

氏名（本籍）	上 田 昌 史（兵庫県）
学位の種類	博 士（再生医科学）
学位授与番号	甲第 951 号
学位授与日付	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Polyglutamine expansion disturbs the endoplasmic reticulum formation, leading to caspase-7 activation through Bax
審査委員	（主査）教授 深 尾 敏 幸 （副査）教授 岩 間 亨 教授 藤 崎 和 彦

論文内容の要旨

ポリグルタミンタンパク質は神経細胞死を誘導し、ハンチントン病などの神経変性疾患を引き起こす。ポリグルタミンはカスパーゼ（システインプロテアーゼ）を活性化することによりアポトーシスを誘導することが知られているが、その詳細な機構は不明のままである。カスパーゼの活性化は Bcl-2 ファミリータンパク質によって制御されている。アポトーシス刺激により Bcl-2 ファミリータンパク質は小胞体やミトコンドリアに局在化し、これらの膜に挿入することでカスパーゼを活性化する。

本研究は、ポリグルタミンタンパク質が発現した細胞において小胞体膜が形態変化を起こすことを見出し、ポリグルタミンが引き起こすカスパーゼ活性化における小胞体膜の役割を解析するものである。

【対象と方法】

- 1) *in vivo* におけるポリグルタミンの小胞体膜形態への影響を解析するため、ハンチントン病モデルマウス（R6/2: HD exon 1 トランスジェニックマウス）を用いた。免疫染色法、電子顕微鏡観察により小胞体膜形態を検討し、カスパーゼ活性化も解析した。
- 2) 培養細胞株（HEK293T）におけるポリグルタミンタンパク質と小胞体膜の形態を解析するため、ポリグルタミン-GFP 融合タンパク質をコードする遺伝子（polyQ82-GFP）及び小胞体膜タンパク質 cb5 の mRFP 融合タンパク質をコードする遺伝子（mRFP-cb5）を用いて、共局在を共焦点顕微鏡及び電子顕微鏡の組み合わせにより解析した。更にタイムラプスにより HEK293T 細胞での小胞体膜の形態変化とポリグルタミン凝集体形成を経時的に観察した。
- 3) アポトーシス促進型 Bcl-2 ファミリータンパク質である Bax/Bak のダブルノックアウト細胞と polyQ82-GFP を用いて、ポリグルタミンによる小胞体膜形態変化への Bax/Bak の関与と、カスパーゼ-7 活性化への影響を検討した。
- 4) HEK293 細胞株に安定的にポリグルタミンを発現させるため、Tet-Off システムを用いて polyQ82-GFP 発現誘導細胞株を樹立した。細胞死機構を解析するため、小胞体膜分画を超遠心分離で抽出し、アルカリ処理によって Bax の小胞体膜への挿入を検討した。
- 5) ポリグルタミンが小胞体膜に局在する Bcl-2 ファミリータンパク質を介してカスパーゼ-7 を活性化する可能性が考えられたため、小胞体局在型 Bax（ER-Bax）及び小胞体局在型 Bcl-xL（アポトーシス抑制型、ER-Bcl-xL）を作製し遺伝子導入してカスパーゼ-7 の活性化を解析した。

【結果】

- 1) 9 週齢のモデルマウス脳切片で小胞体膜が形態変化を起こし、ポリグルタミン凝集体周辺での蓄積が観察された。また小胞体膜に連続する核膜の形態変化も見られ、週齢に伴い増悪していた。また 13 週齢のモデルマウス脳内でカスパーズ-7 が活性化していた。
- 2) モデルマウス脳切片と同様、ポリグルタミンが発現している HEK293T 細胞においても小胞体膜は形態変化を起こし、polyQ82-GFP と mRFP-cb5 が一部共局在していた。mRFP-cb5 の凝集はポリグルタミンが凝集するよりも早い段階から始まっていた。またポリグルタミン凝集前の mRFP-cb5 凝集はコンゴアレッド（ポリグルタミンオリゴマー化阻害剤）によって抑制された。
- 3) Bax/Bak ダブルノックアウト細胞ではポリグルタミン発現によるカスパーズ-7 の活性化が抑制されていた。しかしポリグルタミン凝集体周辺での小胞体膜の形態変化は観察された。
- 4) ポリグルタミン発現誘導によって小胞体膜分画における Bax の挿入が増加した。
- 5) polyQ82-GFP と同様に ER-Bax もカスパーズ-7 の活性化を引き起こした。また、これらのカスパーズ-7 の活性化は ER-Bcl-xL の発現によって抑制された。

【考察】

小胞体膜の形態変化はハンチントン病モデルマウスで観察され、病態の進行に伴い形態変化の増悪が見られたことから、ポリグルタミンによる細胞死機構への関与が示唆された。ポリグルタミン凝集体の周囲において小胞体膜が蓄積しており、Bax/Bak ダブルノックアウト細胞でも小胞体膜の形態変化が観察されたことから、ポリグルタミンによる小胞体膜の形態変化は Bax/Bak 活性化の上流に位置すると考えられる。ポリグルタミンの凝集体形成以前から小胞体膜が蓄積し、コンゴアレッドにより形態変化が抑制されたことから、小胞体膜の形態変化はポリグルタミンオリゴマーによるものと考えられる。

polyQ82-GFP 発現誘導細胞株によって、Bax の小胞体膜への挿入増加が明らかとなり、小胞体膜局在型 Bax によってもカスパーズ-7 活性化が誘導された。これらの結果は、小胞体膜がポリグルタミンによる細胞死機構においてカスパーズ-7 活性化のシグナル発信部位である可能性を示唆している。小胞体ストレスによって Bax が小胞体膜でコンフォメーション変化しオリゴマー化することが知られているので、ポリグルタミンによって小胞体膜へ挿入した Bax がこれら活性化を示すのかを今後検討していく必要がある。

【結論】

ポリグルタミンは小胞体膜の形態変化と Bax の膜内への挿入を引き起こし、カスパーズ-7 を活性化することにより細胞死を誘導する。

論文審査の結果の要旨

申請者 上田昌史 は、ポリグルタミンが誘導する細胞死機構の解析を行ない、疾患モデルマウス及び培養細胞に共通して小胞体膜の形態変化が現れる事を見出した。またポリグルタミンによって Bax が小胞体膜へ挿入され、カスパーズ-7 を活性化することにより細胞死を誘導することを明らかにした。これらの成果は神経病理学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Masashi Ueda, Shimo Li, Masanori Itoh, Yoshika Hayakawa-Yano, Miao-xing Wang, Miki Hayakawa, Ryoko Hasebe-Matsubara, Kazunori Ohta, Eri Ohta, Akihito Mizuno, Yoko Hida, Munekazu Matsumoto, Huayue Chen, and Toshiyuki Nakagawa : Polyglutamine expansion disturbs the endoplasmic reticulum formation, leading to caspase-7 activation through Bax. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443, 1232-1238 (2014)