

令和元年5月27日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19490

研究課題名(和文)小胞体ストレス依存的な新規A $\beta$ 分解制御機構を解く研究課題名(英文) Novel regulatory mechanism of A $\beta$  degradation via ER stress

研究代表者

上原 孝 (Uehara, Takashi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00261321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチンE3リガーゼの基質としてA $\beta$ 分解酵素(プロテアーゼ)の一つを同定することに成功した。当該基質タンパク質はポリユビキチン化されるものの、プロテアソームによる分解を受けないことが明らかとなった。そこで、酵素活性を人工的A $\beta$ ペプチドの水解活性から求めたところ、ユビキチンによって、有意に抑制されることがわかった。また、ユビキチン化部位を欠失させた変異体を発現した細胞では、細胞外に分泌される酵素量が有意に低下することもわかった。したがって、小胞体ストレス環境下では、ある種のE3リガーゼが高発現し、基質をユビキチン化することで細胞内局在を変化させて、酵素活性を調節している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、小胞体ストレスとA $\beta$ 蓄積との因果関係を明らかにした研究はない。本研究において、小胞体ストレス依存的に発現が上昇するユビキチンE3リガーゼがA $\beta$ 水解酵素を基質として、その酵素活性に影響を及ぼすことを見出した。この現象が、ヒトアルツハイマー病発症に連関するかどうか、今後ヒト死後脳などを使用して検証していく予定である。これが証明されれば、創薬の標的になり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of E3 ligase that is involved in ER stress signaling, we attempted to find its substrate. In this study, we succeeded in identifying an A $\beta$  degrading enzymes (proteases). The substrate protein was polyubiquitinated but not degraded by proteasome. Next, we examined if ubiquitination results in the change in the enzymatic activity. Hydrolysis of A $\beta$  peptide was significantly suppressed by this modification. Therefore, it is suggested that under the endoplasmic reticulum stress environment, an E3 ligases is highly expressed, and ubiquitination of the substrate may alter intracellular localization by regulating the enzyme activity.

研究分野：神経薬理学

キーワード：小胞体ストレス アルツハイマー病 ユビキチン化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体内腔における新生タンパク質の正確な折り畳みには、多くのシャペロンやジスルフィド異性化酵素が関与している。申請者は、酸素やカルシウムの濃度変化、活性酸素/窒素種の暴露などによる環境変化によってタンパク質成熟システムが阻害され、小胞体内腔に未熟な変性タンパク質が蓄積(小胞体ストレス状態)されることを見出した(PNAS 2004; Science 2005; Nature 2006)。このとき、小胞体膜上では変性タンパク質蓄積を感知するセンサータンパク質が速やかに活性化して unfolded protein response (UPR) と呼ばれるシグナル伝達系を駆動させてシャペロンなどを誘導し、また、小胞体関連分解(ERAD)機構によって変性タンパク質を速やかに排除・分解することで恒常性を保っている。一方、過度のストレスが負荷された際には、UPR が持続的に活性化し、神経細胞死が惹起される可能性を明らかにしてきた(PNAS 2013; Sci. Rep. 2015)。

### 2. 研究の目的

未だ解決されていない問題の一つとして、長時間に渡る小胞体ストレス環境が及ぼす細胞の質的な変化がある。例えば、ヒト神経変性疾患において、病態発症までの時間軸を考慮すると、ごく短時間での影響よりは、むしろ長時間/長期間によって起こり得る現象を解析する必要がある。そこで、本研究ではこれまで着目されてこなかった UPR 活性化後に起こる神経細胞の機能的/質的な変化を追求し、病態との関連性を明らかにすることに挑戦する。

UPR によって発現が上昇するユビキチン(Ub)E3 リガーゼの一つに HRD1 がある。一過性発現などの短期間では HRD1 は A $\beta$  産生を制御していることが報告(Kaneko ら JN 2010; Tanabe ら JBC 2012。ただし両者の結果は相反している)されているが、A $\beta$  分解系への影響に関する報告はこれまでに無い。申請者は初期的検討から、1) 神経細胞における HRD1 の基質探索を網羅的に行った結果、インスリン分解酵素(IDE)の特定に成功した。2) IDE は HRD1 によって K11Ub 化修飾を受ける可能性を発見した。興味深いことに、3) Ub 化 HRD1 はプロテアソームによる分解を受けず、4) エクソソームを介して細胞外に分泌され、この修飾は酵素活性を負に調節していることを強く示唆する結果を得た。これらの初期的知見を詳細に検討し、小胞体ストレスとアルツハイマー病発症(とくに A 蓄積)との因果関係を紐解くことにチャレンジする。

