

学位論文題名

アポトーシス誘発 GAPDH の研究：
遺伝子解析と抗痴呆薬の作用

学位論文内容の要旨

アポトーシス（プログラムされた細胞死）は生理的な自殺機構であり、RNA 及び蛋白質の *de novo* 合成が関与することが明らかとなっている。神経系においてアポトーシスは正常な分化に必須とされ、神経ネットワークの形成に不可欠の過程である。一方、正常なアポトーシス機構の破綻は癌・ウイルス感染・自己免疫疾患や神経変性疾患等の発症や病態進行に関わっている。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）はハウスキーピング遺伝子として知られる解糖酵素である。これまで、他の蛋白質との相互作用など非解糖酵素としての GAPDH に関する少数の報告が存在するが、中でも注目されるのはアポトーシスとの関連性である。近年、種々の神経細胞死モデル系において GAPDH mRNA 発現が増加することが報告され、過発現した GAPDH 蛋白質は主に核分画に存在することが示唆された。しかし、GAPDH 発現がアポトーシスを直接誘発するのか、未だ不明であった。

本研究では、GAPDH とアポトーシスとの関連性に着目し、GAPDH 発現がアポトーシス誘発の直接の原因であるのか、アポトーシスの結果の現象であるのかを明らかにする目的で研究を進め、以下の新知見を得た。併せて、GAPDH を標的とする創薬応用の可能性を提案した。

1. GAPDH 過発現によるアポトーシス

大脳皮質由来神経細胞の 5-HT 誘発細胞死は、*de novo* 合成阻害薬で抑制されないこと、また、クロマチン構造変化を起こさずに細胞質に空胞を生じることから、この細胞死はネクローシスであることを見出した。この時 GAPDH の過発現は観察されず、GAPDH アンチセンスオリゴヌクレオチドの導入によっても細胞死を抑制できなかったことから、GAPDH はアポトーシス特異的に過発現すると考えられた。本研究では、アポトーシス細胞で過発現する GAPDH のクローニングを試み、その塩基配列からヒト解糖酵素 GAPDH と同一遺伝子であることを証明した (GenBank Acc. No.: AB017801)。

次に、GAPDH 発現がアポトーシスを直接的に誘導するのかを評価した。GAPDH cDNA を COS-7 細胞へ導入し、GAPDH 自身が直接的にアポトーシスを誘発することを示した。強制発現させた GAPDH のみならず、初代培養神経細胞のアポトーシスにおいても過発現した GAPDH

は単量体で核へ移行しており、GAPDH 過発現とそれに続く核移行がアポトーシスの初期過程であることを示した。

2. GAPDH 蛋白質の核移行及び凝集体形成に関わる領域

過発現 GAPDH の細胞内局在を精査するために、緑色蛍光蛋白質(GFP)と GAPDH の融合蛋白質を発現させたところ、細胞質や核に凝集体を形成することを発見した。種々の GAPDH 欠失変異体融合蛋白質の発現実験から GAPDH 蛋白質の機能ドメインを解析した結果、核移行と凝集体形成の責任領域は別であって、62-188 が核移行に、1-267 が核凝集体形成に機能しており、GAPDH による凝集体形成と高率な核移行が細胞死を誘導することを示した。さらに GAPDH に結合する薬物の報告から、アポトーシス初期に見られる GAPDH 核移行を指標に創薬応用できる可能性を提案した。解糖酵素 GAPDH はホモ四量体で機能し、その活性中心である 149Cys と基質結合部位を含む 149-333 が解糖活性に重要とされるが、解糖活性と核移行・凝集体形成は直接的には連動していないと考えられる。

3. GAPDH 遺伝子プロモーターの解析と抗痴呆薬の作用

GAPDH 過発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アポトーシス過程の GAPDH mRNA 過発現部分を抑制するが、basal 以下には下げないことから、アポトーシス過程で活性化される GAPDH 遺伝子プロモーターの存在を考えた。ゲノムウォーキングによって GAPDH プロモーター配列のクローニングに成功した (Genbank Acc. No.: AB047299 & AB 047300)。種々の長さのプロモーターを連結したレポーターアッセイから、AB047299 の翻訳開始点から上流・154~84 にプロモーター活性を担うコア領域を見出した。コリンエステラーゼ阻害作用を有するタクリンやドネペジルは用量に応じてコア領域の活性化を抑え、抗痴呆作用の発現に貢献している可能性が考えられた。同時に、GAPDH プロモーターを標的とする創薬応用から新規の抗痴呆薬開発が期待される。

