

# 研究結果報告書集

— 交通安全等・高齢者福祉 —

VOL. 11

2005年度研究助成

2007年8月

財団法人 三井住友海上福祉財団

Mitsui Sumitomo Insurance Welfare Foundation

SINCE 1975

〈表題〉異常タンパク質蓄積による細胞老化の分子機構：老年病の先駆的  
予防・治療法の開発

代表研究者 宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野教授  
今泉 和則

【まとめ】

小胞体ストレスから救済する新規化合物 BIX を発見し、この化合物が脳虚血による神経細胞死から保護する作用を有することを明らかにした。また、小胞体ストレス応答の新たな経路としてオートファジーの活性化が生じることを発見した。このオートファジーは異常タンパク質のバルク分解を行うことで小胞体ストレス誘導性細胞死から救済する役割があることを証明した。

1. 研究の目的

異常タンパク質が細胞内に蓄積すると種々の疾患を発症する(コンフォメーション病)。細胞の老化を促進し細胞死を誘発するからである。コンフォメーション病にはアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患も含まれる。これら神経変性疾患の発症に小胞体ストレスが密接に関わることが最近明らかにされている。すなわち、小胞体ストレスから回避できればコンフォメーション病の治療に直結する。本研究は異常タンパク質蓄積による細胞障害およびそれに対する生体防御機構のメカニズムを解明し、それを踏まえてコンフォメーション病に代表される老年病に対する先駆的治療法開発につなげることを目的とする。

小胞体分子シャペロン BiP を細胞内に強制発現させておくと、小胞体ストレスから保護されることが知られている。小胞体ストレス誘導性神経細胞死から救済するために筆者らは小胞体分子シャペロン BiP を誘導する化合物の開発を試み、新規低分子化合物 BIX (BiP inducer X) を見出した。本研究ではこの化合物の薬効を細胞レベルおよび動物レベルで詳細に解析することで、薬物の作用機序を解明するとともに神経変性疾患治療薬としての可能性を検討した。さらに、小胞体ストレス応答の全容解明は神経変性疾患の治療法開発に重要と考え、小胞体ストレスに適応するための新たな細胞応答経路を探索した。その結果、小胞体ストレスが細胞に負荷されると直ちにオートファジーが活性化し異常タンパク質の排除に働く可能性を見出したので合わせて報告する。

2. 研究方法

2-1 化合物 BIX の作用機序の解析

小胞体分子シャペロン BiP のプロモーター領域 132bp を pGL3 ベクターに組み込み、293 細胞に導入してレポーター活性を測定した。

2-2 神経細胞死抑制効果

神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞に化合物

BIX を投与後、小胞体ストレスを負荷して化合物BIXの細胞死抑制効果を検討した。

### 2-3 脳虚血に対する効果

化合物 BIX を脳室内に注入したマウスの中大脳動脈を完全に結紮し脳梗塞巣を作成した。24 時間後に脳梗塞巣の大きさを TTC 染色により測定した。

### 2-4 電子顕微鏡観察

SK-N-SH 細胞を刺激後、2.5% グルタルアルデヒド、2% パラホルムアルデヒドを含む 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) を用い、室温にて 60 分固定した。細胞は 1% OsO<sub>4</sub> を含む 0.1M phosphate buffer にて室温で 60 分後固定し、脱水後、エポキシ樹脂 Quetol 812 (Nissin EM Co., Tokyo, Japan) に包埋した。細胞はブロックにマウントし、70nm の薄さに切った。切片を uranyl acetate (saturated aqueous solution) と lead citrate にて染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7100; Hitachi, Ibaraki, Japan) にて観察した。

### 2-5 GFP-LC3 集積面積の測定

GFP-LC3 をトランスフェクションした細胞は、蛍光顕微鏡と CCD カメラ (ORCA-ER-1394 System; Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka, Japan) を用いて観察・写真撮影した。撮影した写真を用いて、GFP-LC3 のドットをそれぞれ肉眼観察にて抽出し、その面積を Lumina Vision software (Mitani Corporation, Fukui, Japan) を用いて測定した。

## 3. 研究の成果

### 3-1 化合物 BIX の発見と薬効解析

約 20000 種類のケミカルライブラリーから BiP プロモーター活性を上昇さ

せる化合物をレポーターアッセイによりスクリーニングした。その結果、5つの候補化合物を見出すことに成功した。そのうち、レポーター活性を最も上昇させる機能をもつ BIX (BiP Inducer X) について検討を加えた。

