

研究課題名=ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析に関する研究

分担研究者 垣塚彰 大阪バイオサイエンス研究所 部長

#### 研究要旨

我々は、ハンチントン舞踏病やMachado-Joseph病の原因遺伝子産物に共通に含まれる伸長したポリグルタミンが神経細胞を変性・死滅させることを見いだしてきた。本研究では、このポリグルタミンを発現させる神経培養細胞・トランスジェニックマウスを作成し、その実験系を用いて、内分泌系に関わる諸物質が神経変性の増悪因子として作用する可能性を検討し、その分子機構を解析した。培養神経細胞PC12にテトラサイクリンによる制御でポリグルタミンの発現を誘導させ、同調した細胞死を引き起こす神経細胞株を樹立する事に成功した。ポリグルタミンは、発現誘導後核内凝集体形成し、それに一致してSEK1というキナーゼが活性化されることが見出され、このものの細胞死シグナルの誘導が示唆された。

#### A. 研究目的

我々は、これまでに、ハンチントン舞踏病(HD)やMachado-Joseph病(MJD)の原因遺伝子産物に共通に含まれる伸長したポリグルタミンが神経細胞を変性・死滅させることを示してきた。本研究では、ポリグルタミンを発現させる培養細胞系・トランスジェニックマウスを作成し、それらの実験系を用いて、内分泌系に関わる諸物質が神経変性の増悪因子として作用する可能性を検討し、その分子機構を解析することを目的とする。

#### B. 研究方法

テトラサイクリン等の薬剤で遺伝子発現をコントロール出来るシステムを利用し、同調してポリグルタミンを発現させる神経細胞株の樹立を試みる。そして、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的な解析を行った。

#### C. 研究結果

I. ポリグルタミンを同調的に発現させるPC12神経細胞の樹立

ラット副腎褐色細胞腫由来の神経細胞

株PC12に、14(Q14)及び79(Q79)リピートからなるポリグルタミンをコードするCAGリピートをテトラサイクリンを培地から除くことで発現誘導が可能なプロモーター支配下にトランスフェクションし、その遺伝子が染色体に組み込まれた細胞株を樹立した。Q14とQ79には発現蛋白を検出するために共通のflagエピトープを付けた。テトラサイクリン存在下において、これらの細胞(PC12-Q14、PC12-Q79)は親株と同じく、NGF(Nerve Growth Factor)非添加では指数増殖を、NGF添加後は増殖の停止と神経様細胞への分化を示した。

テトラサイクリンを培地から除くのと同時にNGFを添加すると、PC12-Q14細胞は親株のPC12と同様に増殖の停止と分化を示した。一方、PC12-Q79細胞は神経様の分化を遂げながら徐々に死んでいき、Q79を誘導後96から120時間にかけて、ほとんど全ての細胞が死に絶えた。

II. 細胞内のポリグルタミンの凝集と神経細胞死

続いて、発現誘導されたポリグルタミンをflagエピトープに対する抗体で染色し、細胞内局在について解析を行った。

Q79 は、発現誘導から 24 時間後にはほぼ細胞質内に均一的に分布し、48 時間後には細胞質に、96 時間後には細胞質と核内に大きな凝集体として観察された。このような凝集体は、PC-12-Q14 細胞では観察されなかった。上述したように 4 から 5 日後にかけて、ほとんどすべての細胞が死滅したが、その時点で細胞をつぶさに観察すると、時折、ポリグルタミンに抵抗性を示す細胞のコロニーが見いだされた。驚いたことに、その細胞では、ポリグルタミンの凝集体は細胞質のみに存在しており、核内での凝集が見受けられなかった。さらに核外移行シグナルをつないでポリグルタミンを核外に発現させた PC12 細胞は細胞死を引き起こさなかった。以上の結果は、核内で凝集したポリグルタミンにより何らかの細胞死シグナルが活性化され神経細胞死が誘導されることを示しており、ハンチントン舞踏病や Machado-Joseph 病などのポリグルタミン病発症において、ポリグルタミンの核内凝集体が極めて重要な役割を果たしていると考えられた。

### III. CPP32 キヤスペースの解析

ここで樹立した細胞では、ポリグルタミンの発現及び細胞死が同調的に引き起こされるため、生化学的な解析に適している。まず、いわゆるアポトーシスに極めて重要と考えられているキヤスペース、とくに CPP32 (caspase 3) が、この細胞死の過程でどのように活性化されるかを検討した。コントロールとしてこの細胞を Ca イオノフォア A23187 で処理すると、処理後 18 時間後に於いて顕著な CPP32 の活性を検出することが出来た。予期に反して、PC12-Q79 細胞においては CPP32 の活性は A23187 で処理した時と比べてわずかに上昇するだけであった。さらに、細胞を CPP32 の阻害剤 DEVD 等で処理しても細胞死は抑制されなかった。この場合、核の凝集は抑制されたが細胞質の分断化は阻害されず、結果として細胞は死滅した。従って、CPP32 は、核の凝集や DNA のフラグメンテーションというよう

なアポトーシスの表現型を示すには重要であるが、細胞死のコミットメントには別の分子が関与していると考えられた。

### IV. SEK1-JNK キナーゼの解析

この細胞を用い他のアポトーシス関連物質の活性化をいろいろ解析したところ、SEK1-JNK のキナーゼカスケードが活性化されていることが見いだされた。SEK1、JNK はそれぞれ MAPKK、MAPK に属するキナーゼで、種々のストレスに应答して上流のキナーゼによってリン酸化を受けて活性化される。これらの活性化型キナーゼは、リン酸化されたキナーゼを特異的に認識する抗体を用いて Western blot 及び免疫染色で同定することが出来る。Q79 の発現によって JNK、SEK1 とその蛋白量にはそれほど変化を認めなかったが、Q79 誘導 24 時間後から SEK1 のリン酸化が、48 時間後から JNK のリン酸化が検出された。この結果から、この系においても SEK1-JNK のキナーゼカスケードが順次活性化されていると考えられた。もちろん、このような SEK1-JNK の活性化は PC12-Q14 細胞では認められなかった。

### V. 核内ポリグルタミンの凝集部位での SEK1 の活性化

続いて、免疫組織染色法をもちいて SEK1 がどこで活性化を受けているかを検討した。先に述べたように、PC12-Q79 細胞では、Q79 発現 24 時間後では、ほとんどの細胞で Q79 は、細胞質にとどまっている。解析の結果、そのような細胞では、活性化された SEK1 は検出されなかった。ところが、頻度は低いがいくつかの細胞で Q79 が核内に凝集体を作りはじめている細胞が観察され、そのような細胞の核内で、活性化された SEK1 が検出された。さらに、Q79 発現 72 時間後では、ほとんど全ての細胞が細胞質と核内に大きなポリグルタミンの凝集体を有していたが、SEK1 は核内のポリグルタミンの凝集体と一致した場所でのみ活性化を受けていることが見いだされた。共焦点顕微鏡での解析では、観察した全ての細胞断面で核内のポリグルタミンの凝集部位に一致し

て活性型 SEK1 が同定された。また、同じ場所で JNK の標的蛋白質の一つである c-Jun が活性化を受けていることが見いだされた。

#### VI. ドミナント・ネガティブ SEK1 での細胞死の阻害

以上の結果は、核内でのポリグルタミンの凝集が、SEK1 を活性化して細胞死シグナルを作り出しているとの考えを導き出させる。したがって、続いての実験として、実際に SEK1 の活性化が細胞死に繋がっているかどうかを解析した。

この実験では、SEK1 の機能をブロックする変異体（ドミナントネガティブ変異体）を発現させ、その結果細胞死が抑制されるかどうかの検討をおこなった。ドミナントネガティブ SEK1 (DN-SEK1) を発現した細胞が判別出来るように、DN-SEK1 は GFP (green fluorescent protein) の C-末端部位に融合した形 (GFP-DN-SEK1) で PC12-Q79 細胞に発現させた。

コントロールの GFP の発現ベクターのトランスフェクションでは、Q79 誘導 96 時間後で GFP ポジティブな細胞のおおよそ 70% の細胞がアポトーシスに特徴的な形態をしめした。一方、GFP-DN-SEK1 発現ベクターのトランスフェクションでは、GFP ポジティブな細胞の 80% 以上の細胞が健康な形態をとっていた。また、これらの健康にみえる GFP-DN-SEK1 を発現した細胞では c-Jun の活性化は観察されず、実際に SEK1-JNK のカスケードがブロックされていると考えられた。さらに、核外移行シグナルをつないで核外に発現させた DN-SEK1 では、このような Q79 による細胞死の阻害効果が認められなかった。以上の結果を総合して、我々は、核内で凝集したポリグルタミンが SEK1 を活性化して、神経細胞の細胞死を引き起こすと結論した。

