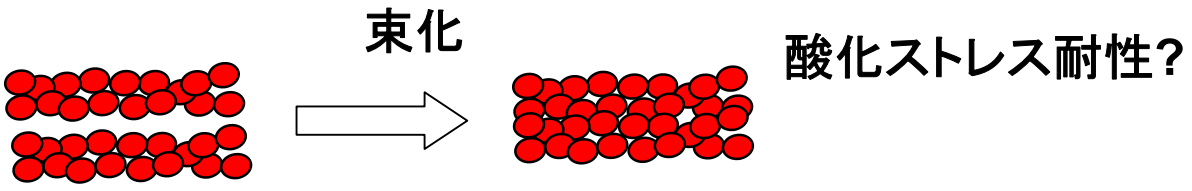
150　ストレスから細胞骨格を保護する新規シャペロンの解析	篠原　恭介

【目的】今日、我が国は人口の超高齢化が進んでおり、高齢者が QOL を損なう事なく健康で快適な生活を維持する技術が求められている。多くの高齢者が悩まされる疾患の代表例として、ガン・血管障害・心臓疾患などがある。これらの疾患の主な原因の一つとして、加齢に伴い活性酸素（Reactive oxygen species：ROS）が過剰に細胞内で産生され細胞老化が引き起こされた結果発症するという機構が提唱されている。最近の研究から高いレベルの ROS は細胞骨格であるアクチンを不安定化し細胞老化に関与する事が報告されている。ROS が豊富に存在する細胞内環境下ではモノオキシゲナーゼ MICAL がアクチンのメチオニン残基とシステイン残基を酸化し、その残基を標的としてアクチン切断因子 Cofilin が攻撃する事でアクチンフィラメントが不安定化する事が報告されている。本研究では、最近同定した新規分子 Dpcd の解析を通して、細胞が酸化ストレスからアクチンを保護し細胞老化を防ぐ仕組みを明らかにする事を目指した。

【方法】1. 人工的に誘導した酸化ストレスに対する耐性の評価：野生型マウスと *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスそれぞれの気管を単離した後、人工的に酸化ストレスを誘導した。細胞内、特に Dpcd が発現する繊毛細胞内におけるアクチンフィラメントの量と分布に注目して酸化ストレスの影響評価を行った。2. マウス生体内における Dpcd 蛋白の結合因子の探索：Dpcd が酸化ストレスからアクチンフィラメントを保護するしくみを明らかにするためにマウス組織を用いて結合因子の探索を行った。3. 食事を通じた抗酸化物質の投与と繊毛病の症状への影響：繊毛病と酸化ストレスの個体レベルでのつながりを明らかにするため、抗酸化物質を含むエサの摂取に対する影響を野生型マウスと *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスで比較・検証を行った。

【結果】1. 人工的に誘導した酸化ストレスに対する耐性の評価：野生型マウスに比べて *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスの気管繊毛細胞では酸化ストレスによりアクチンフィラメントの量が減少する事が観察された。2. マウス生体内における Dpcd 蛋白の結合因子の探索：RuvBL2 など分子シャペロンが Dpcd と相互作用する因子として同定されたが、還元酵素のような抗酸化機能に直接的に結びつく因子は見つからなかった。3. 食事を通じた抗酸化物質の投与と繊毛病の症状への影響：繊毛病と酸化ストレスの個体レベルでのつながりを明らかにするため、抗酸化物質を含むエサの摂取に対する影響を野生型マウスと *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスで比較・検証を行った。

アクチンフィラメントの束化とストレス耐性



150. ストレスから細胞骨格を保護する新規シャペロンの解析

篠原　恭介

東京農工大学 工学部 生命工学科 生命環境工学講座

Key words：アクチン，酸化ストレス，繊毛細胞

緒　言

今日、我が国は人口の超高齢化が進んでおり、高齢者が QOL を損なう事なく健康で快適な生活を維持する技術が求められている。多くの高齢者が悩まされる疾患の代表例として、ガン・血管障害・心臓疾患などがある。これらの疾患の主な原因の一つとして、加齢に伴い活性酸素（Reactive oxygen species：ROS）が過剰に細胞内で産生され細胞死や細胞老化が引き起こされた結果発症するという機構がこれまでに提唱されている。線虫やハエについては酸化ストレスの低減による寿命の延長が報告されている一方で、ヒトに最も近いモデル生物であるマウスでは抗酸化因子の発現レベルと寿命の延伸との間には相関性はないという報告があり未だ議論が続いている。特定の疾患に酸化ストレスが直接的に関与しているかどうかを検証し、また細胞が活性酸素のもたらすストレスに耐える原理を解明する事は基礎科学だけでなく医学的に大変重要な事である。