BIX を神経芽細胞腫 SK-N-SH の培養上清に加え、12時間後にトータル RNA を抽出しノーザンブロッティングで BiP mRNA の発現を検討した。その結果、BIX の濃度依存的に BiP mRNA の発現上昇が認められた。BiP 以外の小胞体ストレス関連遺伝子については BIX の投与により発現変動がみられなかった。このことから、BIX は小胞体ストレスを誘発することなく、小胞体分子シャペロン BiP のみを特異的に発現上昇させることが明らかになった。

SK-N-SH 神経芽細胞の培養上清に BIX を添加し、12時間後に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (Tm) を 0.5 μg/ml の濃度で添加し、細胞死の程度を溶媒のみを添加した時と比較した。その結果、BIX を添加した細胞では Tm 誘導性の神経細胞死に対して抵抗性が亢進していた。この結果から BIX は小胞体ストレスから回避し、細胞に保護的に作用することがわかった。

マウス脳室内に BIX を持続注入しておき、その後に中大脳動脈を永久血紮して脳梗塞を誘発させた。BIX を投与しなかったマウスと比べ、BIX 投与群では明らかに梗塞巣の領域が減少し、脳損傷を軽減させた。つまり、BIX は *in vivo* においても神経細胞死を抑制する機能があることがわかった。

化合物 BIX は小胞体分子シャペロン BiP を転写レベルで発現上昇させる活性があることがわかった。BiP 遺伝子のプロモーター領域には小胞体ストレス応答エレメント (ERSE) とサイクリック AMP 応答エレメント (CRE) が存在することが知られている。今回の解析では BIX による BiP プロモーターの活性上昇は ERSE を介している可能性が考えられた。しかし、どのような機序で BIX が ERSE を活性化しているかは謎のままである。今後は BIX の直接のターゲット分子を明らかにし、作用機序を明確にする必要があると思われる。

### 3-2 小胞体ストレス誘導性オートファジーに関する研究

小胞体ストレス時における細胞の形態変化はあまりよく調べられていない。そこで電子顕微鏡を用いて小胞体ストレス負荷後の超微形態変化を観察した。ツニカマイシンやサブシガルジンにより小胞体ストレスを負荷した神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞において、ストレス処理後 2-6 時間で、オルガネラを取り込んだ 2 重膜構造体、すなわちオートファゴゾームが高頻度に観察された。オートファジーのマーカーである LC3 の動態を蛍光顕微鏡による観察とウエスタンブロッティングにより検討したところ、小胞体ストレス時に LC3 がプロセッシングを受け活性化し、オートファゴゾームに局在していることが観察された。このオートファゴゾーム形成は IRE1 欠損細胞では観察されないことから、小胞体ストレス誘導性オートファジーには IRE1 からのシグナルが必須であることがわかった。

オートファジーの阻害剤である 3-methyladenine を処理すると小胞体ストレスによる細胞死が増強された。さらにオートファジー不全株である ATG5 欠損細胞、ATG5 ノックダウン細胞でも同様に小胞体ストレスに対する抵抗性は減弱していた。以上の結果から小胞体ストレス誘導性オートファジーは小胞体ストレスから細胞を保護する可能性が示唆された。

### 4. 今後の課題

化合物 BIX は培養細胞のみならず *in vivo* の実験でも脳神経細胞のアポトーシスから救済できることが本研究で明らかになった。脳虚血以外の神経変性疾患モデルにおいても同様の効果が得られるか否かを検討するとともに、脳内へのドラッグデリバリーに関しても今後は詳細に検討する必要があると思われる。

オートファジーは細胞内の長寿命蛋白質やオルガネラなどの消化を担う細胞内タンパク質バルク分解系として機能している。小胞体ストレス時にオートファジーが活性化していることは、小胞体関連分解 (ERAD) とは別に小胞体内に蓄積した異常タンパク質を小胞体ごと分解排除している可能性を示すものである。今後、さらに小胞体の微細構造の解析やタンパク質分解機序の解析を通してオートファジーの生理的役割を明らかにしていきたい。

### 5. 研究成果の公表方法

化合物 BIX に関する研究成果は *Cell Death & Differentiation* に投稿中である。オートファジーの研究成果に関してはす

でに *Molecular Cellular Biology* に掲載  
済みである。

発表論文：

Ogata M, Hino S-I, Saito A, Morikawa  
K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T,  
Taniguchi M, Tani I, Yoshinaga K,  
Hammarback JA, Urano F and Imaizumi K. :  
Autophagy is activated for cell  
survival after ER stress. *Molecular and  
Cellular Biology*, 26 (24) :9220-9231,  
2006.

謝辞

本研究の遂行にあたりご援助をいただき  
ました財団法人三井住友海上福祉財団  
に厚く御礼申し上げます。

以上