

平成25年度

博士論文

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

千葉科学大学

大学院薬科学研究科

薬科学専攻

齋藤 僚

平成26年3月

目次

	ページ
【略語一覧】	…1
【使用試薬一覧】	…3
【序論】	…5
 第1章 アルツハイマー病患者死後大脳皮質における小胞体ストレス応答 関連遺伝子および関連タンパク質の発現解析	
【目的】	…21
【材料と方法】	…22
1. タンパク質抽出液の調製（界面活性剤 NP-40 可溶性画分および不溶性画分）	
2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）および Western blot 解析	
3. Total RNA の抽出	
4. 逆転写反応による cDNA の合成	
5. Real-time PCR（TaqMan プローブ法）	
6. Amyloid- β の抽出	
7. Sandwich ELISA 法	
8. 統計処理	
【結果】	…27
1. A β 蓄積量を指標とした検体の選定	
2. AD 患者死後大脳皮質における小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現解析	
3. AD 患者死後大脳皮質における小胞体関連分解（ERAD）関連タンパク質の発現解析	
4. AD 患者死後大脳皮質における A β 蓄積量と HRD1 タンパク質量との相関	
【考察】	…35

第2章 アルツハイマー病発症機構の解明に向けた HRD1 減少機序の解析

	ページ
【目的】	…38
【材料と方法】	…39
1. 動物飼育	
2. 細胞培養	
3. 形質移入	
4. 薬物処理	
5. タンパク質抽出液の調製（界面活性剤 NP-40 可溶性画分および不溶性画分）	
6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）および Western blot 解析	
7. Total RNA の抽出	
8. 逆転写反応による cDNA の合成	
9. Real-time PCR（TaqMan プローブ法）	
10. Sandwich ELISA 法	
11. 蛍光免疫染色法	
12. 統計処理	
【結果】	…44
1. 培養細胞を用いた短期的な A β /tau 負荷による HRD1 タンパク質量および不溶化への影響	
2. モデルマウスを用いた長期的な A β /tau 負荷による HRD1 タンパク質量および不溶化への影響	
3. 小胞体ストレスによる HRD1 タンパク質量および不溶化への影響	
4. 酸化ストレスによる HRD1 タンパク質量および不溶化への影響	
5. 新規タンパク質合成抑制下における NP-40 可溶性 HRD1 タンパク質に対する酸化ストレスの影響	
6. 酸化ストレスによる HRD1 タンパク質の凝集体形成	
【考察】	…54
【総括】	…58
【参考文献】	…59

【略称一覧】

A	A β	amyloid β
	AD	Alzheimer's disease
	ALS	amyotrophic lateral sclerosis
	ANOVA	analysis of variance
	APP	amyloid precursor protein
	ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
	ATF4	activating transcription factor 4
B	ATF6	activating transcription factor 6
	BACE1	β -site APP cleaving enzyme
	BIM	B-cell leukaemia/lymphoma2 (BCL-2) interacting mediator of cell death
	BiP	immunoglobulin heavy-chain binding protein
C	BSA	bovine serum albumin
	CARE	C/EBP-ATF response element
D	CHOP	C/EBP-homologous protein
	DEPC	diethylpyrocarbonate
	DIAN	Dominantly Inherited Alzheimer Network
	DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
	dNTP	deoxynucleotide triphosphate
	DR5	death receptor 5
	DTT	dithiothreitol
E	E1	ubiquitin-activating enzyme
	E2	ubiquitin-conjugating enzyme
	E3	ubiquitin ligase
	EDEM	ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein
	EDTA	ethylenediamine- <i>N, N, N, N</i> -tetraacetic acid
	eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2 α
	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
	ER	endoplasmic reticulum
	ERAD	endoplasmic reticulum-associated degradation
	ERdj4	ER-localized DnaJ-domain containing protein 4
	ERSE	endoplasmic reticulum stress response element
F	FCS	fetal calf serum
	FTD	frontotemporal dementia
G	GADD	growth arrest DNA and damage protein
	GPR37	G protein-coupled receptor 37
	GRP	glucose-regulated protein
	GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3 β
H	H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
	H ₂ SO ₄	sulfuric acid
	HCl	hydrochloric acid
	HECT	homologous to E6-AP carboxyl terminus
	HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
	HRD1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase degradation 1
	HRP	horseradish peroxidase
I	IgG	immunoglobulin G

	IRE1	inositol-requiring enzyme 1
J	JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal kinase
K	KCl	potassium chloride
M	MgCl ₂	magnesium chloride
	MHC	major histocompatibility complex
N	NaCl	sodium chloride
	NaF	sodium fluoride
	NaOH	sodium hydroxide
	NO	nitric oxide
	NP-40	Nonidet P-40
	Nrf1	nuclear respiratory factor 1
	NTC	non template control
P	Pael-R	parkin-associated endothelin receptor-like receptor
	PBS	phosphate-buffered saline
	PCR	polymerase chain reaction
	PD	Parkinson's disease
	PDI	protein disulfide isomerase
	PERK	double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase
	PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
R	rER	rough-surfaced ER
	RING	really interesting new gene
	RNase	ribonuclease
S	SCF	Skip1/Cul1/F-box protein
	SDS	sodium dodecyl sulfate
	SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
	SE	standard error
	SEL1L	suppressor enhancer lin12 1 like
	sER	smooth-surfaced ER
	siRNA	small interfering ribonucleic acid
	SVZ	subventricular zone
T	TBS	tris-buffered saline
	TCR- α	T-cell receptor- α chain
	Tg	thapsigargin
	Tm	tunicamycin
	TMB	tetramethylbenzidine
	TRAF2	tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
	Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
	Triton X-100	polyoxyethylene (10) octylphenyl ether
	Tween-20	polysorbate 20
U	Ub	ubiquitin
	UPR	unfolded protein response
	UPRE	unfolded protein response element
X	XBP1	X-box binding protein 1

【使用試薬一覧】

1	1-Butanol	和光純薬工業株式会社
	2-Mercaptoethanol	和光純薬工業株式会社
	2-Propanol	和光純薬工業株式会社
	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)	SIGMA-ALDRICH
A	Acrylamide	和光純薬工業株式会社
	Albumin, from Bovine Serum, Cohn Fraction V, pH7.0 (BSA)	和光純薬工業株式会社
	Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibody	Molecular Probes
	Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit antibody	Molecular Probes
	Ammonium Peroxodisulfate	和光純薬工業株式会社
	anti-4-HNE monoclonal antibody (HNEJ-2)	日本老化制御研究所
	anti-β-actin mouse monoclonal antibody (C4)	Santa Cruz
	anti-γ-tubulin monoclonal antibody (GTU-88)	SIGMA-ALDRICH
	anti-HRD1 (C-term) rabbit polyclonal antibody	ABGENT
	anti-HRD1/SYVN1 (C-terminal) rabbit polyclonal antibody	SIGMA-ALDRICH
	anti-KDEL mouse monoclonal antibody (10C3)	Stressgen
	anti-mouse IgG horseradish peroxidase	GE Healthcare
	anti-PDI mouse monoclonal antibody (RL90)	Affinity BioReagent
	anti-rabbit IgG horseradish peroxidase	GE Healthcare
	anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling
	anti-Sel-1L goat polyclonal antibody (T-17)	Santa Cruz
	anti-tau monoclonal antibody (Tau-5)	Millipore
	Aprotinin	SIGMA-ALDRICH
B	Benzoyloxycarbonylleucyl-leucyl-leucine aldehyde (MG132)	ペプチド研究所
	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories
	Bromophenol Blue (BPB)	和光純薬工業株式会社
C	Chloroform	和光純薬工業株式会社
	Complete™ Mini protease inhibitor cocktail tablets EDTA-free	Roche Diagnostics
	Cycloheximide	SIGMA-ALDRICH
D	Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)	SIGMA-ALDRICH
	Diethylpyrocarbonate treated Water	株式会社ニッポンジーン
	Dimethylsulfoxide (DMSO)	和光純薬工業株式会社
	Disodium Hydrogenphosphate 12-Water (Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O)	和光純薬工業株式会社
	Dithiothreitol	Invitrogen
	Donkey anti-Goat IgG, HRP	Promega
	Dulbecco's Modified Eagle' Medium-high glucose	SIGMA-ALDRICH
E	Ethanol (995)	和光純薬工業株式会社
	Ethylenediamine- <i>N, N, N, N</i> -tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (EDTA•2Na)	同仁化学研究所
F	FastStart Universal Probe Master (Rox)	Roche Diagnostics
	Fetal Bovine Serum	BioWest
	First-Strand Buffer	Invitrogen
	Formic Acid	和光純薬工業株式会社
G	G418 disulfate salt (Geneticin®)	Invitrogen
	Glycerol	和光純薬工業株式会社
	Glycine	和光純薬工業株式会社

H	HNE-DMA	SIGMA-ALDRICH
	Human Amyloid β (1-40) 測定キット-IBL	免疫性物研究所
	Human Amyloid β (1-42) 測定キット-IBL	免疫性物研究所
	Human/Rat β Amyloid (42) ELISA Kit Wako, High-Sensitive	和光純薬工業株式会社
	Hydrochloric Acid (HCl)	和光純薬工業株式会社
	Hydrogen Peroxide	和光純薬工業株式会社
I	Image-iT[®] FX Signal Enhancer	Invitrogen
L	Leupeptin	SIGMA-ALDRICH
	Lipofectamine [™] LTX	Invitrogen
M	Magnesium Chloride (MgCl₂)	Invitrogen
	Methanol	関東化学株式会社
	<i>N, N</i> -Methylene-bis (acrylamide)	和光純薬工業株式会社
N	NP-40 (Polyoxyethylene (9) Octylphenyl Ether)	Calbiochem
O	Okadaic Acid	和光純薬工業株式会社
	OPTI-MEM [®] I	Invitrogen
	Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ primer	Invitrogen
P	Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	和光純薬工業株式会社
	Plus [™] Reagent	Invitrogen
	Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (Triton X-100)	和光純薬工業株式会社
	Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween-20 相当品)	和光純薬工業株式会社
	Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane	MERCK MILLIPORE
	Potassium Chloride (KCl)	和光純薬工業株式会社
	Potassium Dihydrogenphosphate (KH ₂ PO ₄)	和光純薬工業株式会社
	Precision Plus Protein [™] Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories
	Pure Nitrocellulose Membrane (0.45 μ m)	Bio-Rad Laboratories
R	RNaseOUT[™] Recombinant RNase Inhibitor	Invitrogen
	Rotenone	SIGMA-ALDRICH
S	SlowFade[®] Gold antifade reagent	Invitrogen
	Skim Milk	森永乳業株式会社
	Sodium Chloride (NaCl)	和光純薬工業株式会社
	Sodium Deoxycolate	和光純薬工業株式会社
	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	和光純薬工業株式会社
	Sodium Fluoride (NaF)	和光純薬工業株式会社
	Sodium Hydrogen Carbonate (NaHCO ₃)	和光純薬工業株式会社
	Sodium Orthovanadate (V)	和光純薬工業株式会社
	SuperScript [®] Enzyme Mix	Invitrogen
	SuperScript [™] III RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen
T	<i>N, N, N, N</i>-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	和光純薬工業株式会社
	Thapsigargin	和光純薬工業株式会社
	Tunicamycin	和光純薬工業株式会社
	TRI [®] Reagent	SIGMA-ALDRICH
	Trizma [®] base (Tris)	SIGMA-ALDRICH
	Trypsin-EDTA solution	SIGMA-ALDRICH
V	VILO[™] Reaction Mix	Invitrogen
W	Western Lightning[™] Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer
あ	一般 99 度以上合成アルコール	株式会社ゴー ドー

【序論】

小胞体 (endoplasmic reticulum ; ER) は真核生物における細胞内小器官の一つであり、滑面小胞体 (smooth-surfaced ER ; sER) とリボソームが付着した粗面小胞体 (rough-surfaced ER ; rER) に大別される。sER では、主として、コレステロールやリン脂質の生合成、ヘムの分解、薬物代謝などが行われる他、細胞内におけるカルシウムイオン (Ca^{2+}) の貯蔵にも関与する。一方、rER では、主として、膜結合型リボソームを介した分泌型タンパク質や膜結合型タンパク質などの分泌系タンパク質の合成が行われる他、新規合成タンパク質への N 結合型糖鎖基本構造の付加、ジスルフィド結合の形成、ER シャペロンによるフォールディングを介した高次構造の形成に関与する。成熟した分泌系タンパク質は、ゴルジ装置へと運ばれ、さらなる修飾を受ける他、リソソームや細胞表面などの最終目的地へと輸送分泌される。細胞が産生する全タンパク質の約 3 分の 1 は、小胞体を通過すると考えられており、同器官における新規合成タンパク質に対する品質管理は、細胞が生存する上で極めて重要である。

小胞体におけるタンパク質品質管理機構

細胞膜受容体に代表される膜結合型タンパク質や、ホルモンに代表される分泌型タンパク質は、小胞体において様々な修飾を受け、正しい分子構造を形成することで、正常な機能を有するタンパク質へと成熟する。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。また、低酸素、低グルコース、 Ca^{2+} 濃度の変化などによる細胞を取り巻く環境の変化、あるいは変異遺伝子より翻訳された異常タンパク質の産生は、タンパク質の正常な成熟を阻害し、小胞体における異常タンパク質の蓄積を助長する。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) 翻訳開始因子のリン酸化を介した新生タンパク質の合成抑制、2) 転写因子活性化による小胞体シャペロンの誘導、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 (図 1A-C) 【1, 2】。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、細胞死経路の一種である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 (図 1D) 【3-5】。

