

平成22年1月25日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成19年度～平成20年度

課題番号：19790070

研究課題名（和文） 小胞体の蛋白質分解系遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of genes involved in endoplasmic reticulum-associated degradation

研究代表者

金子 雅幸（Masayuki Kaneko）

千葉科学大学・薬学部・講師

研究者番号：10322827

研究成果の概要：

HRD1の発現抑制は、APPとA β の増加をもたらすと同時に、小胞体ストレスと神経細胞死を誘発することを示めし、AD患者の大脳皮質において、HRD1タンパク質が低下していることを明らかにした。さらに、APPの分解に関与する新規ユビキチンリガーゼも新たに見出した。また、小胞体ストレス応答転写因子ATF6とXBP1がAPPの分解を促進し、A β の産生を減少させることを明らかにした。さらに、HRD1やSEL1、Kf-1を含むERAD分子は、脳神経細胞に発現していることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,900,000	0	1,900,000
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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：小胞体ストレス，ERAD，アルツハイマー病，ユビキチンリガーゼ，APP，小胞体，ニューロン，神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

小胞体は膜タンパク質や分泌タンパク質の折りたたみや糖鎖修飾，ジスルフィド結合の形成を行う細胞内器官である。この小胞体の機能が障害されると、成熟が不完全なタンパク質が小胞体に蓄積する。この状態は小胞体ストレスと呼ばれ、これに対して細胞は様々な防御機構を作動させる。はじめにリボソームでのタンパク質合成を抑制し、小胞体

に流入するタンパク質を減少させる。つぎに、小胞体シャペロンを誘導し、折りたたみ不全タンパク質の修復を行う。最後に、修復しきれなかったタンパク質を小胞体から細胞質に排出し、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解除去する。これは小胞体関連分解（ER-associated degradation; ERAD）と呼ばれている。これらの応答機構は、変性タンパク質の蓄積をシグナルとして、小胞体膜上

のストレスセンサー分子によって小胞体内腔から小胞体外に伝達され、遺伝子が誘導されることで起こる。小胞体ストレスが関与すると考えられる疾患は様々な報告があり、アルツハイマー病やパーキンソン病、ポリグルタミン病などの神経変性疾患の他、脳虚血、双極性うつ病、糖尿病、リウマチなどがあり、このほかにも多くの疾患に関与する可能性が予想される。

私は、ERAD の抗小胞体ストレス作用に着目してきた。その中で、ERAD に関与するヒト新規遺伝子 HRD1 のクローニングに成功しており、その小胞体局在性、および抗小胞体ストレス作用を証明していた。さらに HRD1 はパーキンソン病の原因タンパク質の一つと考えられる Pael 受容体の分解を促進し、Pael 受容体蓄積による神経細胞死を抑制することを示していた。さらに、HRD1 によってアルツハイマー病に関連する APP (アミロイド前駆体タンパク質) のタンパク質分解が促進され、 $A\beta$ の産生が減少することも見出していた。また私は、HRD1 が脳の海馬、黒質緻密層、ならびに小脳プルキンエ細胞が存在することを免疫組織化学的に明らかにしていた。

そこで私は、ERAD と神経変性疾患の関係についてさらに詳細に検討するため、小胞体ストレスによって誘導される HRD1 様の ERAD 遺伝子を同定・クローニングし、その機能について HRD1 と比較解析するという、本研究を計画した。それまで私は、ERAD に関与する遺伝子について、バイオインフォマティクス的手法により同定し、新規のものを含む 8 個の遺伝子のクローニングに成功していた。本研究では、さらにそれらの分子について、HRD1 との構造の違いによる機能の差について比較するため、これまで分かっている HRD1 の基質、Pael 受容体や APP を用いて、基質特異性に関して明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下のような新規 ERAD の分子機構と生体での生理的役割、とくに神経変性疾患防御への役割について検討した。

- (1) バイオインフォマティクスを用いた網羅的解析より同定した HRD1 様の新規 ERAD 分子の機能解析および HRD1 との機能差や基質特異性について比較検討する。とくに、膜貫通領域の役割や小胞体シャペロンを介した基質認識機構に関して詳細に解析する。
- (2) ERAD 遺伝子の特徴 (組織分布・細胞内局在) について検討する。とくに、神経変性疾患患者脳での量的、および脳内分布の変化を健常ヒトと比較する。

- (3) ERAD 遺伝子を高発現するトランスジェニックマウスを用いることで、ヒトでのパーキンソン病、アルツハイマー病発症への ERAD の関与を検討する。

3. 研究の方法

- (1) バイオインフォマティクスの解析より同定した推定の ERAD 関連遺伝子を哺乳類細胞に過剰発現させることによって、小胞体ストレスによる細胞死が抑制されるかを検討する。さらに、siRNA を用いて ERAD 遺伝子の発現抑制を行い、小胞体ストレスに対してより脆弱になるか、小胞体ストレス抵抗性に対する寄与を調べる。
- (2) クローニングした ERAD 分子の細胞内局在について、小胞体に局在するか否か免疫染色によって確認する。さらに、どのような組織に分布しているか mRNA の発現量について解析を行う。また、ポリクローナル抗体の作成を行う。
- (3) ERAD を高発現するトランスジェニックマウスを作成する。
- (4) 新規 ERAD 分子が、小胞体に局在する神経変性疾患の原因タンパク質 (APP と Pael 受容体) の除去に有効であるかを検討する。
- (5) 新規 ERAD 分子の特徴的構造を除いた変異体を用いて、基質タンパク質に対する結合能や分解促進能について検討する。また、膜貫通領域領域を欠損した変異体を作成し、基質タンパク質に対する分解促進作用や逆行輸送能について検討する。
- (6) 新規 ERAD 分子の基質認識機構に関して明らかにするため、小胞体シャペロン群と相互作用するか、免疫沈降法などを用いて検討する。そこで、小胞体シャペロン群や SEL1 を siRNA によって発現抑制した場合、新規 ERAD 分子の基質タンパク質との結合や分解促進作用が抑制されるか否かについて検討する。
- (7) 新規 ERAD に対する抗体を用いてマウスの組織免疫染色を行い、ERAD タンパク質の発現分布を各組織において調べ、小胞体ストレスとの関与が考えられる疾患と関連性があるか予測する。
- (8) 新規 ERAD 遺伝子に関して、小胞体ストレスが関連するアルツハイマー病やパーキンソン病など疾患患者脳における発現量や細胞内、脳部位的局在の変化を免疫組織化学的に検討する。
- (9) 新規 ERAD トランスジェニックマウスにおいて、ERAD 分子の発現がパーキンソン病やアルツハイマー病、などの神経変性疾患に対し保護的作用を有するかについて検討する。

4. 研究成果

- (1) HRD1 を介した ERAD 系の抑制は, APP の蓄積とそれに伴う A β の産生増加をもたらすとともに, 小胞体ストレスと神経細胞死を誘発することが示めされた. このことから, ERAD 系の破綻は新たなアルツハイマー病の発症原因となりうる可能性が示唆された.
- (2) AD 患者脳における HRD1 の発現量について健常者と比較したところ, AD 患者の大脳皮質において, HRD1 タンパク質量の有意な低下が認められた. 一方, AD 患者において, GRP78 (Bip) および CHOP mRNA の有意な増加が認められ, HRD1 を含む他の小胞体ストレス応答遺伝子の mRNA も増加傾向にあったことから, AD 患者脳が小胞体ストレス状態であることが判明した. また, HRD1 タンパク質の減少は, mRNA の低下によるものではないことが明らかとなった. これらの結果より, AD の発症に HRD1 タンパク質の減少と小胞体ストレスが関与する可能性が示された.
- (3) APP の分解に関与する HRD1 以外の新規ユビキチンリガーゼを見出し, APP と結合することを明らかにした. このことより, HRD1 以外にも APP の分解に関与する分子が存在し, AD との関連性を明らかにする必要性を新たに示した.
- (4) 小胞体ストレスによる HRD1 と SEL1 の誘導機構について明らかにした. それによって, HRD1 や SEL1 の誘導を介した ERAD 促進薬が開発できれば, アルツハイマー病治療薬の候補となりうる可能性が示された.
- (5) 小胞体ストレス応答転写因子 ATF6 と XBP1 が APP の分解を促進し, A β の産生を減少させることを見出した. また, この APP の分解が ERAD を介したタンパク質分解であることを示し, 変性した APP が選択的に分解されることを明らかにした. これらの結果より, ATF6 や XBP1 を介した ERAD 誘導薬が, AD の治療薬となりうる可能性が示された.
- (6) HRD1 は中脳黒質, 海馬・歯状回, 大脳皮質, 線条体, 淡蒼球, 小脳プルキンエ細胞など, 広範囲に脳神経細胞に発現しており, グリア細胞には発現していなかった. また, HRD1 の安定化や基質認識に関与する SEL1 も HRD1 同様に分布することが分かった. さらに, 新規のユビキチンリガーゼ Kf-1 も神経細胞に発現することを見出した. これらの結果から, HRD1 や SEL1, Kf-1 を含む ERAD 分子は脳神経細胞のタンパク質分解機構に関与していると推測され, 神経変性疾患などの疾患と

