

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究(C)(一般)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590073

研究課題名(和文)

神経変性疾患に関わる小胞体ストレス関連分子の制御と医薬としてのケミカルシャペロン

研究課題名(英文) Function of endoplasmic reticulum stress-related molecule, and effects of chemical chaperon involved in 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：

小胞体ストレスが関与する神経変性疾患との観点でユビキチンリガーゼの一種である新規遺伝子 HRD1 はパーキンソン病で脱落が認められる黒質緻密層周辺のドパミンニューロンに発現していた。さらに、大脳皮質、海馬などにも発現していた。蛋白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 4-PBA の誘導体および他の物質について、4-PBA と同等それ以上のケミカルシャペロン能を有する化合物が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2000000	600000	2600000
2008年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

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、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その治療法は対症療法であり、治療法が確立されているとは言い難い。脳・神経変性疾患の治療についてはいずれも対症療法であり、それは発症の原因・発症を防止する機構の解明が遅れていることにも起因する。一方、このような疾患では小胞体に異常蛋白質の蓄積・凝集が認められている。小胞

体は蛋白質の折りたたみや修飾、細胞内カルシウムの貯蔵などの生理機能を担う細胞内小器官であり、この小胞体に変性した蛋白質が蓄積した状態を小胞体ストレスといい、小胞体ストレスがこれら脳・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<sup>1)</sup>, 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<sup>1)</sup>。さらに、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。私たちはごく最近、HRD1がマウス脳黒質緻密層にPael-Rとともに局在すること、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<sup>2)</sup>。

このような小胞体ストレスと神経細胞死の関連において、ごく最近小胞体シャペロンである protein-disulfide isomerase (PDI) は一酸化窒素NOによりニトロソ化修飾されることで活性が低下し、不良蛋白質の蓄積/小胞体ストレスが生じ、細胞死を来すこと。さらにパーキンソン病の患者の脳にPDIのニトロソ化修飾が増加している所見が報告された<sup>3)</sup>。

また、私たちはごく最近、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、Pael 受容体蓄積および小胞体ストレスや脳虚血による神経細胞死を抑制できることを明らかにした<sup>4)</sup>。私たちの報告の後、ごく最近、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<sup>5)</sup>。

1. Kaneko, M., Ishiguro, M., Niinuma, Y., Uesugi, M. and Nomura, Y.: Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation. **FEBS Lett.** 532, 147-152 (2002).
2. Omura T, Kaneko M, Okuma Y, Orba Y, Nagashima K, Takahashi R, Fujitani N, Matsumura S, Hata A, Kubota K, Murahashi K, Uehara T, Nomura Y. A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin. **J Neurochem** (in press)
3. Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. **Nature** 441:513-517(2006)
4. Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, Uesugi M, Uehara T, Hosoi T, Nomura Y.: Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. **J Neurochem** 97(5):1259-68 (2006)
5. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science.** 313:1137-1140(2006)

## 2. 研究の目的

本研究の目的として、小胞体ストレスが関与する神経変性疾患との観点でユビキチンリガーゼの一種である新規遺伝子 HRD1 の機能解析を行うこと。さらに、4-PBA の誘導体および他の分子についてケミカルシャペロン機能を解析することで、神経変性疾患に対する新しい治療薬のターゲットとしての小胞体・変性蛋白質分解機構、および治療薬としてのケミカルシャペロン機能を明らかにする目的で以下について検討する。

(1) HRD1 について、A) マウス脳内組織局在を詳細に検討することで他の神経変性疾患との関与を検討する。B) 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、ならびに、HRD1 のターゲット

である基質蛋白質および HRD1 と相互作用する蛋白質を検索・同定する。(2) 神経変性疾患発症に、グルタミン酸の過剰遊離 → NMDA 受容体 → 一酸化窒素 NO 産生 → HRD1 の S-ニトロシル化修飾/活性低下 → 変性タンパク質蓄積 → 神経細胞死 という仮説が成立する可能性を検討する。(3) 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が、どのような神経変性疾患に有用であるかを、in vitro および iv vivo の病態モデルを用いて明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 変性蛋白質の分解に促進的に関与する新規ユビキチンリガーゼHRD1について、抗HRD1抗体を用いてHRD1のマウス脳免疫組織化学的検討を行い、小胞体ストレスとの関与が考えられる神経変性疾患との関連についてその局在を詳細に検討する。
- (2) HRD1分子の領域特異的欠失変異体を構築し、膜貫通領域、RING-finger領域、proline-rich領域の役割について、HRD1の詳細な機能解析を進める。具体的には、安定発現株にPael受容体を強制発現させること、または小胞体ストレスを惹起させる試薬を作用することで、HRD1のタンパク質分解促進機能に影響を与えるか否かについて検討する。
- (3) 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 (HRD1と同様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。そこで、HRD1のターゲットである基質蛋白質およびHRD1と相互作用する蛋白質を、とくに神経変性疾患に関連する蛋白質を中心