### 3. 研究の方法

#### 1) HRD1 による基質タンパク質のユビキチン化と細胞内局在変化

以下の研究から、IDE の Ub 鎖形成の意義、とくに細胞内局在と分解への影響を明らかにする。

HRD1 結合タンパク質の網羅的同定: HRD1 を高発現させたモデル及び初代培養神経細胞に対して、HRD1 抗体を用いて免疫沈降を行う。次に、免疫沈降物を SDS-PAGE で分離後、MASS 解析から同定を試みる。

動物細胞内での結合の確認: 申請者は先行して初期的検討を行い、HRD1 に結合するタンパク質としてインスリン分解酵素(IDE)の単離に成功している。そこで、動物細胞内で強制発現系ならびに内在性タンパク質同士が結合するか否かを確認する。

結合部位の同定: E3 リガーゼである HRD1 のどの部位が IDE との結合に必要なか、逆に、IDE のどの部位が HRD1 との会合に必要なかを様々な欠失変異体を構築して、検討する。

Ub 化の有無: 結合が確認出来た基質候補に関しては、動物細胞内で確かに HRD1 によってポリ Ub 化されるか否かを検討する。その際に観察される HRD1 依存的なポリ Ub 化によって IDE の寿命(タンパク質分解)にどのような変化がもたらされるのかを明らかにする。さらに、IDE のどのリジン残基がポリ Ub 化されるかについても証明する。

細胞内局在: 修飾を受ける Ub 鎖の種類によっては、細胞内の局在が大きく変化するケースがある。そこで、の結果を踏まえて、細胞内での局在が変化するか否か免疫組織化学的に検討する。

#### 2) HRD1 による IDE の Ub 化/それによる局在や酵素活性への影響

HRD1 による IDE の Ub 化の細胞内局在と酵素活性への影響を検討し、その意義について明らかにする。

Ub鎖の同定(Ubコード決定): HRD1によって形成される結合Ub鎖の特徴をすべてのUb変異体を用いて生化学的手法から明らかにする。また、MASS解析からUb鎖の結合様式を特定するとともに、TUBE(Tandem Ubiquitin Binding Entity)を用いた解析からUbが何分子結合しているのかを明らかにする。

Ub化による細胞内局在・エクソソーム内包への影響: IDEはエクソソームによって一部が内包されて細胞外へ分泌されているが、これにはIDEのC末端側に存在するSlyXモチーフの関与が重要であることを確認した。エクソソームは様々なタンパク質やmiRNAなどを包含しており、多岐に渡る細胞間情報伝達に関与していることが示唆されている。しかしながら、含有タンパク質に関してはどのような修飾がエクソソーム内移行に重要なのかは不明である。初期的研究から、細胞質に局在しているIDEはHRD1との共発現によって、ドット状に集積することを明らかにした。これが、エクソソームに連関する後期/多胞性エンドソームなのかを特異的マーカータンパク質との共染色から明らかにする。さらに、HRD1活性抑制変異体を発現させて、で決定したUbコードとの関係を明らかにする。

Ub化によるエクソソームを介した細胞外輸送への影響: IDEのUb化がエクソソームを介した細胞外分泌にどのように関与しているのかを明らかにする目的で、まず初めに、IDEのUb化部位欠失変異体を使用して、蛍光免疫染色法から細胞内局在変化を検討する。さらに、細胞外に分泌された培地中のエクソソームを遠心分離によって回収し、含有IDEのUb化を検出する。また、種々のHRD1及びIDE変異体を発現した際に、エクソソームを介したIDEの分泌量に差が現れるか否かをELISAで調べる。加えて、IDEのC末に存在するSlyXモチーフ配列を含むタンパク質をヒトゲノムから探索し、IDEと同様に、Ub化を受けてエクソソームに内包されているか否かを明らかにする。順調に進捗した際には、種々のADモデル動物の脳組織におけるIDEのUb化を調べる。

