

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17025010

研究課題名（和文）神経変性シグナルの遺伝学的解析による疾患治療ターゲットの解明

研究課題名（英文）Identification of therapeutic targets by genetic studies of neurodegeneration signal

研究代表者

三浦 正幸 (MIURA MASAYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：50202338

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングによって得られた神経変性の進行を抑制する因子 Rpn11 の同定により、老齢個体における生体内の 26S プロテアソーム活性の低下を遺伝学的操作で向上させることによって神経変性の進行を抑制できる可能性を示した。これは加齢に伴う生体内の 26S プロテアソーム活性の低下が、神経変性疾患の晩発性発症や加齢に伴う進行の原因、つまり危険因子の一つであることを強く示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

The ubiquitin-proteasome system, which contributes to protein quality control by degrading unfolded or misfolded proteins, is closely related to the etiology of neurodegenerative disorders. The 26S proteasome is composed of one, proteolytically active, core particle (alias 20S proteasome) and one or two 19S regulatory particles subdivided into lid and base subcomplexes. In a genetic gain-of-function screen, we identified one of the lid subunits as a suppressor of expanded polyglutamine-induced neurodegenerative phenotypes in a *Drosophila* disease model. Our results suggest that an age-related reduction in 26S proteasome activity is the key factor of the increased risk for late-onset of neurodegeneration, and implicate that keeping the amount of the 26S proteasome by providing an overexpressed lid subunit will provide a way to delay the onset of neurodegeneration in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	19,600,000	0	19,600,000
2006 年度	20,400,000	0	20,400,000
2007 年度	20,400,000	0	20,400,000
2008 年度	20,400,000	0	20,400,000
2009 年度	20,700,000	0	20,700,000
総計	100,500,000	0	101,500,000

研究分野：病態脳

科研費の分科・細目：

キーワード：モデル生物、ショウジョウバエ、細胞死、神経変性、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患における変性シグナルカスケードの機能解析は脳神経疾患治療の重要な基本ステップとして位置づけられている。神経変性に深く関係したカスパーゼ非依存的な細胞死経路を含む晩発性神経変性機構は殆ど明らかにされておらず、この新規細胞死を制御する遺伝子群を機能的に同定し治療ターゲット分子を効率よく抽出するシステムを構築することが急務である。我々はこれまでに遺伝学的な研究に適したショウジョウバエを用いて神経変性シグナルの機能的ゲノムスクリーニングを可能にする実験系の構築を行ってきた。

2. 研究の目的

アポトーシス実行メカニズムの進化的保存性・共通性が線虫やショウジョウバエ・マウスといったモデル生物系を用いて明らかにされてきた。しかし、神経変性疾患に特有の晩発性発症に深く関係した神経変性シグナルは殆ど明らかにされておらず、神経変性を制御する遺伝子群を機能的に同定し治療ターゲット分子を効率よく同定することが重要である。本研究では遺伝学的な研究に適したショウジョウバエを用いて神経変性シグナルの機能的ゲノムスクリーニングを展開し、その成果を哺乳類に還元することによって晩発性神経変性機構の包括的な理解と新規治療法に開発に向けた創薬ターゲットを提供する。

3. 研究の方法

(1)ショウジョウバエ遺伝学を用いて神経変性に関わる遺伝子のスクリーニングを行った。

(2)マウス神経系におけるカスパーゼ活性化状態を免疫組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1)ミトコンドリアを介した神経変性シグナル

