

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

分担研究者 垣塚 彰（財）大阪バイオサイエンス研究所 研究部長

研究要旨

神経機能におよぼす内分泌ホルモン及び内分泌攪乱化学物質の作用を解析する過程で、脳内核内受容体の新規核内受容体コファクターを同定した。このコファクター（PGC-2と名命）は、エストロゲン受容体(ER)等の核内受容体とリガンド依存性の結合を示した。また、高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められなかった。

一方、ポリグルタミンが核内で凝集し、SEK1-JNK の細胞死シグナルを活性・伝達している部位が PML body であることを明らかにした。

A. 研究目的

我々は、これまでに、ハンチントン舞蹈病(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神経細胞系・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、核内受容体・そのコファクター・そのリガンド及び攪乱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

(1) 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う。

(2) 上記の培養細胞をもちいて、種々の内分泌攪乱物質を培養系に添加し、その細胞死の増強及び阻害効果を定量的に解析し、内分泌かく乱物質がポリグルタミンが引き起こす神経変性に及ぼす影響の解析を行う。

(3) 神経系に発現する新規の核内受容体のコファクターを同定し、核内受容体と新規コファクターの相互作用における内分泌攪乱物質の作用を解析する。

(4) 上記の実験と並行してポリグルタミンを神経に特異的に発現させる種々のトランスジェニックマウスを作成し、培養細胞で効果を認めた内分泌かく乱物質が神経変性に及ぼす影響を in vivo で解析する。

本研究は、主に培養神経細胞を用いた研究であり、倫理的な問題点は極めて低い。

C. 研究結果

背景

研究分担者は、1989年～1992年の米国留学時より、核内受容体の研究に参加し、核内受容体のうち特にレチノイン酸受容体の研究において数々の業績を挙げてきた。1992年に帰国後は、核内受容体の一つであるアンドロゲン受容体の変異がもたらす球脊髄性筋萎縮症の研究にヒントを得て、神経変性疾患の研究を開始した。そして1994年に神経難病 Machado-Joseph 病の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞踏病と同じく、原因遺伝子内の CAG の繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを見いだした。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内の CAG の繰り返しが共通にポリグルタミンリピートに翻訳される。研究分担者はこのことに着目し、これまでに、伸長したポリグルタミンリピートを培養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ることを見だし、また、マウスの小脳の神経細胞に発現させると小脳の神経細胞が脱落し小脳失調を示すことを明らかにしてきた。

一方、近年大きな社会問題となっている内分泌かく乱物質は、その多様な作用が推測されているが、いまだ分子機構の解明に繋がる詳細な解析はなされていない。特に神経系の

影響に関しては、適当な実験系が無いことが解析を遂行する上で大きな障害となっている。本研究では、研究分担者がこれまでに行ってきた神経変性疾患の解析系と研究分担者の別の得意分野である核内受容体に関する経験を融合させ、内分泌かく乱物質の神経機能及び神経変性疾患における役割を、とりわけ伸長したポリグルタミンによって引き起こされる細胞死のリスクファクターとしての可能性を含めて解析し、内分泌かく乱物質の新たな作用とその作用点を分子レベルで明らかにすることを目指していく。

結果の詳細

I. PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) 類似蛋白質、PGC-2 の解析

1) PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) 類似蛋白質、PGC-2 の同定

神経系にはエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) などのリガンドが判明している核内受容体から Nurr1 をはじめとする多くのオーファン受容体が発現しており、神経系に於いて、核内受容体が脳の高次機能や脳神経系の疾患の病態を修飾する可能性が示唆されている。一方、核内受容体は共通のコファクターを利用し、標的遺伝子の転写の活性化を促すことが示されてきた。そのようなコファクターの中で、1998年に PPAR γ の coactivator として同定された PGC-1 は、唯一、褐色細胞等の特有的の細胞に限局した発現をするコファクターであるという点で、他のコファクターと趣を異にしている。遺伝子ファミリーの恒として、このよ

うな場合、PGC-1 と異なる発現様式を取るであろう PGC-1 類似因子が存在する可能性が推測され、特に神経系に発現するような類似因子の存在を仮定し、EST データベースサーチを行ったところ複数の PGC-1 とホモロジーをもつ遺伝子断片が存在していた。そのうちの 하나가、脳において比較的はっきりとした発現が認められたため、この遺伝子を PGC-2 と名付け、全長 cDNA を単離し、解析を行うことにした。