小胞体ストレスと疾患

近年、小胞体ストレスが、1) アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) やパーキンソン病 (Parkinson's disease ; PD), 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis ; ALS) などの神経変性疾患や、2) 双極性障害 (躁鬱病) などの精神神経疾患、3) 心疾患や糖尿病などの生活習慣病、4) 骨粗鬆症や骨形成不全、軟骨低形成症などの骨軟骨疾患、さらには、5) がんの病態形成に深く関与することが報告されている【6-10】。これら疾患の発症要因として、異常タンパク質の過度な蓄積に基づく小胞体ストレスの亢進 (例：老人斑, Lewy 小体の形成) や、細胞内環境変化に起因する小胞体ストレスによる細胞内情報伝達系の変化 (例：インスリン・レプチン抵抗性の獲得)、さらには、遺伝子変異による小胞体ストレス応答機構の阻害 (例：変異型タンパク質の産生, 遺伝子プロモーター領域の多型) などの関与が報告されている【11-13】。

ユビキチン-プロテアソーム系におけるユビキチンリガーゼの分類

ユビキチンリガーゼ (E3) は高度な多様性を有しており、ユビキチン結合酵素 (E2) の結合部位である活性中心の構造から、HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) 型, RING (really interesting new gene)-finger 型および U-box 型に大別される【14】。HECT 型 E3 は、E2 に結合したユビキチンを、チオエステル結合を介して HECT ドメイン内のシステイン残基に転移後、基質タンパク質へと結合させる酵素群である。一方、RING 型および U-box 型 E3 は、E2 に結合したユビキチンを、E2 から直接基質タンパク質へと結合させる酵素群である。多くの場合、E3 によるユビキチン修飾を受けた基質タンパク質は、ユビキチンタンパク質における 48 番目のリジン残基 (K48) を介してポリユビキチン鎖が形成される。一般に、ポリユビキチン化した基質タンパク質は、タンパク質分解酵素複合体である 26S プロテアソームによって分解を受けることが知られている【15-18】。

HECT 型 E3 における HECT ドメインは、E2 結合部位と、ユビキチンとチオエステル結合する触媒部位を併せ持つことが知られている。HECT 型 E3 として E6AP や Nedd4, Rsp5 などが同定されている【19】。一方、RING 型 E3 における RING-finger ドメインは、亜鉛イオン (Zn^{2+}) が配位した構造を有しており、E2 結合部位として機能する。単量体で機能する RING 型 E3 として Ubr1 や cIAP, Siah が、多量体で機能する RING 型 E3 として SCF (Skip1/Cul1/F-box protein) 複合体が同定されている【20】。また、U-box 型 E3 は RING 型 E3 の亜種であり構造に金属イオンを必要としないことが知られている。U-box 型 E3 として CHIP や PRP19, CYC4 などが同定されている【21】。

ヒト新規 ERAD 関連遺伝子 HRD1 および SEL1L の同定

出芽酵母の小胞体膜上には、ERAD 機構に関与する RING 型ユビキチンリガーゼ Hrd1p (3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase degradation ; HRD) が存在する。Hrd1p は、細胞質側に RING-H2 Finger 領域を有する複数回膜貫通型タンパク質であり、ERAD 機構において基質タンパク質のポリユビキチン化を行うことが知られている。一方、Hrd3p は I 型膜タンパク質であり、小胞体内腔において Hrd1p の基質認識や Hrd1p の安定化に寄与することが報告されている【22, 23】。当研究室では、バイオインフォマティクス的手法を用いた小胞体タンパク質の探索により、酵母 Hrd1p および酵母 Hrd3p と高いアミノ酸相同性、およびドメイン構造を有するヒト新規 ERAD 関連遺伝子として、KIAA1810 (酵母 Hrd1p 相同遺伝子) および SEL1L (酵母 Hrd3p 相同遺伝子) の同定に成功した【24】。なお、KIAA1810 は完全長クローニングを行い、ヒト新規 ERAD 関連遺伝子として HRD1 と命名した。また、当研究室は、これらヒト新規 ERAD 関連遺伝子の機能が酵母より保存されていることも明らかにした。すなわち、哺乳類細胞内においても、HRD1 および SEL1L は小胞体に局在し、小胞体ストレスによって発現誘導を受けることを明らかにした。また、HRD1 は RING 型のユビキチンリガーゼ活性を有し、小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導を抑制することも示した【24】。

ヒト HRD1 の生体内局在

当研究室では、HRD1 はいずれの臓器においても発現が認められ、特に、肝臓、骨格筋、脾臓で高発現することを見出した【24】。また、脳神経系においては、海馬 CA3-CA1 領域における錐体細胞や、海馬歯状回における顆粒細胞、さらには、大脳皮質の神経細胞、黒質緻密層のドパミン神経細胞や、小脳プルキンエ細胞に高発現することを示した【25】。一方、グリア細胞においては発現が認められないことも明らかにした【25】。また最近の研究では、側脳室下帯 (subventricular zone ; SVZ) に局在する Nestin 陽性神経幹細胞においても HRD1 が発現することを見出した【26】。

小胞体ストレスに応答した HRD1 と SEL1L の誘導機構

酵母では、小胞体ストレスに対するセンサー分子として I 型膜タンパク質である Ire1p を有している。したがって、小胞体ストレス下、酵母 Hrd1p と Hrd3p は Ire1p を介して誘導される。

一方、哺乳類細胞では、小胞体ストレスに対するセンサー分子として IRE1 の他に、I 型膜タンパク質である ATF6 が存在する。IRE1 は細胞質側に Ser-Thr キナーゼドメインと RNase ドメインを有しており、ホモ二量体形成後、自己リン酸化により活性化する。転写因子 XBP1 (X-box binding protein 1) は、活性化した IRE1 によるスプライシングを受けた後、小胞体ストレス応答遺伝子のプロモーター領域に存在する unfolded protein response element (UPRE-I, -II) および ER-stress response element (ERSE-I, -II) に結合することが知られている【27】。一方、ATF6 は小胞体ストレスに応答してゴルジ装置へと分泌輸送された後、膜貫通領域で切断され、細胞質側の ATF6 が転写因子として機能する。また、ATF6 は核内において小胞体ストレス応答遺伝子のプロモーター領域に存在する ERSE に結合することが知られている【27】。哺乳類細胞において、HRD1 はプロモーター領域に UPRE-II および ERSE-I, -II 配列を有し、特に ERSE 配列を介した IRE1-XBP1 経路および ATF6 経路によって誘導されることが報告されている【28, 29】。一方、SEL1L においては、現在に至るまでプロモーター領域における既知の UPRE および ERSE 配列の存在は認められていないが、ATF6 経路によって誘導されることが明らかとなっている【28】。

HRD1-SEL1L 複合体の基質タンパク質

ERAD 機構における HRD1-SEL1L 複合体の基質タンパク質として、これまでに 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase や CD3- δ , T-cell receptor- α (TCR- α), misfolded major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, nuclear respiratory factor 1 (Nrf1), Z variant α 1-antitrypsin, p53 などが同定されている【30-33】。これらの他に、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 ; A β) の前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein ; APP) や、家族性パーキンソン病 (Parkinson's disease ; PD) 責任遺伝子 *PARK2* として知られるユビキチンリガーゼ Parkin の基質タンパク質である parkin-associated endothelin receptor-like receptor (Pael-R ; 別名 G protein-coupled receptor 37, GPR37), さらには Prion Protein, 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 の機能が破綻することにより、何らかの疾患が発症する可能性が示唆される【34-37】。

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD)

アルツハイマー病 (AD) は、進行性かつ不可逆性の認知機能の低下および人格の変化を主な症状とする疾患であり、認知症の主要な原因を成している。AD の定義となる病理学的特徴は、大脳皮質や海馬における老人斑の形成と神経原線維変化であり、これらを伴う神経変性および神経脱落による脳の萎縮が同疾患には認められる。

老人斑は異常線維構造物である A β を主要構成成分とする細胞外蓄積物であり、周囲を変性した神経突起やミクログリアが取り囲んでいる。A β は 40~42 アミノ酸からなるペプチドであり、APP から β -セクレターゼ (β -site APP cleaving enzyme ; BACE1) および γ -セクレターゼ (presenilin-nicastrin-APH-1-PEN-2 複合体) による連続的切断によって生理的に産生される【38】。一般に、A β 40 に比して A β 42 の凝集能は高く、神経毒性は高いことが示されている【39】。また、A β 40 と A β 42 の存在比 (A β 42/ A β 40) の増大は AD 発症に深く関与していると考えられている【40】。現在に至るまで、家族性 AD の原因遺伝子として、21 番染色体上の APP (例 : K670N/K671L, Sweden 型変異 ; V717I, London 型変異) や 14 番染色体上の presenilin 1, 1 番染色体上の presenilin 2 などの遺伝子変異が同定されており、いずれも A β の産生および蓄積を促進することが明らかになっている【41, 42】。また、孤発性 AD の遺伝的危険因子として唯一確立しているアポリポタンパク質 E の対立遺伝子である ϵ 4 の存在も A β の蓄積を促進することが示唆されている【43】。正常状態では、A β 40 および A β 42 とともに、生成後、凝集・蓄積する前に速やかに分解されると考えられている。よって、その存在量は生成と分解のバランスによって規定されている。産生された A β は、種々のメカニズムにより脳実質から除去されると考えられている。近年、A β を生理的に分解する中性エンドペプチダーゼ様プロテアーゼとしてネプリライシンが同定された【44-46】。ネプリライシンは II 型膜タンパク質であり、神経細胞では分泌顆粒内およびシナプス膜上で A β を分解する。ネプリライシンの活性および発現量は加齢とともに減少し、同酵素活性の低下は A β 量を上昇させることが明らかとなっている【47】。よって、加齢依存的なネプリライシン活性の低下が、孤発性 AD における A β 蓄積の原因である可能性が強く示唆されている。

一方、神経原線維変化は、高度にリン酸化された tau が細胞質内において線維化し、沈着した病理像である。tau は中枢神経系に多く発現する微小管結合タンパク質の一種であり、主にチューブリンとの結合による微小管重合の促進・安定化に寄与する他、神経細胞の形態形成や軸索極性、軸索輸送に関わることが報告されている【48】。また、ヒト成人脳では選択スプライシングにより、6 種類の tau タンパク質アイソフォームが存在する。これらは、N 末端側における挿入ドメイン数 (0N~2N) と C 末端側における微小管結合ドメインとして機能するリピート配列の数 (3 リピート (3R) もしくは 4 リピート (4R)) との組み合わせにより分類される【49】。また、tau

は前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia ; FTD) の原因遺伝子として同定されており、同疾患における変異遺伝子は現在に至るまで 10 種類以上が報告されている【50, 51】。中でも、G272V, P301L, V337M, R406W などのミスセンス変異は、微小管結合ドメインあるいは、その近傍に存在し、tau の微小管重合促進能を低下させる他、野生型と比して凝集しやすいことが確認されている。一方、凝集した A β はリン酸化酵素である GSK-3 β を活性化し、tau の過剰リン酸化を引き起こすことが報告されている【52, 53】。過剰リン酸化 tau の時間的・空間的蓄積は AD の病理進行を 6 段階に分類できるほど特徴的な分布を示し、神経細胞死の程度や認知障害などの臨床症状と高い相関があることが明らかになっている【54】。また、これらの病理学的変化を経て、実際に認知症を発症するまでには、10 年以上もの歳月を要すると考えられている。近年における家族性 AD を対象とした研究 (Dominantly Inherited Alzheimer Network ; DIAN) では、疾患発症の約 20 年前より A β の蓄積が開始 (髄液中の A β 42 が低下) し、約 10 年前から認知能力が徐々に低下することが示唆された【55】。しかしながら、A β の蓄積から過剰リン酸化 tau の蓄積、さらには神経変性へと病態が進行するメカニズムには、未だに不明な点が多く残されている。

ERAD 機構における HRD1 を介した APP の分解と A β 産生への影響

私たちは、近年 A β の前駆体タンパク質である amyloid precursor protein (APP) も HRD1 の基質であることを見出した。マウス脳組織を用いた解析では、海馬や大脳皮質の神経細胞において HRD1 と APP が共局在することが示唆された (図 3)。また、*in vitro* ユビキチン化実験では、APP が HRD1 によってポリユビキチン化されることを明らかにした【34】。続いて、培養細胞を用いて、APP の分解過程における HRD1 の関与を検討した。その結果、HRD1 の発現増加により、細胞内における APP の蓄積が抑制されることが明らかになった (図 4A)。また、これらはプロテアソーム阻害薬である MG132 の前処置より抑制されたことから、HRD1 を介した APP の減少は、プロテアソーム依存的なタンパク質分解に基づくことが示唆された (図 4A)。さらに、本条件下において、A β の産生量を解析した結果、HRD1 の発現増加により A β 40, A β 42 共にその産生量が有意に減少することが明らかとなった (図 4B)。よって、HRD1 は APP の分解を促進することで A β の産生を抑制することが示唆された【34】。一方、HRD1 の発現抑制による APP 分解への影響について検討を行った結果、HRD1 の発現抑制に伴い細胞内における APP の蓄積が認められた (図 4C)。また、小胞体ストレスの指標となる GRP78 および GRP94 の増加も認められたことから、HRD1 の発現抑制により小胞体ストレスが惹起されることも明らかになった (図 4C)。さらに、本条件下における A β の産生量を解析した結果、HRD1 の発現抑

制により A β 40, A β 42 共にその産生量が有意に増加することが明らかとなった(図 4D). よって, HRD1 の発現抑制により APP の蓄積と小胞体ストレスを伴う, A β の産生増加が惹起されることが明らかになった【34】.

このように私たちは, HRD1 が関与する ERAD 機構の機能破綻により, AD が発症する可能性を見出してきた. しかしながら, AD 患者における 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, 未だに不明な点が多く残されている. そこで本研究では, AD 発症原因としての ERAD 機能破綻を仮定して検討を行った. 第 1 章において, AD 患者死後大脳皮質を用いた小胞体ストレス応答関連遺伝子および関連タンパク質の発現解析を行った結果, ユビキチンリガーゼ HRD1 が AD 患者の大脳皮質では, タンパク質不溶化により特異的かつ有意に減少することが明らかになった. さらに, 第 2 章において, AD 発症機構の解明に向けた HRD1 減少機序の解析を行った結果, HRD1 タンパク質は酸化ストレスによってのみ不溶化することが示唆された.