最近の研究から高いレベルの ROS は細胞骨格であるアクチンを不安定化し細胞老化に関与する事が報告されている。ROS が豊富に存在する細胞内環境下ではモノオキシゲナーゼ Mical がアクチンのメチオニン残基とシステイン残基を酸化し、その残基を標的としてアクチン切断因子 Cofilin が攻撃する事でアクチンフィラメントが脱重合する事が報告されている［1，2］。アクチンの不安定化は細胞老化のシグナル経路を活性化するため［3］、細胞にはアクチンを酸化ストレスから守るしくみが存在すると考えられてきたが、その分子実体は未解明であった。本研究では、最近同定した新規分子 Dpcd の解析を通して、細胞が酸化ストレスからアクチンを保護し細胞老化を防ぐ仕組みを明らかにする。

過去の研究において、研究代表者はマウス胚の左右非対称性の獲得に異常を示す Dpcd 変異マウス胚 （Deleted in Primary Ciliary Dyskinesia）において繊毛の運動性が低下する事を報告した［4］。しかしながら、*Dpcd* 遺伝子の機能の詳細については不明なままであった。最近 *Dpcd* 遺伝子の発現パターンを調べた所、マウス卵母細胞とマウス胚ノード細胞・気管・脳室・卵管・精巣など運動する繊毛を持つ組織において発現し、マウス個体の一生にわたって発現していた。さらに *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスにおける表現型を解析したところ繊毛細胞のアピカル面内における F アクチンの集積が消失するという異常を観察した。また同時に *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスの気管繊毛細胞では核とゴルジ体が断片化する典型的な細胞老化の表現型が観察された（以下、全て未発表データ）。Dpcd 蛋白は特徴的な機能ドメインやモチーフを持たない。そこでアクチンに対する機能の有無を検証するため、応募者は大腸菌によるリコンビナント Dpcd 蛋白の精製を行い得られた蛋白を重合中のアクチン溶液中に添加した。共焦点蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察した結果、Dpcd 蛋白はアクチンと結合し、アクチンが互いに密接した束を試験管内に形成するという観察結果を得た。 また生化学的な実験と Dcpd は非還元的環境下で分子間のジスルフィド結合により 2 量体を形成しアクチンに結合・束化する事が明らかとなった。一般に動物細胞の細胞質は還元的環境であると考えられている。Dpcd 蛋白が細胞のどこで機能しているかを検証するために Dpcd と蛍光蛋白質 Venus の融合蛋白質 Dpcd::Venus を発現する遺伝子組み換えマウスを作製し細胞内の局在を観察した。その結果、Dpcd 蛋白は気管繊毛細胞において細胞表面アピカル膜直下に集積するアクチンに沿って共局在する事が明らかとなった。ノックアウトマウスの表現型と併せて考えると Dpcd は繊毛細胞表面のアクチンを束ねている事が示唆されるが、分子間のジスルフィド結合が形成されるためにはシステインのチオール基が酸化される必要がある。このため繊毛細胞内の環境は Dpcd 蛋白が活性を維持できる非還元的環境である可能性が予想された。この事を検証するため活性酸素と酸化脂質膜に反応する蛍光プローブを利用してマウス気管組織の酸化ストレス状態の可視化を行った所、運動繊毛細胞はその他の細胞に比べて恒常的に高い酸化ストレス

