

## ストレス応答キナーゼの遺伝子多型と神経変性疾患タウオパチ

### ーゲノム編集によるヒト病態遺伝子の機能解析ー

#### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヒラマツ ノブヒコ 平松 伸彦
所属等	金沢医科大学 総合医学研究所 助教（平成 31 年 4 月退職）
プロフィール	海外留学を終えて、2016 年 10 月より金沢医科大学、総合医学研究所、助教に着任しました。研究のテーマは細胞に生じる負荷（ストレス）についてです。細胞は日々曝されるストレスをどのように感知し対処しているのか、若年期と老年期でなぜストレスに対する応答性の変化、細胞ストレスが病態の発症や進展にどのように関わるのか、などなど知りたいです。

#### 1. 研究の概要

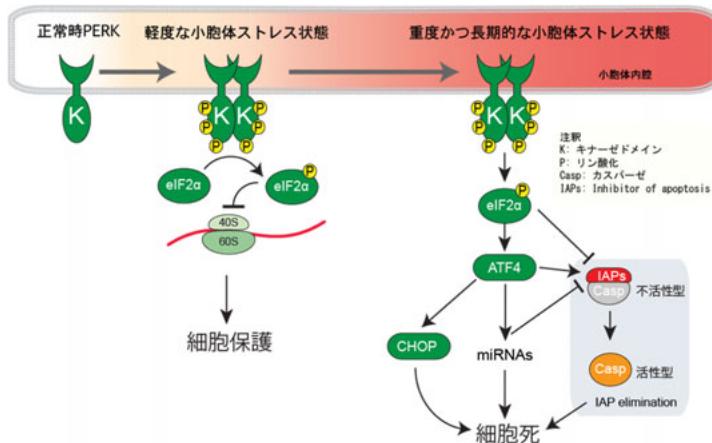
タウオパチーは微小管結合タンパク質の一つであるタウタンパク質（以下、タウ）の異常蓄積を特徴とする神経変性疾患群であり、アルツハイマー病などが含まれる。タウオパチー発症に関わる遺伝的要因の探索のため大規模なゲノム解析(GWAS)が実施され、細胞ストレス群の一つである小胞体ストレスに応答するキナーゼである EIF2AK3（以下 PERK）が新たなリスク遺伝子として同定された（Hoglinger et al. Nat Genet 2011, Liu et al. Neurobiol Aging 2013）。本研究は GWAS の結果より同定された PERK 遺伝子多型がタウオパチー病態(タウ凝集体形成や神経細胞変性)へどの様に寄与するのかについて解析を行った。その結果、リスク型に相当する PERK ではキナーゼ活性の減弱が引き起こされており、タウオパチー発症や病態進展へと関与する可能性が示唆された。そこで PERK のキナーゼ活性の減弱とタウとの関係性を調べるためにゲノム編集技術、リプログラミング法による評価系の構築に取り組んだ。

#### 2. 研究の動機、目的

タウオパチーはタウというタンパク質の凝集、蓄積が病理学的に認められる疾患である。本来、タウは親水性に富んだ構造で凝集とは縁がないようなタンパク質である。それにもかかわらず、タウタンパク質が何故凝集体を形成するのかについては今も分かっていない神経病理学の大きな課題の一つである。その解決の糸口を探すべく実施された GWAS の結果、小胞体ストレス応答キナーゼ PERK が関与している可能性が示唆された。そこで、PERK が「なぜ？」、「どのように？」タウオパチー病態の発症や進展へと関与するのかについて解明し、究極的には予防や治療法の確立へと繋げる為の基盤作りが本研究の目的である。

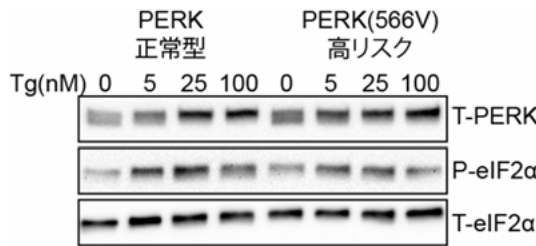
#### 3. 研究の結果

図 1 に概説した通り、PERK は小胞体に局在するキナーゼであり、小胞体ストレス応答機構の中心分子の一つである。これまでの研究から PERK の高度な活性化は細胞変性を引き起こすことが知られている。一方で PERK ノックアウト細胞を用いた研究から、PERK の機能欠損は細胞を脆弱化させることが報告されている。つまり、PERK の活性は最適なチューニングが重要なのである。こうした背景から、GWAS によって同定された PERK の遺伝子多型 (SNP :



**図1: PERK 経路** 正常時には単量体として小胞体膜に存在する PERK は、小胞体ストレス状態（異常タンパク質の小胞体内腔での蓄積）においては二量体を形成し、キナーゼドメイン (K) を自己リン酸化することによって活性化する。基質である翻訳開始因子 eIF2α をリン酸化する事でリボソーム複合体 (tRNA-Met) の形成が阻害されるため一過的に翻訳が抑制される。これは細胞保護作用を有する。しかし、慢性的または高度な小胞体ストレス時には下流に存在する ATF4 や CHOP という転写因子の発現が上昇し、細胞死が誘導されてくる。

rs7571971)は、PERK の キナーゼ機能を増強させているのか、または減弱させているのか、について解析を行った。その結果、リスク型 PERK (136 番、166 番、704 番の 3カ所のアミノ酸が置換されている) では正常型に比べ、キナーゼ活性が減弱していることを見出した。ではなぜリスク型 PERK ではキナーゼ活性が低下しているのかについて引き続き検討を行った。置換されたアミノ酸に着目すると、リスク型 PERK では 136 番セリンがシステインへと置換され、ジスルフィド結合を形成するためのシステイン総数が奇数 (5 個) となってしまふ。そこで、奇数によって異常なジスルフィド結合形成 (構造異常) が生じている可能性について検討を行った結果、リスク型 PERK では高分子量 (多量体) 形成が引き起こされている可能性を見出した。一般的に、異常構造をとるタンパク質に対し、小胞体は速やかに分解をする機構が存在しているため、リスク型 PERK の半減期について解析を行った。その結果、リスク型では半減期 (安定性) の低下が引き起こされていることを見出した。さらに、正常型における 704 番セリンは PERK のキナーゼドメイン中に存在し、そこはキナーゼ活性獲得に必要な潜在的なリン酸化部位とされている。そこで、PERK キナーゼドメインの組み換え体を作成し、リスク型における 704 番がアラニンに置換の意義を検討した。その結果、アラニン置換において優位にキナーゼ活性が減弱することを見出した。これらの結果から、リスク型 PERK においてキナーゼ活性の減弱が引き起こされている原因は、異常な構造による安定性の低下や活性ドメイン中の変異が寄与している可能性が示唆された。



**図2: 高リスク型 PERK(566V)におけるキナーゼ活性の減弱** 小胞体ストレス誘導剤であるタプシガルギンに曝露された際、正常型 PERK では eIF2α のリン酸化が顕著に誘導されるのに対して、高リスク型 PERK (566V) ではその量が低かった。

また、タウオパチーの一つである PSP (進行性核上性麻痺) において、PERK 遺伝子中に存在する別の SNP (rs55791823, 566 番がバリン置換) は低頻度ながらも高リスクであることが同定された。そこで、PERK の 566 番バリン変異体 (566V) についても機能解析を行った。リスク型 PERK の結果と一致して、PERK (566V) においてもキナーゼ活性の減弱が引き起こされていた (図 2)。興味深いことに、PERK(566V)では 1 箇所のみの変異にも関わらず、より高度に活性が減弱していることを見出された。566 番アミノ酸は PERK の細胞膜貫通ドメイン直下に存在しているが、その構造機能への役割は分かっておらず、今後の課題の一つである。

タウオパチー病態に PERK のキナーゼ活性の低下が関与している可能性が示唆されたことから、キナーゼ活性の低下がどのようにタウの凝集体形成や神経細胞変性へ影響するのかについて検討を行っていった。従来、遺伝子導入による過剰発現系を用いた評価検討が一般的であった。PERK に関しては遺伝子導入による方法では、ストレス感受性への変化などが引き起こされ、バイアスの掛かった結果になってしまうという問題があった。また、タウは過剰発現させること自体が凝集体形成を引き起こしてしまうという問題点を孕んでいる。そこで、本研

究においてはバイアスの掛からない評価系を構築するため、外来遺伝子を導入する従来の方法ではなく、ゲノム編集技術により遺伝子情報を書き込む戦略を用いていく。リスク型 PERK の遺伝子情報をもつ細胞を iPS 細胞または Direct Conversion 法により神経細胞へ分化誘導し、内因性タウへの影響を継続的に評価できる実験系の構築を目指していく。