の関連性が期待される.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Kaneko, M., Yasui, S., Niinuma, Y., Arai, K., Omura, T., Okuma, Y. and Nomura, Y., A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes, *FEBS Lett.*, 581, 5355-5360 (2007). 査読有り
- 2) Omura, T., Kaneko, M., Onoguchi, M., Koizumi, S., Itami, M., Ueyama, M., Okuma, Y. and Nomura, Y., Novel functions of ubiquitin ligase HRD1 with transmembrane and proline-rich domains, *J. Pharmacol. Sci.*, 106, 512-519 (2008). 査読有り
- 3) 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
- 4) 金子雅幸, ヒト新規小胞体タンパク質 HRD1 の神経変性疾患治療に関する薬理的基盤研究, *日本薬理学雑誌* 133, 252-256 (2009).
- 5) 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.*, *in press*. 査読有り

[学会発表] (計 21 件)

- 1) 金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸, 小胞体の変性タンパク質分解関連分子 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, 出雲 (2007 年 6 月).
- 2) 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 に関与する HRD1 は APP によるアポトーシス抑制する, *Neuro2007* (第 50 回日本神経化学会大会), 横浜 (2007 年 9 月).
- 3) 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).
- 4) 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, 横浜 (2008 年 3 月).
- 5) 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).
 - 6) 三森盛亮, 飯田博一, 五十嵐麻美子, 浜名洋, 大村友博, 金子雅幸, 大熊康修, 松本澄, 4-フェニル酪酸構造類似体の合成によるケミカルシャペロン活性の解析, 日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008 年 3 月).
 - 7) 金子雅幸, 大熊康修, 野村靖幸, HRD1 の発現抑制による APP の分解阻害は A β 産生増加と小胞体ストレスを誘発する, 第 35 回日本脳科学会, 東京 (2008 年 6 月).
 - 8) 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 β の産生増加を引き起こす, 第 51 回日本神経化学会大会, 富山 (2008 年 9 月).
 - 9) 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, 第 119 回日本薬理学会関東部会, 東京 (2008 年 10 月).
 - 10) Kaneko, M., Koike, H., Omura, T., Okuma, Y. and Nomura, Y., Suppression of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and b-amyloid generation with endoplasmic reticulum stress and apoptosis, Neuroscience 2008, Washington, DC (November 2008).
 - 11) Okuma, Y., Omura, T., Kaneko, M. and Nomura, Y., The brain distribution of a ubiquitin ligase HRD1 in mice, Neuroscience 2008, Washington, DC (November 2008).
 - 12) 金子雅幸, ヒト新規小胞体タンパク質 HRD1 の神経変性疾患治療に関する薬理的基盤研究, 第 82 回日本薬理学会, 横浜 (2009 年 3 月).
 - 13) 金子雅幸, 小池洋, 齋藤僚, 野村靖幸, 大熊康修, 小胞体のユビキチンリガーゼ HRD1 の減少は APP の蓄積と A β の産生増加を引き起こす, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜 (2009 年 3 月).
 - 14) 大村友博, 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 HRD1 の膜貫通領域および proline-rich 領域の機能解析, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜 (2009 年 3 月).
 - 15) 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, 京都 (2009 年 3 月).
 - 16) 金子雅幸, 小胞体タンパク質の分解促進/凝集抑制による神経変性疾患防御機構, 第 22 回脳機能分子研究会, 京都 (2009 年 4 月).
 - 17) 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 β 産生機構, 第 36 回日本脳科学会, 金沢 (2009 年 6 月).
 - 18) 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).
 - 19) 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) に関与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).
 - 20) Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Okuma, Y. and Nomura, Y., Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid- β generation, Neuroscience 2009, Chicago (October 2009).
 - 21) Omura, 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 2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.cis.ac.jp/~pharm/mkaneko/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 雅幸 (Kaneko Masayuki)

千葉科学大学・薬学部・講師

研究者番号: 10322827