を背負っている事が判明した。運動繊毛はモーター分子ダイニンを駆動源とするため ATP を常に消費し続ける。このため繊毛の根元には大量のミトコンドリアが集積しているが、これらが多量の活性酸素種（ROS）の産生源になっている可能性が考えられる。研究開始前の予備データ：1. 繊毛細胞内は恒常的に酸化的な環境である。2. Dpcd がストレスから細胞を守る Small Heat Shock Protein と 3 次構造が非常に似ている。3. Dpcd は酸化的環境下で 2 量体を形成しアクチンに対する束化活性を発現する。を総合して考えると、『Dpcd は、恒常的に高いレベルの酸化ストレスを背負っている卵母細胞と運動繊毛細胞においてアクチンを密接に束化させる事で切断酵素の標的となるアミノ酸残基を細胞質表面から隠し、酸化ストレスが引き起こすアクチンフィラメントの不安定化から保護し細胞老化を防ぐ新規の分子シャペロンである』という可能性があると考えた。そこで本研究課題では上記の仮説に基づいて Dpcd の機能解析を行った。

方　法

1.　人工的に誘導した酸化ストレスに対する耐性の評価

まず初めに予備実験で得られていた繊毛細胞において ROS レベルが高い現象の再現性の確認を行った。活性酸素に反応し蛍光を発するプローブ（Click iT：Invitrogen）を固定したマウス気管に処理した後、繊毛マーカであるアセチル化チューブリンとの共染色を行った。その結果、マウス気管の繊毛細胞では他の細胞に比べて ROS レベルが高い事が蛍光の強さから示唆された（図 1）。次に、マウス気管に対して過酸化水素水処理により酸化ストレスを誘導した。Dpcd 蛋白の標的となる F アクチンをファロイジンで染色し酸化ストレスに対する耐性を検証した。野生型マウスでは、コントロール培養・50 mM の過酸化水素水存在下での培養、いずれの場合においても気管繊毛細胞内の F アクチンの分布に違いはなく細胞表面直下アピカル面に集中した局在が観察された。一方、*Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスでは、過酸化水素水存在下の培養において F アクチンの局在が消失する事が観察された（図 2）。この事から、Dpcd は繊毛細胞内の F アクチンの酸化ストレス耐性に関与している事が示唆された。