PGC-2 は全長 1014 アミノ酸からなり、分子全体にわたり PGC-1 との相同性を示した (図 1)。PGC-1 同様 C 末端部分に RNA 結合モチーフを含み、その部分で最も高いホモロジー (52%) を示した。PGC-1 が PPAR γ と相互作用する領域及び N 末部分でも、それぞれ 47%、41% の相同性を保っていた。また、N 末部分には核内受容体コファクターに核内受容体と相互作用するモチーフとして報告されている LXXLL モチーフが 2 つ存在していた。

2) PGC2 の発現部位の解析

ノザンブロットィングを用いた解析の結果、予測通り PGC-2 は、組織間で異なる発現を示し、脳の他にも心臓、腎臓、脂肪細胞に比較的強い発現があり、卵巣・子宮・精巣等の性ホルモンに関わる臓器にも発現が認められた。一方、肝臓や膵臓の発現はわずかであることが判明した。これまでに報告されていたように、褐色脂肪細胞での PGC-1 の発現は寒冷刺激により顕著に増強されたが、同様な発現誘導は PGC-2 には観察されなかった。

しかし、脂肪細胞の分化に伴い、PPAR γ 同様の発現誘導が PGC-2 において観察された。

3) PGC-2 と核内受容体のリガンド依存性の相互作用の解析

PGC-2 は、ER、甲状腺ホルモン受容体(TR)、レチノイン酸受容体(RAR)とリガンド依存性の相互作用を示すことが、酵母 two-hybrid 法と GST pull down アッセイで確認できた。一方、PGC-2 と PPAR γ の相互作用はリガンド非存在下でも検出されたが、その相互作用は PPAR γ リガンドのチアゾリン誘導体を添加する事でさらに増強された。PGC-2 と PPAR γ の相互作用では、PGC-1 の場合と異なり中央部分の PPAR γ binding 領域ではなく、N 末にある LXXLL モチーフの内の一つが関わるということが明らかになった。一方、このモチーフに変異を導入した場合にも RAR 等とのリガンド依存性の相互作用は維持されており、PGC-2 では PPAR γ と他の受容体との結合部位を使い分けていることが判明した。

4) PGC-2 と ER の相互作用に及ぼす内分泌攪乱物質の効果

PGC-2 と ER のリガンド依存性の相互作用を two-hybrid 法で定量的に測定する系で、各種内分泌攪乱物質が、PGC-2 と ER の相互作用を誘導するかどうかについて検討した (図 2 a)。このアッセイでは、約高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められ

なかった。

また、ER のコアクティブレーターとして解析が進んでいる SRC-1 と ER の相互作用をコントロールとして用い解析を行った (図 2b)。

このアッセイでは、約高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されたが、ビスフェノール、ノニルフェノールにそのような活性は認められなかった。

II. ポリグルタミン発現 PC12 細胞の解析

1) ポリグルタミンの核内凝集部位としての PML body の同定

ポリグルタミンが核内で凝集し、SEK1-JNK の細胞死シグナルを伝達している部位が PML body であることを明らかにした。PML body は、研究分担者が、急性前骨髄球性白血病(APL)の原因となる PML-RAR の細胞内標的部位として同定した核内のサブドメインである。また、近年報告された Pml 遺伝子のノックアウトの解析から、PML or PML body は、UV、インターフェロン、TNF、Fas、セラミド等が引き起こす細胞死に極めて重要な役割を果たすことが示されている。SEK1 や JNK はいろいろなストレスに応答して活性化されることが示されている。例えば NaCl 等の高浸透圧刺激で SEK1 は細胞質全体で強く活性化される。しかしこのような場合、必ずしも細胞死に至る訳ではない。したがって、このような結果を総括的に考えると、PML body は細胞死シグナルを伝達する重要な場となっている可能性が考えられる。この可能性の検証を次に計画している。

2) ポリグルタミンが引き起こす細胞死における各種核内受容体リガンドの効果の解析

ポリグルタミンが引き起こす細胞死に各種核内受容体のリガンドやビスフェノール・ノニルフェノール等の物質の効果を検討したが、明らかな効果は観察されなかった。

D. 考察

本年度の研究では、複数の核内受容体とリガンド依存性に相互作用する PGC-1 類似因子 PGC-2 を同定することに成功した。この分子は、従来のいわゆる核内受容体のコファクターと異なり、組織特異的な発現や分化に伴う発現の変化を示す点でも PGC-1 と似通っている。脳での発現や複数の受容体との相互作用を手がかりに、脳機能や神経疾患と関わりを解析していきたい。

我々の解析で、これまで機能不明の核内のサブドメインとして同定されていた PML body が細胞死シグナルを伝える場として機能している可能性が生じてきた。PML body には核内受容体を含む多くの転写因子のコファクターである CBP が存在することも報告されている。残念ながら、これまでに調べた各種核内受容体のリガンド類では、ポリグルタミンが引き起こす細胞死に対し、明らかな抑制・増強効果を示す物質を同定するには至らなかった。しかし、細胞死が引き起こされる場所が CBP 等が存在する PML body であることから、核内受容体を同時に発現させた場合等について、今後、もう少し解析を進めていきたい。

E. 結論

新規核内受容体のコファクター PGC-2 を同定し、高濃度のゲニスタインによって ER と PGC-2 の相互作用が誘導されることを酵母 two-hybrid 法で見いだした。

ポリグルタミンが核内で凝集し、SEK1-JNK の細胞死シグナルを伝達している部位が PML body であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 発表論文

1) Sanchez, I., Xu, C.-J., Juo, P., Kakizuka, A., Blenis, J., & Yuan, J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22: 623-633, 1999

2) Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Yamamoto, Y., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, F., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Sasaki, H., Takeda, K., Ichijo, H., & Kakizuka, A. Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes to Cells* 4: 743-756, 1999

2. 学会等発表 (招待講演分)

1) 垣塚 彰

ポリグルタミン病

浜松医科大学精神科セミナー

1月18日, 浜松医科大学 (静岡)

2) 垣塚 彰

遺伝性神経変性疾患に共通する発症の分子機構の解明を目指して

生命工学工業技術研究所セミナー

1月29日, 生命工学工業技術研究所 (茨城)

3) 垣塚 彰

遺伝病 京都大学医学研究科大学院講義「遺伝医学」

2月9日, 京都大学医学研究科 (京都)

4) 垣塚 彰

遺伝性神経変性疾患発症の分子機構

第3回関西遺伝子医療研究会「生体への遺伝子導入と治療への展望」2月27日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

4) 垣塚 彰

異常蛋白質の蓄積から見た神経変性疾患

国立循環器病センター COE シンポジウム「生体内情報伝達とその制御」3月11日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

5) 垣塚 彰

ポリグルタミン病とアポトーシス

第25回日本医学会総会

4月4日, 東京国際フォーラム (東京)

6) 垣塚 彰

神経変性疾患と細胞死

第3回細胞死研究会

6月26日, テレビ愛媛 EBC ホール (愛媛)

7) 垣塚 彰

ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析 第5回 Tanabe Medical Frontier Conference

7月10日, 軽井沢プリンスホテル (軽

井沢)

8) 垣塚 彰

神経変性の分子機構：神経の死に係わる遺伝子と生化学を探して 京都大学大学院生命科学研究所シンポジウム

7月15日, 京大会館(京都)

9) 垣塚 彰

ポリグルタミン病における神経細胞死の分子メカニズム 第35回千里神経懇話会「神経細胞死と神経変性疾患」7月19日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪)

10) 垣塚 彰

神経変性疾患に共通する分子機構解明を目指して：ポリグルタミン病の解析から 第3回分子血管リモデリング研究会

8月19日, 経団連ゲストハウス(静岡)

11) 垣塚 彰

神経変性疾患に共通する普遍的分子機構を求めて 兵庫県立高齢者脳機能研究センター学術講演会 9月3日, 兵庫県立高齢者脳機能研究センター(兵庫)

12) 垣塚 彰

神経変性疾患発症の分子機構解析と治療への展望 滋賀医科大学第3内科セミナー

9月9日, 滋賀医科大学(滋賀)

13) 垣塚 彰

ポリグルタミン病における神経細胞死のメカニズム 第42回日本神経化学会

9月17日, 広島国際会議場(広島)

14) 垣塚 彰

神経変性疾患の総括的な治療にむけての戦略 ゲノム創薬フォーラム 9月28日, 日本薬学会会長井記念館ホール(東京)

15) 垣塚 彰

癌とアポトーシス 第58回日本癌学会総会 9月30日, 広島国際会議場(広島)

16) 垣塚 彰

神経変性疾患と細胞死 第72回日本生化学会 10月7日, パシフィコ横浜(横浜)

17) 垣塚 彰

ポリグルタミン病発症の分子機構 第12回千里ライフサイエンスセミナー 10月15日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪)

18) 垣塚 彰

ポリグルタミン病発症機構の分子解析と予防・治療戦略の構築を目指して 第6回鳥取大学医学部遺伝子医療セミナー

10月22日, 鳥取大学(鳥取)

19) 垣塚 彰

神経変性疾患と細胞死 大阪大学蛋白質研究所セミナー「細胞死の分子機構」

11月5日, 大阪大学蛋白質研究所(大阪)