に検索・同定する。

- (4) 一酸化窒素NOによりユビキチンリガーゼであるHRD1がS-ニトロシル化修飾/活性低下を受ける可能性について、NOを発生する試薬NOドナーを用いて、HRD1のユビキチンリガーゼ活性修飾およびHRD1がS-ニトロシル化修飾されるかを検討する。
- (5) 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。

[連携研究者]

千葉科学大学・薬学部・教授、浜名 洋:4-PBA誘導体の設計および合成

### 4. 研究成果

小胞体ストレスが関与する神経変性疾患との観点でユビキチンリガーゼの一種である新規遺伝子 HRD1 の機能解析を行うこと。さらに、4-PBA の誘導体および他の分子についてケミカル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し、神経変性疾患に対する新薬開発における新しい治療薬のターゲットとしての小胞体・変性蛋白質分解機構、および治療薬としてのケミカルシャペロン機能を明らかにすることを目的で研究を行い、以下の成績を得た。

- (1) 変性蛋白質の分解に促進的に関与する

新規ユビキチンリガーゼ HRD1 について、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、HRD1はパーキンソン病で脱落が認められる黒質緻密層周辺のドパミンニューロンに発現していた。さらに、大脳皮質、海馬(歯状回、CA領域)、線条体および淡蒼球、そして小脳プルキンエ細胞にも発現していることを見出した。一方で、グリア細胞には発現していなかったことから、HRD1は脳内においては神経細胞特異的に発現していることが明らかとなった。また、HRD1にはパーキンソン病以外にも神経変性疾患に関与する可能性が示唆された。

- (2) 変性蛋白質の分解に促進的に関与する新規ユビキチンリガーゼ HRD1 について、分子内にユビキチンリガーゼ活性以外の、折り畳み不完全の蛋白質の分解に関与する領域、蛋白質輸送に関与する領域などを有していることが明らかとなった。
- (3) HRD1のターゲットである基質蛋白質およびHRD1と相互作用する蛋白質を、とくに神経変性疾患に関連する蛋白質を中心に検索したところ、いくつかの小胞体シャペロンとの結合が認められたことから、現在さらに詳しい解析を行っている。
- (4) 一酸化窒素 NO によりユビキチンリガーゼであるHRD1がS-ニトロシル化修飾/活性低下を受ける可能性について、NOを発生する試薬NOドナーを用いて、HRD1のユビキチンリガーゼ活性修飾およびHRD1がS-ニトロシル化修飾されるかを検討した結果、HRD1分子のS-ニトロシル化修飾が認められたが、その修飾は比較的弱いものであった。
- (5) 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 4-PBAの誘導体および他の物質(共同研究にて化学合成した)についてケミカルシャペロンの作用機

構を検討した結果、アルコール数の変化、あるいは炭素数を変化させることで、4-PBAと同等それ以上のケミカルシャペロン能を有する低分子有機化合物が得られた。現在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目的で、小胞体ストレスにより誘導される細胞死に対する保護作用における検討を行っている。

## 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)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Hosoi T, Hyoda K, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K. Inhibitory effect of 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride on PI3K inhibitor-induced CHOP induction. *Eur J Pharmacol* 554 (1): 8-11 (2007)
- ② Hosoi T, Hyoda K, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K. Geldanamycin induces CHOP expression through a 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF)-responsive serine protease. *Cell Res* 17(2):184-186 (2007).
- ③ Tomobe K, Okuma Y, Nomura Y. Impairment of CREB phosphorylation in the hippocampal CA1 region of senescence-accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Res* 1141(1): 214-217 (2007)
- ④ Hosoi T, Hyoda K, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K. Akt up- and down-regulation in response to endoplasmic reticulum stress. *Brain Res* 1152(1): 27-31 (2007)
- ⑤ Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, Taniguchi T, Yoshimoto K, Kaneko M, Okuma Y, Taira T, Ariga H, Shimohama S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J Neurochem* 101(6):1491-1504 (2007)
- 6 Kaneko M, Yasui S, Niinuma Y, Arai K, Omura T, Okuma Y, Nomura Y. A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett* 581(28):5355-5360 (2007)
- 7 Omura T, Kaneko M, Tabei N, Okuma Y, Nomura Y.: Immunohistochemical localization of a ubiquitin ligase HRD1 in murine brain. *J*

Neurosci Res 86(7):1577-1587 (2008)