#### D. 考察

本年度の研究では、培養神経細胞を用いたポリグルタミン病のモデル系の構築に

成功し、ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死を分子レベルで解析する見通しがたってきた。平成 11 年度には、ポリグルタミンが引き起こす細胞死の分子機構をより詳細に解析し、SEK1 が活性化される分子機構やそれがどのように CPP32 の活性化に繋がって行くかというような点を明らかにしていく。加えて、内分泌かく乱物質がこのような神経の変性過程に関わるか否か、また、関わりとすればどのような物質が如何様に関わるかを解析していく。さらに、現在進行中のモデル動物を作り上げる計画を押し進め、将来 *in vivo* の実験を行う上で準備を進めていく。

#### E. 結論

培養神経細胞 PC12 にポリグルタミンの発現を誘導させ、同調した細胞死を引き起こす神経細胞株を樹立する事に成功した。ポリグルタミンは、発現誘導後核内凝集体形成し、それに一致して SEK1 というキナーゼが活性化されることが見出された。今後、内分泌かく乱化合物の神経毒性の作用点として、このキナーゼカスケードの重要性が考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sanchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* Mar;22(3):623-33 (1999)
2. Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, A., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Takeda, K., Ichijo, H., & Kakizuka, A. Nuclearly accumulated polyglutamine activates SEK1 and induces cell death in neuronal PC12 cells. *in revision* (1999).
3. Ogasawara, Y., Hanazono, Y., Kodaira, H., Urabe, M., Mano, H.,

- Kakizuka, A., Kume, A., & Ozawa, K. Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Gene Ther. Mol. Biol.* 3: in press (1998).
4. Kakizuka, A. Protein Precipitation: A common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends in Genetics* 14, 396-402 (1998).
5. Imaizumi, M., Suzuki, H., Yoshinari, M., Sato, A., Saito, T., Sugawara, A., Tsuchiya, S., Hatae, Y., Fujimoto, T., Kakizuka, A., Konno, T., Iinuma, K. Mutations in the E-domain of RAR alpha portion of the PML/RAR alpha chimeric gene may confer clinical resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *BLOOD* 92, 374-382 (1998).
6. Kokubun, M., Kume, A., Urabe, M., Mano, H., Okubo, M., Kasukawa, R., Kakizuka, A., & Ozawa, K. Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production by genetically engineered fibroblasts. *Gene Therapy* 5, 923-929 (1998).
7. Kodaira, H., Kume, A., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kitano, K., Kakizuka, A., & Ozawa, K. Fas and Mutant estrogen receptor chimeric gene: A novel suicide vector for tamoxifen-inducible apoptosis. *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 741-747 (1998).
8. Segawa, T., Takebayashi, H., Kakehi, Y., Yoshida, O., Narumiya, S. & Kakizuka, A. Prostate-specific amplification of expanded polyglutamine expression: A novel approach for cancer gene therapy. *Cancer Res.* 58, 2282-2287 (1998)
9. Yamaguchi, M., Nakamoto, M., Honda, H., Nakagawa, T., Fujita, H., Nakamura, T., Hirai, H., Narumiya, S., & Kakizuka, A. Retardation of skeletal development and cervical abnormalities in transgenic mice expressing a dominant-negative retinoic acid receptor in chondrogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7491-7496 (1998)
10. Nakamoto, M., Ikeda, H., & Kakizuka, A. Genetic and Molecular Studies of Machado-Joseph Disease. In *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases.* eds Wells, R. D. and Warren, S. T. (Academic Press, San Diego), pp283-297 (1998).
11. Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Hackam, A. S., Margolis, R. L., Trifiro, M. A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G. S., Propp, S. S., Bromm, M., Rowland, K. J., Zhang, T., Rasper, D., Roy, S., Thornberry, L., Pinsky, L., Kakizuka, A., Ross, C. A., Nicholson, D. W., Bredesen, D. E., and Hayden, M. R. Caspase Cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 273, 9158-9167 (1998).