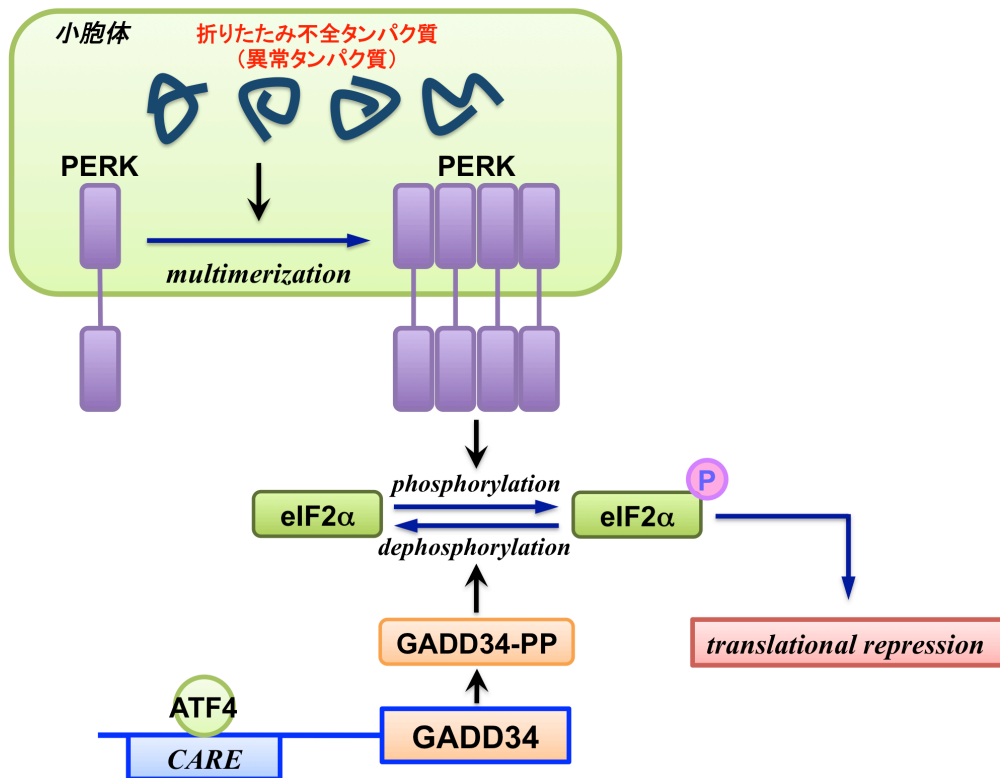


図 1A. 新生タンパク質の翻訳抑制機構

小胞体膜上に存在する PERK (PKR-like ER kinase) は、小胞体ストレスに応じてオリゴマーを形成し、自己リン酸化することで活性化する。活性化した PERK は、タンパク質翻訳開始因子である eIF2α (eukaryotic initiation factor 2α) の 51 位のセリンをリン酸化する。リン酸化された eIF2α は、43S initiation complex の形成を阻害し、タンパク質への翻訳開始を阻害する。これにより、多種のタンパク質が翻訳の抑制を受けるが、一方で、転写因子 ATF4 (activating transcription factor 4) などの発現量は増加する。ATF4 は、DNA 配列上の CARE (C/EBP-ATF response element) 領域に結合し、特定遺伝子の転写を促進する。それらの 1 つである GADD34 (growth arrest DNA and damage protein 34) は、セリン・スレオニン脱リン酸化酵素である PP1 (protein phosphatase 1) と複合体を形成し、リン酸化 eIF2α を再び脱リン酸化することで小胞体ストレス応答によるタンパク質翻訳抑制は終結する【56-58】。

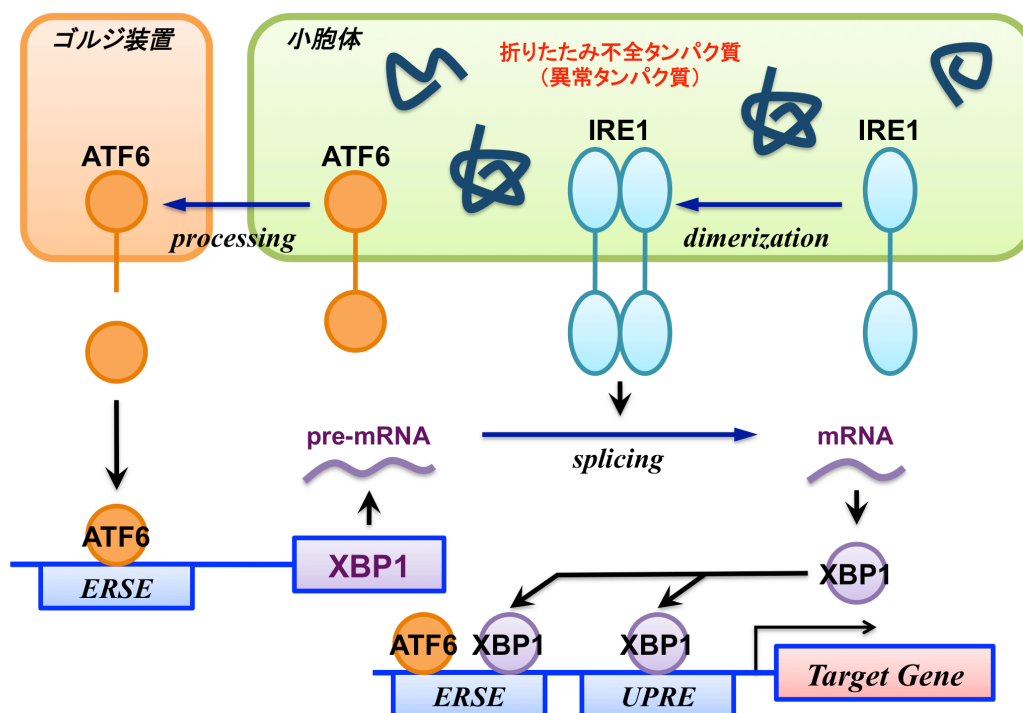


図 1B. UPR 応答遺伝子誘導機構

小胞体膜上に存在するストレスセンサー分子 IRE1 (inositol-requiring 1) や ATF6 (activating transcription factor 6) は、ストレスが負荷されていない定常状態においては、分子シャペロンである GRP78/BiP (glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein) と結合している。しかし、異常タンパク質が小胞体内腔に蓄積し、小胞体ストレス状態になると、GRP78/BiP は異常タンパク質に結合することで IRE1 および ATF6 より解離する【59, 60】。一方、GRP78/BiP が解離した ATF6 は、小胞体膜からゴルジ装置に輸送され、膜内で切断を受けた後、その細胞質領域は核内へと移行し、転写因子として ERSE (endoplasmic reticulum stress response element) に直接結合する【61】。転写された xbp1 (x-box binding protein 1) pre-mRNA は、ホモダイマーを形成して活性化した IRE1 によってスプライシングを受け、XBP1 が翻訳されるようになる【62】。転写因子である XBP1 は、核内の UPRE (unfolded protein response element) に結合して ERdj4 (ER-localized DnaJ-domain containing protein 4) や EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein) といった分子シャペロン遺伝子や ERAD 促進分子などの転写を誘導し、異常タンパク質の修復・分解を促進する【63, 64】。

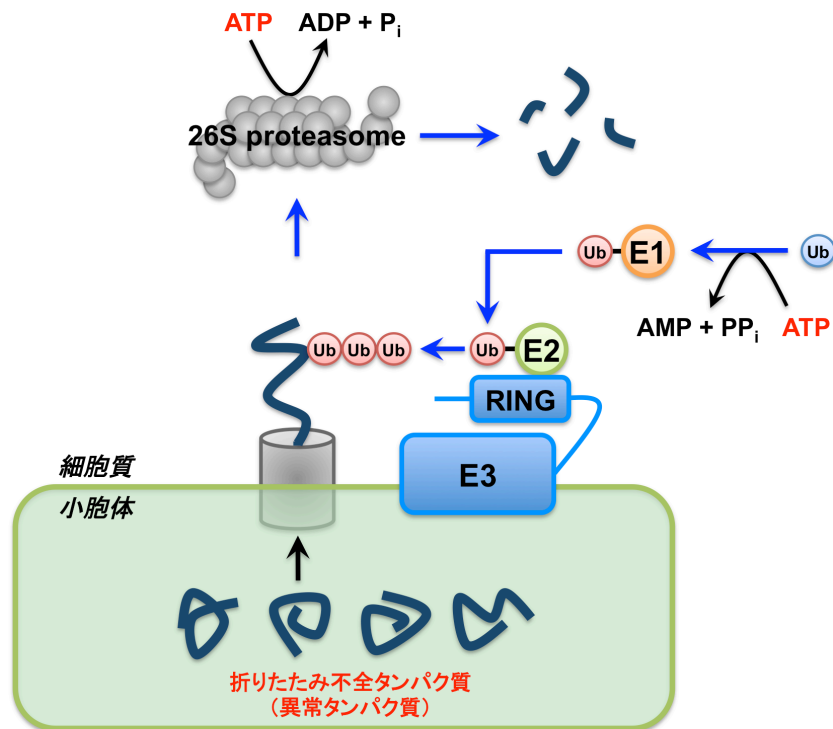


図 1C. 小胞体関連分解（ERAD）機構

膜貫通型タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体で折りたたまれ、種々の修飾を受けて正しい高次構造をとることによって機能性タンパク質へと成熟する。しかしながら、タンパク質の成熟は高頻度の割合で失敗し、小胞体内腔では分子シャペロンによる異常タンパク質の修復が試みられている。修復不可能な異常タンパク質は小胞体膜に存在するトランスロコンを介して細胞質側へと排出され【15】、その後速やかに、ユビキチン活性化酵素（ubiquitin-activating enzyme；E1）、ユビキチン結合酵素（ubiquitin-conjugating enzyme；E2）、ユビキチンリガーゼ（ubiquitin ligase；E3）などの分子によってATP依存的にユビキチン化される【16, 17】。そして、異常タンパク質に結合したユビキチンの48番目のリジン残基（K48）を介してポリユビキチン化されたものは、26Sプロテアソームによって認識されて分解・消化される【18】。

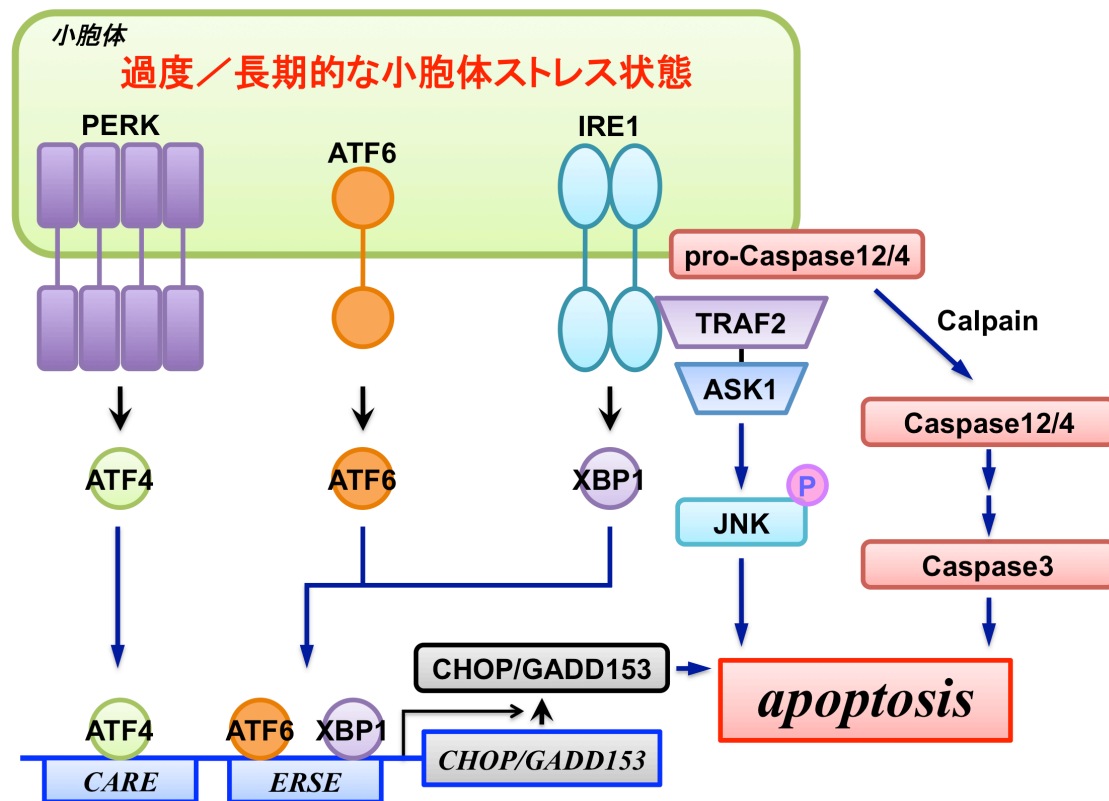
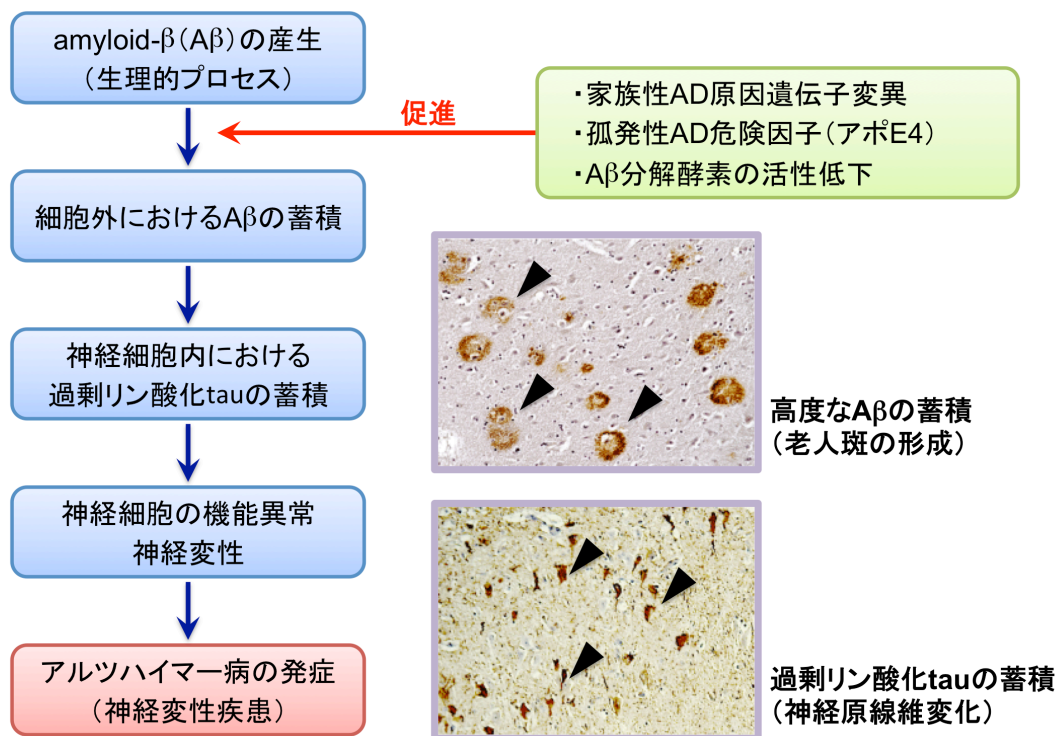


