

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580346
 研究課題名（和文）新規に同定したGAPDHアミロイド様繊維の神経変性疾患における役割の解明
 研究課題名（英文）Role of GAPDH amyloid-like fibrils formation in neurodegenerative diseases
 研究代表者 中嶋 秀満 (NAKAJIMA HIDEMITSU)
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
 研究者番号：30405360

研究成果の概要：

本研究では、我々が新規に同定した GAPDH アミロイド様繊維の形成分子機構と神経変性疾患における病態生理学的意義について細胞および個体レベルで検討を行った。結果、アミロイド化機構として活性中心システイン間のジスルフィド結合とコンフォメーション変化が重要であることを明らかにした。また、種々の GAPDH 変異体発現誘導細胞を神経細胞株 (SH-SY5Y) にて樹立し、GAPDH アミロイド繊維形成が酸化ストレス性神経細胞死に関与することを明らかにした。更に、GAPDH トランスジェニックマウスを用いた神経変性疾患モデルを作製し、脳内 GAPDH アミロイド様繊維形成と神経変性の程度が相関することを明らかにした。また、新たに GAPDH ドミナントネガティブ変異体を発見し、本変異体を用いた神経変性疾患への治療応用の可能性を示唆した。

交付額：

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：薬理・神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

GAPDH は解糖系酵素として同定された古

典的酵素であるが、近年、様々な機能を有する多機能蛋白質であることが報告されている。特に、酸化ストレス性神経細胞死におい

て、GAPDH は核内移行し p53 や PUMA などのアポトーシス関連遺伝子の発現を誘導することから、細胞死のイニシエーターである可能性が示唆されている。一方で、我々は GAPDH が酸化ストレスによりアミロイド様繊維を形成することを世界に先駆けて発見した。研究開始時には、GAPDH アミロイド様繊維の形成過程の詳細及びその生物学的意義は不明な部分が多く残されていた。また、GAPDH が多くの神経変性疾患の病巣部において蓄積していることから、病態形成に関することは示唆されていたが、その病態生理学的意義は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が発見した GAPDH アミロイド様繊維の形成分子機構、生物学的および神経変性疾患における病態生理学的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

アミロイド様繊維形成の分子機構については、組み換え型精製ヒト GAPDH およびその各種点変異体を作製し、酸化ストレスとして一酸化窒素または過酸化水素を用い、分光光度計による濁度（凝集）、円二色性スペクトル、コンゴレッドおよびチオフラビン S によるアミロイド染色、走査型電子顕微鏡によるネガティブ染色法など、種々の蛋白質科学的解析を行った。生物学的意義を探るにあたって、ドキシサイクリンにより発現調節可能な GAPDH 安定発現 SH-SY5Y 細胞株を Tet-ON システム (Invitrogen) を用いて樹立し、種々の点変異体 GAPDH を用いて酸化ストレス性細胞死を評価した。病態生理学的意義に関しては、GAPDH トランスジェニック

クマウス（小野薬品工業から供与）を用いて、メタンフェタミン投与モデル（黒質線条体ドーパミン神経破壊モデル）を作製し、黒質および線条体における酸化ストレスマーカー（プロテインカルボニル化）および神経変性（ドーパミンおよびその代謝物の HPLC 測定、ドーパミン合成酵素チロシンヒドロキシラーゼの Western blot 解析）の程度を生化学的および組織化学的に解析した。

