

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790828

研究課題名(和文) 異性体セリン混入異常タンパク質に注目した筋萎縮性側索硬化症の新規治療標的の開発

研究課題名(英文) Cellular stress by proteins contaminated with D-serine as a novel therapeutic target of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

笹部 潤平(SASABE JUMPEI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10398612

研究成果の概要(和文): 本研究では、D-アミノ酸結合 tRNA 脱アシル化酵素である D-tyr-tRNA deacylase(DTD)に着目して、D-アミノ酸がタンパク質合成に利用されることにより生じる運動神経細胞ストレスメカニズムについて検討した。DTD 存在下では、D-アミノ酸の存在は細胞に明らかな毒性を示さなかったものの、DTD 非存在下では細胞は小胞体ストレスを増悪させることが明らかとなり、D-アミノ酸負荷はユビキチン化タンパクの増加へと導くことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): We investigated in this study how motoneurons reacts against contamination of D-amino acids in protein synthesis by focusing on D-tyr-tRNA deacylase (DTD). D-amino acids do not make any cellular stresses in the existence of DTD, whereas genetic disruption of DTD enhances unfolded protein response and D-amino acids increase ubiquitinated proteins.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：D-アミノ酸、D-tyr-tRNA deacylase

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、中年発症の運動神経疾患であり、随意筋の麻痺がわずかな数年間で全身へ進行して呼吸筋麻痺に致ってしまう疾患である。現在のところ、進行を止める治療法は見つかっておらず、治療標的の開発は急務である。

主要な病態仮説一つである、グルタミン酸による運動神経興奮毒性に着目して、我々はグルタミン酸受容体の一つであるN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体のcoagonistであるD-セリンがALSの脊髄で病

勢とともに増加し、神経変性を増悪することを明らかにした。一方、ALSの病理像として、特徴的な細胞内封入体形成が知られているものの、詳細なメカニズムは明らかとなっておらず、D-セリンの増加と凝集体形成が関連するかどうかは知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、加齢性変化として、D-アミノ酸がタンパク質合成に混入することに着目し、細胞ストレスを引き起こしALS関連細胞死へと導くのではないかと考えた。D-アミノ酸が

タンパク質中に翻訳されるのを生理的に阻止する分子として、D-tyrosine-tRNA deacylase (DTD)が知られている。DTDはD-アミノ酸がtRNAに結合するのを非アシル化することによって、タンパク質翻訳合成にはD-アミノ酸は通常状態では排除されることが知られている。そこで、DTDの機能または発現の加齢性変化および、それに伴う細胞ストレスを評価した。

3. 研究の方法

動物

C57BL/6Jc1 マウスを株式会社クレアから購入して使用した。動物は、specific pathogen free の環境下で飼育し、実験は慶應義塾大学医学部動物実験委員会による承認を得た。

細胞、遺伝子導入

NSC34細胞を使用した。NSC34細胞は、マウス脊髄前角細胞とマウス神経芽細胞腫のハイブリドマである。37℃で10%血清を含むDMEMにて培養した。遺伝子導入はLipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて、製造元のプロトコールに沿って行った。

抗体

マウス DTD56-70番目のペプチドを抗原として、ウサギポリクローナル抗体を作成した(蛋白精製工業)。M2抗体(anti-FLAG抗体)は、sigma-aldrichから購入した。GAPDH抗体は、cell signaling technologyから購入した。

クローニング、プラスミド、siRNA

マウスおよびヒトcDNA libraryからPCRにてmDTDおよびhDTDのcDNAを増幅し、pCMV-FLAGベクター(Sigma-Aldrich)にクローニングした。Pfu turbo mutagenesis kit(Stratagene)を用いて、T81A変異を導入し、DTD活性を喪失したmutant (T81ADTD)を作成した。mDTDおよびhDTDに対するsiRNAは、Enhanced siDirect社のホームページにて設計した。

4. 研究成果

(1)DTDのマウスにおける発現と経時的変化

マウスにおけるDTDの臓器別発現をDTD抗体を用いて検討したところ、中枢神経系で多く発現していることが確認された(図1:下左)。また、経時的変化を検討したところ、DTDは成長とともに増加し、加齢とともに減少することが明らかとなった(図2:下右)。

