

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590094

研究課題名(和文)ポリグルタミン病における小胞体分子シャペロン発現調節機構の解析と治療への応用

研究課題名(英文) Regulation of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 expression in expanded polyglutamine diseases

研究代表者

山岸 伸行 (Yamagishi, Nobuyuki)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60298685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：伸長ポリグルタミン病は、疾患原因遺伝子内のCAGリピートが伸長することにより生じる伸長ポリグルタミン鎖含有タンパク質の凝集を特徴とする遺伝性神経変性疾患であり、このタンパク質凝集体が他の細胞内タンパク質の機能低下を誘発することが発症原因であると考えられている。本研究では、(1)我々が明らかにしてきた伸長ポリグルタミン病モデル細胞での小胞体分子シャペロンGRP78の発現減少がユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解の促進に起因すること、および(2)漢方薬からのGRP78発現調節物質の探索し、甘草の主成分の一つであるナリンゲニンをGRP78発現誘導物質として見出した。

研究成果の概要(英文)：Polyglutamine (polyQ) diseases are inherited neurodegenerative diseases characterized by the aggregation of proteins containing expanded polyQ tract. It has been shown that expanded polyQ tract-containing proteins impair the functions of other cellular proteins. In this study, (1) we found that the decreased GRP78 expression in the cells expressing EGFP-polyQ97 was due to the enhanced protein degradation of GRP78 through the ubiquitin-proteasome pathway, and (2) performed the screening for compounds that modulate the GRP78 expression in herbal medicines, and found that naringenin, one of the major constitutions of Kanzo (Glycyrrhizae Radix), induced the expression of GRP78 in several mammalian cells.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：神経変性疾患 小胞体ストレス GRP78

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞踏病をはじめとするポリグルタミン病などの神経変性疾患は、特定の神経細胞死を誘導することにより痴呆・運動失調・筋力低下などそれぞれの疾患に特有の症状を示す難病であるが、これらを根治させる治療法は現在までに確立されていない。近年、これら神経変性疾患の共通の病態として異常な構造を持つタンパク質凝集体が神経細胞に蓄積することが明らかになり、タンパク質のフォールディングや凝集抑制に関わる分子シャペロンが様々な神経変性疾患の共通の治療ターゲットとして注目されている。しかしながら、ポリグルタミン病をはじめとする神経変性疾患において分子シャペロンの発現や機能低下に関する報告はされていなかった。研究代表者は、これまでにポリグルタミン病の共通モデル細胞として、テトラサイクリン添加により伸長ポリグルタミン鎖（伸長 PolyQ 鎖）発現を調節できる細胞株を樹立し、そのプロテオーム解析の結果、伸長 PolyQ 鎖の発現・凝集体形成に伴い小胞体分子シャペロン GRP78 の発現低下がみられることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果に基づきポリグルタミン病モデル細胞における GRP78 発現減少機構を明らかにし、GRP78 高発現がポリグルタミン病の治療標的となりうるか検討するとともに、天然物成分より新規 GRP78 発現誘導物質を探索し、その有用性について検討する。

## 3. 研究の方法

(1)ポリグルタミン病モデル細胞での GRP78 発現減少機構の解明：ポリグルタミン病モデル細胞における GRP78 遺伝子発現を転写調節および翻訳・翻訳後調節の観点から検討する。

具体的には、リアルタイム PCR による GRP78 mRNA の定量、GRP78 遺伝子上流配列を組み込んだレポータープラスミドによる GRP78 プロモーター活性の定量、<sup>35</sup>S]メチオニンパルスラベル法による GRP78 タンパク質の合成量および分解量などを伸長 PolyQ 鎖の発現の有無で比較する。

(2)既知 GRP78 誘導物質のポリグルタミン病モデル細胞での有用性の検討：GRP78 遺伝子上流配列を組み込んだレポータープラスミドを C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入して取得し多安定発現株を用いて、これまでにインドメタシンなどの非ステロイド性抗炎症薬が GRP78 発現を誘導することを見出しているため、これらの薬剤が伸長 PolyQ 鎖によるタンパク質の凝集体形成や細胞死に対する影響を検討する。

(3)新規 GRP78 誘導物質の探索とポリグルタミン病モデル細胞での有用性の検討：GRP78 遺伝子上流配列を組み込んだレポータープラスミドを導入した C3H10T1/2 細胞を用いて、特に抗炎症作用を有する天然物抽出物について GRP78 発現誘導活性を検討し、新規 GRP78 誘導物質を探索する。また、同定できた物質について、ポリグルタミン病モデル細胞およびモデルマウスにおける疾患治療効果を検証する。

## 4. 研究成果

(1)ポリグルタミン病モデル細胞での GRP78 発現減少機構の解明：伸長 PolyQ 鎖の発現に伴う GRP78 発現減少機構を明らかにするために、まず mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討したが、伸長 PolyQ 鎖発現の有無により発現量に差が見られなかった。そこで次に、<sup>35</sup>S]メチオニンパルスラベル法にて、GRP78 タンパク質の合成量および分解量を検討した。その結果、GRP78 タンパク質合成量

は、伸長 PolyQ 鎖発現の有無により差が見られなかったが、分解量は明らかに増大していた。また、プロテアソーム阻害剤である MG-132 またはラクタシスチンを培養液に加えておくと、伸長 PolyQ 鎖発現による GRP78 の発現低下が抑制された。以上の結果から、伸長ポリグルタミン含有タンパク質の発現による GRP78 の発現減少は、翻訳後レベル、特にユビキチン プロテアソーム系によるタンパク質分解が関与することが明らかになった。