4. 研究成果

アミロイド様繊維形成分子機構については、活性中心システイン (Cys152) がその責任アミノ酸であり、分子間ジスルフィド結合によるコンフォメーション変化が繊維化のトリガーとなることを明らかにした。また、アミノ酸 284 番を含む柔軟なループ構造がアミロイド形成を促進させる構造であることをその欠損変異体を用いて明らかにした（発表論文 1 を参照）。活性中心システインを欠損させた GAPDH(C152A) の誘導発現 SH-SY5Y 細胞では、酸化ストレス性細胞死が抑制されること、また、繊維化が著明に亢進する GAPDH 変異体(S284C)の発現細胞では、細胞死が増強することを明らかにした。更に、GAPDH トランスジェニックマウスでは、メタンフェタミン投与による黒質線条体系の酸化ストレスおよびドーパミン神経変性（チロシンヒドロキシラーゼ量およびドーパミン量の減少）が増強し、病変部位に GAPDH アミロイド様繊維が蓄積することを明らかにし、世界で初めて個体レベルでの GAPDH 凝集と神経変性との関連性を示唆した（投稿中）。加えて、C152A-GAPDH は酸化ストレス性神経細胞死において内在性 GAPDH のアミロイド様繊維を阻害することで細胞保護作用を示すドミナントネガティブ分子と

して働くことを明らかにし、本変異体を用いた神経変性疾患への治療応用への可能性を示唆した（投稿中）。

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1件）

I. Nakajima H., Amano A., **Fujita A.**, Fukuhara A., Azuma YT., Hata F., **Inui T.**, Takeuchi T. (2007) The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death. *J. Biol. Chem.* 282(36): 26562-26574. (査読有)

〔学会発表〕（計9件）

1. 第114回日本薬理学会近畿部会

2008年11月14日、神戸（口頭発表）

小野 葉子、居原 秀、**中嶋 秀満**、東 泰孝、竹内 正吉

「酸化ストレスによるGAPDHの核内移行とその役割」

2. 第146回日本獣医学会学術集会

2008年9月24日、宮崎。（口頭発表）

中嶋 秀満、小野 葉子、東 泰孝、竹内 正吉

「酸化ストレス誘発性細胞死における核内GAPDHのシグナル伝達経路」

3. 第51回日本神経化学学会大会

2008年9月11日、富山。（ポスター発表）

小野 葉子、居原 秀、**中嶋 秀満**、東 泰孝、竹内 正吉

「酸化ストレス誘発性神経細胞死において、核

内GAPDHがPARP-1を活性化する」

4. 第145回日本獣医学会学術集会（シンポジウム）

2008年3月30日、相模原。（口頭発表）

中嶋 秀満、東 泰孝、竹内 正吉

「Moolighting Protein GAPDHによる神経細胞死の分子メカニズム解明～GAPDHによるアミロイド様凝集の発見と創薬への展望～」

5. 第81回日本薬理学会年会

2008年3月18日、横浜。（口頭発表）

中嶋 秀満、天野 渉、東 泰孝、竹内 正吉

「酸化ストレス誘発性神経細胞死におけるヒトGAPDH活性中心システインの重要性」

6. 第30回日本神経科学大会/第50回日本神経化学学会大会/第17回日本神経回路学会大会合同学会

2007年9月11日、横浜。（ポスター発表）

天野 渉、**中嶋 秀満**、東 泰孝、竹内 正吉

「グリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素のアミロイド様凝集と神経細胞死への関与」

7. 第30回日本神経科学大会/第50回日本神経化学学会大会/第17回日本神経回路学会大会合同学会

2007年9月10日、横浜。（口頭発表）

中嶋 秀満、天野 渉、東 泰孝、竹内 正吉

「酸化ストレスによるグリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素のアミロイド様凝集には活性中心システイン残基が重要である」

8. 第144回日本獣医学会学術集会

2007年9月3日、江別。（口頭発表）

天野 渉、中嶋 秀満、東 泰孝、竹内 正吉

「ヒトグリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素の酸化ストレスによるアミロイド様凝集と神経細胞死。」

9. 第111回日本薬理学会近畿部会

2007年6月15日、名古屋。(口頭発表)

天野 渉、中嶋 秀満、東 泰孝、竹内 正吉

「酸化ストレスによるヒトグリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素のアミロイド様凝集と神経細胞死への関与」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀満 (NAKAJIMA HIDEMITSU)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：30405360

(2) 研究分担者

乾 隆 (INUI TAKSHI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：80352912

(3) 連携研究者

藤田 秋一 (FUJITA AKIKAZU)
名古屋大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60282232