図 1D. 小胞体ストレス誘導性細胞死

小胞体ストレス応答から細胞死に至る情報伝達経路は複数存在する。TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) は、小胞体ストレスにより Pro-Caspase12 から解離し、活性化した IRE1 へと結合する。IRE1 に結合した TRAF2 は、ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) を活性化することで、JNK (c-Jun Nterminal kinase) 経路による細胞死を誘導する【4, 65】。一方、TRAF2 が解離した Pro-Caspase12 は、小胞体膜上でクラスターを形成した後、ER から放出された Ca^{2+} によって活性化したシステインプロテアーゼの一種である calpain によって切断され、活性型 Caspase12 となる【3, 4】。Caspase12 は Caspase9 を、さらに細胞死実行因子である Caspase3 を活性化し、細胞死を誘導する【5】。一方、ATF4, ATF6, XBP1 それぞれによって誘導される転写因子 CHOP (C/EBP-homologous protein) /GADD153 は、DR5 (death receptor 5) や BIM (B-cell leukaemia/lymphoma2 (BCL-2) interacting mediator of cell death) の誘導を介して細胞死を引き起こす【66-69】。



参考 : http://www.nirs.go.jp/seika/brain/outline/alzheimers_15.html

図 2. アルツハイマー病 (AD) における疾患発症機構の概念 (仮説)

脳実質におけるアミロイド B (Aβ) ペプチドの蓄積は、アルツハイマー病 (AD) の主たる発症原因として有力視されている。AD では、早期病変として Aβ の沈着が認められ、その数十年後に tau タンパク質の蓄積を介した神経原線維変化が生じると考えられている。その後、神経炎症や神経機能不全、さらには神経細胞死が誘導され、その結果、認知能力の低下と精神症状の発現に至ると推察されている。しかしながら、個々の病理現象との間を繋ぎ合わせた厳密な意味での疾患発症機構は、未だに確立されておらず、不明な問題が多く残されている。

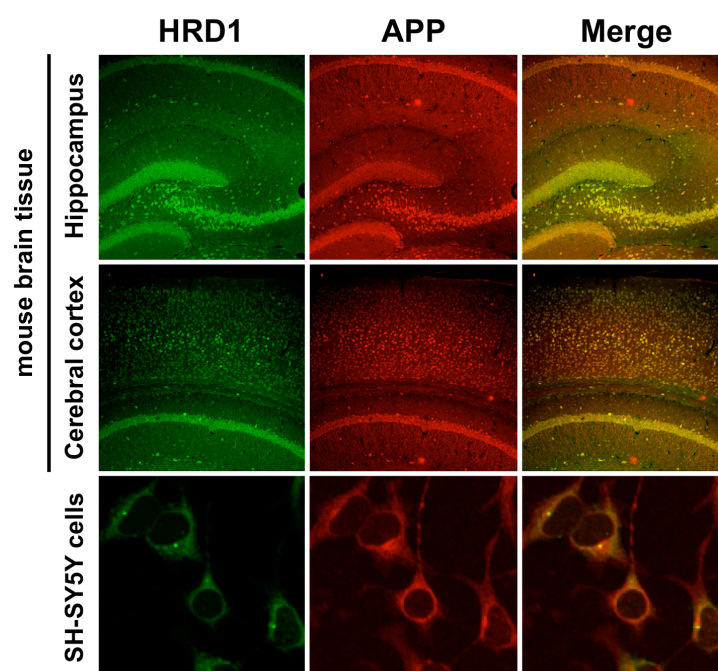


図 3. マウス脳組織におよび培養神経細胞内における HRD1 と APP の共局在

*ddy*系マウスより作成した冠状脳切片を用いて、マウス脳組織における HRD1 と APP の局在を解析した。蛍光免疫染色法により、HRD1 および APP の二重染色を行った結果、海馬および大脳皮質の神経細胞において、両タンパク質は共局在することが示された。一方、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、HRD1 および APP の細胞内局在を解析した結果、両タンパク質は小胞体において共局在することが示された【34】。

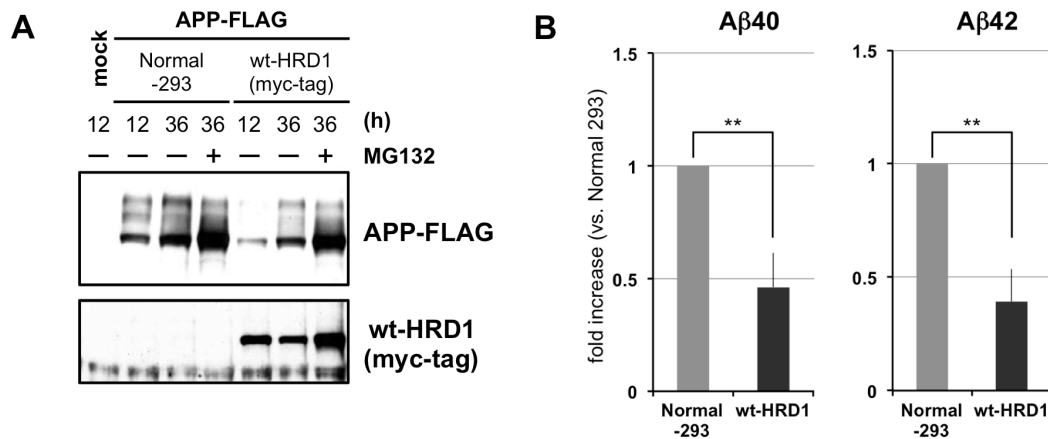


図 4A, B. APP の代謝分解過程における HRD1 を介した ERAD 機構の関与

野生型 HRD1 (wt-HRD1) を安定発現するヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に対して、APP-FLAG 発現ベクターをリポフェクション法により形質移入し、12 時間および 36 時間の培養を行った。一方、野生型 HEK293 細胞に対しては、空ベクター (mock) および APP-FLAG 発現ベクターの形質移入を行い、これらを wt-HRD1 安定発現株に対する比較対照群とした。各種培養細胞における APP のタンパク質量を、Western Blot 法により解析を行った結果、wt-HRD1 の発現により APP 量の減少が認められた。また、wt-HRD1 の発現による APP の減少は、回収 12 時間前における MG132 (プロテアソーム阻害剤; 10 μ M) の処理により抑制されることが示唆された。よって、APP は HRD1 を介したプロテアソーム依存的なタンパク質分解により、分解除去される可能性が示唆された。また、本条件下における培養液中に放出された A β 量を ELISA 法により定量した結果、wt-HRD1 の発現により A β 40 および A β 42 の産生量が有意に減少することが明らかになった。よって、HRD1 は APP の分解を促進することで、A β の産生を抑制する可能性が示唆された【34】。

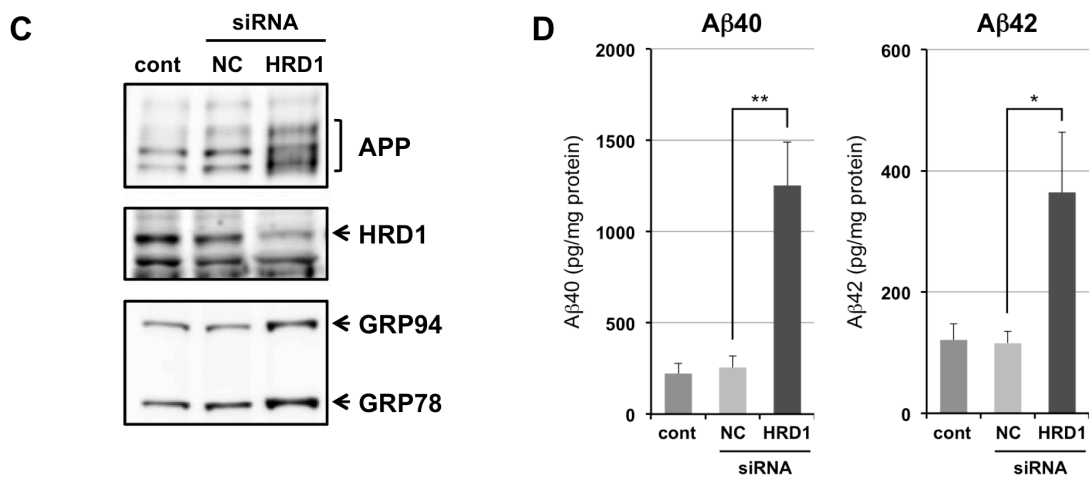


図 4C, D. HRD1 発現抑制による APP 代謝分解への影響

APP を安定発現するヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に対して、RNA 干渉法による HRD1 タンパク質の発現抑制を行った。各種培養細胞における APP のタンパク質量を、Western Blot 法により解析を行った結果、HRD1 の発現抑制により、細胞内における APP の蓄積が認められた。また、HRD1 の発現抑制により、小胞体ストレスの指標となる GRP78 および GRP94 の増加も認められた。また、本条件下における培養液中に放出された Aβ 量を ELISA 法により定量した結果、HRD1 の発現抑制により Aβ40 および Aβ42 の産生量が有意に増加することが明らかになった。よって、HRD1 の発現抑制により APP の蓄積と小胞体ストレスを伴う、Aβ の産生増加が惹起される可能性が示唆された【34】。

第 1 章

アルツハイマー病患者死後大脳皮質における

小胞体ストレス応答関連遺伝子および関連タンパク質の発現解析

【目的】

当研究室では、小胞体ストレス応答の一つである小胞体関連分解 ERAD 機構に着目し、これまでに数種類の新規ヒト ERAD 関連遺伝子の単離・同定に成功している【24】。その一つである 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になっている。すなわち、1) ユビキチンリガーゼ活性を有し、小胞体における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【24】、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【28】、3) 成体脳においては神経細胞特異的に発現する【25】、4) 家族性パーキンソン病の責任遺伝子 *PARK2* として知られるユビキチンリガーゼ 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 の蓄積による小胞体ストレスを抑制する【35】、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【34】。これらの他に、Prion 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 機構の機能破綻により神経変性疾患が発症する可能性が示唆されている【36, 37】。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、不明な点が多く残されている。

そこで第 1 章では、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、AD 患者死後大脳皮質における小胞体ストレス応答関連遺伝子および関連タンパク質の発現解析を行った。

【材料と方法】

1. タンパク質抽出液の調製（界面活性剤 NP-40 可溶性画分および不溶性画分）

ヒト死後脳（AD 患者群, 6 検体：非 AD 患者群, 8 検体）における大脳皮質切片 100 mg 重量に対して, lysis buffer A [1% NP-40, 10 mM Tris-HCl (pH7.6), 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, Complete™ Mini protease inhibitor cocktail tablets EDTA-free] を 1 mL 加え, 氷中で超音波破碎を行った. 氷中にて溶液を 20 分間静置した後, 遠心分離 [30,000 × *g*, 4 °C, 30 分間] を行い, 得られた上清を NP-40 可溶性画分とした.

一方, 沈殿物 (NP-40 不溶性画分) は lysis buffer A で洗浄した後, lysis buffer B [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycolate, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 1 mM PMSF, 100 µM sodium orthovanadate, 10 mM NaF, 100 nM okadaic acid] を加え, 再度氷中で超音波破碎を行った. 氷中にて溶液を 20 分間静置した後, 遠心分離 [20,400 × *g*, 4 °C, 20 分間] を行い, 得られた上清を NP-40 不溶性画分とした.

両画分におけるタンパク質抽出液の濃度測定は Bradford 法に従い, Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて行った.

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Western blot 解析

上述の方法で調製したタンパク質抽出液と 4 × Laemmli SDS-PAGE sample buffer [250 mM Tris-HCl (pH6.8), 20% 2-mercaptoethanol, 40% glycerol, 8% SDS, 0.01~0.02% bromophenol blue] を 3 : 1 (= タンパク質溶液 : Laemmli sample buffer) の割合で混合し, Western blot 用のサンプルとした.

調製したサンプルは, 7.5~15%の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動 [130 V 定電圧, 室温, 約 2 時間] を行った. 泳動後のゲルに含まれるタンパク質は, ニトロセルロース膜もしくは 100% methanol で処理した PVDF 膜へと転写 [100 V 定電圧, 4 °C, 1 時間] した. 転写後の膜は, 5% skim-milk を含む TBS-T [20 mM Tris-HCl (pH7.6), 137 mM NaCl, 0.1 v/v% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween-20 相当品)] でブロッキング [室温, 1 時間] を行った後, 希釈した各種一次抗体を反応 [4 °C, 一晚] させた.

