

アルツハイマー病の病態形成に関与する
小胞体ストレス応答性ユビキチンリガーゼ HRD1 の分子機構
Molecular mechanism of endoplasmic reticulum stress-responsive
ubiquitin ligase HRD1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease

薬科学専攻 氏名 齋藤 僚
氏名 Ryo Saito

【目的】

小胞体では、主としてホルモンに代表される分泌タンパク質や、細胞膜受容体に代表される膜タンパク質の合成が行われている。合成されたタンパク質は、小胞体内腔で糖鎖などの修飾や、小胞体シャペロンによるフォールディングを受けることで“正しい分子構造”を形成し、機能性タンパク質として成熟する。しかしながら、タンパク質の高次構造形成は往々にして失敗し、結果として未成熟な異常タンパク質は一時的に小胞体へ蓄積する。このような異常タンパク質の蓄積は、小胞体におけるタンパク質品質管理機構を破綻させ、“異常タンパク質が小胞体内腔において過度に蓄積した状態”である小胞体ストレスを惹起する。細胞は、小胞体ストレスに対する防御反応として小胞体ストレス応答 (unfolded protein response; UPR) 機構を有しており、1) 新生タンパク質の翻訳抑制、2) 転写因子活性化による UPR 遺伝子の誘導、3) ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解 (小胞体関連分解; endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD) 機構の促進を介して、小胞体ストレスを軽減させることが知られている。一方、長期的な小胞体ストレスにより、小胞体の機能障害が上述のストレス防御反応を上回った場合においては、アポトーシス経路が活性化され、障害細胞は細胞死へと誘導される。

当研究室では、UPR の一つである ERAD 機構に着目し、バイオインフォマティクスを用いた解析により、これまでに数種類の新規ヒト ERAD 関連遺伝子の同定に成功した。その一つであるヒト ERAD 関連酵素 HRD1 は、以下の特徴を有することが我々の研究で明らかとなっている。すなわち、1) ユビキチンリガーゼ活性を有し、異常タンパク質の分解促進を介して小胞体ストレスを抑制する、2) 小胞体ストレスによって活性化される転写因子 XBP1 により発現誘導を受ける、3) 成体脳において神経細胞特異的に発現する、4) 家族性パーキンソン病責任遺伝子 Parkin の基質タンパク質である Pael 受容体 (Parkin associated endothelin-receptor like receptor; Pael-R) の分解を促進し、Pael-R 蓄積による小胞体ストレスを抑制する、5) 培養神経細胞において、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) の原因タンパク質とされるアミロイドβ (amyloid β; Aβ) の前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein; APP) をポリユビキチン化し、異常構造を呈する APP の分解を促進することで Aβ の産生を抑制する。これらの他に、プリオンタンパク質や Huntingtin など、神経変性疾患に深く関連するタンパク質が HRD1 の基質として同定されており、HRD1 が関与する ERAD の機能破綻による神経変性疾患発症の可能性が示唆されている。

しかしながら、各種神経変性疾患において、ERAD 関連分子の生理機能異常と疾患発症機序との関連性については、未だ不明な点が残されている。本研究では、HRD1 を介した APP の代謝分解機構に着目し、AD 発症原因としての ERAD 機能破綻を仮定した上で、1) AD 患者死後脳大脳皮質における UPR 関連遺伝子/タンパク質の発現解析および、2) HRD1 減少機序の究明による AD 発症機構の解明を試みた。

【方法および結果】

1. アルツハイマー病患者死後脳大脳皮質における UPR 関連遺伝子／タンパク質の発現解析

アルツハイマー病 (AD) は大脳皮質における $A\beta$ を主要構成成分とした老人斑の形成を病死的所見とする神経変性疾患の一つである。同疾患の発症機構を、ヒト死後脳を用いて解析するにあたり、各検体の病理学的背景を知ることが非常に重要である。本研究では、対照群 (平均年齢 78 歳) および AD 患者群 (平均年齢 80 歳) の死後脳大脳皮質における $A\beta$ 量を ELISA 法により定量し、各検体に対する生化学的解析を行った。その結果、興味深いことに対照群においても $A\beta$ の蓄積量が多く、また、 $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ の存在比 ($A\beta_{40}/A\beta_{42}$) が顕著に増大し、AD の特徴を有している検体が 3 例確認された。一方、AD 患者群においては、 $A\beta$ の蓄積量が少ない検体が 1 例確認された。よって、本研究においては上述の 4 例を除いた全 10 検体 (AD 患者群 5 例:対照群 5 例) に関して比較検討を行った。

はじめに、UPR 関連分子である HRD1 (ユビキチンリガーゼ)、SEL1L (ERAD 基質認識因子) および GRP78/Bip (小胞体シャペロン) の mRNA 発現量を *real-time* PCR 法を用いて解析した結果、AD 患者群において HRD1 および GRP78/Bip の mRNA 量が有意に増加していることが明らかとなった。また、SEL1L の mRNA 量も AD 患者群において増加傾向が認められたことから、AD 患者の大脳皮質は小胞体ストレス状態にあることが示唆された。

続いて、小胞体膜画分 (界面活性剤 NP-40 可溶性画分) における HRD1 および SEL1L のタンパク質量を Western blot 法を用いて解析した結果、AD 患者群において HRD1 タンパク質量が有意に減少していることが明らかとなった (Fig. 1A)。しかしながら、HRD1 と複合体を形成し、同タンパク質の安定化に寄与する SEL1L のタンパク質量に関しては、有意な変化が認められず、HRD1 タンパク質が特異的に減少していることが示された (Fig. 1A, B)。一方、界面活性剤である SDS およびデオキシコール酸によって可溶化した NP-40 不溶性画分における HRD1 および SEL1L のタンパク質量を解析した結果、AD 患者群において NP-40 不溶性画分の HRD1 タンパク質量が有意に増加していることが明らかとなった。また、NP-40 可溶性画分において有意な変化が認められなかった SEL1L のタンパク質量においても、NP-40 不溶性画分では HRD1 と同様に AD 患者群において有意に増加していることが明らかとなった。

脳神経細胞において、SEL1L は HRD1 の膜貫通領域と結合することで複合体を形成している。また、SEL1L の発現抑制により HRD1 タンパク質の分解および減少が認められることから、SEL1L は HRD1 の安定化に寄与する可能性が示唆されている。上記知見より、AD 患者において両タンパク質は複合体として共に不溶化した可能性が考えられる。そこで、NP-40 不溶性画分における両タンパク質間の相関係数を Pearson product-moment correlation coefficient により算出した結果、 $r = 0.81$ と高い正の相関関係を有することが明らかとなった。よって、HRD1 と SEL1L は複合体として共に不溶化した可能性が示唆された。

これまでの研究で、培養神経細胞における HRD1 の発現抑制は、 $A\beta$ の産生増加を引き起こすことが明らかとなっている。そこで、ヒト大脳皮質における HRD1 タンパク質の減少が $A\beta$ の産生増加に寄与する可能性を検討するため、ヒト死後脳大脳皮質における $A\beta$ 蓄積量と NP-40 可溶性画分および不溶性画分における

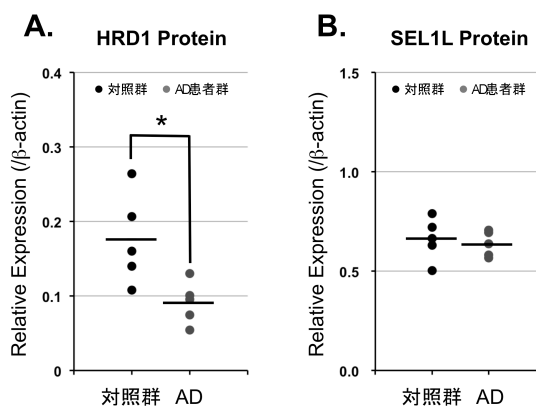


Fig.1 NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質の特異的減少

HRD1 タンパク質量との相関性について解析を行った。その結果、ヒト死後脳大脳皮質における A β 蓄積量と NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量との間には、高い負の相関関係があることが示唆された (A β 40, $r = -0.70$; A β 42, $r = -0.69$)。一方、ヒト死後脳大脳皮質における A β 蓄積量と NP-40 不溶性画分における HRD1 タンパク質量との間には、高い正の相関関係があることが明らかとなった (A β 40, $r = 0.70$; A β 42, $r = 0.70$)。したがって、これらの結果から、ヒト大脳皮質における A β 産生量と HRD1 タンパク質量が相関関係にあることが示唆された。