- 8 Omura T, Kaneko M, Onoguchi M, Koizumi S, Itami M, Ueyama M, Okuma Y, Nomura Y.: Novel functions of ubiquitin ligase HRD1 with transmembrane and proline-rich domains. J Pharmacol Sci 106(3):512-519 (2008)
- ⑨ Shimizu M, Matsumoto Y, Kurosawa T, Azuma C, Enomoto M, Nakamura H, Hirabayashi T, Kaneko M, Okuma Y, Murayama T.: Release of arachidonic acid induced by tumor necrosis factor-alpha in the presence of caspase inhibition: evidence for a cytosolic phospholipase A2alpha-independent pathway. Biochem Pharmacol 75(6):1358-1369 (2008)
- ⑩ Nabemoto M, Mashimo M, Someya A, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Kaneko M, Okuma Y, Saito T, Yamaguchi N, Murayama T.: Release of arachidonic acid by 2-arachidonoyl glycerol and HU210 in PC12 cells; roles of Src, phospholipase C and cytosolic phospholipase A(2)alpha. Eur J Pharmacol 590(1-3):1-11. (2008)
- ⑪ Hosoi T, Saito A, Kume A, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K.: Vanadate inhibits endoplasmic reticulum stress responses. Eur J Pharmacol 594(1-3):44-48. (2008)

[学会発表] (計 19 件)

国際学会

- ① L. Zhan, Y. Okuma, T. Hosoi, Y. Nomura. Stress-induced Schlafen-8 Expression in the Brain  
The ASPN symposium supported by ISN on "Glial Activation and Fundtion" 2007/10/18-10/20 Dalian, China
- ② M. Kaneko, T. Omura, H. Koike, Y. Okuma, Y. Nomura. Suppression of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and  $\beta$ -amyloid generation with endoplasmic reticulum stress and apoptosis. Society for Neuroscience 2008 Annual meeting. 2008/11/14-11/19 Washington D.C.
- ③ Y. Okuma, T. Omura, M. Kaneko, Y.

Nomura. The brain distribution of a ubiquitin ligase HRD1 in mice.

Society for Neuroscience 2008 Annual meeting. 2008/11/14-11/19 Washington D.C.

国内学会

- ④ 大村友博、金子雅幸、大熊康修、野村靖幸：小胞体関連分解(ERAD)関連ユビキチンリガーゼ HRD1 による Pael-受容体の分解機構の解析、第 80 回日本薬理学会年会 2007. 3. 14-16、名古屋市
- ⑤ 金子雅幸、大熊康修、野村靖幸：小胞体の変性蛋白質分解関連分子 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 2007. 6. 8-9、出雲市
- ⑥ 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を抑制する、第 50 回日神経化学学会大会 2007. 9. 10-12、横浜市
- ⑦ 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 2008. 3. 17-19、横浜市
- ⑧ 本多美那、細井徹、高桑美冴、大熊康修、野村靖幸、小澤光一郎：小胞体ストレスの免疫機能に対する関与の可能性、第 81 回日本薬理学会年会 2008. 3. 17-19、横浜市
- ⑨ 三森盛亮、飯田博一、五十嵐麻美子、浜名洋、金子雅幸、坪山沙有里、齋藤弓子、大村友博、大熊康修、松本澄、4-フェニル酪酸構造類似体の合成とそのケミカルシヤペロン活性の解析、日本薬学会第128年会 2008. 3. 27-29、横浜市
- ⑩ 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 2008. 3. 27-29、横浜市
- ⑪ 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 に関与する SEL1 の脳内発現、日本薬学会第128年会 2008. 3. 27-29、横浜市
- ⑫ 大谷芳代、細井徹、糸綾香、齊藤敦、大熊康修、野村靖幸、小澤光一郎：利尿薬アミロライドが及ぼす小胞体ストレス応答への影響、日本薬学会第128年会 2008. 3. 27-29、横浜市

- ⑬ 多武保泰治、細井徹、堀江直裕、大熊康修、野村靖幸、小澤光一郎：新規小胞体ストレス関連遺伝子の同定および解析、日本薬学会第128年会 2008. 3. 27-29、横浜市
- ⑭ 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 $\beta$ の産生増加を引き起こす。第51回日本神経化学学会大会 2008. 9. 10-13、富山市
- ⑮ 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 2008. 10. 4、第119回日本薬理学会関東部会 東京都
- ⑯ 金子雅幸、小池洋、齋藤 僚、大熊康修、野村靖幸小胞体のユビキチンリガーゼHRD1の減少はAPPの蓄積とA $\beta$ 産生増加を引き起こす、第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18、横浜市
- ⑰ 大村友博、金子雅幸、小野口雅之、野村靖幸、大熊康修、HRD1はユビキチンリガーゼ活性のみならず他の機能も有する蛋白質である、第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18、横浜市
- ⑱ 三森盛亮、飯田博一、清水真希、金子雅幸、田窪裕介、齋藤弓子、池永枝里花、大村友博、大熊康修、浜名洋、4-フェニル酪酸構造類似体の合成と解析、日本薬学会第129年会 2009. 3. 26-28、京都市
- ⑲ 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 2009. 3. 26-28、京都市

## 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