多くの神経変性疾患において、細胞内の異常タンパク質の凝集体形成が共通する病態として知られている。凝集体形成や細胞毒性は、異常蛋白質の蓄積とその分解系のバランスによって規定されると考えられる。ユビキチンプロテアソーム経路は異常蛋白質の主要な分解経路であるが、この経路はATPを利用した蛋白質分解系であるために、ミトコンドリアの機能低下によって大きく影響を受けることが考えられる。ミトコンドリア複合体IやIIの活性低下がパーキンソン病やハンチントン舞踏病で観察されていることから、これらの病態発症とミトコンドリア機能とは密接に関わることが考えられている。ミトコンドリアにある主要な細胞死調節因子としてBcl-2ファミリーがあるが、神経変性に関わる機能に関する研究は殆ど行われていなかった。ショウジョウバエはゲノム中にただ2つのBcl-2ファミリー分子(Drob-1とその阻害分子Buffy)が存在すること、ショウジョウバエでは優れた神経変性モデルが作成されていることから、神経変性におけるBcl-2ファミリー分子機能解析をショウジョウバエを用いて行った。その結果、Drob-1のノックダウンはATP産生の低下、細胞内ユビキチン蛋白質の蓄積をもたらし、ポリグルタミンによる神経変性を増強した。ミトコンドリア複合体IやIIの阻害剤による膜電位低下、電子伝達効率の低下、生存率低下、ミトコンドリアの形態異常をDrob-1ノックダウンは増強した。これらの結果は、Drob-1がストレスにさらされたミトコンドリアの機能保持を介して、神経保護作用を発揮すること

を示すものである。よって Bcl-2 ファミリーはアポトーシス経路の制御に加え、ミトコンドリアの機能保持を介して神経変性の制御を行う分子であることが示唆された。

(2) 神経変性シグナルの遺伝学的スクリーニング

ショウジョウバエ遺伝子の過剰発現スクリーニング (GS スクリーニング) を取り入れることで、神経細胞死シグナルの機能的ゲノムスクリーニングを行った。GS スクリーニングで得られた *endd* (effector for neural cell death and degeneration) 系統で遺伝子の過剰発現によって R7 が完全に消える系統が 4964 の GS 系統中 30 系統あった。このスクリーニングでポリグルタミンによる神経細胞死に関与する遺伝子として小胞体に存在する不良品蛋白質の輸送チャンネル (Sec61 α) を同定した。Sec61 α は、分泌経路で合成される蛋白質の小胞体への移行と、小胞体関連タンパク質分解 Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation:ERAD において小胞体から細胞質への不良品タンパク質の輸送を担う重要なチャンネルである。Sec61 α をショウジョウバエ複眼や培養細胞で過剰発現すると不良品タンパク質が細胞質に逆輸送されて蓄積し細胞死が誘導されること、逆に Sec61 α の活性を遺伝学的に弱めることによりポリグルタミン病モデルにおいて細胞質に蓄積していた不良品タンパク質が減少し、晩発性の神経変性が回復することが明らかになった。一方、GMR>reaper による複眼縮小を回復させる染色体欠失系統が一次スクリーニングで 21 得られ、この中に *endd* スクリーニングで得られた遺伝子が含まれるかを調べたところ、DF (2L) TW161 系統が *endd29* を含んでいた。この原因遺伝子は IKK ϵ でありこのキナーゼが内在性のカスパーゼ阻害遺伝子蛋白質 DIAP1 の分解をリン酸化によって調節することを見いだした。DmIKK ϵ によって調節される細胞死を誘導しないレベルのカスパーゼ活性が神経前駆細胞の運命決定に関わることを明らかにした。神

経変性においても細胞死に至らないカスパーゼの活性化が神経変性の初期に関与することが示唆されており、今回見いだしたカスパーゼの新たな調節機構の関与に興味を持たれる。

(3) 細胞死シグナル検出系の開発と生体での細胞死シグナル機能

進化的に保存された内在性カスパーゼ阻害遺伝子として IAP (Inhibitor of Apoptotic Protein) が知られている。IAP は E3 ユビキチンリガーゼであり代謝回転のはやい短寿命蛋白質である。IAP 蛋白質の量的な調節によってカスパーゼ活性の調節が行われているため、IAP 分解を生体内でリアルタイムに可視化することでカスパーゼ活性化シグナルの時空間的な解析が可能になると考えられる。ショウジョウバエ DIAP1-venus (GFP variant) を作成し、細胞死刺激によって細胞死が誘導され venus による蛍光の消失がみられるトランスジェニックショウジョウバエを作成した。このプローブは、DIAP1 に変異を導入することでカスパーゼとの結合は出来ないがプロテアソームによって内在性の DIAP1 と同様に分解されるようにデザインされている (Pre-apoptosis signal detecting probe based on DIAP1 degradation: PRAP と命名)。生体イメージングにおいては十分なプローブの発現が必要であるが、PRAP は高レベル発現させてもカスパーゼ阻害による細胞死には影響がなかった。次にショウジョウバエ末梢外感覚器形成の全過程を、PRAP を用いた生体イメージングにより解析した。その結果システインプロテアーゼであるカスパーゼが細胞死の実行のみならず、細胞骨格の制御等の非細胞死機能を発揮するための調節機構として、カスパーゼ抑制因子である IAP タンパク質の分解、及び安定化が経時的かつ、細胞系譜依存的に厳密に制御されることが重要であることを明らかにした。生体イメージングによって明らかとなったもう一つの驚きは、細胞死抑制に必須と考えられてきた DIAP1 が感覚器形成過程において消失するこ

とであり、この結果は、カスパーゼ活性化制御が多段階的に行われることを示唆している。終分化した神経細胞ではカスパーゼ活性化因子 Apaf-1 の発現が低下しており、様々なストレスによって DIAP1 の代謝や分解が影響されるが、そのような状況下においても神経細胞は安定した生存を維持する仕組みを獲得していることが明らかになった。

次にほ乳類脳で組織化学的にカスパーゼ活性化細胞を検出する系の構築を行った。神経系や免疫系で重要な働きをするセマフォリン7Aがカスパーゼ9によって特異的に切断されることを見だし、この切断されたセマフォリン7Aを組織化学によって検出する抗体を用いて、脳の老化におけるカスパーゼの活性化を解析した。その結果、24ヶ月齢マウスの脳では、カスパーゼ9が活性化するが、この活性化はカスパーゼ3の活性化を伴わず、細胞死の誘導をしていのではないことが示唆された。このように、老化脳ではイニシエーターカスパーゼの活性化はあるものの、アポトーシスが抑制された状態にあることが明らかになった。晩発性におこる神経変性が非アポトーシス形態をとることが数多く報告されているが、今回の結果はその知見を裏付けるものと考えられる。

(4)晩発性におこる神経変性発症機構の解析
神経細胞における異常タンパク質の凝集・蓄積は多くの神経変性疾患において見られる特徴であり、この異常タンパク質の凝集・蓄積のプロセスが神経細胞死に共通するメカニズムであると考えられている。これら異常タンパク質の主要な分解経路としてユビキチンプロテアソームシステム(UPS)があり、この蛋白質分解系の神経変性への関わりが注目されている。異常タンパク質の凝集・蓄積に加え、神経変性疾患の大きな特徴の一つとして、その発症が加齢に伴っておこるいわゆる晩発性発症の様式をあげることができる。しかし、神経変性が晩発性に発症・進行する理由はまだ明らかではなく、遺伝学

的な説明が待たれるところである。

我々は、ショウジョウバエをモデル生物として用いて、*in vivo* における神経変性とプロテアソーム活性の関与を示すことを試みた。まず、神経変性が晩発性に発症する原因として加齢依存的なプロテアソーム活性の変化を想定し、ショウジョウバエ頭部のプロテアソーム活性を測定した。その結果、若年個体と比較して老齢個体におけるプロテアソーム活性の段階的な低下が観察された。プロテアソーム活性の老齢個体における低下または若年個体での亢進が何によって制御されているのか、遺伝学的なスクリーニングにより制御分子の同定を目指しているが、これまでに行った神経変性抑制因子の過剰発現型スクリーニングにより、26Sプロテアソームの構成因子 Rpn11 (19Sプロテアソームの構成因子)が同定された。Rpn11の過剰発現は伸長ポリグルタミンによる神経変性を有意に抑制した。このプロテアソーム構成因子に着目し、個体におけるプロテアソーム活性を測定したところ、プロテアソーム構成因子発現系統において老齢個体においても恒常的にプロテアソーム活性が維持された。

一種類のプロテアソーム構成因子 Rpn11 を発現させただけで、伸長ポリグルタミンによる神経変性や加齢に伴うプロテアソーム活性の低下を抑制した理由を調べるために、グリセロール密度勾配遠心法を用いて、それぞれのプロテアソームの量的変化及び活性を、若年・老年・プロテアソーム構成因子発現老年の個体でそれぞれ比較した。その結果、老年ショウジョウバエでは若年ショウジョウバエに比べて26Sプロテアソームの量及び活性が減少しており、プロテアソーム構成因子を発現させた個体では、その減少が抑制されていた。これらの結果から、加齢に伴うプロテアソーム活性の低下は26Sプロテアソームの量が変化することにより引き起こされ、26Sプロテアソーム構成因子を正常より多く発現している個体では26Sプロテアソームの量を若年と同様に保つことができるという仕組みが考えられた。興味深いことに、26S

を構成する 20S や 19S のタンパク質量は若年と老年を比較しても顕著な差は認められなかった。以上より、①26S プロテアソーム量に関して若年と老年で差があり、②メカニズムは不明であるがプロテアソーム構成因子の過剰発現は老年における 26S プロテアソームの減少を抑制すると考えられた。

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 26 件)

1. Koto, A., Kuranaga, E. & Miura, M. Temporal regulation of *Drosophila* IAP determines the dual functions of caspases in sensory organ development. *J. Cell Biol.* **187**, 219-321 (2009).

2. Ohsawa, S., Hamada, S., Asou, H., Kuida, K., Uchiyama, Y., Yoshida, H. & Miura, M. Caspase-9 activation revealed by Semaphorin 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. *J. Neurosci.* **29**, 11385-11392 (2009).

3. Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K. & Miura, M. Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with aging process. *Mol Cell Biol.* **29**, 1095-1106 (2009).

4. Ohsawa, S., Hamada, S., Yoshida, H. & Miura, M. Caspase-mediated changes in Histone H1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons. *Cell Death Diff.* **15**, 1429-1439 (2008).

5. Kuranaga, E., Kanuka, H., Tonoki, A., Takemoto, K., Tomioka, T., Kobayashi, M., Hayashi, S. & Miura, M. *Drosophila* IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell* **126**, 583-596 (2006).

6. Senoo-Matsuda, N., Igaki, T. & Miura, M. Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in *Drosophila*. *EMBO J.* **24**, 2700-2713 (2005).

7. Kanuka, H., Hiratou, T., Igaki, T., Kanda, H., Kuranaga, E., Sawamoto, K., Aigaki, T., Okano, H. & Miura, M. Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61 α translocon in *Drosophila* postmitotic neurotoxicity. *BBA* **1726**, 225-237 (2005)

[学会発表] (計 41 件)

1. Miura, M.: In vivo imaging and physiological roles of cell death signaling during development. The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. 2008, 12.2-3, Tokyo, Japan

2. Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., Miura, M.: Involvement of the 26S proteasome in the age-related neurodegenerative diseases. BMB 2008 Symposium. 2008. 12.9-12. Kobe, Japan

3. Miura, M.: Involvement of the 26S proteasome in *Drosophila* model of age-related neurodegenerative disease. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2008.7.9-11. Tokyo, Japan.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 生体刺激存在下での mRNA のフレームシフトを利用した蛋白質の発現方法

発明者: 三浦正幸、岩脇隆夫

権利者: 理化学研究所

種類: 特許・実用新案

番号: 4446057

取得年月日: 2010 年 1 月 29 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~genetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 正幸 (MIURA MASAYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：50202338