

新規 caspase 結合蛋白質 GMEB 1 の 単離・同定および機能解析

学位論文内容の要旨

Caspase はシステインプロテアーゼであり、アポトーシス実行因子として重要な役割を担っている。Caspase ファミリーの一つである caspase-2 は胎児期の各組織で発現が認められるが、とくにニューロン死が亢進している胎児期の脳での発現が顕著である。また、近年 caspase-2 はハンチントン病やアルツハイマー病などの関連も報告されている。したがってニューロンのアポトーシスや様々な病態に深く関与していることが推定されているが、詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、caspase-2 活性化調節機構の詳細を解明するために、caspase-2 結合蛋白質の単離・同定さらに機能解析を試みた。

1. Caspase-2 結合蛋白質の単離

Procaspase-2 と相互作用する蛋白質を単離するために procaspase-2 (C303S) の全長を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングを行った。その結果 16 個の陽性クローンが得られ、そのうち Ubc9 および glucocorticoid modulatory element binding protein-1 (GMEB1) を結合蛋白質として単離・同定した。Caspase-2 の GMEB1 結合部位を yeast two-hybrid system を用いて検討したところ CARD および全長との結合は認められたが、CARD を除いた p20/p10 とは結合しなかった。このことから、GMEB1 は procaspase-2 の CARD 部分と結合することが示唆された。さらに、他のサブタイプの procaspase との結合を調べたところ procaspase-8 および-9 との結合は見られたが、procaspase-1, -3, -4, -7 との結合は認められなかった。同様に procaspase-8 との結合部位を調べたところ、GMEB1 は procaspase-8 のプロドメイン中の C 末側の DED 部分と結合することが示唆された。次に、GMEB1 の caspase 結合部位を検討したところ、GMEB1 の C 末側 (AA 509-563) が結合に重要であることが示唆された。この領域は α ヘリックス構造をとることが推定されており、caspase のプロドメインである CARD および DED も α ヘリックス構造を有していることから、この領域を介して両者が結合していることが考えられた。Yeast 内で procaspase-2, -8 および-9 と GMEB1 との結合が確認されたことから、HEK293T 細胞内で caspase が GMEB1 と結合するか否かを検討した。GMEB1 を過剰発現する HEK293T 細胞を調製し、ここに procaspase-2, -8 または-9 を一過性に強制発現させ、免疫沈降反応を行いその後 Western Blotting を行った。その結果、いずれにおいても特異的結合バ

ンドが検出された。さらに、内在性 GMEB1 と procaspase との結合を免疫沈降法により確認したところ、同様の特異的バンドを検出した。以上より、GMEB1 は HEK 293 T 細胞内で procaspase-2, -8 および-9 と結合していることが明らかとなった。

2. Caspase 活性化およびアポトーシスにおける GMEB1 の機能解析

Proaspase-2 はプロドメインに CARD を有しており、この CARD 同士の結合により多量体化し、自己活性化する。GMEB1 の結合特異性から、caspase-2 活性化に影響を及ぼす可能性が示唆された。一般に、caspase が一旦活性化すると自身を含めたほとんどの内在性 caspase は次々に切断され活性化するため、caspase-2 のみの調節機構を明らかにすることは困難である。そこで FKBP と FK506 が結合する性質を利用したシステムを用いてデスシグナル非依存的に caspase-2 のみを特異的に活性化する系を構築したところ、GMEB1 は caspase-2 の活性化およびアポトーシスを抑制した。また、caspase-8 および-9 経路を活性化させる生理的なデスシグナルである Fas によるアポトーシスを GMEB1 は抑制した。このとき caspase の活性化も抑制していた。さらに、*in vitro* においても GMEB1 は caspase の活性の上昇を抑制した。一方、神経芽細胞腫である SK-N-MC 細胞に低酸素ストレスを負荷すると内在性 GMEB1 蛋白質量の減少に従い caspase-2 の活性化およびアポトーシス細胞の増加が認められた。以上より、GMEB1 はプロドメインに結合することで caspase の活性化を抑制しアポトーシスを抑制していることが示唆された。また、低酸素ストレス下では GMEB1 蛋白質量の減少が caspase の活性化およびアポトーシスを惹起している可能性が示唆された。

3. マウス局所脳虚血における GMEB1 のニューロン保護効果の検討

低酸素ストレスや脳虚血に対して様々な分子がニューロン保護効果を示すことが知られている。GMEB1 も caspase の活性化とそれに続くアポトーシスを抑制したことから、次に動物個体における GMEB1 の効果、とくに脳虚血に対するニューロン保護作用の有無を検討した。まず、Neuron-specific enolase (NSE) プロモーターを用いて、C 末に haemagglutinin (HA) タグを付加したヒト GMEB1 をニューロン特異的に発現するトランスジェニック (TG) マウスを作出した。次に、コントロールマウスおよび TG マウスの中大脳動脈(MCA)を閉塞し、局所脳虚血モデルマウスを作製した。脳梗塞巣、脳浮腫および神経症状を指標として GMEB1 のニューロン保護効果を検討したところ、いずれのパラメーターにおいても TG マウスで改善傾向（抵抗性）が認められた。したがって、GMEB1 は MCA 閉塞による局所脳虚血においてニューロン保護作用を示すことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	上 原	孝
副 査	教 授	野 村	靖 幸
副 査	教 授	横 沢	英 良
副 査	助教授	川 原	裕 之

学 位 論 文 題 名

新規 caspase 結合蛋白質 GMEB 1 の 単離・同定および機能解析

Caspase はシステインプロテアーゼであり、アポトーシス実行因子として重要な役割を担っている。Caspase ファミリーの一つである caspase-2 は胎児期の各組織で発現が認められるが、とくにニューロン死が亢進している胎児期の脳での発現が顕著である。また、近年 caspase-2 はハンチントン病やアルツハイマー病などの関連も報告されている。したがってニューロンのアポトーシスや様々な病態に深く関与していることが推定されているが、詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、caspase-2 活性化調節機構の詳細を解明するために、caspase-2 結合蛋白質の単離・同定さらに機能解析を試みた。

1. Caspase-2 結合蛋白質の単離

Procaspase-2 と相互作用する蛋白質を単離するために procaspase-2 (C303S) の全長を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングを行った。その結果 16 個の陽性クローンが得られ、そのうち Ubc9 および glucocorticoid modulatory element binding protein-1 (GMEB1) を結合蛋白質として単離・同定した。Caspase-2 の GMEB1 結合部位を yeast two-hybrid system を用いて検討したところ CARD および全長との結合は認められたが、CARD を除いた p20/p10 とは結合しなかった。このことから、GMEB1 は procaspase-2 の CARD 部分と結合することが示唆された。さらに、他のサブタイプの procaspase との結合を調べたところ procaspase-8 および-9 との結合は見られたが、procaspase-1, -3, -4, -7 との結合は認められなかった。同様に procaspase-8 との結合部位を調べたところ、GMEB1 は procaspase-8 のプロドメイン中の C 末側の DED 部分と結合することが示唆された。次に、GMEB1 の caspase 結合部位を検討したところ、GMEB1 の C 末側 (AA 509-563) が結合に重要であることが示唆された。この領域は α ヘリックス構造をとることが推定されており、caspase のプロドメインである CARD および DED も α ヘリックス構造を有していることから、この領域を介して両者が結合していることが考えられた。Yeast 内で procaspase-2,

-8 および -9 と GMEB1 との結合が確認されたことから, HEK293T 細胞内で caspase が GMEB1 と結合するかどうかを検討した. GMEB1 を過剰発現する HEK293T 細胞を調製し, ここに procaspase-2, -8 または -9 を一過性に強制発現させ, 免疫沈降反応を行いその後 Western Blotting を行った. その結果, いずれにおいても特異的結合バンドが検出された. さらに, 内在性 GMEB1 と procaspase との結合を免疫沈降法により確認したところ, 同様の特異的バンドを検出した. 以上より, GMEB1 は HEK 293T 細胞内で procaspase-2, -8 および -9 と結合していることが明らかとなった.

2. Caspase 活性化およびアポトーシスにおける GMEB1 の機能解析

Proaspase-2 はプロドメインに CARD を有しており, この CARD 同士の結合により多量体化し, 自己活性化する. GMEB1 の結合特異性から, caspase-2 活性化に影響を及ぼす可能性が示唆された. 一般に, caspase が一旦活性化すると自身を含めたほとんどの内在性 caspase は次々に切断され活性化するため, caspase-2 のみの調節機構を明らかにすることは困難である. そこで FKBP と FK506 が結合する性質を利用したシステムを用いてデスシグナル非依存的に caspase-2 のみを特異的に活性化する系を構築したところ, GMEB1 は caspase-2 の活性化およびアポトーシスを抑制した. また, caspase-8 および -9 経路を活性化させる生理的なデスシグナルである Fas によるアポトーシスを GMEB1 は抑制した. このとき caspase の活性化も抑制していた. さらに, *in vitro* においても GMEB1 は caspase の活性の上昇を抑制した. 一方, 神経芽細胞腫である SK-N-MC 細胞に低酸素ストレスを負荷すると内在性 GMEB1 蛋白質量の減少に従い caspase-2 の活性化およびアポトーシス細胞の増加が認められた. 以上より, GMEB1 はプロドメインに結合することで caspase の活性化を抑制しアポトーシスを抑制していることが示唆された. また, 低酸素ストレス下では GMEB1 蛋白質量の減少が caspase の活性化およびアポトーシスを惹起している可能性が示唆された.

3. マウス局所脳虚血における GMEB1 のニューロン保護効果の検討

低酸素ストレスや脳虚血に対して様々な分子がニューロン保護効果を示すことが知られている. GMEB1 も caspase の活性化とそれに続くアポトーシスを抑制したことから, 次に動物個体における GMEB1 の効果, とくに脳虚血に対するニューロン保護作用の有無を検討した. まず, Neuron-specific enolase (NSE) プロモーターを用いて, C 末に haemagglutinin (HA) タグを付加したヒト GMEB1 をニューロン特異的に発現するトランスジェニック (TG) マウスを作出した. 次に, コントロールマウスおよび TG マウスの中大脳動脈(MCA)を閉塞し, 局所脳虚血モデルマウスを作製した. 脳梗塞巣, 脳浮腫および神経症状を指標として GMEB1 のニューロン保護効果を検討したところ, いずれのパラメーターにおいても TG マウスで改善傾向 (抵抗性) が認められた. したがって, GMEB1 は MCA 閉塞による局所脳虚血においてニューロン保護作用を示すことが明らかになった.