



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Polyglutamine expansion disturbs the endoplasmic reticulum formation, leading to caspase-7 activation through Bax(要約版 (Digest))
Author(s)	上田, 昌史
Report No.(Doctoral Degree)	博士(再生医科学) 甲第951号
Issue Date	2014-03-19
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/49089

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 951 号

氏 名: 上 田 昌 史

Full Name Masashi Ueda

学位論文題目: ポリグルタミンは小胞体の形態形成を阻害しBax依存的にカスパーズ-7を活性化
する

Thesis Title Polyglutamine expansion disturbs the endoplasmic reticulum formation, leading
to caspase-7 activation through Bax

学位論文要約:
Summary of Thesis

ポリグルタミンタンパク質は神経細胞死を誘導し、ハンチントン病などの神経変性疾患を引き起こす。ポリグルタミンはカスパーズ (システインプロテアーゼ) を活性化することによりアポトーシスを誘導することが知られているが、その詳細な機構は不明のままである。カスパーズの活性化はBcl-2ファミリータンパク質によって制御されている。アポトーシス刺激によりBcl-2ファミリータンパク質は小胞体やミトコンドリアに局在化し、これらの膜に挿入することでカスパーズを活性化する。

本研究は、ポリグルタミンタンパク質が発現した細胞において小胞体膜が形態変化を起こすことを見出し、ポリグルタミンが引き起こすカスパーズ活性化における小胞体膜の役割を解析するものである。

【対象と方法】

1) *in vivo*におけるポリグルタミンの小胞体膜形態への影響を解析するため、ハンチントン病モデルマウス (R6/2: HD exon 1トランスジェニックマウス) を用いた。免疫染色法、電子顕微鏡観察により小胞体膜形態を検討し、カスパーズ活性化も解析した。

2) 培養細胞株 (HEK293T) におけるポリグルタミンタンパク質と小胞体膜の形態を解析するため、ポリグルタミン-GFP融合タンパク質をコードする遺伝子 (polyQ82-GFP) 及び小胞体膜タンパク質cb5のmRFP融合タンパク質をコードする遺伝子 (mRFP-cb5) を用いて、共局在を共焦点顕微鏡及び電子顕微鏡の組み合わせにより解析した。更にタイムラプスによりHEK293T細胞での小胞体膜の形態変化とポリグルタミン凝集体形成を経時的に観察した。

3) アポトーシス促進型Bcl-2ファミリータンパク質であるBax/Bakのダブルノックアウト細胞とpolyQ82-GFPを用いて、ポリグルタミンによる小胞体膜形態変化へのBax/Bakの関与と、カスパーズ-7活性化への影響を検討した。

4) HEK293細胞株に安定的にポリグルタミンを発現させるため、Tet-Offシステムを用いてpolyQ82-GFP発現誘導細胞株を樹立した。細胞死機構を解析するため、小胞体膜分画を超遠心分離で抽出し、アルカリ処理によってBaxの小胞体膜への挿入を検討した。

5) ポリグルタミンが小胞体膜に局在するBcl-2ファミリータンパク質を介してカスパーズ-7を活性化する可能性が考えられたため、小胞体局在型Bax (ER-Bax) 及び小胞体局在型Bcl-xL (アポトーシス抑制型, ER-Bcl-xL) を作製し遺伝子導入してカスパーズ-7の活性化を解析した。

【結果】

1) 9週齢のモデルマウス脳切片で小胞体膜が形態変化を起こし、ポリグルタミン凝集体周辺での蓄積が観察された。また小胞体膜に連続する核膜の形態変化も見られ、週齢に伴い増悪していた。また13週齢のモデルマウス脳内でカスパーズ-7が活性化していた。

2) モデルマウス脳切片と同様、ポリグルタミンが発現しているHEK293T細胞においても小胞体膜は形態変化を起こし、polyQ82-GFPとmRFP-cb5が一部共局在していた。mRFP-cb5の凝集はポリグルタミンが凝集するよりも早い段階から始まっていた。またポリグルタミン凝集前のmRFP-cb5凝集はコンゴアレッド (ポリグルタミンオリゴマー化阻害剤) によって抑制された。

3) Bax/Bakダブルノックアウト細胞ではポリグルタミン発現によるカスパーズ-7の活性化が抑制されていた。しかしポリグルタミン凝集体周辺での小胞体膜の形態変化は観察された。

4) ポリグルタミン発現誘導によって小胞体膜分画におけるBaxの挿入が増加した。

5) polyQ82-GFPと同様にER-Baxもカスパーズ-7の活性化を引き起こした。また、これらのカスパーズ

ース-7の活性化はER-Bcl-xLの発現によって抑制された。

【考察】

小胞体膜の形態変化はハンチントン病モデルマウスで観察され、病態の進行に伴い形態変化の増悪が見られた事から、ポリグルタミンによる細胞死機構への関与が示唆された。ポリグルタミン凝集体の周囲において小胞体膜が蓄積しており、Bax/Bakダブルノックアウト細胞でも小胞体膜の形態変化が観察された事から、ポリグルタミンによる小胞体膜の形態変化はBax/Bak活性化の上流に位置すると考えられる。ポリグルタミンの凝集体形成以前から小胞体膜が蓄積し、コンゴレッドにより形態変化が抑制された事から、小胞体膜の形態変化はポリグルタミンオリゴマーによるものと考えられる。

polyQ82-GFP発現誘導細胞株によって、Baxの小胞体膜への挿入増加が明らかとなり、小胞体膜局在型Baxによってもカスパーズ-7活性化が誘導された。これらの結果は、小胞体膜がポリグルタミンによる細胞死機構においてカスパーズ-7活性化のシグナル発信部位である可能性を示唆している。小胞体ストレスによってBaxが小胞体膜でコンフォメーション変化しオリゴマー化することが知られているので、ポリグルタミンによって小胞体膜へ挿入したBaxがこれら活性化を示すのかを今後検討していく必要がある。

【結論】

ポリグルタミンは小胞体膜の形態変化とBaxの膜内への挿入を引き起こし、カスパーズ-7を活性化することにより細胞死を誘導する。

Biochemical and Biophysical Research Communications, 443, 1232-1238 (2014).