

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890216
 研究課題名（和文）新規 ALS 原因遺伝子 VAPB の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the novel ALS-causative VAPB gene.

研究代表者

金蔵 孝介（KANEKURA KOHSUKE）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10508568

研究成果の概要（和文）：新規 ALS 原因遺伝子 VAPB が小胞体ストレス応答シグナル(UPR)に関与することを既に報告してきたが、我々はさらに野生型 VAPB が小胞体ストレスセンサーのうち小胞体シャペロンの発現量を上昇させる IRE1 経路に対して促進的に、細胞死を誘導するとされる PERK 経路に対しては抑制的に働くことを見出した。それに対し、ALS を起こす変異型 VAPB は野生型 VAPB の機能を優性抑制性変異体として抑制し、PERK 経路を刺激して細胞死誘導性転写因子 CHOP の発現を上昇させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The novel ALS-causative gene, VAPB is involved in unfolded protein response, a physiological signal against endoplasmic reticulum (ER) stress. We investigated VAPB function in detail, and demonstrated that wt-VAPB triggers IRE1 to enhance expression of ER chaperons but it suppress PERK pathway. On the other hand, ALS-causative mutant VAPB dominant negatively suppresses wt-VAPB function and triggers PERK pathway, resulting in upregulation of cytotoxic transcription factor CHOP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：ALS, UPR, VAPB, ER stress

1. 研究開始当初の背景

申請者らは筋萎縮性側索硬化症(ALS)の根治療法を確立すべく、家族性 ALS 原因遺伝子

によるシグナル伝達異常を解明している。家族性 ALS の原因遺伝子としては長らく SOD1 変異を中心に研究が進められて来たが、孤発性 ALS との相違点も指摘されており、

また近年数多くの ALS 原因遺伝子が同定されて来たことから、それぞれの ALS 原因遺伝子の機能解析とその遺伝子変異による異常を同定し、その結果を孤発性 ALS と比較検討することが非常に重要となって来た。

2. 研究の目的

新規 ALS 原因遺伝子 VAPB は優性遺伝性 ALS を誘導するが、その機能は全く未知であった。我々は酵母の VAPB ホモログの機能解析から VAPB が小胞体ストレス応答反応 UPR に関連しているとの仮説に基づき研究を遂行している。我々は既に VAPB が IRE1/XBP1 経路に促進的に作用すること、変異型 VAPB はその機能が失われていること、さらに変異型 VAPB は野生型 VAPB の機能を dominant negative 変異体として抑制することを報告して来た。

我々は本研究において、VAPB による UPR 調節機構のより詳細な解明、特に VAPB による UPR 促進作用に必須と推定された FFAT モチーフ蛋白の同定、VAPB を用いた ALS モデル作成を計画し、最終的に ALS 原因遺伝子 VAPB の生理機能および変異による異常を詳細に解明し家族性 ALS のみならず孤発性 ALS 発症メカニズムを明らかにすることを目標としている。

3. 研究の方法

(1)ルシフェラーゼアッセイ

UPR 下流シグナルを同定するために、UPR 下流で転写が調節される UPRE, ERSE, および ATF4 プロモーター領域と融合させたルシフェラーゼコンストラクトを用いて、運動神経細胞株 NSC34 細胞においてルシフェラーゼアッセイを行った。また、IRE1 遺伝子、または PERK 遺伝子ノックアウトマウス由来線維芽細胞へもルシフェラーゼを導入し、同様のアッセイを行った。

(2)リアルタイム PCR およびウエスタンブロット法

ルシフェラーゼアッセイで得られた結果を mRNA レベルおよび蛋白質レベルで証明するために、それぞれ下流の遺伝子に対するプライマーを作成しリアルタイム PCR を行った。また、同様にウエスタンブロット法により、蛋白質の増減を証明した。

(3)初代培養運動神経細胞死アッセイ

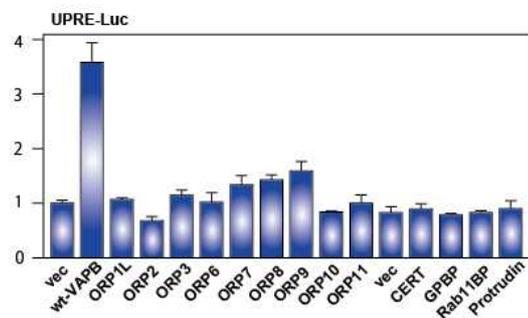
E14 妊娠マウスから胎児を採取し、脊髄を単離する。髄膜を除去した後プロテアーゼにより運動神経細胞を単離し、B27 supplement 添

加 neurobasal メディウム中で細胞を播種する。播種後 3~4 日後 LipofectAmine2000 を用いて遺伝子を導入し、2 日後に形態学的、または活性化 caspase 検出色素により変異 VAPB による神経毒性を評価する。

4. 研究成果

(1) 我々は VAPB が UPR の構成因子であることを既に報告したが、その機能には diphenylalanine in acidic tract (FFAT) モチーフを持つ蛋白が必須であることが予想された。