4. 神経変性疾患と GAPDH の関連性

パーキンソン病におけるレヴィ小体は α -シヌクレインが不溶性に凝集したものであり、蛋白質の misfolding や凝集体形成は神経変性疾患の発症メカニズムの一つとされる。 α -シヌクレインと GAPDH が共発現するとレヴィ小体の形成が促進した。このレヴィ小体様凝集体はユビキチン/プロテアソーム経路にコミットしており、患者脳で認めるレヴィ小体と同じく、amyloid 様の凝集体であることを証明した。

また、マシャドージョセフ病患者の病態部位である橋核やアルツハイマー病患者の前頭前野の神経細胞核に GAPDH 免疫陽性シグナルを確認した。病因蛋白質が異なる疾病にも拘らず、神経細胞核にアポトーシスを誘発する GAPDH の陽性シグナルが存在することは GAPDH とこれら神経変性疾患との関連性を裏付けるものと考えられる。

上記の通り、本研究では GAPDH とアポトーシスに着目した研究を行い、GAPDH 過発現とそれに続く核移行がアポトーシスを直接的に誘発することを示した。その際、活性化するプロモ

一ター領域を同定し、また、GAPDH による凝集体の発見から神経変性疾患との関連性を証明してきた。以上の事実から、過発現と核移行を指標に、GAPDH が抗痴呆薬の創薬標的になることを提示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	野村靖幸
副査	教授	有賀寛芳
副査	助教授	大熊康修
副査	助教授	平敬宏

学位論文題名

アポトーシス誘発 GAPDH の研究： 遺伝子解析と抗痴呆薬の作用

グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) はハウスキーピング遺伝子として知られる解糖酵素であり、ハイブリダイゼーション実験の内標として多用されている。これまで、GAPDH と神経細胞アポトーシスとの関連性、特に、アポトーシス過程で GAPDH 発現が上昇することは報告されていたが、GAPDH がアポトーシスを直接誘発するのか不明であった。今回、申請者は、アポトーシスシグナルがなくても、GAPDH を過発現させることによってアポトーシスを誘発できることを証明した。これまでの GAPDH と神経細胞アポトーシスの研究は初代培養神経細胞を用いた細胞生物学的な解析が主であったが、非神経細胞を用いた強制発現系を逆用してアポトーシスであることの証明と高感度のアポトーシス定量解析に成功している。過発現した GAPDH が単量体で速やかに核移行することを生理的なアポトーシスが発生する初代培養神経細胞を用いた系において見出している。また申請者は、Green fluorescence protein (GFP)を用いた GAPDH 融合蛋白質が凝集体を形成することを発見するとともに、GAPDH 核移行・凝集体形成の責任領域を見出した。一方、アポトーシスシグナルに応じて活性化する GAPDH 遺伝子プロモーターを単離し、既知転写因子の応答配列がないことを報告した。

GAPDH の病態生理学的な役割を明らかにするために、申請者はマシヤドージョセフ病患者の橋核やアルツハイマー病患者の前前頭皮質に存在する神経細胞の GAPDH 免疫染色性を検討し、これらの領域の神経細胞核が陽性であることを示した。病因蛋白質が異なる疾患の神経細胞核に共通して GAPDH が存在しており、これら神経変性疾患の発症や病態進展に GAPDH が関連している可能性を示唆した。またパーキンソン病では α -シヌクレインを成分とする凝集体（レヴィ小体）が見られるが、申請者は過発現モデル系を用いて、 α -シヌクレイン単独の発現では生じないが GAPDH をともに発現させたときにレヴィ小体に似た凝集体が初めて形成されることを見出した。変異体のみならず野生型 α -シヌクレインと GAPDH の共発現によっても凝集体が形成され、病因が不明である弧発型パーキンソン病に対する GAPDH の関わりを示した。

さらに、申請者は GAPDH 核移行や GAPDH 遺伝子プロモーターに作用する CGP3466 やドネペジル等の薬物を見出したことから、GAPDH プロモーターの活性化や GAPDH 核移行の阻害は創薬研究に応用できることを提示した。実際、臨床で使用する抗痴呆薬がプロモーター活性化を抑制しており、新規の抗痴呆薬の探索に有用であることを示している。

以上の通り、申請者は GAPDH とアポトーシスに着目した細胞・分子生物学的な研究を行い、GAPDH の過発現とそれに続く核移行がアポトーシスを誘発することを証明した。その際に活性化する GAPDH 遺伝子のプロモーターの同定、GAPDH による凝集体の発見から神経変性疾患との関連性を示し、GAPDH 過発現と核移行を指標にした創薬研究の方法論を提示しており、博士（薬学）の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた。