

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19300135  
 研究課題名（和文） 新規小胞体誘導タンパク質の脳変性疾患抑制機構と薬物作用機構  
 研究課題名（英文） The inhibitory mechanism of novel proteins induced in the endoplasmic reticulum and of drugs on neurodegenerative diseases

研究代表者  
 野村 靖幸（Nomura Yasuyuki）  
 横浜薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：00034041

## 研究成果の概要：

本研究では、抗脳神経変性疾患薬創製に向けて、細胞内小器官小胞体への変性タンパク質蓄積抑制機構に関する研究を行った。小胞体のタンパク質分解系（ERAD）分子の生体での生理的役割、とくに脳変性疾患への関与を明らかにするとともに、ERAD 分子をターゲットとした脳変性疾患抑制薬の基盤研究を行った。また、タンパク質凝集抑制作用を有する化合物を作成し、神経細胞死抑制作用について検討した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：小胞体，神経変性疾患，小胞体ストレス，ERAD，ケミカルシャペロン，ユビキチンリガーゼ，神経細胞死，アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）および脳梗塞などの脳神経変性疾患の発症機序は原因不明で、まだ根本的治療法は確立されていない。したがって、抗脳変性疾患薬の創製は脳科学研究および医療における重要な課題である。研究代表者らがこれらの疾患の原因の一つとして注目してきたものに、小胞体ストレスがある。小胞体（ER）はタンパク質の折りたたみや修飾を担う細胞内小器官であり、この小胞体に変性タンパ

ク質が蓄積した状態が小胞体ストレスである。脳変性疾患における神経細胞死に小胞体ストレスが関わると、最近考えられるようになり、変性タンパク質の凝集・蓄積を防止する薬物（小胞体ストレス抑制薬）の脳変性疾患予防・治療薬としての応用と開発が期待されている。

研究代表者らはこれまでの研究で、小胞体シャペロンである protein-disulfide isomerase (PDI) とそれと結合する ubiquitin, および、修復不能な変性タンパク質を小胞体

より排出し、分解を促進する小胞体関連分解 (ER-associated degradation; ERAD) に関するヒト新規遺伝子 HRD1 の抗小胞体ストレス作用と神経変性疾患への関与について明らかにしている。

また、研究代表者らは、ケミカルシャペロンとして知られている 4-フェニル酪酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) が、変性タンパク質の凝集を抑制することを明らかにし、小胞体ストレスと神経細胞死を抑制することを見出している。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下を主な目的とした。

- (1) HRD1 の詳細なタンパク質分解機構について解明する。また、HRD1 の AD 患者死後脳での変化を健常者と比較する。これらの解析により、ヒトでの AD 発症への HRD1 の関与を明らかにする。
- (2) パイオインフォマティクスを用いた網羅的解析より同定した HRD1 様の ERAD 分子の機能解析と脳神経変性疾患への関与について解明する。
- (3) HRD1 および新規 ERAD 遺伝子発現増加作用を有する新規薬物の探索を行う。
- (4) 4-フェニル酪酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) の誘導体の中から優れたケミカルシャペロン活性を有する新規化合物を発見し、新規抗脳変性疾患薬の開発をめざす。

## 3. 研究の方法

- (1) ERAD に関するユビキチンリガーゼ HRD1 は、AD の原因タンパク質 -amyloid (A $\beta$ ) の前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein; APP) をユビキチン化し、分解促進することで、A $\beta$  の産生量を低下させることから、HRD1 の抑制発現抑制に伴う A $\beta$  の産生量の変化と、神経細胞死について検討を行った。
- (2) ERAD 関連分子に対する抗体を用いて、ERAD タンパク質の脳内の発現分布と、どの細胞に発現するかを検討した。
- (3) AD 患者と健常者の死後脳における ERAD 分子の発現量について、mRNA とタンパク質を比較した。
- (4) 小胞体ストレスに対する ERAD 遺伝子の誘導機構について、関与するシグナル伝達分子、転写因子、転写調節部位の同定を行った。
- (5) ERAD 遺伝子の転写を促進する小胞体ストレス応答転写因子 ATF6 と XBP1 によって、APP の分解が促進されるかを検討した。
- (6) ERAD 遺伝子の発現を誘導する薬物の探索を行った。