(2)既知 GRP78 誘導物質のポリグルタミン病モデル細胞での有用性の検討：これまでに非ステロイド性抗炎症薬であるインドメタシンおよびスリンダックの活性代謝物であるスリンダックスルフィドが GRP78 発現を誘導することが明らかになってきたが、これらの薬剤処理により伸長 PolyQ 鎖によるタンパク質の凝集体形成や細胞死が抑制されることが明らかになった。一方、抗炎症作用をもつサリチル酸、ノルジヒドログアイアレチン酸、アセクロフェナックなどでは GRP78 発現は誘導されなかった。また、スリンダックによる GRP78 発現の誘導は、COX 阻害活性を持たないスリンダックスルホンでも認められ、伸長 PolyQ 鎖によるタンパク質の凝集体形成も抑制した。以上のことから、インドメタシンおよびスリンダックによる GRP78 発現誘導には COX 阻害活性などの抗炎症作用ではなく、これらの物質に共通した構造が関与している可能性が考えられた。

(3)新規 GRP78 誘導物質の探索とポリグルタミン病モデル細胞での有用性の検討：GRP78 遺伝子上流配列を組み込んだレポータープラスミドを導入した C3H10T1/2 細胞を用いて、約 50 種類の漢方薬抽出液の GRP78 発現誘導活性を検討したところ、10 種類の抽出液が GRP78 発現誘導活性を有することが分かった。

これらの漢方薬の構成生薬を検討し、共通して含有する柴胡、桂皮、生姜、甘草、芍薬の水およびエタノール抽出液について同様の検討をしたところ、甘草の水およびエタノール抽出液のみ GRP78 発現誘導活性が認められた。さらに、甘草抽出液の主成分と考えられるグリチルルチン酸およびナリンゲニンとそれらの配糖体に関して検討したところ、ナリンゲニンにのみ GRP78 発現誘導活性が認められた。また、ナリンゲニン処理はポリグルタミン病モデル細胞での伸長 PolyQ 鎖によるタンパク質の凝集体形成を抑制できることがわかった。さらに、ポリグルタミン病の一つである球脊髄性筋萎縮症モデルマウスにナリンゲニンを継続的に経口摂取させたところ、ロータロッド試験による運動能力低下の改善および寿命延長効果が認められる傾向にあった。さらに検討を続ける必要があるが、これらの結果は、GRP78 の発現誘導が未だ確立した治療法がないポリグルタミン病に関して治療効果が期待できるものであると考えられた。また、ポリグルタミン病モデル細胞と同様に GRP78 の発現低下が 1 型および 2 型糖尿病動物の肝臓でも認められていることから、ナリンゲニンの血糖値に対する影響についても検討したところ、ナリンゲニンの継続的な投与によりグルコース負荷後の血糖値の上昇が抑えられるなどの結果が得られており、今後ナリンゲニンの小胞体ストレス応答異常が関与する疾患への応用が期待できると考えられる。

## 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)

[雑誌発表] (計 4 件)

Y.Nakayama, Y.Saito, S. Soeda, E.Iwamoto, S.Ogawa, N.Yamagishi, T.Kuga, N.Yamaguchi, Genistein induces cytokinesis failure through

RhoA delocalization and anaphase chromosome bridging. J Cell Biochem 115, 763-771 (2014) 査読あり

doi: 10.1002/jcb.24720.

N.Yamagishi, Y.Yamamoto, C.Noda, T.Hatayama, Naringenin inhibits the aggregation of expanded polyglutamine tract-containing protein through the induction of endoplasmic reticulum chaperone GRP78. Biol Pharm Bull 35, 1836-1840 (2012) 査読あり

N.Yamagishi, S.Magara, S.Tamura, Y.Saito, T.Hatayama, Endoplasmic reticulum chaperone GRP78 suppresses the aggregation of proteins containing expanded polyglutamine tract. Biochem Biophys Res Commun 422, 527-533 (2012) 査読あり

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.078

N.Yamagishi, T.Ueda, A.Mori, Y.Saito, T.Hatayama, Decreased expression of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in liver of diabetic mice. Biochem Biophys Res Commun 417, 364-370 (2012) 査読あり

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.118.

#### [学会発表] (計3件)

海堀祐一郎, 山岸伸行, 畑信二, 中島由利恵, 久家貴寿, 齊藤洋平, 中山祐治: 小胞体分子シャペロン GRP78 による伸長ポリグルタミン鎖含有タンパク質の凝集抑制. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会 2014年10月, 京都

山本洋子, 野田知加, 山岸伸行, 齊藤洋平, 中山祐治, 畑山 巧: 漢方薬成分からの小胞体分子シャペロン GRP78 誘導物質の検索. 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 2012年10月, 西宮

山岸伸行, 野田知加, 山本洋子, 齊藤洋

平, 畑山 巧: ナリンゲニンによる小胞体分子シャペロン GRP78 の発現誘導. 日本薬学会第132年会 2012年3月, 札幌

[その他]

ホームページ

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labp/seika/index.htm>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山岸 伸行 (YAMAGISHI NOBUYUKI)  
京都薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号 60298685

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

畑山 巧 (HATAYAMA TAKUMI)  
京都薬科大学・薬学部・名誉教授  
研究者番号 10094484