

論文の内容の要旨

論文題目 神経変性疾患の晩発性発症における 26S プロテアソームの関与

氏名 殿城 亜矢子

【序】

アルツハイマー病やパーキンソン病、ポリグルタミン病など多くの神経変性疾患に共通する特徴として、神経細胞内に異常タンパク質が蓄積・凝集すること、加齢に伴って発症リスクが上昇し病態が進行することが挙げられる。これまでに、異常タンパク質の主要な分解経路であるユビキチンプロテアソームシステムが、神経変性疾患における神経細胞内の異常タンパク質の凝集に深く関与することが示唆されてきた。しかし、神経変性疾患が晩発性に発症し、進行する理由は未だ明らかではない。そこで本研究では、生体内でのプロテアソーム活性の変化が、神経変性疾患の発症に及ぼす影響に着目した。生体内のプロテアソーム活性を遺伝学的手法で操作することで、生体内のプロテアソーム活性と神経変性疾患の発症・進行の関与を明らかにした。さらに、生体内のプロテアソーム活性が寿命の制御にも影響を与えていることを示し、生体内でのプロテアソーム活性の変化が神経変性疾患の晩発性の発症だけでなく、老化プロセスにも関与することを提唱した。

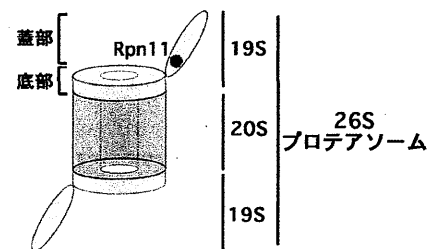


Fig.1 26Sプロテアソームの構造模式図

【方法と結果】

1. 神経変性を抑制する因子の同定

神経変性を抑制する因子を網羅的に探索するために、モデル生物として世代期間が短く、遺伝学的手法を駆使することが可能なショウジョウバエを用いて、未知遺伝子発現系統 (Gal4/UAS システムを用いた異所性発現系) のスクリーニングを行った。スクリーニングにより神経変性を抑制する系統を同定することに成功し、この系統において強制発現されている遺伝子の同定を試みたところ、19Sプ

ロテアソームの蓋部構成因子の一つである Rpn11 が候補遺伝子として明らかとなった (Fig.1)。複眼特異的にポリグルタミンを発現させると、視神経細胞の変性と脱落を伴う神経変性様表現型が加齢に伴い観察される。しかし、Rpn11 の強制発現系統は、ポリグルタミンによる異常タンパク質の凝集を抑制し、加齢に伴う神経変性様表現型の進行を有意に抑制した (Fig.2)。

2. 加齢に伴うプロテアソーム活性の低下

プロテアソームの構成因子の一つである Rpn11 が神経変性の進行を抑制するメカニズムを明らかにするために、生体内のプロテアソーム活性に着目した。まず、野生型系統やコントロール (LacZ 発現) 系統における生体内のプロテアソーム活性を様々な日齢において測定したところ、若齢個体と比較して老齢個体におけるプロテアソーム活性が低下していることが明らかとなった (Fig.3)。このような加齢に伴うプロテアソーム活性の低下が、神経変性の進行を抑制した Rpn11 の強制発現によって回復していることを予想し、Rpn11 強制発現系統における生体内のプロテアソーム活性を測定した。Rpn11 強制発現による発生への影響を回避するために、時間および組織特異的に目的遺伝子の発現を制御することが可能な方法である TARGET システムを用いて Rpn11 を羽化後から全身性に強制発現させたところ、老齢個体においてもプロテアソーム活性が維持されており、野生型系統で見られた加齢に伴うプロテアソーム活性の低下が、Rpn11 の強制発現によって回復していることが明らかとなった (Fig.3)。

