

機関番号：32525

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790089

研究課題名（和文） 小胞体タンパク質分解機構のアルツハイマー病発症への関与

研究課題名（英文） Possible involvement of endoplasmic reticulum protein degradation in Alzheimer's disease

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（和文）：HRD1 は小胞体の変性タンパク質の分解を促進し、アルツハイマー病の原因タンパク質アミロイドβの前駆体 APP を基質とする酵素である。本研究では、アルツハイマー病患者脳における HRD1 減少機構として、酸化ストレスの可能性を示した。また、HRD1 を欠損した遺伝子改変マウスがアルツハイマー病を発症するか評価した。さらに、HRD1 と同様に小胞体の変性タンパク質を分解促進する新規の酵素について、APP の代謝に関与するものを新たに見出した。

研究成果の概要（英文）：HRD1 promotes degradation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum as a ubiquitin ligase. In the present study, we suggest the possible involvement of oxidative stresses in the decrease of HRD1 protein, which promotes degradation of amyloid precursor protein (APP), in the brain of Alzheimer's disease (AD) patient. Furthermore, we evaluated whether HRD1 knockout mice exhibited the phenotypes of AD. In addition, we found another ubiquitin ligase, which is involved in the APP protein metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患の発症機序は不明で、根本的治療法は確立されていない。したがって、抗神経変性疾患薬の創製は脳科学研究および医療における重要な課題である。研究代表者が

これらの疾患の原因の一つとして注目してきたものに、小胞体ストレスがある。小胞体はタンパク質の折りたたみや修飾を担う細胞内小器官であり、この小胞体に変性タンパク質が蓄積した状態が小胞体ストレスである。最近、神経変性疾患における神経細胞死

に小胞体ストレスが関わると考えられるようになり、小胞体への変性タンパク質の蓄積を防止する薬物（小胞体ストレス抑制薬）の神経変性疾患予防・治療薬としての応用と開発が期待されている。

研究代表者はこれまでの研究で、小胞体ストレスを抑制する因子として、修復不能な変性タンパク質を小胞体より排出し、プロテアソームにより分解する、小胞体関連分解（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た。そして、HRD1 がタンパク質の分解に関わるユビキチンリガーゼ活性を有することを見出し、小胞体ストレス抑制作用を有することを証明している。さらに研究代表者は、脳虚血に伴いマウス脳において、HRD1 の発現が誘導されることを示した。また、HRD1 がマウスおよびヒト脳の海馬、黒質緻密層、小脳プルキンエ細胞など、神経細胞特異的に存在することを免疫組織化学的に明らかにした。

これらの結果を基に研究代表者は、HRD1 の基質となる神経変性疾患関連タンパク質の同定を行い、Pael 受容体（家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるユビキチンリガーゼ Parkin の基質タンパク質）を見出した。HRD1 はこの Pael 受容体のユビキチン化と分解を促進し、Pael 受容体蓄積による小胞体ストレスと神経細胞死を抑制することを示した。さらに、Pael 受容体の分解における HRD1 分子の各領域の詳細な役割を明らかにし、HRD1 の分子機構について新たな知見を得た。最近、研究代表者は、APP（アミロイド前駆体タンパク質：アルツハイマー病発症に関わる A β の前駆体タンパク質）も HRD1 の基質となることを見出しており、HRD1 の発現増加によって APP の分解が促進され A β の産生が減少することを示した。また、HRD1 の発現低下は APP の蓄積と A β の産生増加をもたらし、小胞体ストレスを伴う神経細胞死が誘発されることを明らかにした。さらに、アルツハイマー病患者の大脳皮質において、HRD1 のタンパク質量が低下していることも見出し、アルツハイマー病発症機構に、HRD1 発現低下による ERAD の破綻と小胞体ストレスが関与する可能性を初めて明らかにした（図）。さらに研究代表者は、HRD1 発現誘導機構についての解析を行い、小胞体ストレスによる HRD1 の誘導に、小胞体ストレス応答転写因子 ATF6 と XBP1 が関与することを見出した。さらに、ATF6 と XBP1 を強制発現すると HRD1 が誘導され、APP の分解と A β の産生が低下することを明らかにした。また、ATF6 と XBP1 は Pael 受容体の分解促進に対しても有効であったことから、ATF6 や XBP1 による HRD1 をはじめとした ERAD 介した変性タンパク質分解作用が、アルツハイマー病やパ

ーキンソン病の治療に応用できる可能性を新たに示した。

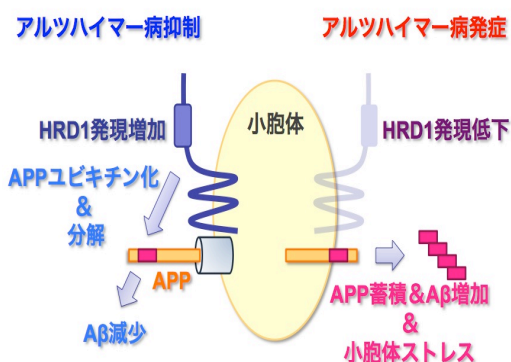


図. HRD1 の減少によるアルツハイマー病発症機構

研究代表者は上記の研究成果に基づき、アルツハイマー病の原因の一つに ERAD の破綻が関与すること、ならびに HRD1 以外のユビキチンリガーゼもその破綻に関わる可能性を推測した。そして、新たに新規ユビキチンリガーゼをバイオインフォマティクス的手法で 51 種同定し、8 種の遺伝子をクローニングした。