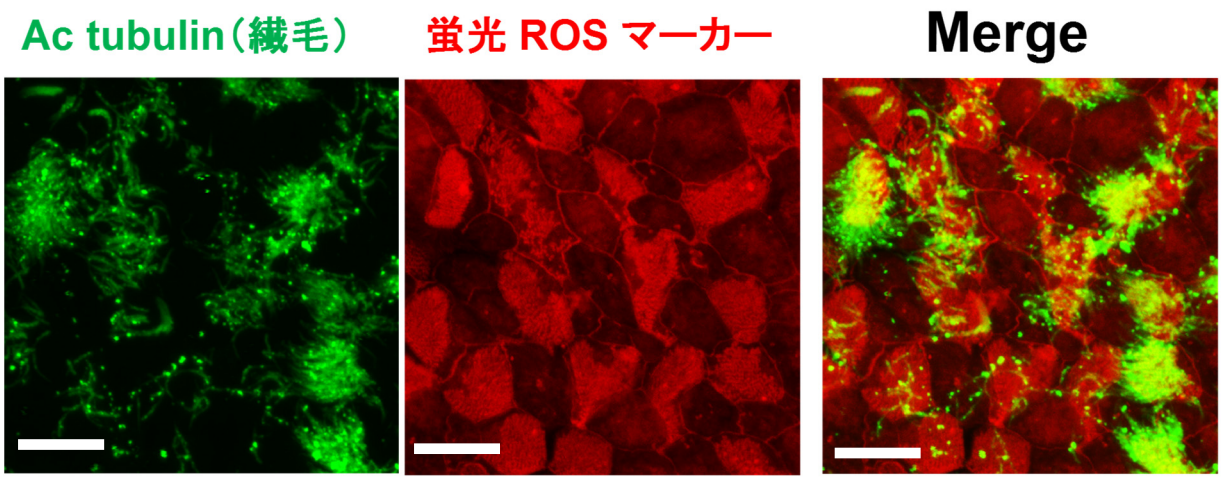


図 1. マウス気管繊毛細胞と ROS レベル

（左）繊毛マーカであるアセチル化チューブリン染色（中央）蛍光 ROS マーカ Click iT。

（右）重ねあわせた画像。繊毛細胞では他の細胞に比べて ROS のレベルが高い事が示唆される。

スケールバーは 10 μm。

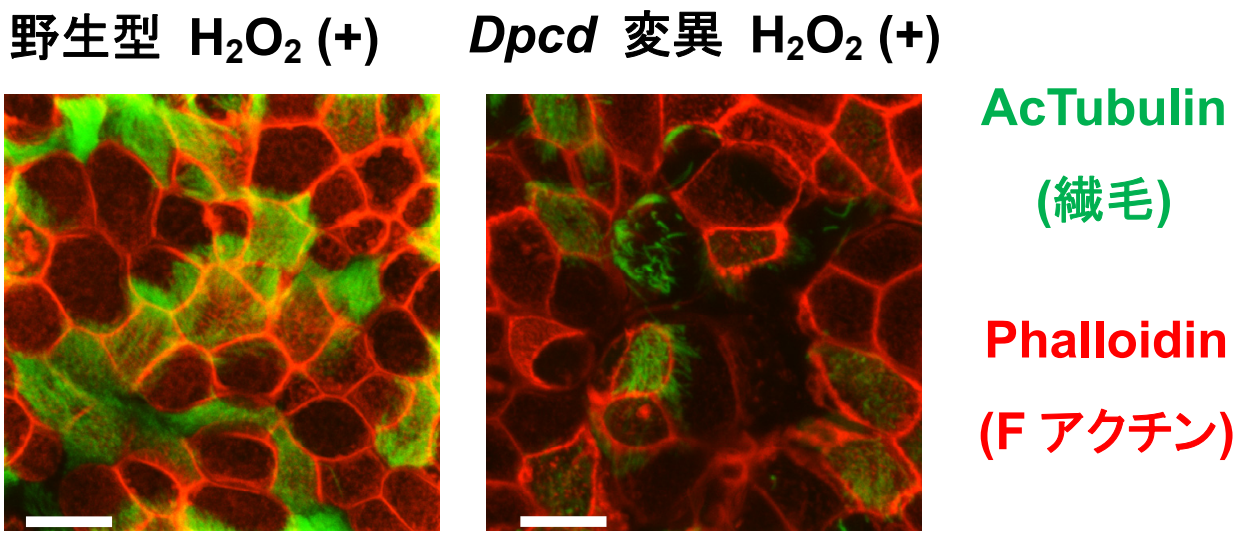


図 2. マウス気管繊毛細胞の酸化ストレス耐性

(左) 野生型マウスの気管に過酸化水素水を処理した場合。

(右) *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスの気管に過酸化水素水を処理した場合。Dpcd 遺伝子ノックアウトマウスでは気管繊毛細胞内の F アクチンが減少しており酸化ストレスに対して脆弱になる事が示唆される。スケールバーは 10 μ m。

2. マウス生体内における Dpcd 蛋白の相互作用因子の探索

研究開始前において、Dpcd が形成する密接したアクチン束がアクチンフィラメント表面のシステインの酸化を防ぎ、酸化ストレスによりフィラメントが不安定化する事を防ぐという仮説を提案した。この仮説を検証するためアクチンを酸化するモノオキシゲナーゼ MICAL、Cofilin、Dpcd、F アクチンを用いて試験管内で仮説の検証を行ったが、Dpcd 存在の有無によるアクチンの不安定化の違いは見られなかった。そこで別の仮説に切り替え研究を進めた。具体的には、『Dpcd と相互作用する細胞内の未知の還元酵素が存在し、この Dpcd はこの還元酵素とアクチンフィラメントを架橋する事で F アクチンの酸化を防ぐ』という仮説である。そこで Dpcd と相互作用する因子の探索を行った。マウス気管を解剖し、Dpcd 抗体を架橋した磁気ビーズにより Dpcd を含む複合体成分を抽出し銀染色と LC-MS により相互作用する蛋白質の同定を行った。同様の実験を Dpcd と Venus の融合蛋白 Dpcd::Venus を発現する遺伝子組み換えマウスと GFP 抗体を用いて行い 2 つの実験で共通して同定された相互作用因子を探索した。その結果、分子シャペロン R2TP 複合体の主要因子である RuvBL1、RuvBL2 が相互作用因子として同定されたが当初期待したような細胞内の活性酸素種を還元する酵素は相互作用する蛋白質データの中には見つからなかった。