3. Rpn11 過剰発現による加齢依存的な 26S プロテアソーム活性低下の回復

次に、プロテアソームの蓋部構成因子の一つである Rpn11 が、どのようなメカ

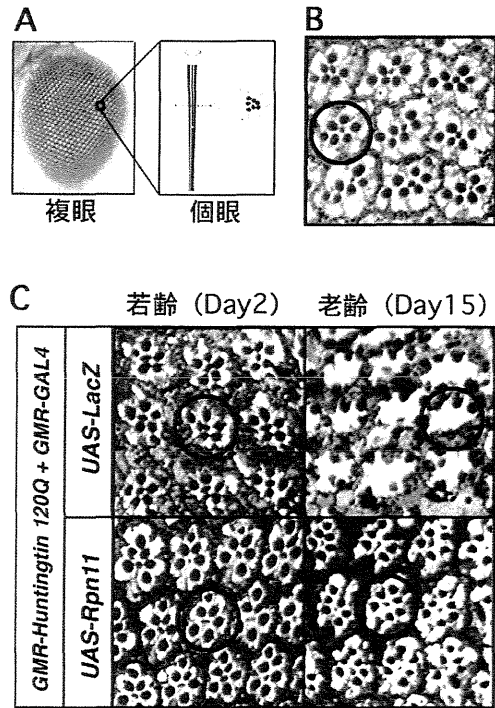


Fig.2 Rpn11 強制発現による神経変性様表現型の進行の抑制 A) ショウジョウバエの複眼と個眼の模式図。B) 野生型の複眼切片の一部。一つの個眼につき七つのラドメア (感桿分体) が見られる。C) 複眼特異的なポリグルタミンの発現による、老齢個体におけるラドメアの脱落が Rpn11 の強制発現により回復する。

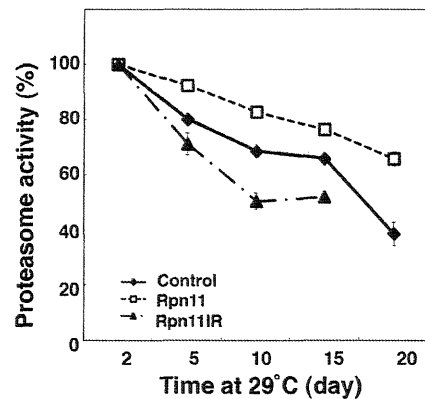


Fig.3 加齢に伴うプロテアソーム活性の低下

ニズムで加齢に伴うプロテアソーム活性の低下を回復しているのかを明らかにすることを試みた。プロテアソームは、触媒ユニットである 20S プロテアソームと調節ユニットである 19S プロテアソームが会合した分子集合体であり 26S プロテアソームと呼ばれる (Fig.1)。通常、20S プロテアソームは不活性型として存在し、調節ユニットである 19S プロテアソームが会合することによって活性型になることが知られている。

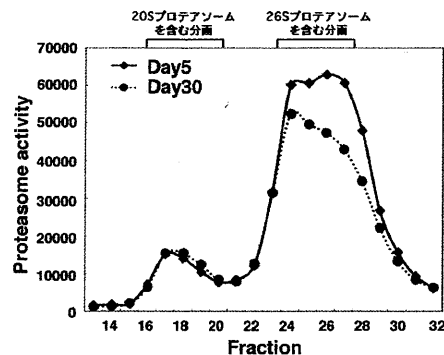


Fig.4 加齢依存的な 26Sプロテアソーム活性の低下

まず、プロテアソーム活性が加齢に伴いどのように低下するのかを明らかにするために、グリセロール密度勾配遠心法を用いて 20S、26S プロテアソームを分離し、それぞれのプロテアソームの活性・量的変化を若齢個体、老齢個体とそれぞれ比較した。その結果、老齢個体では若齢個体に比べて 26S プロテアソームの量および活性が減少していた (Fig.4)。一方で、コントロール (LacZ 発現) 系統の老齢個体と Rpn11 過剰発現系統の老齢個体を比較すると、加齢に伴う 26S プロテアソームの量および活性低下が Rpn11 過剰発現系統において回復することが明らかとなった (Fig.5)。

