L、Bcl-w、Mcl-1 と相互作用することがわかった (図 1)。さらに FLIM-FRET を用いた解析によって IPAS と Bcl-x_L が生細胞内で近傍に位置し直接相互作用することがわかった。IPAS はこれらの生存促進性の Bcl-2 ファミリータンパク質に結合し、Bax との結合を競合することで、細胞死を促進することがわかった (図 2)。これらの結果を国際雑誌にて発表した。

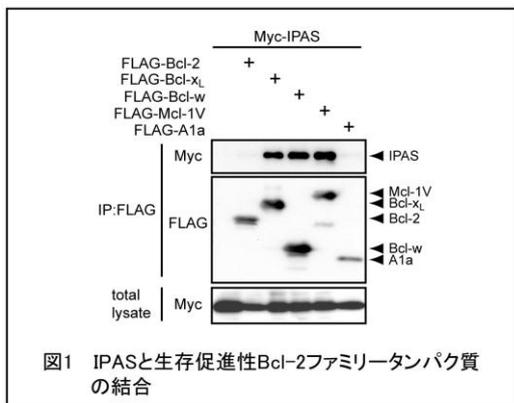


図1 IPASと生存促進性Bcl-2ファミリータンパク質の結合

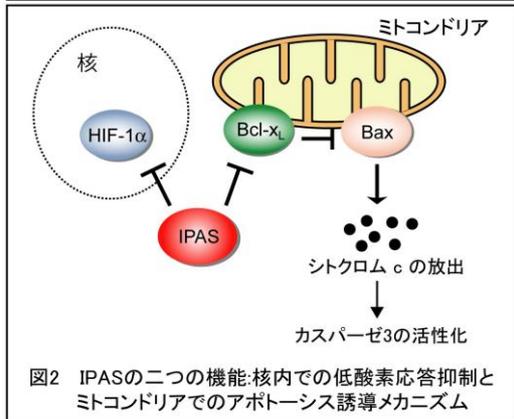


図2 IPASの二つの機能:核内での低酸素応答抑制とミトコンドリアでのアポトーシス誘導メカニズム

さらに Bcl-x_L と IPAS との結合における重要な配列を明らかにするため、IPAS の欠失変異体を作製し、FLIM-FRET 法を用いて観察した結果、IPAS の C 末側の 217-230 アミノ酸が Bcl-x_L との結合に必要であることがわかった。

(2) EGF のような生存刺激によって、IPAS の細胞質局在の増強が弱く起こることがわかった。それに対して、DNA 損傷を引き起こすカンプトテシンや鉄キレート剤のデフェロキサミン、低酸素のようなストレスによって IPAS のミトコンドリアへの局在の増加が引き起こされると同時に、これまで見られなかった細胞質でのドット状という新たな局在

が観察された。

(3) ミトコンドリアにおける IPAS とパーキンソン病原因因子 PINK1-Parkin 経路との関連性に注目した。その結果、IPAS はミトコンドリア脱共役剤の CCCP 依存的に PINK1 および Parkin と結合し、その下流でユビキチン化されプロテアソーム依存的な分解を受けることがわかった (図 3、図 4)。

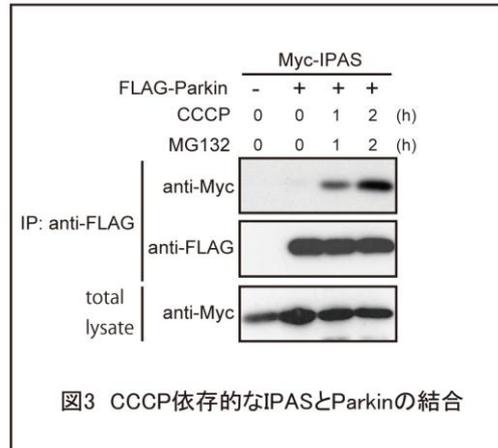


図3 CCCP依存的なIPASとParkinの結合

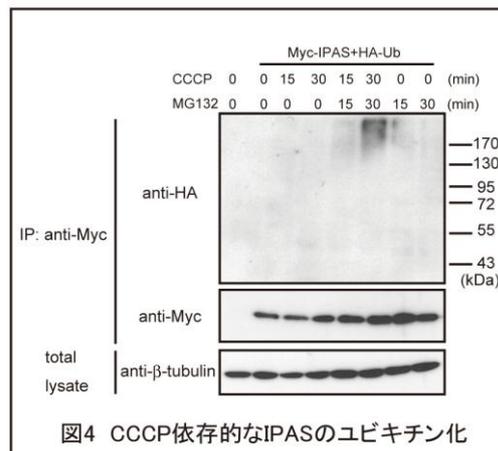


図4 CCCP依存的なIPASのユビキチン化

IPAS 欠失変異体を用いた解析で、この結合は Bcl-x_L と同様に IPAS 特異的な C 末端側で起こることがわかった。さらに Parkin siRNA を用いた解析によって、内在性 Parkin によって IPAS がユビキチン化を受けることが示

