

## 第Ⅱ章

**Ataxin-3** の凝集体形成性と細胞死に対する

プロテアソーム拮抗剤の効果に関する研究

(1). 目的.

Machado-Joseph 病(MJD)は、その変異タンパクである ataxin-3 によって凝集体形成と細胞死が引き起こされることが言われている。現在のところ、核内凝集体は、MJD を含めて6つのポリグルタミン病で確認されている。核内凝集体は、神経変性の最も著明な領域において最も高頻度に認められることより、凝集体形成はポリグルタミン病の病因にとって極めて重要であると考えられている (1-10).

最近の研究によれば、核内凝集体はユビキチン化されているのがわかっている。これは、ミスフォールドタンパクの変性に対する特殊なタンパク分解経路の存在を示唆するものであり、その経路として、ユビキチン-プロテアソーム経路が考えられている (1, 6, 11, 12).

多くの神経変性疾患がミスフォールドタンパクや凝集体に関連していることがわかるにつれ、プロテアソームの機能が注目されるようになった。まず最初に、1998年 Cummings らは、ポリグルタミン病の一つ SCA 1 の変異タンパクである ataxin-1 にプロテアソームが含まれていることを報告した (13)。次いで、1999年 Chai らは、MJD 脳の神経ではプロテアソームは変異タンパクである ataxin3 を含む核内凝集体に局在し、また、MJD 遺伝子を導入された細胞でも、プロテアソームは伸長ポリグルタミンによって形成された凝集体の中に分布しているのを発見し、さらに、プロテアソームの抑制物質である Lactacystin を添加すると凝集体形成が有意に増加したことより、プロテアソームは変異 ataxin3 の分解に関与し、凝集体形成を直接的に抑制している可能性を指摘した (1).

従って、本研究では、前章同様のモデル細胞培養系を用いて、プロテアソーム拮抗剤が凝集体形成に及ぼす影響について検討するとともに、前述した Chai らの報告では、凝集体形成におけるプロテアソーム拮抗剤の作用についてのみで細胞死に関しては記述がないため、今回我々は、この点についても検討した。

(2). 対象と方法.

2-1. 細胞培養.

ハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞(Baby Hamster Kidney cell)を, 10 %胎児牛血清(fetal bovine serum; FBS, Gibco BRL)及び 100 µg/ml の濃度の penicillin-streptomycin(Gibco BRL)が添加された Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> / 95% air の条件下でインキュベーター内で培養した. (第 I 章に準ずる)

2-2. 伸長ポリグルタミン鎖を持つ異常 MJD 遺伝子及び伸長ポリグルタミン鎖を持つ短縮型(truncated form)MJD 遺伝子を発現するプラスミドの作製.

C 末側に myc エピトープを付けた 77 個のポリグルタミンを持つ全長 ataxin-3 (Fig.1A)発現ベクターは, 77 回の CAG リピートを持つ全長 MJDcDNA を pcDNA3.1-Myc-His C(Invitrogen, San Diego, CA)に *Bam* HI 及び *Kpn* I site で組み込み, *Bam* HI-*Kpn* I 間のフラグメントをサブクローニングすることにより作製した (pMJD-FL-Q77-myc). さらに, N 末側のアミノ酸の数が 286 個欠損している ataxin-3 (Fig. 1B)発現ベクターの作製を行った. pMJD-FL-Q77-myc をテンプレートとして, センスプライマーにはイニシャルコドンとともに *Bam* HI site を導入し, アンチセンスプライマーには *Kpn* I を認識する site を入れて PCR を施行し, 短縮型 pMJD-Q77(ΔN286)-myc を構築した. (第 I 章に準ずる)

2-3. 遺伝子導入.