- (7) HRD1 の膜貫通領域 RING-finger 領域、proline-rich 領域についての詳細な機能解析を行った。
- (8) 新規 ERAD 遺伝子の過剰発現によって APP タンパク質分解が促進されるか、また、ERAD 遺伝子の発現抑制を行い、APP が蓄積するか否かを検討した。
- (9) 4-PBA の誘導体を作成し、*in vitro* におけるケミカルシャペロン活性を 4-PBA と比較検討した。
- (10) 4-PBA より凝集抑制作用の強かった誘導体について、PD 関連タンパク質 Pael 受容体による神経細胞死に対する効果を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) HRD1 を介した ERAD 系の抑制は、APP の蓄積とそれに伴う A $\beta$  の産生増加をもたらすと同時に、小胞体ストレスと神経細胞死を誘発することが明らかとなり、ERAD 系の破綻は新たな AD の発症原因となりうる可能性が示唆された。
- (2) HRD1 は中脳黒質、海馬・歯状回、大脳皮質、線条体、淡蒼球、小脳プルキンエ細胞など、広範囲に脳神経細胞に発現しており、グリア細胞には発現していなかった。また、HRD1 の安定化や基質認識に関与する SEL1 も HRD1 同様に分布することが分かった。さらに、新規のユビキチンリガーゼ Kf-1 も神経細胞に発現することを見出した。これらの結果から、HRD1 や SEL1、Kf-1 を含む ERAD 分子は脳神経細胞のタンパク質分解機構に関与していると推測され、神経変性疾患などの疾患との関連性が期待される。
- (3) AD 患者脳における HRD1 の発現量について健常者と比較したところ、AD 患者の大脳皮質において、HRD1 タンパク質量の有意な低下が認められた。また、HRD1 を含む他の小胞体ストレス応答遺伝子の mRNA も増加傾向にあったことから、AD 患者脳が小胞体ストレス状態であることが判明した。さらに、HRD1 タンパク質の減少は、mRNA の低下によるものではないことが明らかとなった。これらの結果より、AD の発症に HRD1 タンパク質の減少と小胞体ストレスが関与する可能性が示された。
- (4) 小胞体ストレスによる HRD1 と SEL1 の誘導機構について、HRD1 は IRE1-XBP1 経路、SEL1 は ATF6 経路であることを示した。また、それらの転写調節領域について明らかにした。
- (5) 小胞体ストレス応答転写因子 ATF6 と XBP1 が APP の分解を促進し、A $\beta$  の産生を減少させることを見出した。また、この APP の分解が ERAD を介したタン

パク質分解であることを示し、変性した APP が選択的に分解されることを明らかにした。これらの結果より、HRD1 や SEL1 の誘導を介した ERAD 促進薬が開発できれば、AD 治療薬の候補となりうる可能性が示された。

- (6) HRD1 の発現を誘導する薬物として、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化する PMA を見出した。今後の展望として、PMA による HRD1 誘導機構を明らかにし、PKC を介した HRD1 誘導薬が、AD の治療薬となりうる可能性を検討したい。
- (7) HRD1 の各領域の役割について検討したところ、HRD1 の小胞体膜貫通領域は HRD1 タンパク質の安定化に寄与し、さらに基質タンパク質の小胞体から細胞質への輸送に関与していることが明らかになった。また、プロリンに富む C 末端領域は、ユビキチン化した基質の分解に関与することが判明した。以上の結果から、HRD1 の新たな機能が明らかとなり、哺乳類における ERAD 機構の解明に寄与した。
- (8) APP の分解に関与する HRD1 以外の新規ユビキチンリガーゼを見出し、APP と結合することを明らかにした。このことより、HRD1 以外にも APP の分解に関与する分子が存在し、AD との関連性を明らかにする必要性を新たに示した。
- (9) 4-PBA のフェニル基にハロゲン (F, Cl, Br) やメトキシ (-OCH<sub>3</sub>) など官能基を入れたものや、カルボン酸の炭素鎖を 3 また 5 等に変えたものについて、*in vitro* におけるタンパク質の凝集抑制作用について検討した。その結果、4-PBA と同等か、それ以上の活性のある 4-PBA 誘導体を 10 種類見出した。
- (10) 4-PBA の誘導体を 24 種類合成し、家族性 PD 関連タンパク質 Pael 受容体による神経細胞死に対する効果について検討した。その結果、4-PBA より神経細胞死抑制作用の強い化合物を見出した。今後は、神経細胞死抑制作用との構造活性相関を明らかにし、詳細な神経細胞死抑制機構について検討したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Kaneko, M., Yasui, S., Niinuma, Y., Arai, K., Omura, T., Okuma, Y. and Nomura, Y., A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1

genes, FEBS Lett., 581, 5355-5360 (2007). 査読有り

Omura, T., Kaneko, M., Onoguchi, M., Koizumi, S., Itami, M., Ueyama, M., Okuma, Y. and Nomura, Y., Novel functions of ubiquitin ligase HRD1 with transmembrane and proline-rich domains, J. Pharmacol. Sci., 106, 512-519 (2008). 査読有り

Omura, T., Kaneko, M., Tabei, N., Okuma, Y. and Nomura, Y., Immunohistochemical localization of a ubiquitin ligase HRD1 in murine brain, J. Neurosci. Res., 86, 1577-1587 (2008). 査読有り

Hosoi, T., Saito, A., Kume, A., Okuma, Y., Nomura, Y. and Ozawa, K., Vanadate inhibits endoplasmic reticulum stress responses, Eur J Pharmacol., 594, 44-48, (2008). 査読有り

Nakagawa, T., Tsuruma, K., Uehara, T. and Nomura, Y., GMEB1, a novel endogenous caspase inhibitor, prevents hypoxia- and oxidative stress-induced neuronal apoptosis, Neurosci Lett., 438, 34-37, (2008). 査読有り

Tomobe, K., Okuma, Y. and Nomura, Y., Impairment of CREB phosphorylation in the hippocampal CA1 region of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8, Brain Res., 1141, 214-217, (2007). 査読有り

Tomobe K and Nomura Y. Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence, Neurochem Res., 34, 660-669 (2009). 査読有り

[学会発表](計 15 件)

金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸:「小胞体の変性タンパク質分解関連分子 HRD1 による APP の分解と神経細胞死抑制」, 第 34 回日本脳科学会, 出雲 (2007 年 6 月)

金子雅幸, 小池洋, 大村友博, 大熊康修, 野村靖幸:「小胞体関連分解 ERAD に関する HRD1 は APP によるアポトーシス抑制する」, Neuro2007 (第 50 回日本神経化学会大会), 横浜 (2007 年 9 月)

金子雅幸, 小池洋, 大村友博, 大熊康修, 野村靖幸:「ユビキチンリガーゼ HRD1 の発現抑制は APP の蓄積と小胞体ストレスによるアポトーシスを誘導する」, 第 81 回日本薬理学会年会, 横浜 (2008 年 3 月)

金子雅幸, 井上慎也, 大村友博, 大熊康修, 野村靖幸:「小胞体関連分解 ERAD に関する SEL1 の脳内発現」, 日本薬学会

第 128 年会, 横浜 (2008 年 3 月)  
大村友博, 金子雅幸, 田部井直樹, 大熊康修, 野村靖幸:「ユビキチンリガーゼ HRD1 のマウス脳内局在」, 日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008 年 3 月)  
三森盛亮, 飯田博一, 五十嵐麻美子, 浜名洋, 大村友博, 金子雅幸, 大熊康修, 松本澄:「4-フェニル酪酸構造類似体の合成によるケミカルシャペロン活性の解析」, 日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008 年 3 月)  
金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸:「HRD1 の発現抑制による APP の分解阻害は A 産生増加と小胞体ストレスを誘発する」, 第 35 回日本脳科学学会, 東京 (2008 年 6 月)  
金子雅幸, 小池洋, 大村友博, 大熊康修, 野村靖幸:「HRD1 のタンパク質分解抑制は小胞体ストレスとアポトーシスを伴うアミロイド前駆体タンパク質の蓄積と A の産生増加を引き起こす」, 第 51 回日本神経化学学会大会, 富山 (2008 年 9 月)  
小野口雅之, 大村友博, 金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸:「ユビキチンリガーゼ HRD1 の膜貫通領域および proline-rich 領域の機能解析」, 第 119 回日本薬理学会関東部会, 東京 (2008 年 10 月)  
Kaneko, M., Koike, H., Omura, T., Okuma, Y. and Nomura, Y.: "Suppression of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and b-amyloid generation with endoplasmic reticulum stress and apoptosis", *Neuroscience* 2008, Washington, DC (November 2008)  
Okuma, Y., Omura, T., Kaneko, M. and Nomura, Y.: "The brain distribution of a ubiquitin ligase HRD1 in mice", *Neuroscience* 2008, Washington, DC (November 2008)  
金子雅幸:「ヒト新規小胞体タンパク質 HRD1 の神経変性疾患治療に関する薬理的基盤研究」, 第 82 回日本薬理学会, 横浜 (2009 年 3 月)  
金子雅幸, 小池洋, 齋藤僚, 野村靖幸, 大熊康修:「小胞体のユビキチンリガーゼ HRD1 の減少は APP の蓄積と A の産生増加を引き起こす」, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜 (2009 年 3 月)  
大村友博, 金子雅幸, 小野口雅之, 野村靖幸, 大熊康修:「ユビキチンリガーゼ HRD1 の膜貫通領域および proline-rich 領域の機能解析」, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜 (2009 年 3 月)  
齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修:「アルツハイマー病患者脳におけるユビキチンリガーゼ HRD1 タンパク質の減少」,

日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009 年 3 月)

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野村 靖幸 (Nomura Yasuyuki)  
横浜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00034041

### (2) 研究分担者

大熊 康修 (Okuma Yasunobu)  
千葉科学大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20127939  
高橋 良輔 (Takahashi Ryosuke)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90216771  
上原 孝 (Uehara Takashi)  
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号: 00261321  
金子 雅幸 (Kaneko Masayuki)  
千葉科学大学・薬学部・講師  
研究者番号: 10322827  
出雲 信夫 (Izumo Nobuo)  
横浜薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号: 70368976  
五十鈴川 和人 (Isuzugawa Kazuto)  
横浜薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号: 90412551