

機関番号：32732

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590095

研究課題名 (和文) 老化に伴う小胞体機能異常と神経変性疾患機構の解析

研究課題名 (英文) Study on the mechanism underlying development of neurodegenerative diseases with age-related dysfunction of the endoplasmic reticulum

研究代表者

友部 浩二 (TOMIBE KOJI)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80460286

研究成果の概要 (和文)：

本研究において我々は SAMP8 の老化促進の発症機構を解明する目的で研究を行った。SAMP8 は正常老化する SAMR1 に比べ酸化ストレスが亢進していることが知られており、酸化ストレス関連タンパク質として Nrf2 を検討し、SAMP8 の肝臓において Nrf2 の核内局在が SAMR1 に比べ有意に減少していることが明らかになった。また、Nrf2 の上流にある Akt および GSK-3 β のリン酸化も SAMP8 において減少していること及び GST や NQO1 の遺伝子発現の低いことから、SAMP8 の老化促進の発症には Nrf2 の核内局在の減少による抗酸化酵素の発現低下が関与している可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we investigated the mechanism underlying the development of accelerated senescence in SAMP8 mice. Oxidative stress is a cause of aging, and is systemically accumulated in SAMP8. Thus, we estimated Nrf2, oxidative stress sensor, in the liver of SAMP8 and SAMR1 by Western Blot analysis. The protein level of Nrf2 in the nucleus of the liver was significantly decreased in SAMP8. In addition, the phosphorylation of Akt and GSK-3 β was significantly decreased in the liver of SAMP8. Thus, it is suggested that the reduction of the translocation of Nrf2 into the nucleus might be induced by a decrease of GSK-3 β phosphorylation, resulting in an increase of oxidative stress in SAMP8 mice.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：老化, 老化促進マウス, 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患やメタボリックシンドローム、糖尿病、骨粗鬆症などさまざまな疾患が老化に伴って発症し、これら疾患の治療は高

齢化社会にとって重要である。近年、線虫を使った実験で寿命に関与する遺伝子 DAF-16、AGE-1 が発見されたことが発端となり、マウスやヒトでもそのホモログである Sirtuin

(Sirt)が見出された。Sirt は NAD 依存性脱アセチル化酵素であり、老化やアルツハイマー病発症にも関与することが示唆されている。また、老化は小胞体やミトコンドリア機能の低下による異常蛋白質や酸化ストレスの蓄積などが原因と考えられている。

自然発症的に老化が促進するモデルマウス老化促進マウス(SAMP8)は若齢期より全身的に酸化ストレスが亢進しており、加齢に伴い増加していることが知られている。さらに脳組織においては神経化学的変化やアルツハイマー病(AD)関連遺伝子の異常発現も見出されている。また、我々はこれまでに小胞体関連分解(ERAD)に関して新規遺伝子 HRD1 を見出し、パーキンソン病の原因蛋白質と考えられる Pael 受容体やアルツハイマー病の APP の分解を促進することを見出している。これらのことから、小胞体ストレスと酸化ストレスの関連性を明らかにすることで成人病や老人性疾患の治療法や治療薬の開発につながると期待できると考える。

2. 研究の目的

SAMP8 はこれまでに SOD やカタラーゼなどの抗酸化酵素活性が低下しており、蛋白質や脂質の酸化が亢進していることが知られており、等に脳においては NMDA 受容体や PKC の減少やシナプスの機能異常が認められている。しかし、老化促進の発症機構は不明であり、この機序を明らかにすることで老人性疾患をはじめとする様々な疾患の治療法の開発に繋がると考え、本研究ではまず SAMP8 の老化促進発症にかかわる蛋白質や遺伝子を見出し、小胞体ストレスとの関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法 および 4. 研究成果

老化促進マウスである SAMP8 と正常老化を示す SAMR1 の 2ヶ月齢、10ヶ月齢における肝臓から抽出したタンパク質をウエスタンブロッティングにより老化関連因子、小胞体ストレス、小胞体関連分解およびユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質の加齢変化を比較検討した結果、老化関連因子では Forkhead 転写因子の発現量が SAMP8 肝臓の 2ヶ月齢および 10ヶ月齢において減少していることが分かった。この転写因子はリン酸化されると核内から細胞質に移動することが知られており、リン酸化 Forkhead を検出したところ 10ヶ月齢において SAMR1 に比べ SAMP8 の肝細胞質で有意に増加していることが明らかとなった。さらに、酸化ストレスに関するタンパク質として酸化ストレスセンサーである Nrf2 の発現を検討した。肝臓における Nrf2 の発現は SAMP8、SAMR1 共に加齢に伴って減少して

いることが分かった。また、Nrf2 の核内局在が SAMR1 に比べ SAMP8 において有意に減少していることが明らかとなった(図 1)。

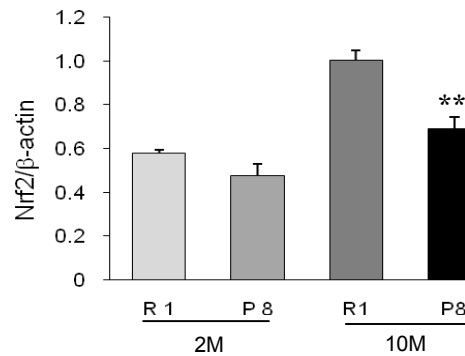


図 1. 肝臓の核内 Nrf2 の加齢変化
**: $p<0.01$ vs SAMR1(10M)

また、Nrf2 の核内局在を免疫組織化学染色により検討したところ、SAMP8 の Nrf2 核内局在は SAMR1 に比べ減少していることが確認された。Nrf2 は Keap1 と結合して細胞質に留められ酸化ストレスや PKC、MAPK などのシグナルにより核内に移動することが知られている。そこで Keap1 の発現量を比較したところ SAMP8 と SAMR1 には差がないことが分かった。このことから、SAMP8 における Nrf2 の核内局在の減少は Keap1 の発現異常によるものではなく、Nrf2 の核内移動に関与するシグナル伝達系が関与している可能性が考えられた。Nrf2 の核内移動に関与する上流にあるシグナル伝達系として Forkhead 転写因子のリン酸化にも関与している Akt のリン酸化を検討した。その結果、リン酸化 Akt(Ser473)が 2ヶ月齢および 10ヶ月齢ともに SAMP8 において有意に減少していた。このことから、Akt の下流にある因子として GSK-3β のリン酸化状態を検討した結果、SAMP8 においてリン酸化 GSK-3β(Ser9)が Akt と同様に有意な減少が認められた(図 2)。

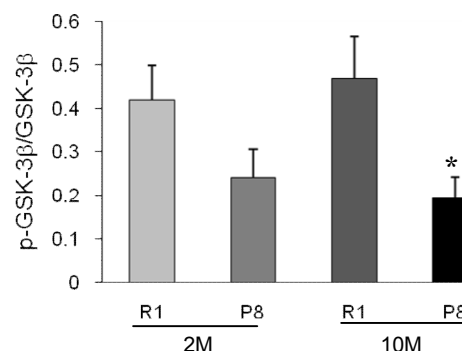


図 2. 肝臓のリン酸化 GSK-3β 加齢変化
*: $p<0.01$ vs SAMR1(10M)

Nrf2 は核内転写因子であり解毒酵素や抗

酸化酵素などの発現に関与している。本研究において Nrf2 の発現量および Nrf2 の核内局在量が SAMP8 において有意に減少していることから、Nrf2 および Nrf2 の下流の遺伝子発現を検討した。2ヶ月および10ヶ月齢の SAMP8 および SAMR1 の肝臓から mRNA を抽出し RT-PCR 法により Nrf2、GSTa1、NQO1、SOD、HO-1 について発現量を比較した。その結果、Nrf2 の mRNA レベルは SAMP8 において有意に減少しており、タンパク量の減少を裏付けている。さらに、GSTa1 および NQO1 の発現が SAMP8 において有意に減少していることが明らかとなった(図3)。SOD および HO-1 の発現は SAMP8 において減少傾向が認められたが有意な差ではなかった。

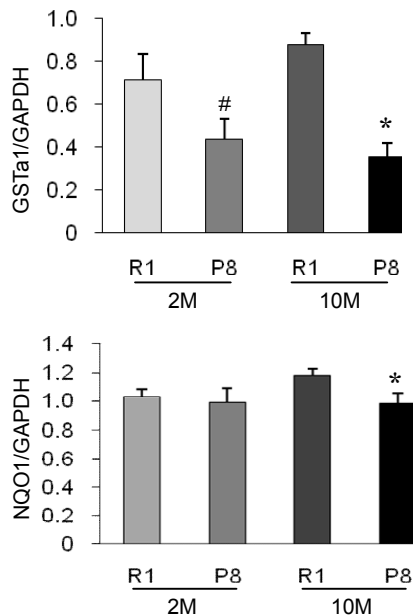


図3. GSTa1 および NQO1 mRNA の加齢変化
*: $p < 0.05$ vs SAMR1(10M)、#: $p < 0.05$ vs SAMR1(2M)

以上の結果から、SAMP8 の脳および肝臓において Nrf2 の発現および核内移動に異常があることが明らかとなった。さらに、Nrf2 の核内局在の減少には Akt/GSK-3 β のリン酸化の低下が関与している可能性が示唆され、Nrf2 によって発現誘導される GSTa1 や NQO1 の発現が減少していることから、SAMP8 の老化促進の発症には Nrf2 の核内局在の減少による抗酸化酵素の発現低下が関与している可能性が示された。また、小胞体ストレス関連タンパク質の異常増加も SAMP8 において認められることから、今後は小胞体関連分解の HRD1 との関連性も検討したい。

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5件)

- ① 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
- ② Tomobe, K., and Nomura, Y., Neurochemistry, Neuropathology, and Heredity in SAMP8: A Mouse Model of Senescence. *Neurochem. Res.* 34(4), 660-669, 2009, 査読有り
- ③ Saito, R., Kaneko, M., Okuma, Y., Nomura, Y., Correlation between decrease in protein levels of ubiquitin ligase HRD1 and amyloid- β production. *J. Pharmacol. Sci.* 113, 285-288, 2010, 査読有り
- ④ Kaneko, M., Koike, H., Kitamura, Y., Okuma, Y., Nomura, Y., Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid- β generation. *J. Neurosci.* 30(11), 3924-3932, 2010, 査読有り
- ⑤ Tomobe, K., Shinozuka, T., Kuroiwa, M., Nomura, Y., Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3 β in a mouse model of accelerated aging (SAMP8). *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2011, (in press), 査読有り

[学会発表] (計8件)

- ① 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)
- ② 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)
- ③ 友部浩二, 磯部正治, 近藤綾子, 澤田昌伸, 黒澤信幸, 野村靖幸:「SAMP8 における学習記憶障害遺伝子の連鎖解析」, 第23回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(京都)、2008年7月
- ④ 出雲信夫, 小林芳子, 友部浩二, 西廣吉, 野村靖幸, 加藤真介:「低線量 X 線連続照射のマウス骨量への影響」, 日本薬学会第129年会(京都)、2009

年 3 月

- ⑤ 小林芳子, 出雲信夫, 友部浩二, 野村靖幸, 加藤真介:「骨量減少症モデルマウスに対する低線量 X 線の影響」、日本薬学会第 130 年会(岡山)、2010 年 3 月
- ⑥ 金子雅幸:「小胞体関連分解 (ERAD) に関与するユビキチンリガーゼ RNF19B 発現抑制によるアミロイド β ($A\beta$) の減少」、第 122 回日本薬理学会関東部会(静岡)、2010 年 6 月
- ⑦ Kaneko, M: 「Correlation between amyloid- β production and decrease in levels of ubiquitin ligase HRD1 due to its insolubilization」, Neuroscience 2010 (San Diego), 2010 年 9 月
- ⑧ 倉岡貴徳, 小林芳子, 出雲信夫, 友部浩二, 野村靖幸, 加藤真介:「LPS 誘導の骨量減少に対する低線量 X 線照射の影響」、日本薬学会第 131 年会(静岡)、2011 年 3 月

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友部 浩二 (TOMOBE KOJI)
横浜薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 80460286

(2) 研究分担者

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

(3) 研究分担者

金子 雅幸 (KANEKO MASAYUKI)
千葉科学大学・薬学部・講師
研究者番号: 10322827