

タンパク質中の D-アミノ酸増加による立体構造変化により誘発される小胞体ストレスに注目した新規老化機序の解明

慶應義塾大学 医学部 解剖学教室
笹部 潤平

【序論】

神経変性疾患の多くは中年発症であり、加齢性変化が疾患の発症に重要であると考えられてきた。本研究では、加齢性変化として、D-アミノ酸がタンパク質合成に混入することに着目し、細胞ストレスを引き起こし細胞死へと導くのではないかと考えた。D-アミノ酸がタンパク質中に翻訳されるのを生理的に阻止する分子として、D-tyrosine-tRNA deacylase (DTD) が知られている。DTD は D-アミノ酸が tRNA に結合するのを非アシル化することによって、タンパク質翻訳合成には D-アミノ酸は通常状態では排除されることが知られている。そこで、DTD の機能または発現の加齢性変化および、それに伴う細胞ストレスを評価した。

【方法】

動物

C57BL/6Jc1 マウスを株式会社クレアから購入して使用した。動物は、specific pathogen free の環境下で飼育し、実験は慶應義塾大学医学部動物実験委員会による承認を得た。

細胞、遺伝子導入

NSC34 細胞を使用した。NSC34 細胞は、マウス脊髄前角細胞とマウス神経芽細胞腫のハイブリドームである。37℃で 10%血清を含む DMEM にて培養した。遺伝子導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、製造元のプロトコールに沿って行った。

抗体

マウス DTD56-70 番目のペプチドを抗原として、ウサギポリクローナル抗体を作成した（蛋白精製工業）。M2 抗体 (anti-FLAG 抗体) は、sigma-aldrich から購入した。GAPDH 抗体は、cell signaling technology から購入した。

クローニング、プラスミド、siRNA

マウスおよびヒト cDNA library から PCR にて mDTD および hDTD の cDNA を増幅し、pCMV-FLAG ベクター (Sigma-Aldrich) にクローニングした。Pfu turbo mutagenesis kit (Stratagene) を用いて、T81A 変異を導入し、DTD 活性を喪失した mutant (T81ADTD) を作製した。mDTD および hDTD に対する siRNA は、Enhanced siDirect 社のホームページにて設計した。

【結果】

1. DTD のマウスにおける発現と経時的変化

マウスにおける DTD の臓器別発現を DTD 抗体を用いて検討したところ、中枢神経系で多く発現していることが確認された (図 1)。また、経時的変化を検討したところ、DTD は成長とともに増加し、

加齢とともに減少することが明らかとなった (図2)。

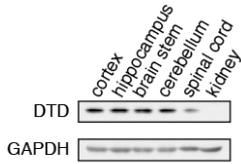


図1

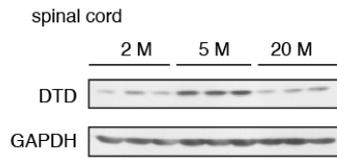


図2

2. siRNA oligo の Lipofection による DTD のノックダウン効率の確認

mDTD および hDTD に対する siRNA を作製し、ネガティブコントロールとして配列をランダムに並べ替えた siRNA および非特異的な siRNA を pCMV-mDTD-FLAG および pCMV-hDTD-FLAG と共に Lipofectamine2000 を用いてそれぞれ遺伝子導入したところ、特異的にほぼ 100% の効率でノックダウンできることを確認した (図3)。

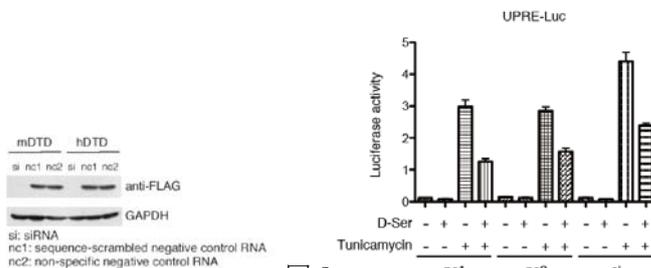


図3

図4

3. DTD ノックダウンによる Unfolded protein response (UPR) への影響

DTD とタンパク質合成との関係を明らかにするため、NSC34 細胞に mouseDTD に対する siRNA および UPRE を含む luciferase のレポーター遺伝子を導入し、40 時間後に tunicamycin を 8 時間処理して Dual luciferase assay を行った。コントロールの siRNA (nc1, nc2) と比較して優位に DTD に対する siRNA で UPRE に結合する転写因子の活性は増強し、驚くべきことに D-セリン処理によって減弱した (図4)。

4. D-セリンと UPR 減弱との関連性の検討

当初、D-セリンによって UPR が増強することが予想されていたため、D-セリンが細胞内に取り込まれていないため何らかの原因で UPR が減弱したのではないかと考えた。細胞内に D-セリン合成酵素のセリンラセマーゼ (SRR) を発現させ、細胞外から L-セリンを処理して細胞内で D-セリン合成を促した条件下で、UPRE の Dual luciferase assay を行った。この結果、L-セリン処理によっても UPR が減弱することが明らかとなり、SRR 発現群ではさらに UPR が減弱したため、細胞内の D-/L-セリンによって UPR が減弱することが明らかとなった (図5)。

