

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 老化にともない生じる神経細胞死を抑制する遺伝子

### 2. 研究者氏名 中野 裕康

グループメンバー 駒澤 (左近) 幸子 (研究期間 H12.11.1. ~ H15.9.30.)

### 3. 研究の狙い:

TNF により誘導される細胞死の分子メカニズムおよびそれを抑制する遺伝子を同定することにより、最終的には老化にともない出現してくる神経細胞死や活性酸素の蓄積を抑制する遺伝子の同定を目指した。

### 4. 研究結果:

#### (1) NF- $\kappa$ B による JNK 活性化の抑制のメカニズム

最近 NF- $\kappa$ B の活性化が障害された細胞では、通常では一過性におこる JNK の活性化が遷延化しており NF- $\kappa$ B の新たな細胞死抑制のメカニズムとして JNK の活性化を抑制することが明らかにされた。しかし、その分子メカニズムは不明であった。我々は TNF レセプターの下流に存在するアダプター分子である traf2<sup>-/-</sup>traf5<sup>-/-</sup>(DKO)マウスを作製し、そのマウス由来胎児線維芽細胞 (MEF) の解析から TNF による JNK の活性化は TRAF 依存性であることを明らかにしていた。そこでまず、遷延化する JNK の活性化が DKO MEF でも認められるかを検討した。その結果予想外なことに、TNF 刺激後早期の JNK の活性化は障害されているにもかかわらず、刺激後 60 分後より JNK の活性化が認められ、120 分後にはピークとなり、以後活性化が遷延化することが明らかとなった。種々のインヒビターを用いた実験や細胞内活性酸素(ROS)の蓄積を検討した結果、通常の細胞で見られる TNF 刺激による MAPK の早期で一過性の活性化は TRAF 依存性であり、NF- $\kappa$ B の活性化の障害された細胞において見られる TNF 刺激後遅れて出現し、遷延化する MAPK の活性化は ROS 依存性であることが初めて明らかとなった。さらに DKO MEF を TNF 刺激した時に認められる ROS 蓄積のメカニズムを解析した結果、TNF により野性型と比較して、細胞内の主な抗酸化分子である還元型グルタチオンや NADPH のレベルが減少することが明らかとなった。そこで、そのメカニズムを明らかにするために、野性型および DKO MEF を用い、TNF 刺激前後で発現が誘導される遺伝子群を cDNA マイクロアレイを用いて検討した。その結果、野性型では TNF 刺激後に抗酸化分子の発現誘導が認められ、さらにこれらの遺伝子群の発現誘導は DKO MEF では野性型に比較し、低下していることも明らかとなった。以上より NF- $\kappa$ B の細胞死抑制の新しい機能として、NF- $\kappa$ B は一群の抗酸化分子の発現誘導を介して ROS の蓄積を抑制していることが明らかとなった。

#### (2) 新規転写活性化因子 BSAC の同定

DKO MEF は TNF 刺激により細胞死が誘導されることより、この細胞にレトロウイルスベクターで作製した cDNA ライブラリーを導入し、TNF 存在下で培養することにより生存してくるクローンより遺伝子を回収し、BSAC (Basic, SAP, and Coiled-coil domain) と命名した新規の転写活性化因子を同定した。BSAC は主に核内に存在することから BSAC の転写活性化能の有無を、酵母の GAL4 融合タンパクとして発現させ、GAL4 依存性の転写活性を検討したところ、BSAC の C 末に存在するプロリンに富む領域に強い転写活性が存在することが明らかとなった。次に BSAC の標的配列を検討した結果 BSAC は CArG box を有するプロモーターを強力に活性化することが明らかとなった。一方 BSAC の細胞死抑制効果およびそのメカニズムについて検討した結果、BSAC は確かに TNF により誘導される細胞死を不完全ながらも抑制すること、およびその抑制のメカニズムとしては caspase 3 や caspase 8 の活性化を抑制する結果であることが明らかとなった。また種々の BSAC の N 末および C 末の欠失変異体を用いた実験の結果、BSAC の転写活性化能と細胞死抑制効果は非常によく相関することから、BSAC は何らかの抗アポトーシス遺伝子の発現上昇を介

して細胞死抑制効果を発揮している可能性が示唆された。一方まったく独立した二つのグループにより t(1,22)転座により生じる急性巨核芽球性白血病で生じる融合遺伝子の片割れが MAL/MKL1 と命名されたヒトの BSAC ホモログであることが明らかにされた。このことは、我々の明らかにした BSAC の有する抗アポトーシス作用や強い転写活性化能が白血病の発症に深く関与していることを示している。現在我々は BSAC ノックアウトマウスの作製に成功しており、今後このマウスを用い BSAC の生理的な役割を明らかにしていきたい。

#### 5. 自己評価 :

細胞死抑制遺伝子を同定するための機能的なスクリーニングにより、NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される遺伝子を同定するねらいであったが、我々の同定したものは白血病の発症に深く関わっていることがその後明らかにされた新規転写因子であった。この予想外の発見は、今後この遺伝子のノックアウトマウスの解析や白血病発病のメカニズムを解析することにより、発展させていきたいと思う。一方 NF- $\kappa$ B による JNK の活性化の抑制のメカニズムを解析することにより、遷延化する MAPK の活性化が TNF により誘導される ROS の蓄積によっていることを明らかにし、NF- $\kappa$ B の新たな機能として、抗酸化分子の発現上昇を介して ROS の蓄積を抑制することを明らかにした。ただ残念なことに NF- $\kappa$ B の標的遺伝子を完全に特定できなかったことに不満が残り、この点については今後明らかにしていきたいと思う。

#### 6. 研究総括の見解 :

TNF 因子を中心に細胞死機構の解明に迫ろうと野心的な挑戦を続けている。途中テーマの一部変更もあったが、着実な歩みを続けてきた。但し、発表論文の数はやや少ない。これまでに得ている成果の質は中程度か。更なる奮起を望みたい。

#### 7. 主な論文等 :

1. Tada, K., T. Okazaki, S. Sakon, T. Kobarai, K. Kurosawa, S. Yamaoka, H. Hashimoto, T.W. Mak, H. Yagita, K. Okumura, W.C. Yeh, and H. Nakano. 2001. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF- $\kappa$ B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276:36530-36534.
2. Honda, K., H. Nakano, H. Yoshida, S. Nishikawa, P. Rennert, K. Ikuta, M. Tamechika, K. Yamaguchi, T. Fukumoto, T. Chiba, and S.I. Nishikawa. 2001. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* 193:621-630.
3. Sasazuki, T., T. Sawada, S. Sakon, T. Kitamura, T. Kishi, T. Okazaki, M. Katano, M. Tanaka, M. Watanabe, H. Yagita, K. Okumura, and H. Nakano. 2002. Identification of a novel transcriptional activator, BSAC, by a functional cloning to inhibit tumor necrosis factor-induced cell death. *J Biol Chem* 277:28853-28860.
4. Sakon, S., X. Xue, M. Takekawa, T. Sasazuki, T. Okazaki, Y. Kojima, J.H. Piao, H. Yagita, K. Okumura, T. Doi, and H. Nakano. 2003. NF- $\kappa$ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *Embo J* 22:3898-3909.
5. Hur, G.M., J. Lewis, Q. Yang, Y. Lin, H. Nakano, S. Nedospasov, and Z.G. Liu. 2003. The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF- $\kappa$ B activation. *Genes Dev* 17:873-882.

#### 受賞

1. Young Investigators' Grants Award (Human Frontier Science Program) "Signal dependent regulation of NF- $\kappa$ B activity" (2001年3月)

招待講演 国内 4 件、海外 1 件