2. 研究の目的

本研究では以下の研究を通して、HRD1 が関与する ERAD 機構の破綻とアルツハイマー病発症の関連性の解明を目指した。

- (1) アルツハイマー病患者脳における ERAD 破綻と A β 産生の機構について詳細に解析する。
- (2) ERAD 機構の破綻とアルツハイマー病発症の関連性を証明するため、HRD1 のヘテロノックアウトマウスがアルツハイマー病様の症状を発症するか検討する。
- (3) ERAD 機構には代償機構があり、ERAD 機構の破綻は HRD1 の減少のみでは説明できないと考えられる。そこで、さらに HRD1 以外に ERAD に関与すると考えられる新規遺伝子の解析を行い、HRD1 と比較しながらその APP 分解機構を明らかにする。また、新規 ERAD 分子の発現減少によるアルツハイマー病への関与を検討する。

3. 研究の方法

- (1) これまでの予備的実験では、基質タンパク質の負荷が HRD1 タンパク質の減少を引き起こす可能性が示されていた。そこで、アルツハイマー病患者脳における HRD1 タンパク質減少の機構を解明するため、APP などの HRD1 基質負荷によ

る HRD1 減少機構について解析した。またさらに、新規 ERAD 分子をはじめとした小胞体ストレス関連分子の発現量の変化について、mRNA 量とタンパク質量の変化について解析し、HRD1 と同様に減少しているものがあるか検討した。

- (2) HRD1 ノックアウトマウスを用いて、HRD1 減少に伴いアルツハイマー病が発症するかを検討した。具体的には、A β の産生が増加するか、免疫組織学的に A β の沈着やタウタンパク質の蓄積が観察されるか、さらに個体の学習記憶能力に低下が見られるか、行動科学的な解析を行った。
- (3) RNAi を用いた新規 ERAD 遺伝子の発現抑制によって、APP の蓄積や A β の産生増加が認められるか検討した。分解に関与する可能性があるものに関して、新規 ERAD 遺伝子の過剰発現によって APP タンパク質分解が促進されるか、さらに、それによって A β の生成が減少するかを検討した。また、APP の分解に関与する新規 ERAD 関連分子について抗体を作成し、細胞内局在や脳内局在について解析した。

4. 研究成果

- (1) 今回私たちは、HRD1 タンパク質の減少機構について検討を行った。まず、基質である APP 負荷によって、HRD1 が減少するか検討したところ、APP 過剰発現による内在性 HRD1 タンパク質の減少は認められなかった。また、APP と Presenilin の過剰発現により、A β の産生を増加させたところ、HRD1 のタンパク質量が増加したため、A β が HRD1 タンパク質の減少の原因ではないことが明らかとなり、HRD1 は A β による小胞体ストレスによって誘導されることが判明した。一方、AD 患者の大脳皮質を 1% NP-40 の可溶性画分と不溶性画分に分離し、HRD1 のタンパク質量を非 AD 患者群と比較したところ、AD 患者の可溶性画分で HRD1 タンパク質が減少し、不溶性画分で増加していることが明らかとなった。このことから、HRD1 タンパク質の減少は、何らかの理由により凝集し、不溶化したためであることが示唆された。そこで、HRD1 タンパク質減少の原因として、種々の酸化ストレスや小胞体ストレスなどを検討したところ、HRD1 および HRD1 と複合体を形成する SEL1L が、過酸化水素で不溶化することが明らかとなった。一方、小胞体ストレスでは HRD1 と SEL1L の不溶化が認められなかった。この結果より、アルツハイマー病の発症

機構として、酸化ストレスによる HRD1 と SEL1L の不溶化と、それに伴う ERAD の破綻が関与する可能性を新たに示された。また、HRD1 のタンパク質量（可溶性および不溶性画分）と A β の産生量について解析したところ、高い相関性があることが明らかとなった。このことから、AD の病態形成に関与する A β と HRD1 の関連性が、人においても証明された。