翌日, 膜を TBS-T で洗浄 [10 分間 - 5 分間 - 5 分間] した後, 2 次抗体を反応 [室温, 0.5~1 時間] させた. 反応後, 膜を TBS-T で洗浄 [10 分間 - 5 分間 - 5 分間 - 5 分間] を行い,

Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) を用いて発光反応 [室温, 1 分間] を行った. 検出は LAS-3000 luminescent image analyzer (Fujifilm) を用いて行い, 定量は Multi Gauge software (Fujifilm) を用いて行った.

抗体反応条件一覧

1 次抗体	希釈溶液	希釈倍率	対応する 2 次抗体	希釈溶液	希釈倍率
Anti-HRD1 (ABGENT)	TBS-T	× 2,000	Anti-rabbit IgG-HRP (GE Healthcare)	TBS-T	× 2,500
Anti-HRD1 (Sigma-Aldrich)	5% skim-milk	× 2,000	Anti-rabbit IgG-HRP (GE Healthcare)	5% skim-milk	× 2,500
Anti-SELIL (Santa Cruz)	TBS-T	× 1,000	Anti-goat IgG-HRP (Promega)	TBS-T	× 5,000
Anti-β-actin (Santa Cruz)	5% skim-milk	× 2,000	Anti-mouse IgG-HRP (GE Healthcare)	5% skim-milk	× 2,500

3. Total RNA の抽出

ヒト死後脳 (AD 患者群, 6 検体 : 非 AD 患者群, 8 検体) における大脳皮質切片 50~100 mg 重量に対して, 1 mL の TRI Reagent™ を添加し, ポリトロンホモジナイザーによる破碎後, 室温で 5 分以上静置した. 組織懸濁液に 200 μ L の chloroform を添加し, ボルテックスミキサーを用いて 15 秒間の攪拌を行った後, 室温で 15 分間静置した. 遠心分離 [12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 15 分間] 後, 水層 (上層) を別のチューブへと移し, 水層に対して 1/10 量の 2-propanol を添加した. その後, 転倒混和を行ない, 室温で 5 分間静置した. 遠心分離 [12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分間] 後, 上清を別のチューブへと移し, 上清と等量の 2-propanol を添加した. その後, 転倒混和を行ない, 室温で 10 分間静置した. 遠心分離 [12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分間] 後, 得られた沈殿物を 1 mL の 75% ethanol で洗浄し, 再度, 遠心分離 [7,500 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分間] を行った. 得られた沈殿物は, 室温で 10 分間風乾した後, 50 μ L の 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理滅菌水で溶解し, インキュベーション [65 $^{\circ}$ C, 10 分間] を行った.

4. 逆転写反応による cDNA の合成

3. に準じて抽出した total RNA の濃度は, NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (SCRUM) を用いて, $\lambda = 260 \text{ nm}$ における吸光度を測定することにより定量を行った. Total RNA 3 μg 相当を DEPC 処理滅菌水により全量を 18 μL とした後, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer を添加し, RNA の熱変性 [70 °C, 10 分間] を行った. その後, 氷中で 2 分間静置し, reverse transcription solution [First-Strand Buffer {250 mM Tris-HCl (pH8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂}, 6 μL ; 0.1 M DTT, 1.5 μL ; 10 mM dNTP, 1.5 μL ; 200 U/ μL SuperScript™III RNase H⁻ Reverse Transcriptase, 0.75 μL ; 40 U/ μL RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor, 1.5 μL] を添加し, 逆転写反応 [50 °C, 1 時間] を行った. その後, 熱変性 [70 °C, 5 分間] を行ない, 逆転写反応を停止させた.

5. Real-time PCR (TaqMan プローブ法)

4. に準じて合成した cDNA を滅菌精製水 (sterile distilled water ; sd H₂O) により 8 倍に希釈し, cDNA サンプルとした. 続いて, 標準サンプル (希釈倍率: 1, 4, 16, 64, 256, 1024), sd H₂O (non template control ; NTC) および各 cDNA サンプルを 96-well プレートに 5 μL ずつ分注した後, 各 well に PCR 反応液 [125 nM TaqMan probe, 200 nM primers (forward/reverse), Master mix] を 20 μL ずつ添加した. PCR 反応および定量は, 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った.

TaqMan probe & Primers (Human) 一覧

Name	Sequence
HRD1 probe	5'-(FAM) ACT GCT GGA CGC CGC CAT GCT G (BHQ)-3'
HRD1 forward primer	5'-CAG AGC CTG CGT AAC ATC CAC-3'
HRD1 reverse primer	5'-TAG TGG CAG TCT CCT CAG TGG-3'
SEL1L probe	5'-(FAM) TGA GCA GCA ACA CAG TGC ACA AGC TAT GT (BHQ)-3'
SEL1L forward primer	5'-CAT TTA TTC ATT ACC GTC TGG CTT-3'
SEL1L reverse primer	5'-TTT CGC AAG GTG AAT ATC CTG T-3'
BiP probe	5'-(FAM) CCG CGT GGA GAT CAT CGC CA (BHQ)-3'
BiP forward primer	5'-CTA CTC CTG CGT CGG CGT-3'
BiP reverse primer	5'-TGA TGC GGT TGC CCT GAT-3'
β -actin probe	5'-(FAM) ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCT GAG CG (TAMURA)-3'
β -actin forward primer	5'-CCT GGC ACC CAG CAC AA-3'
β -actin reverse primer	5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'

6. Amyloid- β の抽出

ヒト死後脳 (AD 患者群, 6 検体 : 非 AD 患者群, 8 検体) における大脳皮質切片 150 mg 重量に対して, 70% formic acid を 1 mL 添加し, ダウンス型ホモジナイザーによる破碎 [Loose pestle \times 3, Tight pestle \times 3] 後, 遠心分離 [100,000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 時間] を行った. その後, 上清 (サンプル) を別のチューブへと移し, 1 M Tris Base を 1 : 20 (= サンプル : Tris Base) の割合で混合することでサンプルの中和を行った.

7. Sandwich ELISA 法

7.1. 組織由来 A β 40 の測定 [Human Amyloid β (1-40) 測定キット-IBL]

6. に準じて調製した Amyloid- β (A β) 抽出液中に含まれる A β 40 を, Human Amyloid β (1-40) 測定キット-IBL (IBL) を用いて定量した. 標準物質 [Human A β (1-40)] は, 希釈用緩衝液を用いて所定の濃度 [500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 (pg/mL)] へと希釈し, 希釈標準液とした. A β 抽出液は必要に応じて希釈用緩衝液にて 2~2,000 倍に希釈し, 検体サンプルとした. 調製が完了した希釈標準液, 検体サンプルおよび盲検液 (希釈用緩衝液) は, 96-well 抗体プレート [anti-human A β (35-40) (1A10) mouse IgG monoclonal antibody 固相] に 100 μL ずつ分注し, 固相抗体と反応 [4 $^{\circ}\text{C}$, 一晚] させた.

翌日, 各 well 内の溶液を除去後, 洗浄液 (リン酸緩衝液) を用いて洗浄操作 [7 回] を行った. 洗浄液を完全に除去した後, 各 well に標識抗体 [HRP 標識 anti-human A β (11-28) mouse IgG monoclonal antibody A.P.] を 100 μL ずつ添加し, 抗原と反応 [4 $^{\circ}\text{C}$, 1 時間] させた. 反応後, 各 well 内の溶液を除去後, 洗浄液 (リン酸緩衝液) を用いて洗浄操作 [9 回] を行った. 洗浄液を完全に除去した後, 各 well に基質溶液 (tetramethylbenzidine ; TMB) を 100 μL ずつ添加し, 発色反応 [遮光下, 室温, 30 分間] を行った. 反応後, 各 well に停止液 (1 N H_2SO_4) を添加し, 反応を停止させた. 各サンプルにおける A β 40 の濃度は, Varioskan Flash マルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて $\lambda = 450 \text{ nm}$ における吸光度を測定することにより定量を行った.

7.2. 組織由来 A β 42 の測定 [Human Amyloid β (1-42) 測定キット-IBL]

6. に準じて調製した Amyloid- β (A β) 抽出液中に含まれる A β 42 を, Human Amyloid β (1-42) 測定キット-IBL (IBL) を用いて定量した. 標準物質 [Human A β (1-42)] は, 希釈用緩衝液を用いて所定の濃度 [800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 (pg/mL)] へと希釈し, 希釈標準液とした. A β

抽出液は必要に応じて希釈用緩衝液にて 2~2,000 倍に希釈し、検体サンプルとした。調製が完了した希釈標準液、検体サンプルおよび盲検液（希釈用緩衝液）は、96-well 抗体プレート [anti-human Aβ (38-42) rabbit IgG A.P. 固相] に 100 μL ずつ分注し、固相抗体と反応 [4 °C, 一晚] させた。標識抗体との反応、発色反応、発色停止反応、および各サンプルにおける Aβ42 の定量は、上述 7.1. に準じて行った。

8. 統計処理

定量結果は $\text{mean} \pm \text{SE}$ で示し、2 群間の比較における統計学的有意差は、two-tailed Student's *t* tests により判定を行った。また、統計学的相関性は、Pearson product-moment correlation coefficient により求めた。

【結果】

1. A β 蓄積量を指標とした検体の選定

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は、大脳皮質における A β を主要構成成分とした老人斑の形成を病理学的所見とした神経変性疾患の一つである。同疾患の発症機構を、ヒト脳組織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は非常に重要である。しかしながら、本研究で用いた検体 (AD 患者・非 AD 患者の死後大脳皮質切片) は、1) どのような診断方法により AD と診断されたのか、2) 各 AD 患者は、AD のどのステージに該当するのか、3) 検体は大脳皮質のどの部位であるか (老人斑や神経変性が認められる部位であるか否か) は不明であった。さらに、4) 対照 (非 AD 患者) 群が生前 AD に罹患していなかったことを証明する根拠などは得られていなかった。そこで、本研究では A β 蓄積量の多寡を指標として、各検体に対する生化学的解析および各群における検体の選定を行った (表 1)。対照群 (平均年齢 78 歳) および AD 患者群 (平均年齢 80 歳) の死後大脳皮質における A β を抽出し、ELISA 法を用いて A β の定量を行った。その結果、興味深いことに対照群においても A β の蓄積量が多く、また、A β 40 と A β 42 の存在比 (A β 42/A β 40) が顕著に増大し、AD の特徴を有する検体が 3 例 (対照群 ; #3, #5, #8) 確認された。一方、AD 患者群においては A β の蓄積量が少ない検体が 1 例 (AD 患者群 ; #3) 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 (対照群 5 例, AD 患者群 5 例) に関して比較検討を行った。

2. AD 患者死後大脳皮質における小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現解析

近年の神経病理学や分子遺伝学の発展により、神経変性疾患では神経細胞への異常構造を有したタンパク質 (異常タンパク質) の凝集・蓄積が共通の病理学的所見であることが報告されている【6, 7】。同疾患の病因に関連する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、小胞体ストレスを惹起させることで神経細胞死を誘発すると推察されている。そこで本研究では、小胞体ストレス応答関連遺伝子である HRD1 (ユビキチンリガーゼ : E3), SEL1L (ERAD 基質認識因子) および GRP78/Bip (小胞体シャペロン) の mRNA 量を real-time PCR 法を用いて解析を行うことで、AD 発症機序における小胞体ストレスの関与を検討した。その結果、HRD1 および GRP78/Bip の mRNA 量が AD 患者群において有意に増加していることが本研究で明らかになった。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ったことが示唆された (図 5)。

3. AD 患者死後大脳皮質における小胞体関連分解 (ERAD) 関連タンパク質の発現解析

小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現解析により、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示唆された。しかしながら、小胞体ストレス誘発の原因や小胞体におけるタンパク質品質管理機構の破綻等については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、ERAD 機構に関連する小胞体膜画分（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 法を用いて解析を行った。その結果、HRD1 タンパク質量が AD 患者群において有意に減少していることが明らかになった（図 6A）。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 が特異的に減少していることが示唆された（図 6A, B）。また、先の遺伝子発現解析により、AD 患者群においては HRD1-mRNA の有意な増加が認められており、HRD1 タンパク質量の減少は同 mRNA の発現低下に伴うものではないことが明らかになった。

AD 患者脳においては、A β や過剰リン酸化 tau の様に、種々の不溶化したタンパク質が認められることから、続いて NP-40 不溶性画分の解析を行った。NP-40 不溶性画分を界面活性剤である SDS, Triton X-100 およびデオキシコール酸によって可溶化を行い、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。その結果、同不溶性画分の HRD1 タンパク質量が AD 患者群において有意に増加していることが明らかになった（図 6C）。また、NP-40 可溶性画分においては有意な変化が認められなかった SEL1L タンパク質量も、同不溶性画分では AD 患者群において有意に増加していることが明らかになった（図 6D）。

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。上述の知見より、AD 患者群において HRD1 および SEL1L は複合体として共に不溶化を起こした可能性が推測された。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、 $r=0.81$ と高い相関関係を有することが明らかになった（図 6E）。よって、HRD1 と SEL1L は複合体として共に不溶化を起こした可能性が示唆された。

4. AD 患者死後大脳皮質における A β 蓄積量と HRD1 タンパク質量との相関

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 β の産生増加を引き起こすことが明らかになっている【34】。そこで、ヒト大脳皮質における HRD1 タンパク質量の減少が A β の産生増加に関与する可能性を検討するため、ヒト死後大脳皮質における A β 蓄積量と NP-40

可溶性画分およびNP-40 不溶性画分における 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(図 7A:A β 40, $r = -0.70$; A β 42, $r = -0.69$)。一方、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示唆された(図 7B : A β 40, $r = 0.70$; A β 42, $r = 0.70$)。よって、これらの結果から、ヒト大脳皮質における A β 産生・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示された他、タンパク質不溶化による機能的な HRD1 タンパク質量の減少が A β 産生増加に関与する可能性が示唆された(図 7A, B)。

表 1. 各検体における A β 蓄積量

対照群		性別	年齢 (歳)	死後 (時間)	Aβ40	Aβ42	Aβ42/Aβ40
					(pg/ml)		
	#1	男	84	6	3.26×10 ²	3.33×10 ²	1.02
	#2	男	77	8	2.81×10 ²	2.27×10 ²	0.81
	#3	女	90	6	3.15×10 ³	2.54×10 ⁴	8.07
	#4	男	79	6	2.57×10 ²	1.93×10 ²	0.75
	#5	女	88	6	3.79×10 ³	8.50×10 ⁴	22.46
	#6	女	65	4	2.66×10 ²	1.70×10 ²	0.64
	#7	男	77	5	3.25×10 ²	1.26×10 ²	0.39
	#8	女	64	5	3.26×10 ²	4.59×10 ⁴	14.06
平均値			78.0	5.75	1.46×10 ³	1.97×10 ⁴	6.02
標準誤差			3.40	0.41	5.73×10 ²	1.11×10 ⁴	2.93

AD患者群		性別	年齢 (歳)	死後 (時間)	Aβ40	Aβ42	Aβ42/Aβ40
					(pg/ml)		
	#1	男	90	7	1.13×10 ³	5.28×10 ³	4.68
	#2	男	82	4	3.14×10 ³	1.31×10 ⁵	41.66
	#3	女	85	7	1.12×10 ²	1.62×10 ²	1.44
	#4	男	73	4	5.08×10 ⁴	1.36×10 ⁵	2.68
	#5	女	82	4	1.75×10 ⁴	2.64×10 ⁵	15.07
	#6	女	70	4	2.74×10 ³	6.67×10 ⁴	24.40
平均値			80.3	5.00	1.26×10 ⁴	1.00×10 ⁵	14.99
標準誤差			3.06	0.63	8.07×10 ³	4.05×10 ⁴	6.43

各検体の大脳皮質における A β 蓄積量は、sandwich ELISA 法を用いて定量した。また、本研究において除外した検体（対照群，3 例；AD 患者群，1 例）は赤字で示した。

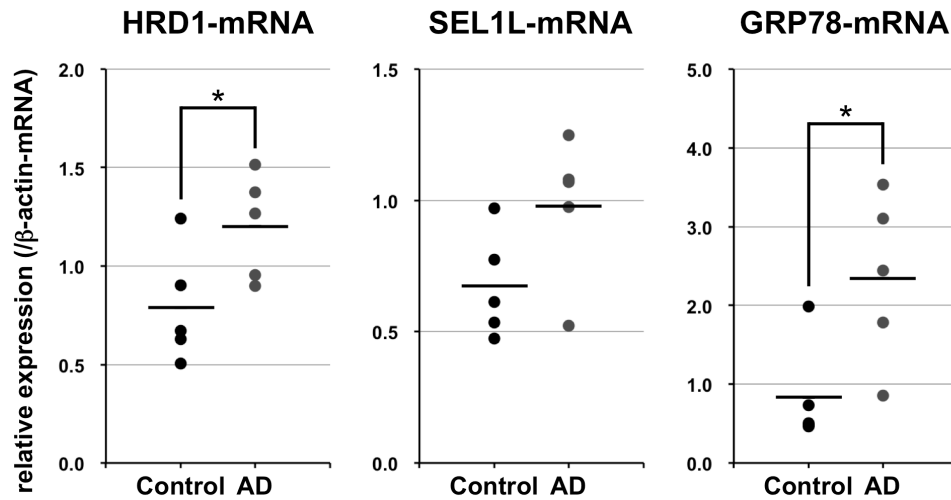


図 5. ヒト死後大脳皮質における小胞体ストレス応答関連遺伝子の mRNA 発現量

対照群 (Control) および AD 患者群 (AD) の死後大脳皮質より total RNA を抽出し, cDNA の合成を行った. その後, real-time PCR 法を用いて, HRD1, SEL1L, GRP78 および β -actin の mRNA 量を測定した. データは β -actin の mRNA 量で標準化を行い, 結果はドットプロット (Control, $n = 5$; AD, $n = 5$) により示し, 平均値は横線で示した. また, 統計学的有意差は Student's t -test によって判定を行った (Control vs. AD ; $*p < 0.05$).

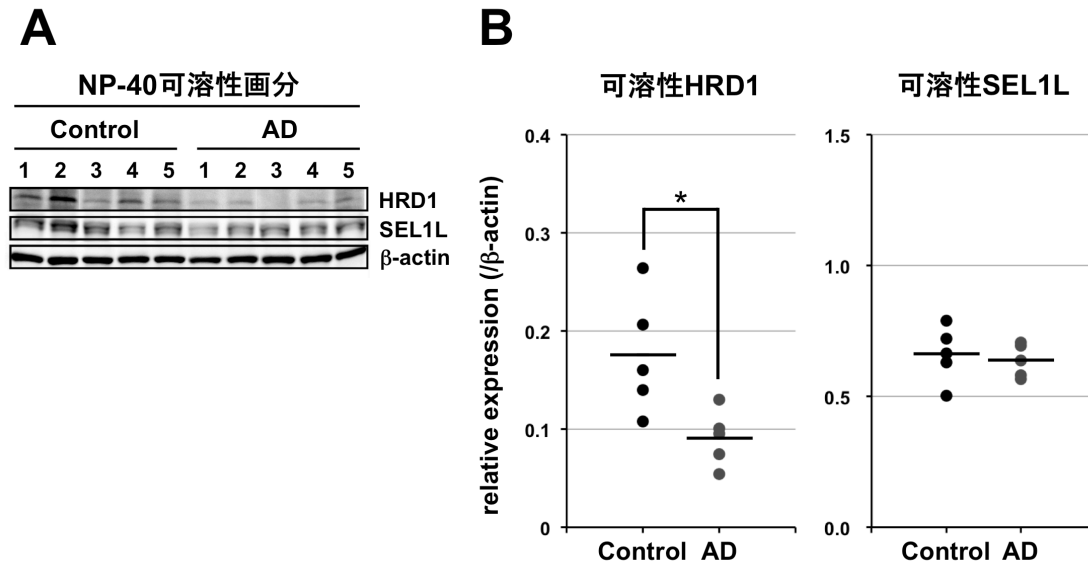


図 6A, B. ヒト死後大脳皮質における NP-40 可溶性 HRD1 および SEL1L の発現量

(A) 対照群 (Control) および AD 患者群 (AD) の死後大脳皮質より、界面活性剤 NP-40 を用いてタンパク質の抽出を行った。その後、Western blot 法を用いて、HRD1、SEL1L および β -actin の検出を行った。

(B) (A)における各バンドの定量は、解析ソフト Multi Gauge (Fijifilm) を用いて行い、データは β -actin で標準化を行った。また、結果はドットプロット (Control, $n = 5$; AD, $n = 5$) により示し、平均値は横線で示した。また、統計学的有意差は Student's t -test によって判定を行った (Control vs. AD ; $*p < 0.05$)。

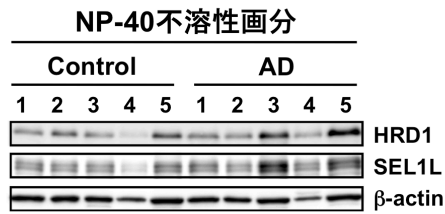
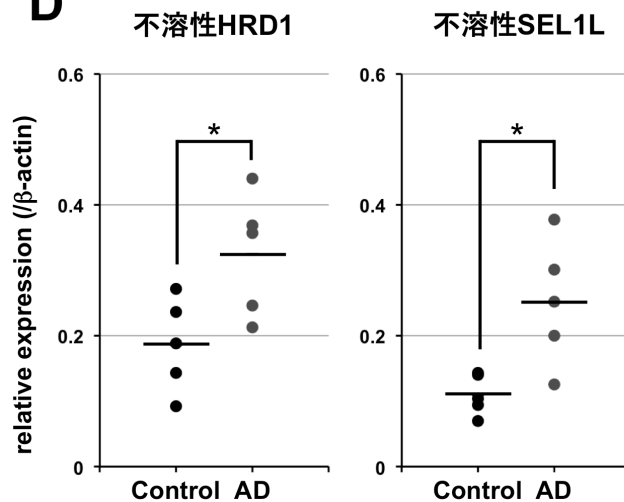
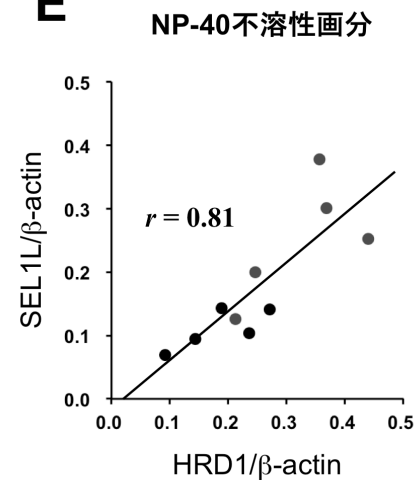
C**D****E**

図 6C-E. ヒト死後大脳皮質における NP-40 可溶性 HRD1 および SEL1L の発現量

(C) 対照群 (Control) および AD 患者群 (AD) における NP-40 不溶性画分を SDS で可溶化し、同不溶性画分のタンパク質の抽出を行った。その後、Western blot 法を用いて、HRD1、SEL1L および β -actin の検出を行った。

(D) (C)における各バンドの定量は、解析ソフト Multi Gauge (Fijifilm) を用いて行い、データは β -actin で標準化を行った。また、結果はドットプロット (Control, $n=5$; AD, $n=5$) により示し、平均値は横線で示した。また、統計学的有意差は Student's t -test によって判定を行った (Control vs. AD ; $*p < 0.05$)。

(E) (C, D)における Western blot の解析データをもとに、NP-40 不溶性画分における HRD1 と SEL1L との間の相関係数を、Pearson product-moment correlation coefficient により求めた ($r = 0.81$: Control, $n=5$; AD, $n=5$)。

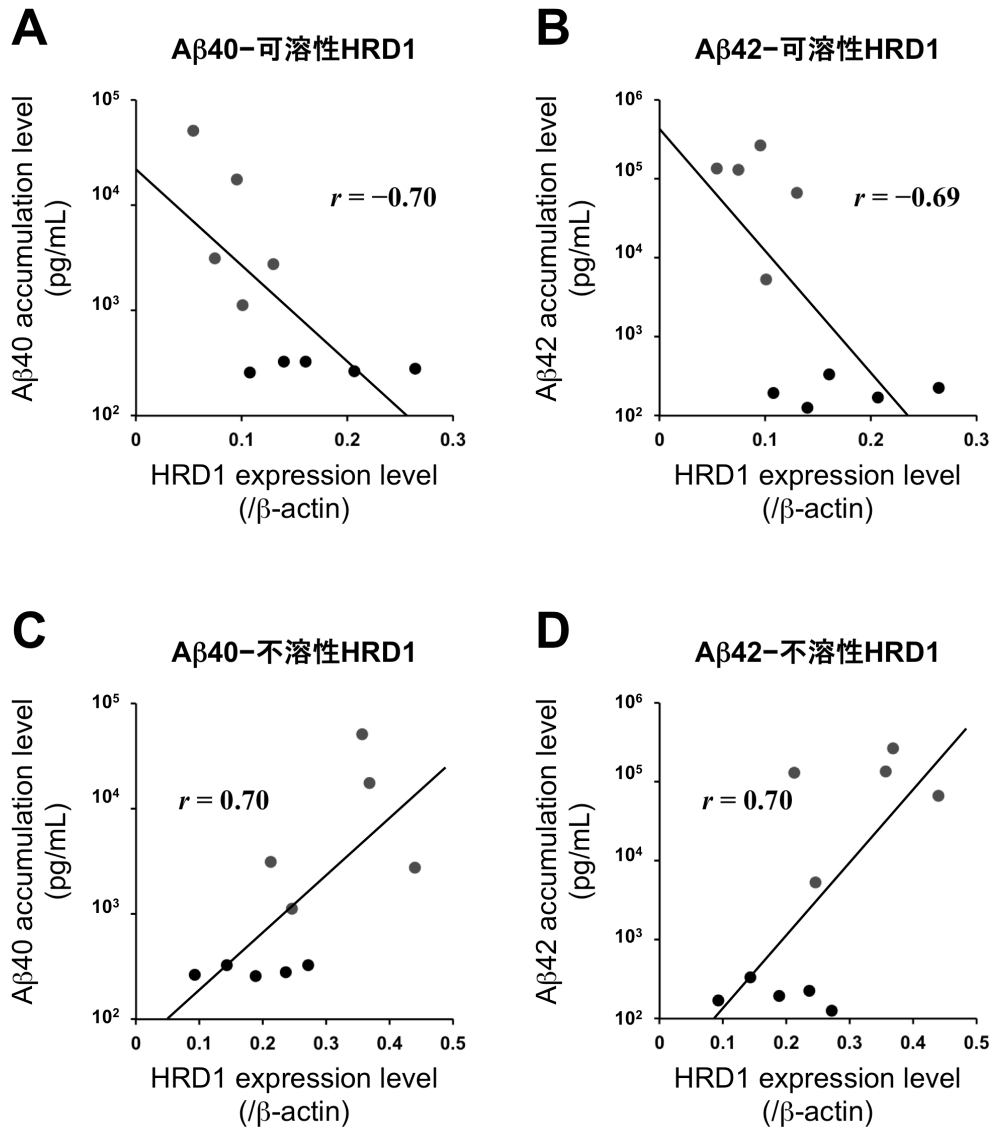


図 7. ヒト死後大脳皮質における Aβ 蓄積量と HRD1 タンパク質量との相関

表 1. における Aβ の定量データと図 6. における Western blot の解析データをもとに、Aβ 蓄積量と HRD1 タンパク質量との間における相関係数を Pearson product-moment correlation coefficient により求めた。

(A, B) Aβ 蓄積量と NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量との相関

(Aβ40, $r = -0.70$; Aβ42, $r = -0.69$)

(C, D) Aβ 蓄積量と NP-40 不溶性画分における HRD1 タンパク質量との相関

(Aβ40, $r = 0.70$; Aβ42, $r = 0.70$)

