

ジーンディスカバリーからファンクションへ

アルツハイマー病関連遺伝子を追う

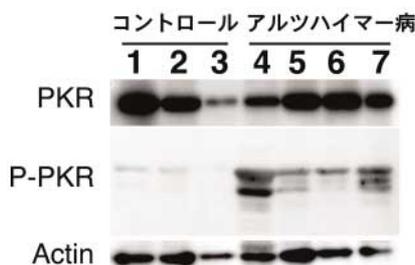
様々な生物のDNA配列情報が解読・整備されている現在、この膨大な情報の中から効率よく目的とする有用遺伝子群の同定・解析ができる手法の開発は必須である。我々は、RNAを配列特異的に切断するリボザイム(以下Rz)に着目し、網羅的な機能遺伝子探索法(ジーンディスカバリー技術)を確立した。ポイントはRzが基質の配列と結合する認識部位をランダム化したことである。このRzのプールは、異なる基質認識部位をもつ106種類以上のRzを含み、それぞれのRzが対応するmRNAに結合し切断する。

今回、このRzライブラリーを用いてアルツハイマー病関連遺伝子群の同定を試みた。この病気は神経細胞が異常な細胞死を起こし、痴呆症状を呈する。近年、この細胞死に小胞体ストレスが深く関与することが示唆された。そこで、ヒト神経芽細胞腫SKNSHにあらかじめランダム化Rz発現ベクターを一過性に導入し、糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシン(以下Tm)を投与、小胞体ストレスを誘導した。本来、糖鎖のない異常タンパクが小胞体に蓄積し細胞死が起こる。もし細胞に発現するRzが細胞死に関与するタンパクのmRNAを切断しその発現を抑制した時、この刺激に対し抵抗性を示すことが考えられる。そこで生き残った細胞からRzの発現ベクターを回収・基質認識部位の配列を決定し、データベースサーチで標的遺伝子の同定を行った。

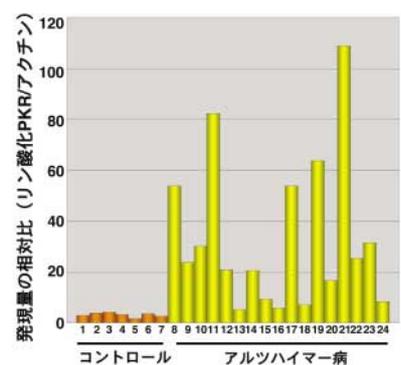
この手法で数十以上の候補遺伝子を同定しているが、今回PKRと呼ばれるプロテインキナーゼについて述べる。PKRは本来ウイルスの感染防御に関わるタンパクとして同定され、小胞体ストレスとの関連は知られていない。また細胞質と核の両方に局在するが、核内PKRの機能について不明である。しかし、我々はPKRを認識するRzが発現する細胞ではTm処理に対し高い抵抗性を示すこと、核内のPKR量がTm処理依存的に増加し、さらにリン酸化を受けて活性化することを示した。また、アルツハイマー病患者脳核抽出液においても対照群と比較し優位にリン酸化PKRの亢進が見られた(図)。リン酸化部位のアミノ酸を変異させ不活化したPKRを培養細胞に強制発現させてTm処理すると抵抗性を示すことから、核内PKRのリン酸化は培養細胞、アルツハイマー病患者脳ともに小胞体ストレスによる細胞死に対し促進的に働く重要な因子であることが示された。

効率的に重要因子を同定できるジーンディスカバリー手法は、様々な有用遺伝子の同定にも応用可能である。同定された遺伝子の機能(ジーンファンクション)解析を行うことで、今回紹介したように、PKRのリン酸化がアルツハイマー病患者の脳において細胞死に対して促進的に働くことを世界で初めて解明した。この手法を用いた更なる研究に是非期待したい。

(A)



(B)



アルツハイマー病及びコントロール群におけるリン酸化型PKRの発現量

(A)はそれぞれのタンパクに対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

(B)はバンドの強度を測定し、アクチン量でリン酸化型PKR量を補正した。



おおぬき りいこ
大貫玲子

r-oonuki@aist.go.jp
ジーンファンクション研究センター

関連情報

- 共著者: 多比良和誠 (ジーンファンクション研究センター) .
- R. Onuki, Y. Bando, E. Suyama, T. Katayama, H. Kawasaki, T. Baba, M. Tohyama, K. Taira: EMBO J., Vol. 23, 959-968 (2004).
- E. Suyama, H. Kawasaki, M. Nakajima, K. Taira: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 100, 5616-5621 (2003).
- R. Onuki, A. Nagasaki, H. Kawasaki, T. Baba, T. Q.P. Ueda, K. Taira: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 99, 14716-14721 (2002).
- H. Kawasaki, R. Onuki, E. Suyama, K. Taira: Nature Biotech., Vol. 20, 376-380 (2002).
- H. Kawasaki, K. Taira: EMBO Rep., Vol. 3, 443-450 (2002).