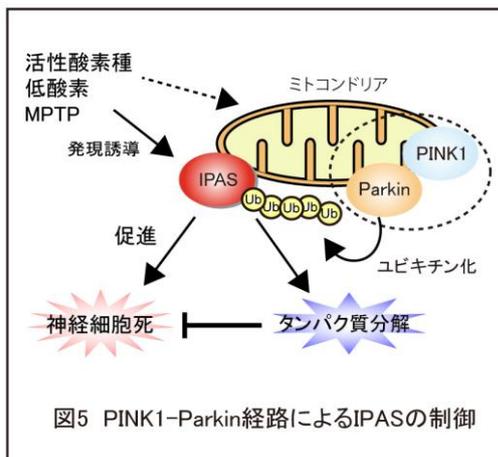
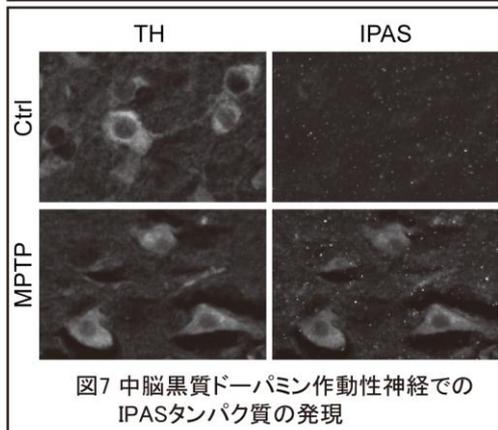
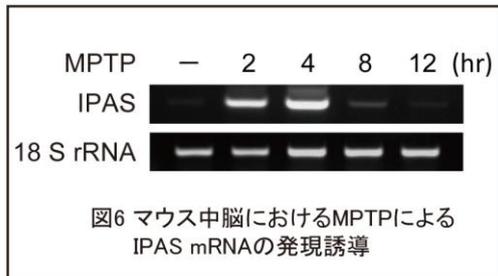


図5 PINK1-Parkin経路によるIPASの制御

された。これらの結果から PINK1-Parkin 経路が IPAS を分解することで、その発現量を制御し、IPAS 依存的な神経細胞死から細胞を保護していることが考えられる (図 5)。

(4) IPAS の C 末端ペプチドを抗原とした抗体を作成して実験に用いたところ、実験的パーキンソン病誘発剤である MPTP 投与されたマウスの中脳黒質を含む中枢神経全般で IPAS mRNA およびタンパク質の発現量が増大し、その局在は核ではなく細胞質であることがわかった (図 6、図 7)。この結果はパーキンソン病において、IPAS の発現量が増大し神経細胞死を引き起こしている可能性を示唆している。



(5) IPAS ノックアウトマウスは理研 CDB との共同研究で作製が行われた。IPAS 特異的なエクソン 16 を欠失させるベクターを作製し、ES 細胞に導入した後、サザンブロッティング法及び PCR 法を用いて、変異が導入された ES 細胞のコロニーを取得した。その後相同組み換え体の ES 細胞のインジェクションを行い、10 匹のキメラマウスを得た。さらに追加のキメラマウスも作成中である。既に入手した 10 匹のキメラマウスを C57BL/6J マウスを掛け合わせた結果、F1 マウスを得ることができ、現在遺伝子欠失に関して測定中である。今後ノックアウトマウスを作製しさらなる解析を行う予定である。

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 3 件)

1. Torii S, Gotoh Y, Ishizawa T, Hoshi H, Goryo K, Yasumoto K, Fukumura H, Sogawa K. Pro-apoptotic activity of inhibitory PAS domain protein (IPAS), a negative regulator of HIF-1, through binding to pro-survival Bcl-2 family proteins. *Cell Death & Differentiation*, 18:1711-1725 (2011). doi:10.1038/cdd.2011.47. 査読有

2. Goryo K, Torii S, Yasumoto K, Sogawa K. Tumor necrosis factor- α suppresses the hypoxic response by NF- κ B-dependent induction of inhibitory PAS domain protein (IPAS) in PC12 cells. *Journal of Biochemistry*, 150:311-318 (2011). doi:10.1093/jb/mvr061. 査読有

3. Hiwatashi Y, Kanno K, Takasaki C, Goryo K, Sato T, Torii S, Sogawa K, Yasumoto K. PHD1 interacts with ATF4 and negatively regulates its transcriptional activity without prolyl hydroxylation. *Experimental Cell Research*, 317:2789-2799 (2011). doi:10.1016/j.yexcr.2011.09.005. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 鳥居暁、安元研一、十川和博、HIF-3 α の選択的スプライスバリエントである IPAS の細胞内局在とその制御機構、第 85 回日本生化学会大会 (招待講演)、2012 年 12 月 14 日、福岡

2. 鳥居暁、Pro-apoptotic activity of inhibitory PAS domain protein (IPAS), a negative regulator of HIF-1, through binding to pro-survival Bcl-2 family proteins、内藤カンファレンス、2012 年 6 月 26 日~29 日、札幌

3. 鳥居暁、IPAS acts as a dual function protein involved in transcriptional repression and apoptosis、The 3rd UCL-Tohoku University Joint Symposium、2011 年 10 月 19 日、University College London、ロンドン、イギリス

[その他]

ホームページ等

東北大学大学院生命科学研究科 HP

<http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/>

所属研究室 HP

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www>

/molbiol/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 暁 (TORII SATORU)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：10444001