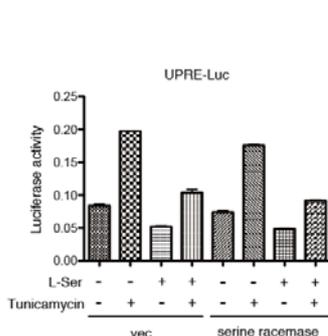


図5

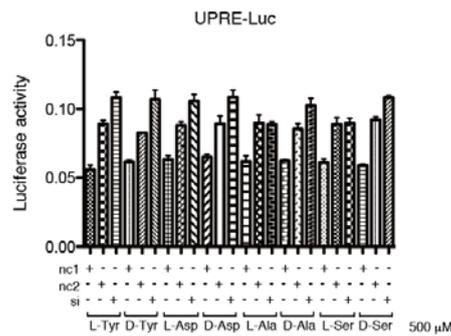


図6

5. D-/L-アミノ酸とUPRとの関連性の検討

DTDの deacylase 活性はセリン以外にもアスパラギン酸やアラニン、チロシンなどにも示す。生体内には D-アラニン、D-アスパラギン酸が比較的豊富に認められるため、これらのアミノ酸と DTD との関連性を次に検討した。DTD ノックダウン条件下において、D-/L-チロシン、アスパラギン酸、アラニン、セリンをそれぞれ 24 時間処理し、UPRE の Dual luciferase assay を行った。アスパラギン酸、チロシンは D-/L-体が UPR に及ぼす影響は同程度であったが、アラニン、セリンはそれぞれ L 体が D 体よりも優位に UPR を抑制することが明らかになった (図 6)。

6. mDTD 高発現による小胞体ストレスへの影響の評価

1. で mDTD 発現を消失させた場合に小胞体ストレスが増強することが明らかになったため、mDTD の発現を上昇させた場合、細胞にかかるストレスが減弱するか否かを検討した。NSC34 細胞に C 末端 FLAG-tag を有した mDTD またはその mutant T81A DTD をそれぞれ遺伝子導入し、40 時間後に tunicamycin を 8 時間処理し、UPRE の Dual luciferase assay を行った。結果、mDTD の過剰発現によって、tunicamycin 誘導性の UPR が優位に減弱し、T81A-DTD も同様に UPR を減弱させた (図 7)。T81A-DTD は deacylase 活性を持たない変異であるにもかかわらず、wild type DTD と同様に UPR を減弱させたことから、DTD と UPR の関連は deacylase 活性とは無関係であることが示唆された。また、この現象は N 末端 tag の DTD でも同様に認められたことから (data not shown)、tag による影響ではないと考えられる。

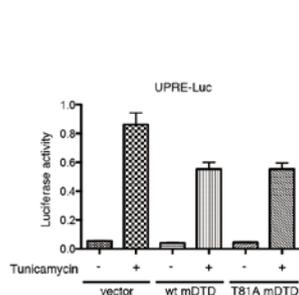


図 7

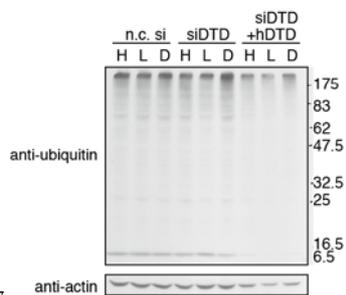


図 8

7. DTD とユビキチン・プロテアソーム系との関連性の検討

異常タンパク質の分解を担うもう一つの系として、ユビキチン・プロテアソーム系と D-アミノ酸含有タンパク質合成との関連を検討した。NSC34 細胞で DTD をノックダウンした細胞に D-/L-セリンを処理し、ユビキチンに対する抗体でウェスタンブロッティングを行ったところ、DTD ノックダウン下で D-セリンを処理した群でユビキチン化が増強していた (図 8)。このことから D-アミノ酸含有タンパク質は、ユビキチン・プロテアソーム系によって主に処理されているのではないかと考えられる。

【まとめ】

DTD は中枢神経系に多量に発現し、加齢によって減少することが明らかとなった。DTD は、小胞体ストレスを減弱させることが一連の研究から明らかとなったが、この作用は D-アミノ酸と tRNA との結合を解除する deacylase 活性とは関係しないことが示唆された。従って、DTD は独立して小胞体ストレスを軽減する作用があると考えられる。D-アミノ酸によるタンパク質合成への負荷は小胞体ストレスではなく、タンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系へとかかっているこ

とが示唆された。今後、本研究で明らかとなった DTD の機能から、加齢性神経疾患との関係性について研究を発展させたい。

【参考文献】

- Kemp M, Bae B, Yu JP, Ghosh M, Leffak M, Nair SK. *J Biol Chem*. 2007 Apr 6;282(14):10441-8.
- Wydau S, van der Rest G, Aubard C, Plateau P, Blanquet S. *J Biol Chem*. 2009 May 22;284(21):14096-104.
- Zheng G, Liu W, Gong Y, Yang H, Yin B, Zhu J, Xie Y, Peng X, Qiang B, Yuan J. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):85-94.