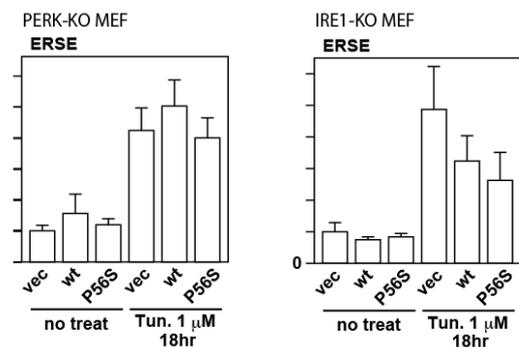
そこで、我々は既知の 14 種類の FFAT モチーフ蛋白の cDNA を全て入手し、それぞれに対して VAPB との結合をプルダウン法にて確認



し、UPR シグナルへの関与を同定するためにルシフェラーゼアッセイおよび XBP1 のスプライシングアッセイを行った。

しかし、VAPB による UPR シグナルを再現する FFAT モチーフ蛋白は既知の 14 種類の蛋白から同定出来なかったため、未知の FFAT モチーフ蛋白である可能性が高いと考え、現在 XBP1 遺伝子を用いた新規スクリーニング法を開発中である。

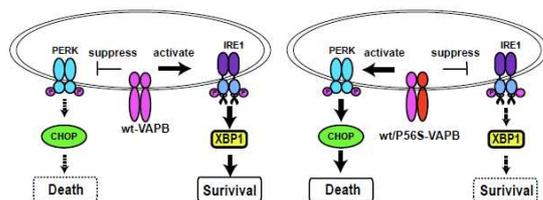
(2)FFAT モチーフ蛋白を同定し得なかったことから、VAPB による ALS 発症機構を解明するには UPR シグナル機構を異なる側面から解明する必要があるため、VAPB と ER ストレスセンサーとの関連を解明することを主眼とした研究を行った。酵母には IRE1 のみ、線虫以降は IRE1 と PERK、さらに哺乳類になると IRE1、PERK、ATF6 の 3 種の ER ストレスセ



ンサーが存在するが、我々は進化の過程で ER ストレスセンサー IRE1 と VAPB の機能的相互作用が酵母から普遍的に遺伝的に保存されていることに着目し、VAPB は IRE1 特異的なシグナルに関与するとの仮説を立て、それを証明するために IRE1 ノックアウトマウスおよび PERK ノックアウトマウスの線維芽細胞に VAPB 遺伝子を導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、IRE1 ノックアウト細胞において野生型 VAPB による unfolded protein response element 支配下ルシフェラーゼの活性化が起こらなくなったことから、VAPB は IRE1 を介して UPR シグナルに関与していることを明らかにした。

また、ルシフェラーゼアッセイを用いた検討により、野生型 VAPB は IRE1 経路の下流の UPR および ERSE 配列下流の遺伝子の発現を上昇させると同時に、PERK 経路下流である ATF4 の発現に対しては抑制的に働くことを見出した。これは IRE1 特異的に活性化することにより小胞体シャペロンの発現が上昇し、内在性 ER ストレスが軽減することにより PERK 経路へのシグナルが減弱した結果と考えている。IRE1 経路と PERK 経路を区別して活性化するメカニズムは全く新規のものであり、FFAT モチーフ蛋白の同定とともに、より深く検討する必要がある。

(3)ルシフェラーゼアッセイで得られた結果を元にリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法を用いた検討を行い、実際に mRNA レベルおよび蛋白レベルで UPR シグナルが調節されることを確認した。その結果、ALS を起こす P56S-VAPB 変異は細胞死誘導性転写因子である CHOP の発現を有意に上昇させることを見出した。反対に野生型 VAPB は小胞体シャペロンである BiP の発現を有意に上昇させたことから、野生型 VAPB は神経細胞保護的に働き、変異型 VAPB はその機能を抑制することにより ALS を発症させるとの仮説を in



vitro において立証した。

また、初代培養運動神経細胞を用いた細胞死アッセイの樹立に挑んだが、細胞導入効率の低さおよび遺伝子導入による神経毒性の問題により、有意な結果を得ることができなかったため、これについては次年度以降の課題としたい。

(4)我々はさらにヒトには VAPA と VAPB の 2 種の VAP 蛋白があるにもかかわらず、VAPB の

1 allele の変異で ALS になるのかを明らかにするために、VAPA と VAPB の差異について検討した。我々は既に変異型 VAPB は野生型 VAPB を特異的に不溶化し、凝集体を形成することを報告しているが、それと一致して、変異型 VAPB は野生型 VAPA が関与するシグナルには影響を与えず、野生型 VAPB のシグナルのみ特異的に抑制することを明らかにした。このことは VAPA よりも VAPB の機能が ALS 発症に重要であり、VAPA だけでは VAPB の機能を補うことができないことを示すものである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/anatomy/ndd/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金蔵 孝介 (KANEKURA KOHSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10508568

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし