

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32525  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21590101  
 研究課題名（和文） 脳神経変性疾患医薬標的としての小胞体関連分子による不良蛋白質分解系／凝集抑制物質  
 研究課題名（英文） DEGRADATION OF ABNORMAL PROTEIN/ANTIAGREGATION SUBSTANCE, REGARDING ENDOPLASMIC RETICULUM ASSOCIATED MOLECULE AS A TARGET OF THERAPEUTIC AGENT ON NEURODEGENERATIVE DISEASE  
 研究代表者 大熊 康修（OKUMA YASUNOBU）  
 千葉科学大学・薬学部・教授  
 研究者番号：20127939

## 研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病 (AD) 患者死後脳大脳皮質において、脳神経細胞に発現するユビキチンリガーゼ (E3) HRD1 タンパク質量が有意に減少していることが明らかとなった。一方、H2O2 による酸化ストレス負荷が HRD1 タンパク質の不溶化を引き起こした。

HRD1 タンパク質は、脳神経細胞のみならず、成体脳の脳室周囲細胞および海馬歯状回に存在する神経幹細胞にも局在していた。

ケミカルシャペロン 4-PBA の誘導体および他の物質について、蛋白異常蛋白質の凝集を防ぐ働きを持つ化合物が得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

The ubiquitin ligase (E3) HRD1 protein levels were significantly decreased in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease (AD), and that the brains of these patients were under ER stress. Furthermore, HRD1 levels negatively correlated with A $\beta$  levels. The present study revealed that the decrease in HRD1 levels was due to its insolubilization. A reactive oxygen species (ROS)-induced insolubilization of HRD1 and SEL1L may be involved in A $\beta$  generation in the pathogenesis of AD. Neural stem/progenitor cells (NSCs) reside in the subventricular zone (SVZ) and subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus in adult mammals. We found the localization of HRD1 in the NSCs of the adult brain. We found that several 4-phenylbutyric acid 1 (4-PBA) derivatives demonstrated anti-aggregation activity as a chemical chaperone activity higher than that of 4-PBA.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：小胞体ストレス、ケミカルシャペロン、細胞死、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病やアルツハイマー病および脳梗塞などの脳・神経変性疾患においては小胞体に異常蛋白質の蓄積・凝集が認められ、これが脳・神経変性疾患の病態に重要な役割を演じていることが推定されるようになった。このような背景から変性蛋白質の凝集・蓄積を防止する薬物、特に小胞体ストレスを抑制する医薬の開発が望まれている。

私たちの研究室では小胞体ストレスを抑制する因子として、修復不能な変性蛋白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) に関与するユビキチンリガーゼの一種である新規遺伝子 HRD1 のクローニングに成功し、HRD1 が小胞体ストレスによる細胞死を抑制することを見出した。また、常染色体劣性遺伝若年性パーキンソン病の原因遺伝子 Parkin (ユビキチンリガーゼの一種) の基質分子の一つである Pael-R は、凝集し易い蛋白質で、Parkin に変異がある場合には Pael-R が分解されずに小胞体に蓄積され小胞体ストレスとなり、細胞死を惹起するとされている。私たちは最近、HRD1 が Pael-R と相互作用すること、および Pael-R を過剰発現することで生じる細胞死を HRD1 が抑制することを見出した。また、ごく最近抗 HRD1 抗体を用いて HRD1 のマウス脳内組織局在を詳細に検討した結果、黒質、海馬、大脳皮質、小脳プルキンエ細胞の神経細胞特異的局在を明らかにした。さらに HRD1 分子の領域特異的欠失変異体を構築し、それぞれの領域の機能解析を行った結果、ユビキチンリガーゼ活性領域の他、安定化に必要な領域、および変性蛋白質の輸送に関わり得る領域を見出した。

また、私たちは最近、蛋白質の折りたたみを促進し、異常蛋白質の凝集を防ぐ働きを持つ化合物であるケミカルシャペロンの一つである 4-フェニル酪酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) が Pael 受

容体の蓄積を防ぎ、パーキンソン病や脳虚血モデルによる神経細胞死を抑制できることを明らかにした。私たちの報告の後、Science 誌において 4-PBA が小胞体ストレスの関与する糖尿病に有用である可能性が報告されている。

一方、神経新生や神経分化に対する小胞体ストレスおよび小胞体関連分解機構の関与については殆ど報告されていない。

## 2. 研究の目的

- (1) アルツハイマー病患者大脳皮質において、脳神経細胞に発現するユビキチンリガーゼ (E3) HRD1 タンパク質の界面活性剤可溶性画分における有意な減少が認められた。そこで、HRD1 を不溶化させる因子をマウス神経芽腫細胞 (Neuro2a) を用いて検討する。
- (2) HRD1 抗体および神経幹細胞特異的抗体を用いて、成体脳に存在する神経幹細胞に HRD1 が局在するかを検討する。また、HRD1 による神経分化の制御機構を検討するために、神経幹細胞モデルとしてのマウス胚性腫瘍細胞株 P19 細胞および胎生マウス由来神経幹細胞を用いて、神経分化過程における HRD1 の発現量および HRD1 欠損による神経系の各種マーカータンパク質の発現量を解析する。また、HRD1 による神経分化の制御機構を明らかにするために、神経系の分化制御に深く関与している bHLH 遺伝子群および Notch シグナル分子の発現量を遺伝子レベルで解析する。
- (3) 4-PBA の誘導体など種々の化合物についてシャペロン機能を解析することで、ケミカルシャペロンとしての活性を決定する分子機構を明らかにする。4-PBA の誘導体等の化学合成は、本学薬学部薬化学研究室との共同研究にて行う。さらに、アルツハイマー病およびパーキンソン病治療薬等の薬物が、小胞体に作用部位を有するかどうかについて検討する。具体的には変性タンパク質

の凝集を抑制する作用（シャペロン活性）を有するか否かについて検討する。

### 3. 研究の方法

(1) マウス神経芽腫細胞 (Neuro2a) を用いて、APP および HRD1 を過剰発現する細胞系を構築し、種々のストレス試薬を負荷して、HRD1 不溶化機構を検討した。

(2) HRD1 抗体および神経幹細胞特異的抗体を用いて、成体脳に存在する神経幹細胞に HRD1 が局在するかを検討した。また、神経幹細胞モデルとしてのマウス胚性腫瘍細胞株 P19 細胞および胎生マウス由来神経幹細胞を用いて、小胞体ストレスや HRD1 の神経分化に及ぼす影響を検討した。

(3) ケミカルシャペロン機能の測定は既に確立した Lactalbumin を用いた蛋白凝集度の測定により行った。

### 4. 研究成果

(1) アルツハイマー病患者大脳皮質において、脳神経細胞に発現するユビキチンリガーゼ (E3) HRD1 タンパク質の界面活性剤可溶性画分における有意な減少が認められた。HRD1 を不溶化させる因子の一つとして、神経毒性を有する A $\beta$  が考えられる。そこで、培養神経細胞に対し A $\beta$  負荷をかけた結果、HRD1 タンパク質の発現誘導および小胞体ストレスの惹起が認められたが、HRD1 の不溶化は認められなかった。つぎに、AD 患者の死後脳大脳皮質が小胞体ストレス状態にあったことから、小胞体ストレスによる HRD1 不溶化の検討を行った。培養神経細胞に対し、小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンおよびタプシガルギンを曝露した結果、小胞体ストレス応答による HRD1 の誘導は認められたが、HRD1 の不溶化は認められなかった。一方、酸化ストレスによる HRD1 タンパク質への影響を解析するため、過酸化水素を培養

神経細胞に曝露した結果、HRD1 の不溶化が認められた。また、過酸化水素の曝露により、HRD1 が凝集体を形成することも明らかとなった。したがって、本結果より、酸化ストレスによる HRD1 の不溶化と減少が起こると、小胞体ストレス応答が破綻し、A $\beta$  の産生増加や、それに伴うさらなる小胞体ストレスの増加と神経変性が促進され、AD が発症する可能性が考えられた。

(2) 側脳室下帯新生細胞において、免疫組織化学的検討の結果、HRD1 タンパク質と nestin (神経幹細胞のマーカータンパク質) の共発現が認められた。したがって HRD1 は神経細胞のみならず、神経幹細胞に局在していることが明らかとなった。P19 細胞において、神経細胞への分化誘導前に HRD1 をノックダウンした影響を検討した。神経細胞への誘導後 5 日目において、神経細胞に分化した指標である  $\beta$ -III tubulin と HRD1 は共発現していたが、 $\beta$ -III tubulin 陽性細胞数は、対照群と比較して減少していた。また、ウェスタンブロッティング法の結果より、HRD1 をノックダウンした細胞でも、分化誘導後いずれの時間においても、神経幹細胞のマーカータンパク質である nestin 及びアストロサイトのマーカータンパク質である GFAP の発現量は変化しなかった。一方、 $\beta$ -III tubulin の発現は、対照群と比較して、分化誘導後 3 日目及び 5 日目で明らかに減少していた。これらの結果から、胚細胞時に発現する HRD1 タンパク質は神経細胞への分化制御に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

HRD1 による神経分化の制御機構を検討するために、神経幹細胞モデルとしてのマウス胚性腫瘍細胞株 P19 細胞および胎生マウス由来神経幹細胞を用いて、神経分化過程における HRD1 の発現量および HRD1 欠損による神経系の各種マーカータンパク質の発現量を解析

した。小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンは、暴露4日目に小胞体ストレスマーカーの発現を増加させるとともにHRD1の発現を増加させた。したがって、小胞体ストレスは、HRD1の増加を介して神経細胞への分化を促進する可能性が推察された。

(3) ケミカルシャペロン機能を解析する目的で、4-PBAの炭素鎖の変化(n=3~6)により、*in vitro*においてnが大きいほどタンパク質凝集抑制活性が高いことが分かった。さらにツニカマイシンを用い、小胞体ストレスで誘導した神経細胞死に対する保護作用もnが大きいほど強く、小胞体ストレスマーカーであるGRP94とGRP78の発現量も同様に減少していた。さらにpael-Rの過剰発現細胞を用いて、特に3-PPAと4-PBAが変性タンパク質の移行を促進させることが明らかとなった。さらに変性タンパク質凝集抑制作用を有する化合物には、インドール骨格の3位にプロピオン酸をもつYK02-34と同様にインドール骨格3位にアクリル酸をもつYK02-35に効果があった。また、GRP78, 94の発現量から小胞体ストレスに関しては低濃度から高濃度へと濃度依存的に軽減していることが明らかとなった。

#### 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 8件)

① Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Kitamura, Y., Okuma, Y. and Nomura, Y.: "Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation", *J. Neurosci.*, 30: 3924-3932 (2010).

② Saito, R., Kaneko, M., Okuma, Y. and Nomura, Y.: "Correlation between decrease in protein levels of ubiquitin ligase HRD1

and amyloid-beta production", *J. Pharmacol. Sci.*, 113: 285-288 (2010).

③ Hosoi T, Tamubo T, Horie N, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K. TEK/Tie2 is a novel gene involved in endoplasmic reticulum stress. *J. Pharmacol. Sci.* 114, 230-2233 (2010).

④ Tada, E., Toyomura, K., Nakamura, H., Sasaki, H., Saito, T., Kaneko, M., Okuma, Y. and Murayama, T.: "Activation of ceramidase and ceramide kinase by vanadate via a tyrosine kinase-mediated pathway", *J. Pharmacol. Sci.*, 114: 420-432 (2010).

⑤ Kawada K, Kaneko, M, Nomura Y, Mimori, S, Hamana, H, Ogita, K, Murayama, T, Fujino, H, Okuma Y. Expression of the Ubiquitin Ligase HRD1 in Neural Stem/Progenitor Cells of the Adult Mouse Brain *J. Pharmacol. Sci.* 117(3):208-12. (2011)

⑥ Mimori, S, Okuma Y., Kaneko M, Kawada, K Hosoi, T, Ozawa, K, Nomura Y Hamada, H, "Protective effects of 4-PBA derivatives on the neuronal cell death and endoplasmic reticulum stress." *Biol. Pharm. Bull.* 35(1):84-90. (2012)

⑦ Kaneko, M, Saito, R, Okuma Y., Nomura, Y.: "Possible involvement of ubiquitin ligase HRD1 insolubilization in amyloid  $\beta$  generation," *Biol. Pharm. Bull.* 35(2):269-72. (2012)

⑧ Kaneko, M, Okuma Y., Nomura, Y.: "Possible involvement of HRD1, a novel molecule related to endoplasmic reticulum stress, in Alzheimer's disease." *J. Pharmacol. Sci.* (in press)

[学会発表] (計 35件)

①金子雅幸, 齋藤僚, 大熊康修, 野村靖幸, 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タンパク質の減少とA $\beta$ 産生機構, 第36回日本脳科学会, 金沢 (2009年6月12日)

②齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, 大脳皮質におけるユビキチンリガーゼHRD1の減少がアルツハイマー病発症に関与する可能

性, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2009, 東京 (2009年8月24日)

③小野口雅之, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, 小胞体関連分解 (ERAD) に関するユビキチンリガーゼRNF19Bによるアミロイド前駆タンパク質 (APP) の分解についての検討, 第121回日本薬理学会関東部会, 東京 (2009年10月10日)

④Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y. and Nomura, Y., Human HRD1 involved in the degradation of unfolded proteins has other functions than ubiquitin ligase activity in its transmembrane and proline-rich domains, Neuroscience 2009, Chicago (October 19, 2009)

⑤Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Okuma, Y. and Nomura, Y., Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid- $\beta$  generation, Neuroscience 2009, Chicago (October 19, 2009)

⑥小野口雅之, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, ユビキチンリガーゼRNF19Bによるアミロイド $\beta$ 前駆体タンパク質 (APP) の分解の検討, 第83回日本薬理学会年会, 大阪 (2010年3月16日)

⑦杉岡夏実, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, ユビキチンリガーゼHRD1発現抑制によるParkinの発現誘導, 日本薬学会第130年会, 岡山 (2010年3月30日)

⑧金子雅幸, 小野口雅之, 野村靖幸, 大熊康修, 小胞体関連分解 (ERAD) に関するユビキチンリガーゼRNF19B発現抑制によるアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) の減少, 第122回日本薬理学会関東部会, 静岡 (2010年6月5日)

⑨齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, ヒト大脳皮質におけるユビキチンリガーゼ

HRD1の不溶化による減少と $A\beta$ 産生量との相関, Neuro2010, 神戸 (2010年9月2日)

⑩東野俊作, 川田浩一, 佐藤亜紗美, 金子雅幸, 大熊康修, 小胞体ストレスに関するユビキチンリガーゼHRD1の神経幹細胞における存在とその発現抑制による神経細胞分化への影響, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010, 京都 (2010年9月11日)

⑪山森正嗣, 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RNF19BおよびDorfinがアルツハイマー病原因タンパク質アミロイド $\beta$ 産生に関する可能性, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010, 京都 (2010年9月11日)

⑫齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, ユビキチンリガーゼHRD1の不溶化による減少とアルツハイマー病原因タンパク質アミロイド $\beta$ 産生との相関, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010, 京都 (2010年9月11日)

⑬Kaneko, M., Saito, R., Yamamori, M., Okuma, Y. and Nomura, Y., Involvement of endoplasmic reticulum-associated degradation in amyloid- $\beta$  generation, ISPC-Nara, Nara (September 15, 2010)

⑭川田浩一, 東野俊作, 佐藤亜紗美, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, 小胞体ストレスに関するユビキチンリガーゼHRD1発現抑制による神経細胞分化への影響, 第12回応用薬理シンポジウム, 横浜 (2010年9月19日)

⑮齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, ユビキチンリガーゼHRD1の不溶化による減少とアルツハイマー病発症の可能性, 第12回応用薬理シンポジウム, 横浜 (2010年9月19日)

⑯Kaneko, M., Saito, R., Okuma, Y. and Nomura, Y., Correlation between amyloid- $\beta$  production and decrease in levels of ubiquitin ligase HRD1 due to its

insolubilization, Neuroscience 2010, San Diego (November 16, 2010)

⑰川田浩一, 東野俊作, 佐藤亜紗美, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, 神経幹細胞分化に及ぼす小胞体関連分解関連分子ユビキチンリガーゼHRD1の役割, 第84回日本薬理学会年会, 横浜 (2011年3月22日)

⑱齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, アルツハイマー病発症におけるアミロイドβの産生増加に活性酸素種によるユビキチンリガーゼHRD1の不溶化が関与する可能性, 第84回日本薬理学会年会, 横浜 (2011年3月24日)

⑲金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸, 小胞体のタンパク質分解系破綻によるアルツハイマー病発症機構, 日本薬学会第131年会, 静岡 (2011年3月31日)

⑳齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, 酸化ストレスによるアルツハイマー病関連ユビキチンリガーゼHRD1の不溶化, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011, 東京 (2011年8月27日)

㉑山森正嗣, 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RNF19BおよびDorfinがアルツハイマー病原因タンパク質アミロイドβ産生に関与する可能性, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011, 東京 (2011年8月27日)

㉒金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸, 小胞体関連分解ERAD破綻によるアルツハイマー病発症機構, 第84回日本生化学会大会 (小胞体ストレスの新概念と疾患), 京都 (2011年9月22日)

㉓山森正嗣, 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RNF19BおよびDorfinがアルツハイマー病原因タンパク質アミロイドβ産生に関与する可能性, 第54回日本神経化学学会大会, 加賀 (2011年9月27日)

㉔金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸, 小胞体のタンパク質分解系ERADのアルツハイマー病への関与, 第54回日本神経化学学会大会 (中枢神経系における小胞体ストレス応答の重要性), 加賀 (2011年9月28日)

㉕金子雅幸, 齋藤僚, 大熊康修, 野村靖幸, 酸化ストレスによるユビキチンリガーゼHRD1の不溶化とアルツハイマー病, 第38回日本脳科学会, 那覇 (2011年10月9日)

㉖齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, 酸化ストレスによるユビキチンリガーゼHRD1の不溶化と凝集体形成, 第125回薬理関東部会, 船橋 (2011年10月15日)

㉗山森正嗣, 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RNF19BおよびDorfinがAβ産生に関与する可能性, 第125回薬理関東部会, 船橋 (2011年10月15日)

㉘東野俊作, 川田浩一, 藤永直巳, 金子雅幸, 大熊康修, 神経分化に対するツニカマイシン誘導性小胞体ストレスの影響, 第125回薬理関東部会, 船橋 (2011年10月15日)

㉙Saito, R., Kaneko, M., Nomura, Y. and Okuma, Y., Possible involvement of ubiquitin ligase HRD1 insolubilization in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Neuroscience 2011, Washington, DC (November 2011).

㉚川田浩一, 藤永直巳, 東野俊作, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修, Extraordinary progress of neuronal differentiation and maturation by tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress, 2011年度科研費特定領域研究「タンパク質の社会」班会議, 日出町 (2011年11月21日)

㉛山森正嗣, 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RNF19B発現抑制による、アミロイドβ産生抑制, 第8

5 回日本薬理学会年会，京都（2012年3月14日）

③①東野俊作，川田浩一，藤永直巳，金子雅幸，大熊康修，神経分化に対するツニカマイシン誘導性小胞体ストレスの影響，第85回日本薬理学会年会，京都（2012年3月15日）

③②金子雅幸，大熊康修，野村靖幸，小胞体のタンパク質分解系ERADとアルツハイマー病，第85回日本薬理学会年会（創薬のターゲットとしての小胞体ストレス：オーガナイザー），京都（2012年3月16日）

③③佐藤俊介，川田浩一，金子雅幸，野村靖幸，大熊康修，成体マウスの神経幹細胞におけるHRD1の発現，日本薬学会第132年会，札幌（2012年3月29日）

③④齋藤僚，金子雅幸，野村靖幸，大熊康修，アルツハイマー病関連因子によるユビキチンリガーゼHRD1不溶化機構，日本薬学会第132年会，札幌（2012年3月30日）

③⑤三森盛亮，荒野直紀，藤平幸祐，山森正嗣，溝井健太，川田浩一，金子雅幸，大熊康修，村上泰興，浜名洋，神経変性疾患治療薬を目指した低分子化合物の合成と評価（2），日本薬学会第132年会，札幌（2012年3月30日）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
大熊 康修  
千葉科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：20127939

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
浜名 洋  
千葉科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：00383472