2. HRD1 減少機序の究明によるアルツハイマー病発症機構の解明

ヒト脳組織を用いた解析により、AD 患者の大脳皮質は小胞体ストレス状態にあったことが明らかとなった。また、APP の代謝分解に関与し、ERAD 構成因子の一つであるユビキチンリガーゼ HRD1 は、AD 患者の死後脳大脳皮質において特異的かつ有意に減少していることが明らかとなった。しかしながら、タンパク質不溶化に起因する HRD1 減少機序においては、不明な点が多く残されている。本研究では、HRD1 不溶化の原因を究明するため、培養神経細胞および各種遺伝子導入 (transgenic; TG) マウスを用いて、AD 関連分子および各種ストレスによる HRD1 タンパク質不溶化への影響を検討した。

ヒト大脳皮質において、A β 蓄積量と HRD1 タンパク質量との間には高い相関関係があることが明らかとなった。しかしながら、A β の神経毒性により HRD1 タンパク質が不溶化し、減少を示した可能性も考えられる。そこで、培養神経細胞において

A β の産生量を増加させ、A β 負荷による HRD1 タンパク質不溶化の検討を行った。マウス神経芽細胞腫 (Neuro-2a) の presenilin 2 安定発現株を用いて、APP を過剰発現させることで細胞内部より A β 産生量を増加させた結果、NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量は有意な増加が認められた。しかしながら、APP 過剰発現を介した A β 産生増加による HRD1 タンパク質の不溶化は認められなかった。また、16-20 ヶ月齢におけるヒト変異型 APP 遺伝子導入マウス (Tg2576 マウス) の大脳皮質においても、同様に NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量の有意な増加が認められたが、APP 過剰発現を介した A β 負荷による HRD1 タンパク質の不溶化は認められなかった。

AD 患者の大脳皮質における病理学的所見として、A β を主要構成成分とする老人斑形成の他に、細胞内における過剰リン酸化タウの蓄積による神経原線維変化も認められる。しかしながら、AD 発症における過剰リン酸化タウの毒性機構については不明な点が多く残されている。そこで、タウによる HRD1 タンパク質への影響を検討するため、Neuro-2a 細胞に対してタウタンパク質アイソフォームの 1 つである 0N4R と、その変異体である P301L を過剰発現させた。タウ負荷の結果、タウの発現増加および不溶化は認められたが、HRD1 タンパク質の不溶化および減少は認められなかった。また、16-20 ヶ月齢におけるヒト変異型タウ遺伝子導入マウス (JNPL3 マウス) の大脳皮質においても、同様に HRD1 タンパク質の不溶化および減少は認められなかった。

ヒト死後脳を用いた解析により、AD 患者の大脳皮質は小胞体ストレス状態にあることが明らかとなっている。そこで、小胞体ストレスによる HRD1 タンパク質不溶化への影響を検討するため、Neuro-2a 細胞に対して、小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンおよびタブシガルギンをそれぞれ曝露した。その結

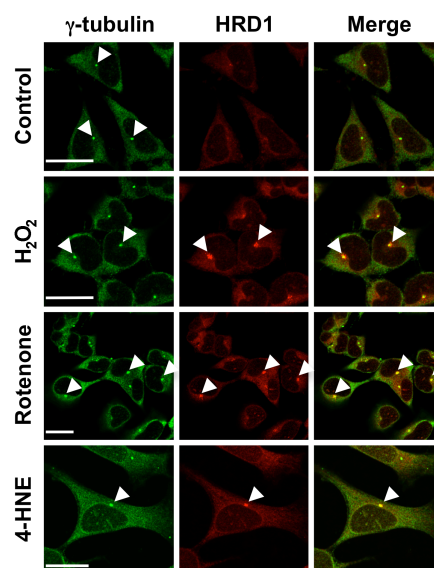


Fig.2 酸化ストレス誘導試薬による HRD1 タンパク質の細胞内凝集

果、UPRによるHRD1-mRNAの増加およびNP-40可溶性画分におけるHRD1タンパク質の増加は認められたが、小胞体ストレスによるHRD1の不溶化は認められなかった。

一方、AD患者の大脳皮質においては、近年アミロイド沈着血管近傍に微小梗塞が多発することが示されており、ADの病態形成における慢性脳虚血や血管障害による酸化ストレスの意義が問われている。そこで、酸化ストレスによるHRD1タンパク質不溶化の検討を行うため、ヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)細胞に対して、過酸化水素(H₂O₂)、ロテノン(rotenone)および4-ヒドロキシノネナル(4-hydroxy-2-nonenal; 4-HNE)をそれぞれ曝露した。その結果、NP-40可溶性画分におけるHRD1タンパク質量の減少は認められなかったが、NP-40不溶性画分においては、酸化ストレス誘導試薬であるH₂O₂、rotenoneおよび4-HNEの濃度依存的なHRD1の増加が認められた。また、シクロヘキシミドによる新規タンパク質合成阻害下においては、H₂O₂による酸化ストレスの誘導により、NP-40可溶性画分におけるHRD1タンパク質量の減少が認められた。したがって、酸化ストレスによりHRD1タンパク質が不溶化し、小胞体膜画分における同タンパク質量が減少することが示された。一方、A β による老人斑形成や過剰リン酸化タウの蓄積など、細胞内外で凝集したタンパク質は不溶化することが知られている。そこで、酸化ストレス誘導試薬によってHRD1タンパク質が凝集体を形成するか検討を行った。小胞体より排出された異常タンパク質は、核近傍の γ -tubulinを主要構成タンパク質とする微小管形成中心付近へと運ばれ、凝集体を形成することが知られている。蛍光免疫二重染色法を用いてHRD1タンパク質の細胞内局在の変化を解析した結果、酸化ストレス誘導試薬であるH₂O₂、rotenone、および4-HNEにより、小胞体膜上に局在するHRD1タンパク質が微小管形成中心付近において凝集することが明らかとなった(Fig. 2)。したがって、酸化ストレスによるHRD1タンパク質の不溶化は、微小管形成中心付近における同タンパク質の凝集体形成に基づく可能性が示唆された。

【結論】

本研究により、AD患者の大脳皮質は小胞体ストレス状態にあることが示唆された。また、APPの代謝分解に寄与し、ERAD関連因子であるユビキチンリガーゼHRD1がAD患者の大脳皮質において特異的かつ有意に減少していることが明らかとなった。一方、培養神経細胞を用いた解析では、酸化ストレスによってHRD1タンパク質が小胞体外に凝集し、不溶化することが明らかとなった。また、同ストレスによるHRD1タンパク質の損傷により、小胞体に局在する機能性HRD1タンパク質(NP-40可溶性HRD1タンパク質)の減少が生じる可能性が示唆された。上記知見より、酸化ストレスによるHRD1タンパク質の不溶化と機能性タンパク質の減少は、HRD1介在性のERAD機構を破綻させ、A β の産生増加およびA β 誘導性の酸化ストレスを惹起する可能性が示唆された。また、上記ERAD機構の破綻とA β 産生増加の悪循環は、小胞体ストレスや神経変性を惹起させ、ADの病態形成を促進させる可能性が考えられた。

【文献】

- 1) Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Kitamura, Y., Okuma, Y., Nomura, Y. "Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid- β generation", *J Neurosci.*, vol. 30, no. 11, pp. 3924-32. (2010).
- 2) Saito, R., Kaneko, M., Okuma, Y., Nomura, Y. "Correlation between decrease in protein levels of ubiquitin ligase HRD1 and amyloid- β production", *J Pharmacol. Sci.*, vol. 113, no. 3, pp. 285-8. (2010).
- 3) Kaneko, M., Saito, R., Okuma, Y., Nomura, Y. "Possible involvement of ubiquitin ligase HRD1 insolubilization in amyloid β generation", *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 35, no. 2, pp. 269-72. (2012).