【考察】

脳組織を用いた研究を遂行する上で、各検体に対する確かな病理学的背景を知ることが非常に重要である。しかしながら、現在、AD の確定診断法は確立されておらず、臨床的診断と AD の病態を正確に結びつけることは困難を極める。AD の病理学的所見として、大脳皮質における高度な A β の沈着や、これを主要構成成分とする老人斑の形成は、一般的に広く知られている。そこで、本研究では生前における臨床的診断に加え、AD の病理学的所見に基づいて、大脳皮質における A β 蓄積量の多寡を指標とした検体の診断および選定を行った（表 1）。本選定により、対照（非 AD）群においては、A β 蓄積量が AD 患者群と同等、もしくはそれ以上の検体が 3 例（対照群；#3, #5, #8）検出された。これらの検体は、認知症に罹患していたが AD と診断されなかった、もしくは、軽度認知障害（Mild Cognitive Impairment；MCI）か、それ以前であった可能性が推察される。一方、AD 患者群においては、A β 蓄積量が対照群と同等の検体が 1 例（AD 患者群；#3）検出された。当検体は上述のような AD の病理学的所見とは一致しないことから、AD ではなく、A β が蓄積しない別のタイプの認知症（レビー小体型認知症や血管性認知症など）であったか、もしくは、非病変部位（側頭葉・頭頂葉・後頭葉以外に位置し、A β の蓄積や神経変性が顕著に認められていない大脳皮質部位）であった可能性が推測される。よって、本研究においては当該の 4 検体（対照群 3 例、AD 患者群 1 例）を除外し、生化学的根拠を有する検体、すなわち、対照群においては A β 蓄積量が AD 患者群と比較して少ない検体 5 例を、AD 患者群においては A β 蓄積量の多い検体 5 例を用いて比較検討を行った。

本研究により、AD 患者の死後大脳皮質において、小胞体ストレス応答遺伝子である HRD1、SEL1L および GRP78 の mRNA 量は対照群と比較して増加を示していたことから、AD 患者の大脳皮質は小胞体ストレス状態にあったことが示唆された（図 5）。また、AD 患者群においては、異常構造を有した APP の分解に寄与するユビキチンリガーゼ HRD1 のタンパク質量が、特異的かつ有意に減少していることが明らかになった（図 6A, B）。この結果は、Katayama 等の報告【70】と一致して、AD 病態における小胞体ストレスの関与を支持する一方で、HRD1-mRNA の発現低下に伴い HRD1 タンパク質が減少したという可能性については否定された。AD 患者群における HRD1 タンパク質の減少原因として、転写・翻訳後におけるタンパク質合成系の異常も推察されたが、HRD1 タンパク質が特異的な減少を示した点を考慮すると、HRD1 タンパク質の成熟過程における異常は考え難い。一般に、神経変性疾患においては凝集・蓄積した多くの不溶性タンパク質が認められるため、NP-40 不溶性画分における HRD1 タンパク質量の解析を行った。その結果、興味深いことに NP-40 不溶性画分では、AD 患者群において HRD1 および SEL1L タンパク質量の有意な増加が明らかになり、NP-40 可溶性画分（小胞体膜画分）における HRD1 タンパク質量の減少は、同タンパク質が不溶化を起こすことに基づく可能性が示唆さ

れた (図 6C, D). また, HRD1 と SEL1L は脳神経細胞内において複合体を形成していることから, 両タンパク質が複合体を形成したまま不溶化した可能性も考えられる. 事実, NP-40 不溶性画分における HRD1 タンパク質量と SEL1L タンパク質量との間には高い正の相関関係があり, 両タンパク質は共に不溶化した可能性が示唆された (図 6E). 一方, NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量と SEL1L タンパク質量との間には相関性がなく (データ未提示), タンパク質不溶化に基づく SEL1L タンパク質量の減少は起きていない様に見える (図 6A, B). しかしながら, 脳神経細胞における HRD1 と SEL1L の細胞内含有量に差があると仮定した場合, 両タンパク質が共に不溶化した (同一量減少した) としても, その可溶性画分における相対的なタンパク質の減少量には差が生じると推察される. すなわち, SEL1L の細胞内含有量が HRD1 と比較して格段に多いと仮定した場合, タンパク質不溶化による NP-40 可溶性画分における SEL1L の減少が HRD1 ほど顕著に検出されなかった可能性が考えられる.

次に, 培養細胞における研究成果をもとに, ヒト大脳皮質における HRD1 タンパク質量の減少が A β の産生増加に寄与する可能性について検討を行った結果, ヒト死後大脳皮質における 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, 一方, 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になった (図 7). 本解析結果より, タンパク質不溶化による HRD1 タンパク質量の減少と, ヒト脳組織における A β 蓄積量, さらに AD 発症との関連性が示唆されたが, その結果のみでは AD 患者における HRD1 タンパク質の不溶化による減少が A β の産生を増加させたとは断定できない. すなわち, 培養細胞レベルでは HRD1 の発現抑制により A β の産生増加や小胞体ストレス, さらにアポトーシスを惹起することが実験的に証明されているが, ヒト脳組織におけるそれらの因果関係は未だに明らかになっていないため, 本仮説とは逆に, 凝集・蓄積した A β による神経毒性が HRD1 タンパク質の不溶化と減少を惹起する可能性も否定できない. そこで現在, それらの因果関係を明らかにするため, HRD1 ノックアウトマウスを用いた記憶・学習に関する行動解析や, その摘出脳における AD 様病変 (A β や過剰リン酸化 tau の蓄積および神経脱落による脳の萎縮) の有無について検討中である. また, 今回の検体は AD 患者の病態進行度が不明であったため, 今後は AD の各ステージにおける HRD1 タンパク質量と A β 蓄積量との相関性について詳細に検討を行うことも, HRD1 タンパク質の減少と AD 発症との因果関係を証明する上で必要になるであろう.

第 2 章

アルツハイマー病発症機構の解明に向けた HRD1 減少機序の解析

【目的】

ヒト脳組織を用いた解析により、AD 患者の脳皮質は小胞体ストレス状態にあったことが明らかになった。また、異常構造を有した APP の代謝分解に関与し、小胞体関連分解 (ERAD) 構成因子の一つであるユビキチンリガーゼ HRD1 が、AD 患者の死後脳皮質においては、タンパク質不溶化により、特異的かつ有意に減少していることが示唆された。さらに、ヒト脳組織における 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になった。しかしながら、タンパク質不溶化に基づく HRD1 減少機序においては、未だに不明な点が多く残されている。すなわち、AD の病態形成過程において、HRD1 タンパク質の減少が A β 産生増加の原因となったのか、もしくは疾患発症の結果として減少したのかは、解明する必要があると推察される。そこで本研究では、HRD1 タンパク質不溶化の原因究明を通して、小胞体膜画分における機能的な HRD1 タンパク質の減少機序を解明するため、AD 関連分子および各種ストレスによる HRD1 タンパク質量および不溶化への影響を検討した。

【材料と方法】

1. 動物飼育

実験動物の取扱は、すべてアメリカ国際衛生研究所における実験動物の管理と使用に関する指針 (The National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) にのっとり、京都薬科大学薬学部動物委員会規約および千葉科学大学薬学部動物委員会規約に基づいて行った。C57BL/6J 系マウス、ヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein with Swedish mutation, APP_{SWE}) 遺伝子導入マウス (Tg2576 マウス) およびヒト変異型 tau (tau with P301L mutation, tau_{P301L}) 遺伝子導入マウス (JNPL3 マウス) を、自由摂取および自由摂水下、室温 [22-24 °C] で、12 時間明期および 12 時間暗期をもつ明暗サイクル下で飼育した。

2. 細胞培養

2.1. マウス神経芽細胞腫 (Neuro-2a)

マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a は、10% FCS [ウシ胎児血清, 56 °C, 30 分間非働化处理] を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)-high glucose 中で培養し、実験に用いるまでインキュベーター [37 °C, 5% CO₂/95% air] 内に静置した。

2.2. Neuro-2a-presenilin 2 安定発現株

Presenilin 2 を安定発現させた Neuro-2a 細胞は、10% FCS および 0.5 mg/mL Geneticin® (G418: 選択培地用抗生物質) を含む DMEM-high glucose 中で培養し、実験に用いるまでインキュベーター [37 °C, 5% CO₂/95% air] 内に静置した。

2.3. ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y)

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y は、10% FCS [ウシ胎児血清, 56 °C, 30 分間非働化处理] を含む DMEM-high glucose 中で培養し、実験に用いるまでインキュベーター [37 °C, 5% CO₂/95% air] 内に静置した。

3. 形質移入

2.2. に準じて培養した Neuro-2a-presenilin 2 安定発現株を 6 cm 培養 dish に播種し、継代翌日にリポフェクション法を用いて形質移入を行った。1 mL の OPTI-MEM® I に 5 µg 相当の DNA (pcDNA3.1-APP-FLAG もしくは pcDNA3.1 空ベクター(mock)) および 5 µL の Plus™ Reagent を添加後、静置 [室温, 5 分間] した。その後、12.5 µL の Lipofectamine™ LTX を添加し、静置 [室温, 30 分間] した。静置の間、培養 dish 中の DMEM を 3.5 mL の OPTI-MEM® I に置換した。調製した DNA-Lipofectamine 混合溶液 1 mL を培養 dish に添加し、インキュベーター [37 °C, 5% CO₂/95% air] 内で 3 時間静置した。その後、0.5 mL の FCS を培養 dish に添加し、実験に用いるまでインキュベーター [37 °C, 5% CO₂/95% air] 内に静置した。タンパク質抽出液の調製については、形質移入後 24 時間に回収した細胞から行った。

4. 薬物処理

2.1. に準じて培養した Neuro-2a を 6 cm 培養 dish に播種し、継代翌日に tunicamycin (Tm ; 5 µg/mL) および thapsigargin (Tg ; 1 µM) に曝露した。一方、2.3. に準じて培養した SH-SY5Y を 6 cm 培養 dish に播種し、継代翌日に hydrogen peroxide (H₂O₂ : 10~50 µM), rotenone (50~200 nM), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE : 1~15 µM) および cycloheximide (CHX : 25 µg/mL) に曝露した。

5. タンパク質抽出液の調製 (界面活性剤 NP-40 可溶性画分および不溶性画分)

5.1. マウス脳組織からの抽出

1. に準じて飼育したマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、脳の摘出を行った後、第 1 章 1. の手順に従って NP-40 可溶性画分および不溶性画分におけるタンパク質の抽出を行った。

5.2. 培養神経細胞からの抽出

2. に準じて培養した神経細胞を培養液と共に回収し、遠心分離 [190 × g, 室温, 5 分間] を行った。上清 (培養液) を回収後、沈殿 (細胞) を冷却した PBS で洗浄し、100~400 µL の lysis buffer A [1% NP-40, 10 mM Tris-HCl (pH7.6), 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 µg/mL aprotinin, 10

μg/mL leupeptin, 1 mM PMSF] へ懸濁後、氷中で 20 分間静置した。静置後、遠心分離 [20,400 × g, 4 °C, 30 分間] を行い、得られた上清を NP-40 可溶性画分とした。

一方、沈殿物 (NP-40 不溶性画分) は lysis buffer A で洗浄した後、100~400 μL の lysis buffer B [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycolate, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 μg/mL aprotinin, 10 μg/mL leupeptin, 1 mM PMSF] を添加し、氷中で超音波破碎を行った。氷中にて溶液を 20 分間静置した後、遠心分離 [20,400 × g, 4 °C, 20 分間] を行い、得られた上清を NP-40 不溶性画分とした。

両画分におけるタンパク質抽出液の濃度測定は Bradford 法に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて行った。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Western blot 解析

SDS-PAGE および Western blot 解析は、第 1 章 2. の手順に従って行った。

7. Total RNA の抽出

2. に準じて培養した神経細胞を培養液と共に回収し、遠心分離 [190 × g, 室温, 5 分間] を行った。上清 (培養液) を回収後、沈殿 (細胞) を冷却した PBS で洗浄した後、第 1 章 3. の手順に従って total RNA の抽出を行った。

8. 逆転写反応による cDNA の合成

7. に準じて抽出した total RNA の濃度は、NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (SCRUM) を用いて、λ = 260 nm における吸光度を測定することにより定量を行った。Total RNA 2 μg 相当を DEPC 処理滅菌水により全量を 12 μL とした後、8 μL の reverse transcription solution [5 × VILO™ Reaction Mix, 4 μL ; 10 × SuperScript® Enzyme Mix, 2 μL ; DEPC 処理滅菌水, 2 μL] を添加し、インキュベーション [25 °C, 10 分間] を行った後、逆転写反応 [42 °C, 1 時間] を行った。その後、熱変性 [85 °C, 5 分間] を行ない、逆転写反応を停止させた。

9. Real-time PCR (TaqMan プローブ法)

8. に準じて合成した cDNA は、滅菌精製水 (sterile distilled water ; sd H₂O) により 8 倍に希釈し、cDNA サンプルとした後、第 1 章 5. の手順に従って real-time PCR を行った。

TaqMan probe & Primers (Mouse) 一覧

Name	Sequence
HRD1 probe	5'-(FAM) CCA CTG CCG CAT CGT CTC TCT CAT GT (BHQ)-3'
HRD1 forward primer	5'-GTG TGG ACT TTA TGG AAC GCA G-3'
HRD1 reverse primer	5'-GCT GTG ATA AGC GTG GCT GA-3'
SEL1L probe	5'-(FAM) AAC AGG GCC GCC TCC CAA GG (TAMURA)-3'
SEL1L forward primer	5'-CCC CAG AGC TTT ACT GCA TTG-3'
SEL1L reverse primer	5'-CCA AGC TTA ATT CTA GCC ACA GTG-3'
BiP probe	5'-(FAM) CGA TCA GGG CAA CCG CAT CA (TAMURA)-3'
BiP forward primer	5'-CGC GTG GAG ATC ATA GCC A-3'
BiP reverse primer	5'-AGG CCA CAT ACG ACG GC-3'
β -actin probe	5'-(FAM) AGGCTCTTTTCCAGCCTTCCTTCTTGG (TAMURA)-3'
β -actin forward primer	5'-GCG GTT CCG ATG CCC T-3'
β -actin reverse primer	5'-CAT GGA TGC CAC AGG ATT CC-3'