3. 食事を通じた抗酸化物質の投与と繊毛病の症状への影響

食事を通じた生活環境による酸化ストレスの軽減が運動繊毛不全症、とくに運動繊毛細胞内の酸化ストレスの軽減と症状の緩和に有効かを検証した。具体的には通常マウスの飼育に用いているエサに加えて、特注したビタミン E を豊富に含むエサを *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスに与え表現型への影響を調べた。具体的には以下の 2 つの異なる方法によりエサの投与を行った。

(1) *Dpcd* 欠損マウスを交配し雌マウスの膣栓を確認後、母親となる雌マウスに抗酸化物質の豊富なエサを与える。出産後も授乳期間中は抗酸化物質の豊富なエサを継続して与え、離乳後には仔マウスには通常のエサを与える。これにより母親から個体が受ける抗酸化成分による繊毛病の症状への効果を観察する。

(2) *Dpcd* 欠損マウスを交配し雌マウスの膣栓を確認後、母親となる雌マウスに通常エサを与える。出産後も授乳期間中は通常のエサを継続して与え、離乳後に仔マウスには抗酸化物質を豊富に含むエサを与える。以上の実験により抗酸化物質摂取による繊毛病症状の軽減の可能性を明らかにし、科学的根拠に基づいた繊毛病のための食事療法の提案に繋げる。

その結果、1. 母親からの母性因子としてのみ仔マウスが抗酸化物質を摂取した場合と 2. 離乳後も引き続き抗酸化物質を仔マウスが摂取した場合、両方のケースにおいて繊毛運動不全症の症状の軽減が認められた。通常、*Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスでは、生後 40 日までに 90%の個体が水頭症により死亡する（生存は 10 個体中の 1 個体)。一方、②継続的に抗酸化物質を摂取した場合は *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスにおいて 40 日を超えて生存する個体が得られ再現性も確認された（生存は 10 個体中の 4 個体)。また、①母親からの母性因子としてのみ抗酸化物質を摂取した場合においても、40 日を超えて生存する個体が得られた（生存は 10 個体中の 3 個体)。抗酸化物質の摂取が繊毛運動不全症の表現型を有意に軽減したかについてはさらに観察する個体の例数を増やす必要があるが、今の時点では効果のある可能性が示唆される。

考　察

上記の項目 1 と項目 3 の結果から *Dpcd* 遺伝子がマウス繊毛細胞におけるアクチンフィラメントの酸化ストレスに対する耐性に関与する事が示唆された。その分子機構の詳細について項目 2 で検討したが、これまでに検証したいずれの仮説についても否定的な実験データが出ており現在までにモデルを提案する段階までには至っていない。今後、Dpcd が単独で機能を持つという仮説に立ち戻り徹底的に分子解剖を進める事で詳しい分子機構を明らかにしたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である椙山女学園大学の本山昇博士と理化学研究所生命機能科学研究センターの浜田博司博士から *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスを提供いただいた。ここに謝意を表する。

文　献

1) Grintsevich EE, Yesilyurt HG, Rich SK, Hung RJ, Terman JR, Reisler E. F-actin dismantling through a redox-driven synergy between Mical and cofilin. Nat Cell Biol. 2016 Aug;18(8):876-85. doi: 10.1038/ncb3390. Epub 2016 Jul 25.
2) Wilson C, González-Billault C. Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. Front Cell Neurosci. 2015 Sep 30;9:381. doi: 10.3389/fncel.2015.00381. eCollection
3) Gourlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jul;6(7):583-9. doi: 10.1038/nrm1682
4) Shinohara K, Kawasumi A, Takamatsu A, Yoshiba S, Botilde Y, Motoyama N, Reith W, Durand B, Shiratori H, Hamada H. Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. Nat Commun. 2012 Jan 10;3:622. doi: 10.1038/ncomms1624.