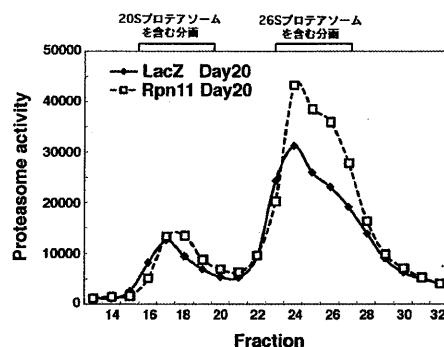


Fig.5 Rpn11 過剰発現による加齢依存的な 26Sプロテアソーム活性低下の回復

4. Rpn11 ノックダウンによる加齢依存的な 26S プロテアソーム活性低下の亢進

Rpn11 を標的とする double strand RNA (dsRNA) の発現 (Rpn11IR) によって内在性 Rpn11 の発現を発生段階よりノックダウンすると致死性を示すが、TARGET システムを用いて羽化後より Rpn11 をノックダウンさせると致死性を回避することが可能である。羽化後より Rpn11 をノックダウンさせた個体のプロテアソーム活性を加齢依存的に測定すると、加齢に伴うプロテアソーム活性の低下が亢進することが明らかとなった (Fig.3)。また、グリセロール密度勾配遠心法より、Rpn11 ノックダウン系統の老齢個体はコントロール系統の老齢個体に比較して、26S プロテアソームの量および活性が顕著に低下していることが明らかとなった。

5. 26S プロテアソームの変化が老化プロセスに及ぼす影響

生体内における 26S プロテアソームの量および活性の変化が、神経変性の発症に与える影響を明らかにするために、Rpn11 のノックダウン系統と神経変性モデルとの遺伝学的相関を解析した。ポリグルタミンの発現系統による進行性の神経変性様表現型は Rpn11 のノックダウンによって増強した。さらに、複眼特異的に Rpn11 を単独でノックダウンさせると、視神経細胞の脱落を伴う神経変性様表現型が加

齢依存的に観察された。Rpn11 ノックダウン系統において神経変性様表現型が見られたことから、26S プロテアソーム活性の変化に伴う異常タンパク質の蓄積を、ユビキチン化タンパク質の蓄積を指標に検討した。コントロール系統において、加齢に伴いユビキチン化タンパク質の蓄積が増加したが、Rpn11 ノックダウン系統においてユビキチン化タンパク質の蓄積が顕著に亢進した。一方で、Rpn11 強制発現系統におけるユビキチン化タンパク質の蓄積は抑制された。

次に、生体内における26S プロテアソームの変化が、老化に与える影響を明らかにするために、Rpn11 強制発現系統と Rpn11 ノックダウン系統における寿命を測定した。Rpn11 ノックダウン系統における平均寿命はコントロール系統に比べて顕著に減少したが、一方で Rpn11 強制発現系統における平均寿命はコントロール系統に比べて有意に伸長することが明らかとなった (Fig. 6)。

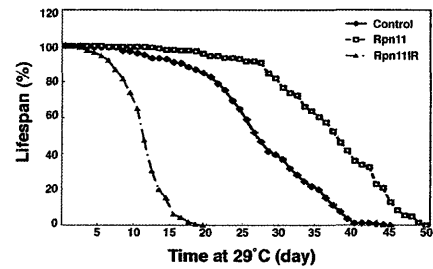


Fig.6 Rpn11 過剰発現、またはRpn11 ノックダウンによる寿命への影響

【まとめと考察】

私は本研究において、遺伝学的スクリーニングによって得られた神経変性の進行を抑制する因子 Rpn11 の同定により、老齢個体における生体内の26S プロテアソーム活性の低下を遺伝学的操作で向上させることによって神経変性の進行を抑制できる可能性を示した。これは加齢に伴う生体内の26S プロテアソーム活性の低下が、神経変性疾患の晩発性発症や加齢に伴う進行の原因、つまり危険因子の一つであることを強く示唆するものである。また、加齢に伴う生体内のプロテアソーム活性の低下が神経変性疾患の発症や進行だけでなく、寿命にも影響を与えていることを初めて明らかにした。今後は、加齢に伴うプロテアソーム活性の低下を制御する因子を明らかにすることで、晩発性に神経変性疾患が発症する機構や寿命を制御する機構が解明されると考えられる。