A 蓄積への影響: まず、野生型およびUb化IDEの $A\beta$ 分解活性を*in vitro*において調べる。次に、初代培養神経細胞やモデル神経細胞において野生型あるいは抑制変異型HRD1を発現させ、細胞内、細胞外(培地中)、および精製エクソソーム中のIDE活性を測定する。さらに、小胞体ストレスを負荷させてHRD1を誘導した際の $A\beta$ 分解活性ならびに $A\beta$ 量についても同様に検討する。

#### 4. 研究成果

本研究課題は、長時間に渡る小胞体ストレス環境が及ぼす細胞の質的な変化を解くことを目的としたものである。ヒトの病態、例えば神経変性疾患や癌などは、発症までに一般的に長期間要すると考えられている。そこで、本研究では小胞体ストレスの中、小胞体ストレス応答(UPR)(シグナル)そのものではなく、その活性化後に惹起される神経細胞の機能的/質的な変化を追求し、病態との関連性を明らかにすることに挑戦した。

まずはじめに、私たちは、ユビキチンE3リガーゼの基質として $A$ 分解酵素(プロテアーゼ)の一つを同定することに成功した。本E3酵素によって、当該基質タンパク質はポリユビキチン化されるものの、プロテアソームによる分解を受けないことが明らかとなった。そこで、ユビキチン鎖の特徴を解析するために、遺伝子改変型ユビキチンを発現させて、細胞内での動向を検討した。その結果、プロテアソーム感受性のK48ではない、ある種のユビキチン修飾が起こっていることが明らかとなった。本基質タンパク質の酵素活性を人工的 $A$ ペプチドの水解活性から求めたところ、E3リガーゼの有無、ユビキチン修飾の有無によって、有意に抑制されることがわかった。さらに、興味深いことに、本基質タンパク質は通常では細胞質全体に存在しているものの、E3リガーゼ共存下では核周囲にドット状に集積することを認めた。この局在は抗ユビキチン抗体陽性でもあった。また、本基質タンパク質はエクソソームを介して細胞外に分泌されるとの報告があったため、ユビキチン修飾との関係を調べた。まず、ユビキチン化部位を欠失させた変異体を発現した細胞では、細胞外に分泌される酵素量が有意に低下することがわかった。

したがって、小胞体ストレス環境下では、ある種のE3リガーゼが高発現し、基質をユビキチン化することで細胞内局在を変化させて、酵素活性を調節している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) Takasugi, N., Hiraoka, H., Nakahara, K., Akiyama, S., Fujikawa, K., Nomura, R., Furuichi, M., and Uehara, T. Emerging role of electrophiles as a key regulator for endoplasmic reticulum (ER) stress. *Int. J. Mol. Sci.* 20(7), E1783, 2019. (査読有り)
- 2) Nakahara, K., Fujikawa, K., Hiraoka, H., Miyazaki, I., Asanuma, M., Ito, A., Takasugi, N., and Uehara, T. Attenuation of macrophage migration inhibitory factor-stimulated signaling via S-nitrosylation. *Biol. Pharm. Bull.* 2019 in press (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 秋山菜里、池尻七望、柴田万里、藤河香奈、高杉展正、柴田貴広、内田浩二、上原 孝: 小胞体レクチンシャペロン calreticulin の酸化による機能制御 第18回日本NO学会 2018
- 2) Takashi Uehara: A novel mechanism of nitric oxide-induced gene expression. WCP2018 KYOTO Satellite Symposia (招待講演)(国際学会) 2018
- 3) 上原 孝: 酸化/ニトロソ化ストレスによる神経障害機構 第55回広島神経医学研究会 (招待講演) 2018年

〔図書〕(計3件)

- 1) 高杉展正, 上原 孝: 実験医学 羊土社 6ページ 2018
- 2) 奥田洸作, 高杉展正, 上原 孝 脳神経化学 化学同人 10ページ 2018
- 3) 平岡秀樹, 上原 孝: 生体の科学 医学書院 2ページ 2018

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 [http://owl.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/yakuri/Uehara\\_Lab/Welcome.html](http://owl.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/yakuri/Uehara_Lab/Welcome.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。