過去に iPS 細胞の作出実績があることからヒト正常繊維芽細胞(IMR90)を使用することにし

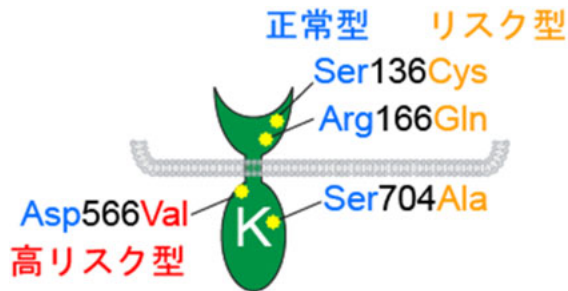


図3：PERK 変異箇所

表：IMR90 細胞における PERK 遺伝子型

	コドン(アミノ酸)
p.136	TCC(Ser)・TGC(Cys)
p.166	CGA(Arg)・CAA(Gln)
p.704	TCT(Ser)・GCT(Ala)
p.566	GAT(Asp)・GAT(Asp)

IMR90 細胞では正常型、リスク型 PERK がヘテロ接合体として存在しており、また、高リスク型 (566 番) PERK の遺伝子型はもっていない。

た。ゲノム編集に先立ち、IMR90 細胞における PERK の遺伝子型をサンガーシーケンスにより解読した。その結果、136 番、166 番、704 番アミノ酸に相当する塩基配列は全てヘテロ接合体として存在することが分かった。また、566 番のアミノ酸については、高リスク型 SNP (566V) の存在は認められなかった (図3と表)。シーケンス結果より、ゲノム編集については、3カ所を段階的に導入するのではなく、高リスク型(566V)を1箇所導入することとした。

IMR90 細胞は分裂に伴うテロメアの短小化により分裂老化が引き起こされてしまうのだが、ヒトテロメラーゼ (hTERT) を導入することで不死化させることが可能である。一般的にはウイルスベクターなどにより導入するのだが、それはゲノム中にランダムに取り込まれてしまう。また、ヒト体細胞中では発現していない hTERT が PERK とタウの関係性を検討する上で影響を与えてしまうことを避けるため、評価段階で必要に応じてゲノム中から取り除ける様にトランスポゾンの原理を利用した PiggyBac(PB)システムにより hTERT を IMR90 細胞に導入することで不死化させることを目指した。従来通りウイルスベクターにより hTERT を導入した IMR90 細胞では分裂を重ねても増殖速度が低下することはなく、不死化することができたのだが、予期せずして PiggyBac のシステムでは安定的に hTERT を発現する不死化株を樹立することができなかった。様々な遺伝子導入試薬 (Lipofectamine2000, Lipofectamine3000, ポリエチレンジミン) を用いて試みたが、どれも十分な遺伝子導入効率が得られず、安定株の樹立には至らなかった。その対策として、エレクトロポレーションなど高効率かつゲノムへのダメージも無い遺伝子導入方法を試験し、最適な条件を見出す必要である。

#### 4. これからの展望

遺伝子導入法の条件設定が整えば、ゲノム編集や神経細胞への分化誘導等は確立されたプロトコルに従い実施できる。しかし高リスク型 PERK の遺伝子型をもつ神経細胞において内因性タウにどのような影響がもたらされるのか全く未知である。長期的な培養を実施するだけでなく、PERK という遺伝的要因だけでなく、培養条件 (栄養、温度、物理刺激など) などの環境的要因を付加するなど、多角的なアッセイを実施することも可能である。より簡便に凝集体形成の有無を評価できるように、ゲノム編集技術によって蛍光タンパク質をタウ遺伝子に融合させ、凝集体形成を GFP 班出現によりリアルタイムに評価観察が可能となる。この細胞が樹立できれば、本研究以外にも創薬などを目的とするハイスループットなスクリーニングにも利用可能なツールの提供となることが期待できる。

#### 5. 社会に対するメッセージ

先ずは平成30年度若手奨励金を賜りました事、この場をかりまして深謝致します。本研究はタウというタンパク質がなぜ凝集するのか、という問題に取り組むものです。冒頭にも述べましたが、タウの凝集体形成はアルツハイマー病などの病態の根底に存在する機構であり、そ

れが解明できれば、病気の予防や治療という形で社会福祉に貢献するテーマと認識しています。本研究の可能性をご理解頂き、研究助成を受けられた事大変光栄に思います。