BHK-21細胞は, ポリ-D-リジンでコートした2-ウェルのスライドガラスチェンバー(Poly-D-lysine coated slide glass chamber 2-well; Beckton-Dickenson, Bedford, MA)の各ウェルに 1 ml の培養液を入れ, 2.5×10<sup>4</sup>個の細胞密度で播種

した。播種後8時間の時点で、各ウェルにつき総計1.76 $\mu$ gのプラスミドDNAをリン酸カルシウム法(共沈)によって一過性に遺伝子導入(トランスフェクション)した。トランスフェクション施行後4時間で、培地を各種薬剤を含む新しい培養液に交換し、さらに44時間培養後(トランスフェクション開始から48時間後)に4%パラホルムアルデヒドにて固定した。(第I章に準ずる)

#### 2-4. 投与薬剤.

この研究では、上述したように、トランスフェクション後4時間の時点で、プロテアソーム拮抗剤としては、Lactacystin (1, 14, 15)及びMG-132 (1, 16, 17)を投与した。Lactacystinは0 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M濃度, MG-132は0 $\mu$ M, 5.0 $\mu$ M濃度を使用した。各薬剤は、上記濃度範囲において薬剤自体による細胞への影響は認められなかった。

#### 2-5. 免疫蛍光染色法とDNA染色法による凝集体形成と細胞死の頻度測定.

組み換えタンパク、すなわちmycタグを付けたataxin-3の発現は、抗myc抗体を用いた間接蛍光抗体法によって評価した。固定した細胞を20分間、0.05% Tween 20を含むPBS (phosphate-buffered saline)にて洗浄した後、1次抗体(200倍希釈、抗mycマウスモノクローナル抗体, Ab-2; NeoMarkers, Union City, CA)を乗せ、4 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。次いで2次抗体(400倍希釈、Cy3-conjugated抗マウスIgG抗体, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)を乗せ、室温で1時間インキュベートした後、さらにHoechst dye (Hoechst 33258)で室温で2分間インキュベートした。そして、PBS-Glycerin (9:1)にて封入した。核の形態はこのHoechst dye 33258を使ったDNA染色によって評価した。

免疫蛍光は、蛍光顕微鏡下に、420倍で観察し、168倍の低倍率で写真撮影した。凝集体形成頻度は蛍光顕微鏡下で無作為に選択された視野でmycエピトープを発現している細胞を500個以上解析することで評価した。つまり、mycエピトープを有する全細胞に対する明確に凝集体を形成している細胞の比率を計算した。

また、細胞死の頻度は myc 陽性細胞の中で、Hoechst33258 で染色された核の形態に基づいて評価した。すなわち、核の形態において、アポトーシスの指標である核の断片化・破碎化や核濃縮を来しているものを計数し、頻度を求めた。

全てのデータは平均  $\pm$  標準偏差で表した。統計的解析には StatView software (Ver. 4.0, Abacus Concepts) の Mann-Whitney's U-test を使用した。そして、 $P < 0.05$  を統計的有意差があると見なした。(第 I 章に準ずる)

### (3). 結果.

#### 3-1. プロテアソーム拮抗剤である Lactacystin 及び MG-132 の短縮型 ataxin-3(Q77)による凝集体形成と細胞死に対する効果.

Lactacystin の場合、凝集体形成頻度はコントロールの  $60.0 \pm 1.9\%$  に対し、 $0.5\mu\text{M}$  濃度では  $70.3 \pm 3.5\%$  にまで増加し ( $p < 0.002$ )、また、MG-132 の場合も、コントロールの  $59.9 \pm 2.3\%$  に対し、 $5.0\mu\text{M}$  濃度では  $80.4 \pm 4.4\%$  にまで増加し ( $p < 0.004$ )、いずれも統計学的有意差を認めた。しかし、細胞死の頻度は Lactacystin ではコントロールの  $20.0 \pm 1.1\%$  に対し、 $0.5\mu\text{M}$  濃度では  $21.4 \pm 1.6\%$  で差を認めなかった ( $p < 0.08$ )。但し、MG-132 ではコントロールの  $20.9 \pm 2.3\%$  に対し、 $5.0\mu\text{M}$  濃度では  $24.6 \pm 2.5\%$  であり増加傾向を示した ( $p < 0.04$ )。ちなみに、グルタミン残基のリピートが 10 回である短縮型の正常 MJD 遺伝子 Q10( $\Delta\text{N}286$ )-myc を発現するプラスミドをトランスフェクションした場合も、細胞死の頻度はコントロールと比較して有意差を認めなかった。従って、この結果は、プロテアソームが少なくとも凝集体形成を抑制することに関与している可能性を示唆するものである。

### (4). 考察.

プロテアソームは細胞質にある大型のタンパク複合体の一種であり、ユビキチ

ンの結合などにより目印のつけられたタンパク質の分解に関与している以外に、細胞周期、制御、分化、生存、抗原提示を含めた多くの細胞内の過程において必要不可欠のものである (18)。また、プロテアソームは、脳内に大量に存在しているが、神経における正確な機能はまだ十分には分かっていないところもある (19)。しかし、多くのポリグルタミン病の病因において、ミスフォールドタンパクや凝集体形成の関連が指摘されるようになるとともに、プロテアソームが重要視されるようになった。Chai らは、MJD 脳及び MJD 遺伝子導入細胞の両者で、プロテアソームは変異タンパクである ataxin3 によって形成された凝集体中に存在しているのを発見し、また、プロテアソーム拮抗剤である Lactacystin 条件下で凝集体形成が有意に増加したことより、凝集体形成抑制に関与している可能性を指摘し (1)、従って、プロテアソームの活性を調節することにより、MJD や他のポリグルタミン病の進行過程を変化させ得る可能性も示唆した。我々の実験結果でも、プロテアソーム拮抗剤である Lactacystin 及び MG-132 により凝集体形成頻度は統計学的有意差を持って増加した。この結果は、Chai らの報告と同様であり、凝集体形成性はプロテアソームの活性に依存している可能性が示唆された。

さらに、我々は、細胞死におけるプロテアソーム拮抗剤の効果を検討した。その結果、プロテアソームのみを抑制するとされる Lactacystin 条件下で、凝集体形成と細胞死の相関に解離が見られた。すなわち、凝集体形成頻度は有意に増加したのに対し、細胞死の頻度は変化を認めなかった。このことは、凝集体が細胞死の直接的な原因ではないとする最近の複数の報告を支持するものである (20-22)。以上のことより、これらの結果は伸長ポリグルタミン鎖を含むミスフォールドタンパクの集積が、凝集体形成と細胞死の過程をそれぞれ別個に活性化していることが示唆される。仮に、この機序が正しければ、第 I 章で使用したケミカルシャペロンは、タンパクのミスフォールディングの程度を減じるので、ケミカル・シャペロンの投与後に、凝集体と細胞死が抑制されるのは十分に合理的であると考えられる。

(5). 結論

<1>. プロテアソーム拮抗剤の存在下では, 変異 ataxin-3 による凝集体形成頻度は統計的有意差を持って増加した. 従って, 凝集体形成性はプロテアソームの活性に依存している可能性が示唆された.

<2>. プロテアソームのみを抑制するとされる Lactacystin 条件下で, 凝集体形成と細胞死の相関に解離が見られたことは, 凝集体が細胞死の直接的な原因ではないとする最近の複数の報告を支持するものである.

引用文献

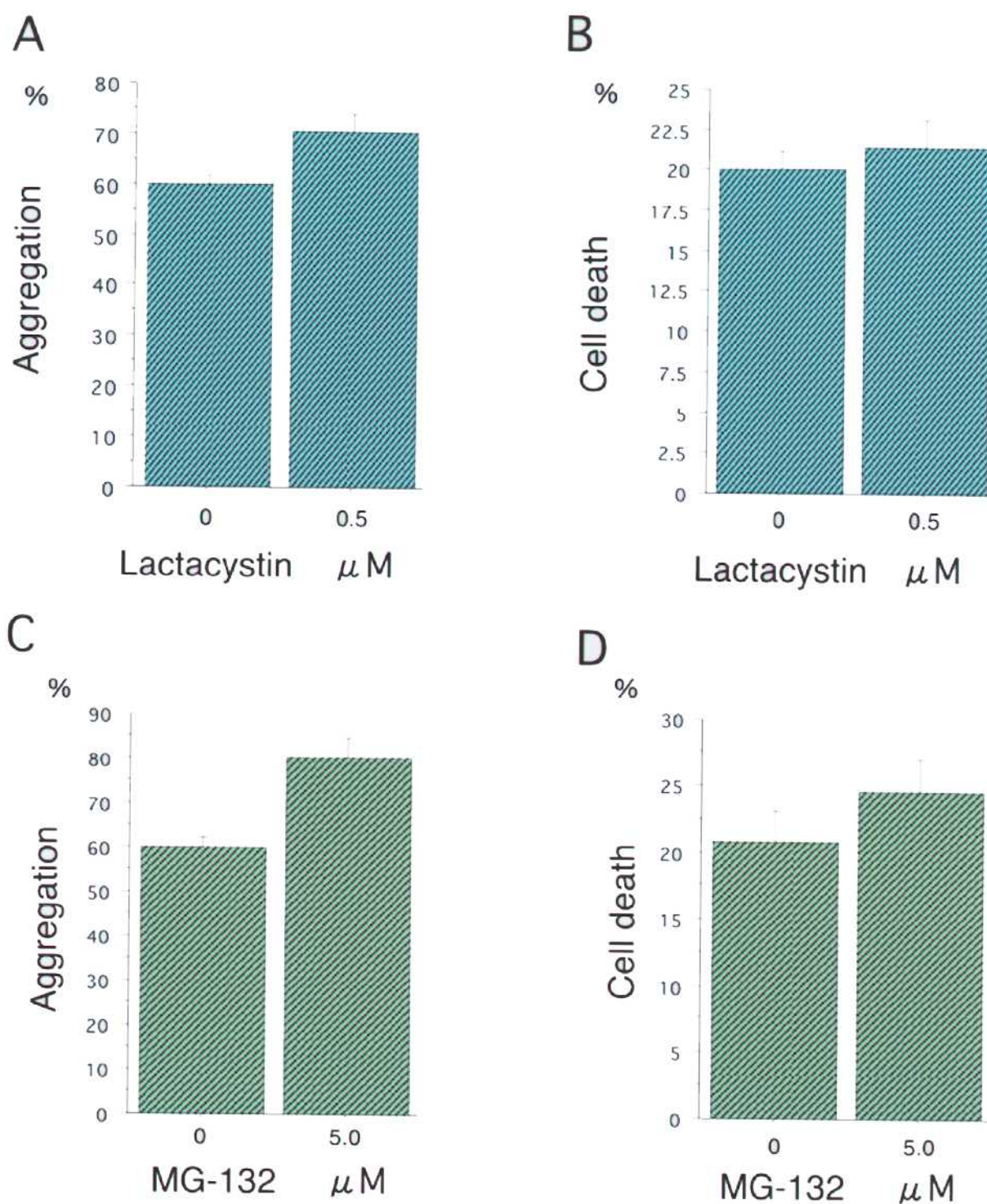
1. Chai, Y., Koppenhafer, S. L., Shoesmith, S. J., Perez, M. K., and Paulson, H. L. (1999) Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 673-682.
2. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davis, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. and Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277, 1990-1993.
3. Paulson, H. L., Perez, M. K., Trotter, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Vig, P., Mandel, J.-L., Fishbeck, K. H. and Pittman, R. N. (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19, 333-344.
4. Ordway, J. M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.-A., Bernstein, E. M., Cearley, J. A., Wiener, H. W., Dure IV, L. S., Lindsey, R., Hersch, S. M., Jope, R. S., Albin, R. L. and Detloff, P. J. (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and progressive late-onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*, 91, 753-763.
5. Klement, I. A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y. and Orr, H.T. (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*, 95, 41-53.
6. Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fishbeck, K. H., Pittman, R. N. and Bonini, N. M. (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93, 939-949.