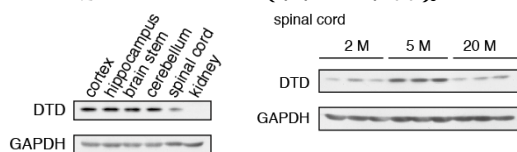


図2

(2)siRNA oligoのLipofectionによるDTDのノックダウン効率の確認

mDTDおよびhDTDに対するsiRNAを作製し、ネガティブコントロールとして配列をランダムに並べ替えたsiRNAおよび非特異的なsiRNAをpCMV-mDTD-FLAGおよびpCMV-hDTD-FLAGと共にLipofectamine2000を用いてそれぞれ遺伝子導入したところ、特異的にほぼ100%の効率でノックダウンできることを確認した(図3)。

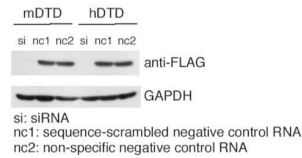


図3

(3)DTDノックダウンによるUnfolded protein response(UPR)への影響

DTDとタンパク質合成との関係を明らかにするため、NSC34細胞にmouseDTDに対するsiRNAおよびUPREを含むluciferaseのレポーター遺伝子を導入し、40時間後にtunicamycinを8時間処理してDual luciferase assayを行った。コントロールのsiRNA(nc1, nc2)と比較して優位にDTDに対するsiRNAでUPREに結合する転写因子の活性は増強し、驚くべきことにD-セリン処理によって減弱した(図4)。

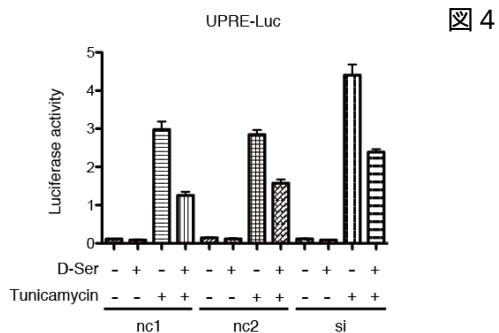
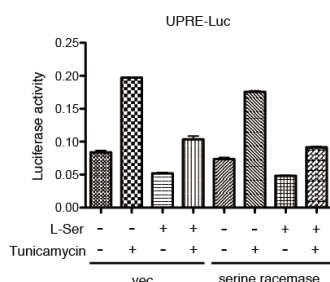


図4

(4)D-セリンとUPR減弱との関連性の検討

当初、D-セリンによってUPRが増強することが予想されていたため、D-セリンが細胞内に取り込まれていないため何らかの原因でUPRが減弱したのではないかと考えた。細胞内にD-セリン合成酵素のセリンラセマーゼ(SRR)を発現させ、細胞外からL-セリンを処理して細胞内でD-セリン合成を促した条件下で、UPREのDual luciferase assayを行った。この結果、L-セリン処理によってもUPRが減弱することが明らかとなり、SRR発現群ではさらにUPRが減弱したため、細胞内のD-/L-セリンによってUPRが減弱することが明らかとなった(図5)。

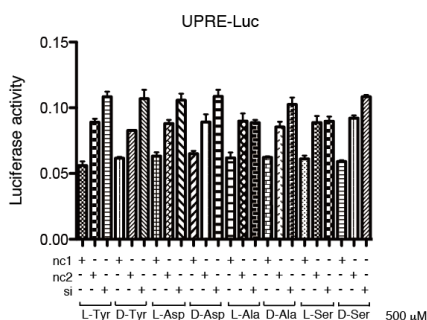
図 5



(5) D-/L-アミノ酸とUPRとの関連性の検討

DTD の deacylase 活性はセリン以外にもアスパラギン酸やアラニン、チロシンなどにも示す。生体内には D-アラニン、D-アスパラギン酸が比較的豊富に認められるため、これらのアミノ酸と DTD との関連性を次に検討した。DTD ノックダウン条件下において、D-/L-チロシン、アスパラギン酸、アラニン、セリンをそれぞれ 24 時間処理し、UPRE の Dual luciferase assay を行った。アスパラギン酸、チロシンは D-/L 体が UPR に及ぼす影響は同程度であったが、アラニン、セリンはそれぞれ L 体が D 体よりも優位に UPR を抑制することが明らかになった (図 6)。

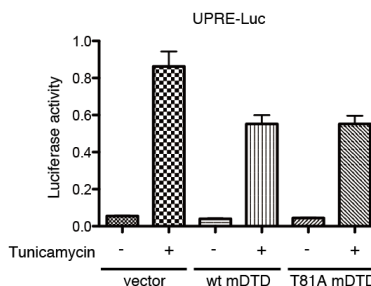
図 6



(6) mDTD 高発現による小胞体ストレスへの影響の評価

(4) で mDTD 発現を消失させた場合に小胞体ストレスが増強することが明らかになったため、mDTD の発現を上昇させた場合、細胞にかかるストレスが減弱するか否かを検討した。NSC34 細胞に C 末端 FLAG-tag を有した mDTD またはその mutant T81A DTD をそれぞれ遺伝子導入し、40 時間後に tunicamycin を 8 時間処理し、UPRE の Dual luciferase assay を行った。結果、mDTD の過剰発現によって、tunicamycin 誘導性の UPR が優位に減弱し、T81A-DTD も同様に UPR を減弱させた (図 7)。T81A-DTD は deacylase 活性を持たない変異であるにもかかわらず、wild type DTD と同様に UPR を減弱させたことから、DTD と UPR の関連は deacylase 活性とは無関係であることが示唆された。また、この現象は N 末端 tag の DTD でも同様に認められたことから (data not shown)、tag による影響ではないと考えられる。

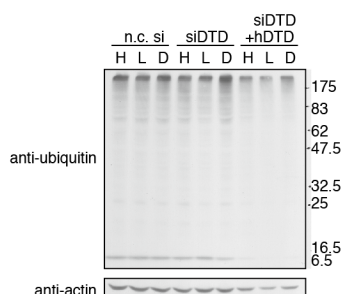
図 7



(7) DTD とユビキチン・プロテアソーム系との関連性の検討

異常タンパク質の分解を担うもう一つの系として、ユビキチン・プロテアソーム系と D-アミノ酸含有タンパク質合成との関連を検討した。NSC34 細胞で DTD をノックダウンした細胞に D-/L-セリンを処理し、ユビキチンに対する抗体でウエスタンブロッティングを行ったところ、DTD ノックダウン下で D-セリンを処理した群でユビキチン化が増強していた (図 8)。このことから D-アミノ酸含有タンパク質は、ユビキチン・プロテアソーム系によって主に処理されているのではないかと考えられる。

図 8



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 4 件)

Jumpei Sasabe, Yurika Miyoshi, Masataka Suzuki, Masashi Mita, Ryuichi Konno, Masaaki Matsuoka, Kenji Hamase, Sadakazu Aiso. D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. Proc Natl Acad Sci USA; 109: 627-32. 2012 査読あり

Kanehiro Hayashi, Jumpei Sasabe, Tomohiro Chiba, Sadakazu Aiso, Naoko Utsunomiya-Tate. D-Ser-containing humanin shows promotion of fibril formation. Amino Acids; in press. 2012 査読あり

Jumpei Sasabe, Sadakazu Aiso. D-Serine in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Seikagaku*; 82: 628-32. 2010. 査読なし

Jumpei Sasabe, Sadakazu Aiso. Aberrant control of motoneuronal excitability in amyotrophic lateral sclerosis: excitatory glutamate/D-serine vs. inhibitory glycine/gamma-aminobutanoic acid (GABA). *Chem Biodivers*; 7: 1479-90. 2010 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

2011年9月10日,発表者: 笹部潤平
CBIR international symposium
‘D-Serine homeostasis in the spinal cord and motoneuron degeneration’
場所: 東京

2011年9月10日,発表者: 笹部潤平
第7回 D-アミノ酸研究会学術講演会
‘運動神経路における D-セリンと運動神経変性’ 場所: 東京

2010年11月14-15日,発表者: 笹部潤平
2010 Society for Neuroscience.
‘Control of D-serine by astrocytic D-amino acid oxidase in descending motor tract.’ 場所: サンディエゴ(米国)

2010年9月17日,発表者: 笹部潤平
第6回 D-アミノ酸研究会学術講演会
‘Control of D-serine by astrocytic D-amino acid oxidase in descending motor tract.’ 場所: 富山

〔図書〕(計2件)

笹部潤平、相磯貞和. D-セリンと中枢神経機能. *Annual Review 神経* 2012.2012; 246-252. 中外医学社

鈴木将貴、笹部潤平. アストロサイトとアミノ酸代謝. *Clinical Neuroscience*. 2011;29:1268-1272. 中外医学社

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.anatomy.med.keio.ac.jp/aiso/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹部 潤平 (SASABE JUMPEI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 10398612