20) 垣塚 彰

ポリグルタミン病の分子病態機構 第2回名古屋大学医学部 COE 公開シンポジウム「神経変性疾患と悪性腫瘍の分子医学」

11月11日, 鶴友会館(名古屋)

21) 垣塚 彰

疾患と遺伝子 東京医科歯科大学歯学部講義 11月12日, 東京医科歯科大学(東京)

22) 垣塚 彰

神経変性疾患と神経細胞死の分子メカニズム 学術シンポジウム「アルツハイマー病のバイオロジー」

11月20日, 都市センター(大阪)

23) 垣塚 彰

モデル動物によるトリプレットリピート病の
解明 第5回ヒューマンサイエンス総合研究
セミナー「創薬へ向けたモデル動物研究の最
前線」11月24日, 東條会館ホール(東
京)

24) 垣塚 彰

遺伝性神経変性疾患の分子解析

荒木千里記念脳外科症例検討会歳末講演会

12月11日, 大阪商工会議所(大阪)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

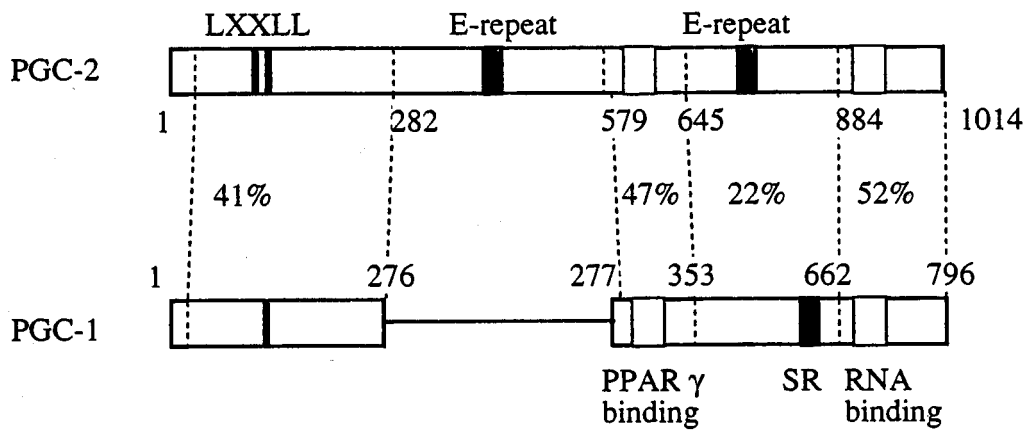


図1 PGC-1 とPGC-2 の構造の比較

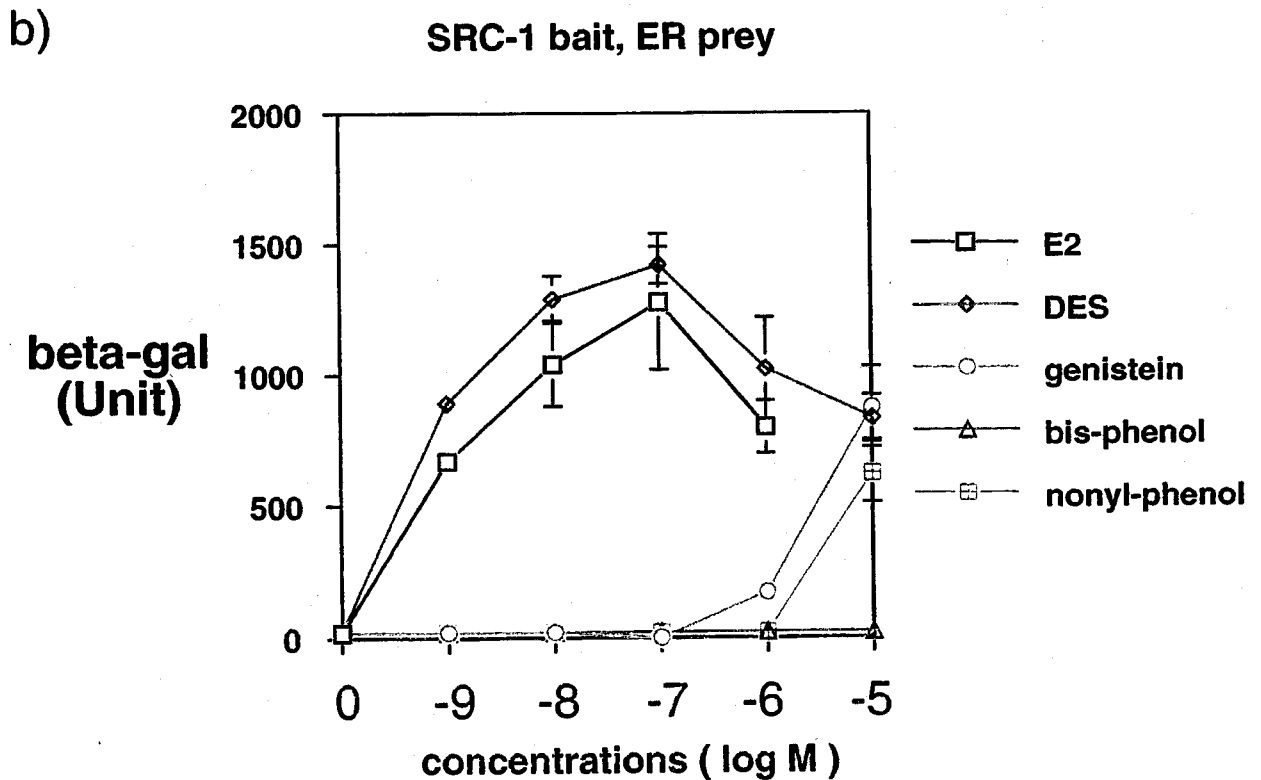
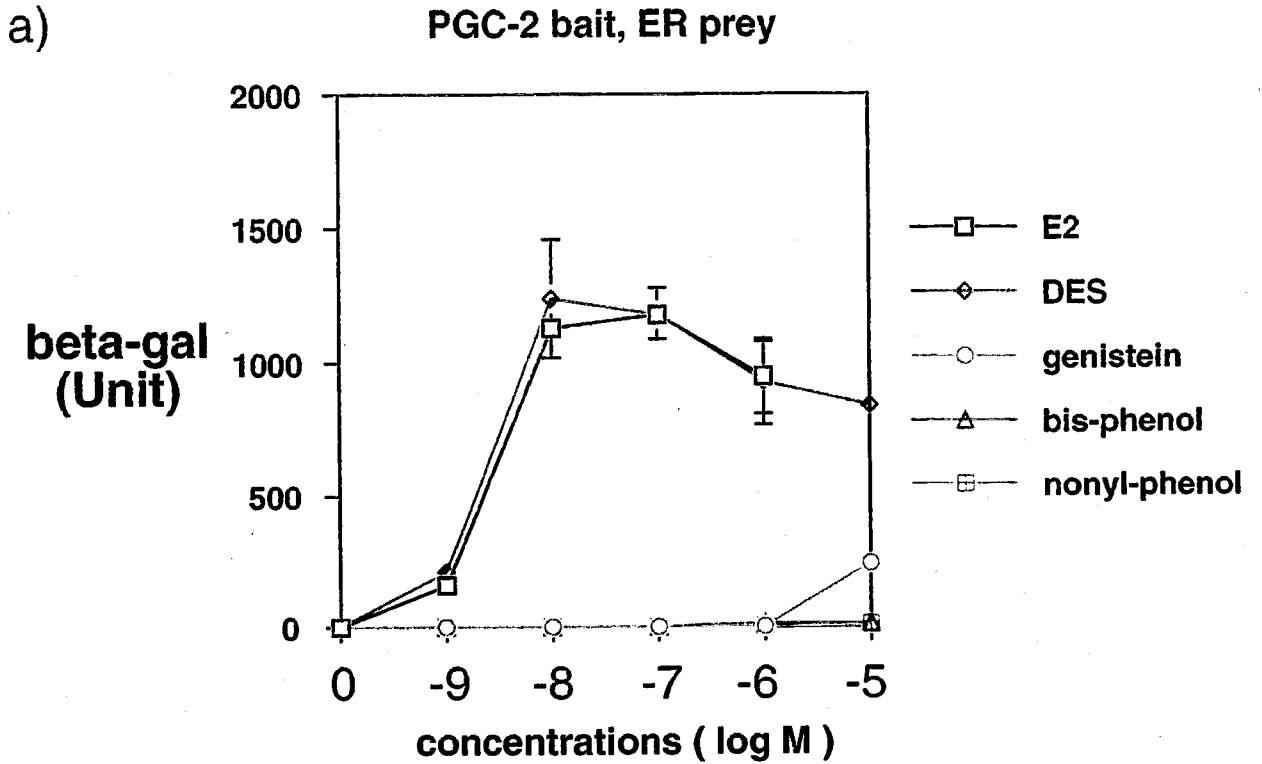


図2 酵母two-hybrid 法を用いたエストロゲン受容体とPGC-2(a)と SRC-1(b) のリガンド依存的相互作用の解析。