7. Sisodia, S. S. (1998) Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell*, 95, 1-4.
8. Ross, C. (1997) Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron*, 19, 1147-1149.
9. Lunkes, A. and Madel, J. L. (1997) Polyglutamines, nuclear inclusions and neurodegeneration. *Nature Med.*, 3, 1201-1202.
10. Davies, S. W., Beardsall, K., Turmaine, M., DiFiglia, M., Aronin, N. and Bates, G. P. (1998) Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet -repeat disorders with polyglutamine -repeat expansion? *Lancet*, 351, 131-133.
11. Alves-Rodrigues, A., Gregori, L., Figueiredo-Pereira, M. E. (1998) Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. (Review) *Trends Neurosci* 21, 516-520.
12. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., Greenberg, M. E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95, 55-66.
13. Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalffy, B., DeFranco, D.B., Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (1998) Chaperone suppression of ataxin-1 aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat. Genet.*, 19, 148-154.
14. Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J., and Schreiber, S. L. (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, 268, 726-731.

15. Wyttenbach, A., Carmichael, J., Swartz, J., Furlong, R. A., Narain, Y., Rankin, J., Rubinsztein, D. C. (2000) Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(6), 2898-2903.
16. Kim, D., Li, G. C. (1999) Proteasome inhibitors lactacystin and MG132 inhibit the dephosphorylation of HSF1 after heat shock and suppress thermal induction of heat shock gene expression. *Cell Physiol. Biochem.* 264(2), 352-358.
17. Wagenknecht, B., Hermisson, M., Eitel, K., Weller, M. (1999) Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells. 9(3), 117-125.
18. Ciechanover, A. (1997) The ubiquitin-proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21.
19. Mergual, E., Arizti, P., Rodrigo, J., Gimenez-Amaya, J. M. and Castano, J. G. (1996) Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. *J. Neurosci.*, 16, 6331-6341.
20. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., Greenberg, M. E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55-66.
21. Sisodia, S. S. (1998). Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: Are they pernicious, coincidental, or beneficial? (Minireview) *Cell* 95, 1-4.
22. Klement, I.A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H.B., Zoghbi, H. Y., Orr, H.T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: Role in polyglutamine-induced disease in SCA 1 transgenic mice. *Cell* 95, 41-5

図・表



**Figure 7.** プロテアソーム拮抗剤であるLactacystin 及び MG-132 条件下における検討

抗 myc-Cy3 抗体を用いた間接蛍光抗体法, および Hoechst dyeを用いたDNA染色法を行い, 蛍光顕微鏡下で観察した.