- (2) HRD1 の減少とアルツハイマー病発症の関連性を明らかにするため、HRD1 のノックアウトマウスがアルツハイマー病の症状を呈するか検討した。Y 字迷路を用いた解析の結果、HRD1 ノックアウトマウスで、記憶力が低下する傾向が認められた。一方、A β の産生量に関しては、HRD1 ノックアウトマウスで低下する傾向にあった。この A β 産生に関する結果は、神経細胞における結果と相反するものとなった。これらの結果に基づいて考察すると、HRD1 は A β の産生に必要であり、さらに記憶学習機能に重要であることが示唆された。今後これらの結果に関して、さらにノックアウトマウスの例数を増やし、様々な実験より検証する必要がある。
- (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として RNF19B (FLJ90005) を見出し、APP をユビキチン化、分解促進することを明らかにした。一方、RNF19B を発現抑制した場合、HRD1 と同様に APP が蓄積したものの、HRD1 とは異なり、A β の産生は低下し、アポトーシスは惹起されなかったことから、HRD1 と異なる機構で APP の代謝に関与する可能性が示唆された。また、RNF19B と相同性が高いユビキチンリガーゼに Dorfin (RNF19A) があるが、Dorfin も RNF19B と同様の結果となったことから、同じ機構で APP の代謝に関与していると考えられる。この結果より、RNF19B や Dorfin の阻害薬は、A β 産生抑制薬として、新しい作用機序に基づくアルツハイマー病治療薬となる可能性が期待される。今後は、それらのユビキチンリガーゼの基質を同定し、APP の代謝機構について明らかにしたい。また、新規ユビキチンリガーゼについてその脳内局在を検討したところ、そのほとんどが神経細胞に発現しており、グリア細胞には発現していないことが明らかとなった。この結果から、ERAD が神経細胞の機能に重要であることが示唆される。さらに、新規ユビキチンリガーゼについて小胞体ストレス抑制作用を検討したところ、RNF185 (FLJ38628)、RNFT1 (LOC51136)、RNF145 (FLJ31951)

が小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制することが明らかとなった。この結果から、これらのユビキチンリガーゼは ERAD に関与し、HRD1 と同様に小胞体に蓄積した変性タンパク質を分解除去できることが示された。siRNA を用いて HRD1 を発現抑制すると、同じく ERAD に関与するユビキチンリガーゼで、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つであるある Parkin の発現が誘導された。ことから、HRD1 が関与するタンパク質分解に関して、Parkin が代償的に働いている可能性が示唆された。一方、AD 患者の大脳皮質において HRD1 のタンパク質量が減少していることから、AD 脳において Parkin の発現誘導が認められるか検討したところ、Parkin の発現量は健常者と差がなかった。このことから、AD 脳においては Parkin の代償機構は機能していないことが示された。今後はさらに、HRD1 ノックアウトマウスにおいて、Parkin の発現誘導について検討し、AD における神経細胞死に Parkin の代償機構の喪失が関与するかを明らかにする予定である。

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 6 件)

- ① 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), 査読有り
- 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), 査読有り
- ③ 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), 査読有り
- ④ 金子雅幸, ミトコンドリアにおける S-ニトロシル化とアルツハイマー病発症機構, *日本薬理学雑誌*, 134, 291 (2009), 査読無し
- ⑤ 金子雅幸, 筋萎縮性側索硬化症 ALS と小胞体ストレス～小胞体タンパク質分解系

ERAD の神経変性疾患への関与～, *日本薬理学雑誌*, 134, 108 (2009), 査読無し

- ⑥ 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), 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)
- ② 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)
- ③ 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)
- ④ 金子雅幸, 小胞体のタンパク質分解系 ERAD の破綻とアルツハイマー病, 広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子細胞情報学セミナー, 広島 (2011 年 2 月 28 日)
- ⑤ Kaneko, M., Saito, R., Okuma, Y. and Nomura, Y., Correlation between amyloid- β production and decrease in levels of ubiquitin ligase HRD1 due to its insolubilization, *Neuroscience 2010, San Diego* (November 16, 2010)
- ⑥ 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)
- ⑦ 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与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)
- ⑧ Kaneko, M., Saito, R., Yamamori, M., Okuma, Y. and Nomura, Y., Involvement of endoplasmic reticulum-associated degradation in amyloid- β generation, *ISPC-Nara, Nara* (September 15, 2010)
- ⑨ 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 β 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)
- ⑩ 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)
- ⑪ 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)
- ⑫ 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 β 産生量との相関, Neuro2010, 神戸 (2010年9月2日)
- ⑬ 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 β (A β) の減少, 第122回日本薬理学会関東部会, 静岡 (2010年6月5日)
- ⑭ 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)
- ⑮ 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 β 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)
- ⑯ 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 19, 2009)
- ⑰ 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 19, 2009)
- ⑱ 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体タンパク質 (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)
- ⑲ 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)
- ⑳ 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12日)
- ㉑ 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19日)

[その他]

新聞報道:

- ① 読売新聞夕刊 (9面) 「アルツハイマー患者発症防ぐ酵素半分」, 2010年7月1日掲載
- ② 神奈川新聞朝刊 (23面) 「認知症予防に光明 酵素ヒト HRD1 発見」, 2010年7月1日掲載
- ③ 薬事日報 (3面) 「HRD1 が A β 分解に関与 アルツハイマー病治療に期待」, 2010年5月21日掲載
- ④ 科学新聞 (4面) 「アルツハイマー病発症脳タンパク質 HRD1 が関与 患者の死後脳で減少」, 2010年4月16日掲載

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