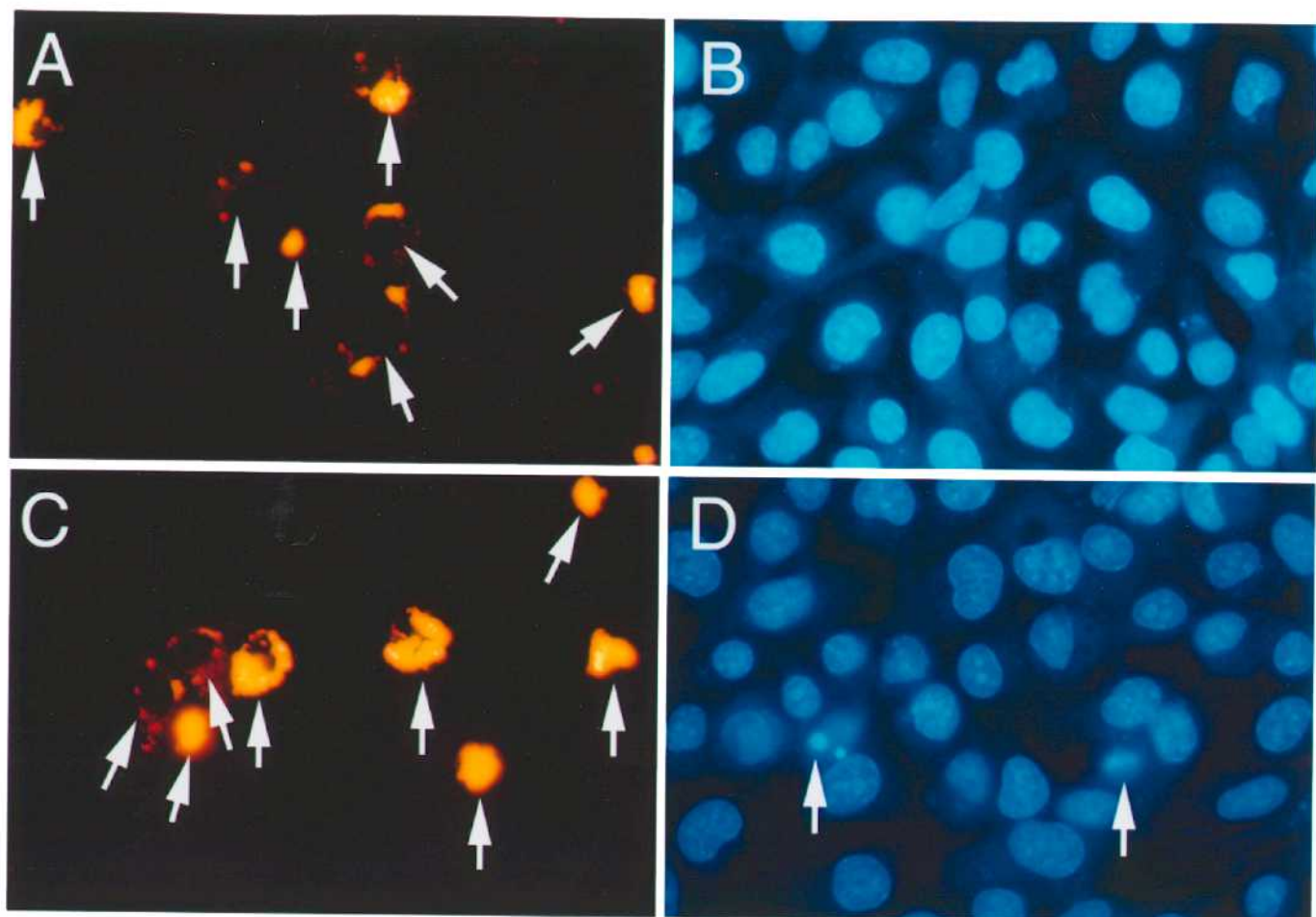
A, C 凝集体形成頻度

縦軸に凝集体形成頻度を示す (%)

B, D 細胞死の評価

縦軸に細胞死頻度を示す (%)

Lactacystin 及び MG-132はQ77( $\Delta\text{N}286$ )-myc 発現による凝集体形成(A,C)を有意に増加させた.  $P < 0.002$ .  $P < 0.004$ . Q10( $\Delta\text{N}286$ )-myc 発現の場合と比較しても統計的有意差を認めた. Lactacystin( $0.5\mu\text{M}$ )はコントロールに比し細胞死に関して差がなく( $p < 0.09$ ), MG-132( $5\mu\text{M}$ )は増加傾向を示した( $p < 0.03$ ). AとBの結果は別個に7回施行された実験の平均  $\pm$  標準偏差を表している. CとDの結果は別個に6回施行された実験の平均  $\pm$  標準偏差を表している.



**Figure 8.** プロテアソーム拮抗剤である Lactacystin 及び MG-132 条件下における短縮型 ataxin-3(Q77) 発現プラスミドの凝集体形成と細胞死

抗 myc-Cy3 抗体を用いた間接蛍光抗体法(A,C), および Hoechst dye を用いた DNA 染色法 (B,D)を行い, 蛍光撮影 (倍率: 200×)した.

Q77( $\Delta$ N286)-myc を発現しているBHK-21 細胞は, Lactacystin( $0.5\mu\text{M}$ )(A,B)乃至 MG-132( $5.0\mu\text{M}$ ) (C,D)の条件下で評価された. コントロールのデータは, 代表して Figure 3A と3B に示した. 凝集体形成はコントロールに比較しLactacystin ( $0.5\mu\text{M}$ ) 及び MG-132( $5.0\mu\text{M}$ ) 条件下で有意に増加した.