10. Sandwich ELISA 法

10.1. 培養細胞由来 A β 40 の測定 [Human Amyloid β (1-40) 測定キット-IBL]

5.2. に準じて回収した培養上清中に含まれる A β 40 を、Human Amyloid β (1-40) 測定キット-IBL (IBL) を用いて、第 1 章 7.1. の手順に従って定量した。

10.2. 培養細胞由来 A β 42 の測定 [Human/Rat β Amyloid (42) ELISA Kit Wako, High-Sensitive]

5.2. に準じて回収した培養上清中に含まれる A β 42 を、Human/Rat β Amyloid (42) ELISA Kit Wako, High-Sensitive (Wako) を用いて定量した。標準物質 [ヒト β amyloid (1-42)] は、スタンダード希釈液を用いて所定の濃度 [90.2, 45.2, 22.6, 11.3, 5.64, 2.82, 1.41 (pg/mL)] へと希釈し、スタンダード溶液とした。培養上清は必要に応じてスタンダード希釈液にて 2~8 倍に希釈し、培養上清サンプルとした。調製が完了したスタンダード溶液、培養上清サンプルおよび盲検液 (スタンダード希釈液) は、96-well 抗体固相化マイクロプレート [anti-human A β (11-28)]

Monoclonal antibody (Clone No. BNT77) 固相] に 100 μ L ずつ分注し、固相抗体と反応 [4 $^{\circ}$ C, 一晚] させた。

翌日、各 well 内の溶液を除去後、洗浄液を用いて洗浄操作 [5 回] を行った。洗浄液を完全に除去した後、各 well に HRP 標識抗体 [anti-human A β (1-42) Monoclonal antibody (Clone No. BC05) Fab'-HRP] を 100 μ L ずつ添加し、抗原と反応 [4 $^{\circ}$ C, 1 時間] させた。反応後、各 well 内の溶液を除去後、洗浄液を用いて洗浄操作 [5 回] を行った。洗浄液を完全に除去した後、各 well に基質溶液 (tetramethylbenzidine ; TMB) を 100 μ L ずつ添加し、発色反応 [遮光下、室温、30 分間] を行った。反応後、各 well に停止液を添加し、反応を停止させた。各サンプルにおける A β 42 の濃度は、Varioskan Flash マルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて $\lambda = 450$ nm における吸光度を測定することにより定量を行った。

11. 蛍光免疫染色法

2. に準じて培養した神経細胞は、冷却した PBS で洗浄後、-20 $^{\circ}$ C 以下に冷却した Methanol に浸透し、細胞固定 [-20 $^{\circ}$ C, 10 分間以上] を行った。固定した細胞は、冷却した PBS を用いて洗浄操作 [5 分間, 2 回] を行ない、Image-iT[®] FX Signal Enhancer (invitrogen) によるブロッキング [室温, 1 時間] を行った後、希釈した anti-HRD1/SYVN1 抗体 (1 : 100) および anti- γ -tubulin 抗体 (1 : 100) を反応 [4 $^{\circ}$ C, 一晚] させた。

翌日、細胞を冷却した PBS で洗浄 [5 分間, 3 回] した後、Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse 抗体 (1 : 200) および Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit 抗体 (1 : 200) を反応 [遮光下、室温、30 分間] させた。反応後、細胞を冷却した PBS で洗浄 [遮光下、5 分間, 3 回] し、SlowFade[®] Gold antifade reagent で封入した。検出および解析は、LSM510 META confocal microscope (Carl Zeiss AG) を用いて行った。

12. 統計処理

定量結果は mean \pm SE で示し、2 群間の比較における統計学的有意差は、two-tailed Student's *t* tests により判定を行った。一方、多群間の比較における統計学的有意差は、Bonferroni/Dunnett post hoc test を用いた一元配置分散分析 (one-way analysis of variance ; one-way ANOVA) により判定した。

【結果】

1. 培養細胞を用いた短期的な A β /tau 負荷による HRD1 タンパク質量および不溶化への影響

ヒト死後大脳皮質を用いた解析により、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になった。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、機能的な HRD1 タンパク質量が減少した可能性も推察される。そこで、培養神経細胞を用いて A β 負荷による HRD1 タンパク質不溶化の検討を行った。A β による培養細胞への負荷は、A β の産生に関与し、 γ -secretase の活性中心である presenilin 2 を安定発現させたマウス神経芽細胞腫 (Neuro-2a) に対して、APP を過剰発現させることにより負荷した。形質移入後 24 時間における培養液中に放出された A β 量を ELISA 法により定量を行った結果、APP の過剰発現により細胞内部における A β 産生量が数十～数百倍に増大し、培養細胞に A β 負荷がかかっていることが示唆された (図 8A)。本条件下における HRD1 タンパク質への影響を Western blot 法により解析を行った結果、A β 負荷により NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量が有意に増加することが明らかになった (図 8B)。また、小胞体ストレスの指標となる GRP78/Bip のタンパク質量においても増加傾向が認められ、培養細胞は小胞体ストレス状態にあったことが示唆された。しかしながら、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 (図 8B)。

一方、AD の病理学的所見として、A β による老人斑形成の他に、神経細胞内における過剰リン酸化 tau の蓄積も認められる。そこで次に、tau 負荷による HRD1 タンパク質不溶化の検討を行った。tau 負荷は、Neuro-2a 細胞に対して tau タンパク質アイソフォームの一つである 0N4R (野生型 tau ; 4 C-terminal repeat tau but with no N-terminal insert) および、その変異体である P301L を過剰発現させることにより負荷した。形質移入後 24 時間における各種タンパク質量を Western blot 法により解析を行った結果、NP-40 可溶性画分および不溶性画分における tau の発現増加が認められ、培養細胞に tau 負荷がかかっていることが示唆された (図 8C, D)。しかしながら、tau 負荷による NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量の減少や、不溶性画分における HRD1 タンパク質の増加は認められなかった (図 8C, D)。

2. モデルマウスを用いた長期的な A β /tau 負荷による HRD1 タンパク質量および不溶化への影響

短期的な A β 負荷および tau 負荷では、HRD1 タンパク質は不溶化しないことが示唆された。しかしながら、AD 発症に至るまでの期間を考慮すると、長期的な A β 負荷および tau 負荷の影響についても検討を行う必要があると推測される。そこで、ヒト変異型 APP 遺伝子導入マウス (APP with Swedish mutation, Tg2576 マウス) および、ヒト変異型 tau 遺伝子導入マウス (tau with P301L mutation, JNPL3 マウス) を用いて、長期的な A β 負荷および tau 負荷による HRD1 タンパク質への影響についても検討を行った。Tg2576 マウスは、神経変性を伴わない AD モデルマウスとして知られており、生後 12 ヶ月齢以降から高度なアミロイドプラーク (老人斑) を形成することが報告されている【71】。一方、JNPL3 マウスは、神経原線維変化および神経脱落を伴う tauopathy (病理像として tau による神経原線維変化を示す神経変性疾患の総称) のモデルマウスとして知られており、生後 10 ヶ月齢以降から高度な過剰リン酸化 tau の蓄積が認められることが報告されている【72, 73】。16~20 ヶ月齢における各種遺伝子導入マウスの大脳皮質に対して Western blot 法による解析を行った結果、培養細胞を用いた解析結果と一貫して、A β 負荷により NP-40 可溶性画分における HRD1 タンパク質量が有意に増加することが明らかになった (図 9A)。一方、A β および tau の長期的負荷によっても、HRD1 タンパク質は不溶化を起こさなかった (図 9B)。よって、*in vitro* および *in vivo* 両実験解析により、A β 負荷および tau 負荷では HRD1 タンパク質は不溶化しないことが明らかになった。

3. 小胞体ストレスによる HRD1 タンパク質量および不溶化への影響

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になった。そこで続いて、小胞体ストレス負荷による HRD1 タンパク質量および不溶化への影響についても検討を行った。小胞体ストレス負荷は、Neuro-2a 細胞に対して糖鎖合成阻害薬である tunicamycin (Tm) および、小胞体 Ca²⁺ポンプ阻害薬である thapsigargin (Tg) を用いた。小胞体ストレス負荷後 24 時間における小胞体ストレス応答遺伝子の mRNA 量を real-time PCR 法により解析を行った結果、小胞体ストレス応答による HRD1-mRNA, SEL1L-mRNA および GRP78-mRNA の有意な増加が認められ、細胞は小胞体ストレス状態にあったことが示された (図 10A)。本条件下における HRD1 タンパク質への影響を Western blot 法により解析を行った結果、NP-40 可溶性画分においては、小胞体ストレス応答による HRD1 および SEL1L

タンパク質量の増加や、Tm（糖鎖合成阻害）による SEL1L の未成熟化が認められた（図 10B 左）. しかしながら、HRD1 タンパク質を始めとする ERAD 関連タンパク質の不溶化は認められなかった（図 10B 右）.

4. 酸化ストレスによる HRD1 タンパク質量および不溶化への影響

近年、AD 患者脳においてはアミロイド沈着血管近傍に微小梗塞が多発することが報告されており、AD の病態形成過程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注目されている【74】. すなわち、AD の病態形成過程における酸化ストレスによって HRD1 タンパク質が不溶化したことで、A β の産生が増加した可能性が推察される. そこで、酸化ストレス負荷による HRD1 タンパク質量および不溶化への影響について検討を行った. 酸化ストレス負荷は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に対して、酸化ストレス誘導試薬である過酸化水素（H₂O₂）および rotenone（ミトコンドリア電子伝達系（複合体 I）阻害薬）により行った. 外因性の酸化ストレスとして H₂O₂ を曝露し、曝露後 24 時間における各種タンパク質量を Western blot 法により解析した結果、NP-40 可溶性画分における ERAD 関連タンパク質の減少は認められなかった（図 11A 左）. しかしながら、NP-40 不溶性画分においては、H₂O₂ の濃度依存的な HRD1 および SEL1L タンパク質の増加が認められた（図 11A 右）. 続いて、内因性の酸化ストレスとして rotenone を曝露し、ミトコンドリア電子伝達系の阻害を介して細胞内における活性酸素の産生を増大させた. その結果、NP-40 可溶性画分における ERAD 関連タンパク質の減少は認められなかった（図 11B 左）. 一方、NP-40 不溶性画分においては、H₂O₂ 曝露時と同様に rotenone の濃度依存的な HRD1 および SEL1L タンパク質の増加が認められた（図 11B 右）.

AD 患者脳においては、acrolein や脂質過酸化によって産生される 4-hydroxy-2-nonenal（4-HNE）などの不飽和アルデヒドが、高度に蓄積していることが報告されている【75, 76】. また、4-HNE は反応性および毒性が高く、DNA やタンパク質に障害を与え、酸化ストレスやアポトーシスを誘導することも知られている【77, 78】. 酸化ストレス薬であり、神経毒性物質である 4-HNE の作用は多岐にわたるため、これらが HRD1 や SEL1L の不溶化に関与する可能性は十分推測される. そこで、続いて 4-HNE 負荷による各種タンパク質量および不溶化への影響について解析を行った. 4-HNE 曝露後 24 時間における各種タンパク質量を Western blot 法により解析した結果、NP-40 可溶性画分における ERAD 関連タンパク質の減少は認められなかった（図 11C 左）. 一方、NP-40 不溶性画分においては、H₂O₂ および rotenone 曝露時と同様に、4-HNE の濃度依存的な HRD1 および SEL1L タンパク質の増加が認められた（図 11C 右）. よって、本研究により、HRD1 タンパク質は、酸化ストレスによって不溶化することが明らかになった.

5. 新規タンパク質合成抑制下における NP-40 可溶性 HRD1 タンパク質に対する酸化ストレスの影響

培養神経細胞を用いた解析により、HRD1 タンパク質は酸化ストレスによって不溶化することが示唆された。しかしながら、いずれの酸化ストレス誘導試薬を用いた場合においても、NP-40 可溶性画分（小胞体膜画分・細胞質画分）における HRD1 タンパク質量の減少は認められていない。神経芽細胞腫における細胞内タンパク質の代謝回転は分化・成熟した神経細胞と比して速く、同画分における HRD1 タンパク質量は、一時的な新規タンパク質合成の促進によって発現が維持されていたことが推察される。そこで、cycloheximide を用いて、新規タンパク質合成阻害下における酸化ストレスの影響について解析を行った。その結果、cycloheximide による新規タンパク質合成阻害下において、 H_2O_2 を用いた酸化ストレスの負荷により、NP-40 可溶画分における HRD1 タンパク質量が有意に減少した（図 11D）。よって、これらの結果より、HRD1 タンパク質は酸化ストレスによって不溶化することで、小胞体膜画分における同タンパク質量が減少する可能性が示唆された。

6. 酸化ストレスによる HRD1 タンパク質の凝集体形成

一般に、AD 患者脳において認められる A β を主要構成成分とした老人斑の形成や過剰リン酸化 tau 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【79】。また、細胞内において、小胞体から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した微小管形成中心付近へと運ばれ、aggresome と呼ばれる凝集体を形成することが報告されている【80, 81】。そこで次に、蛍光免疫二重染色法を用いて、酸化ストレス誘導試薬による HRD1 凝集体形成の可能性について検討を行った。SH-SY5Y 細胞を用いて、 γ -tubulin および HRD1 タンパク質に対する蛍光二重染色を行ない、HRD1 タンパク質の細胞内局在の変化について解析を行った。その結果、興味深いことに、通常小胞体膜上に局在する HRD1 タンパク質が、酸化ストレス誘導試薬である H_2O_2 、rotenone および 4-HNE の曝露により、小胞体外に凝集することが明らかになった（図 12 中）。また、これら HRD1 タンパク質の凝集は、 γ -tubulin との共染色像より微小管形成中心付近に位置することも明らかになった（図 12 右）。よって、本解析により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凝集体である aggresome 形成に基づく可能性が示唆された。

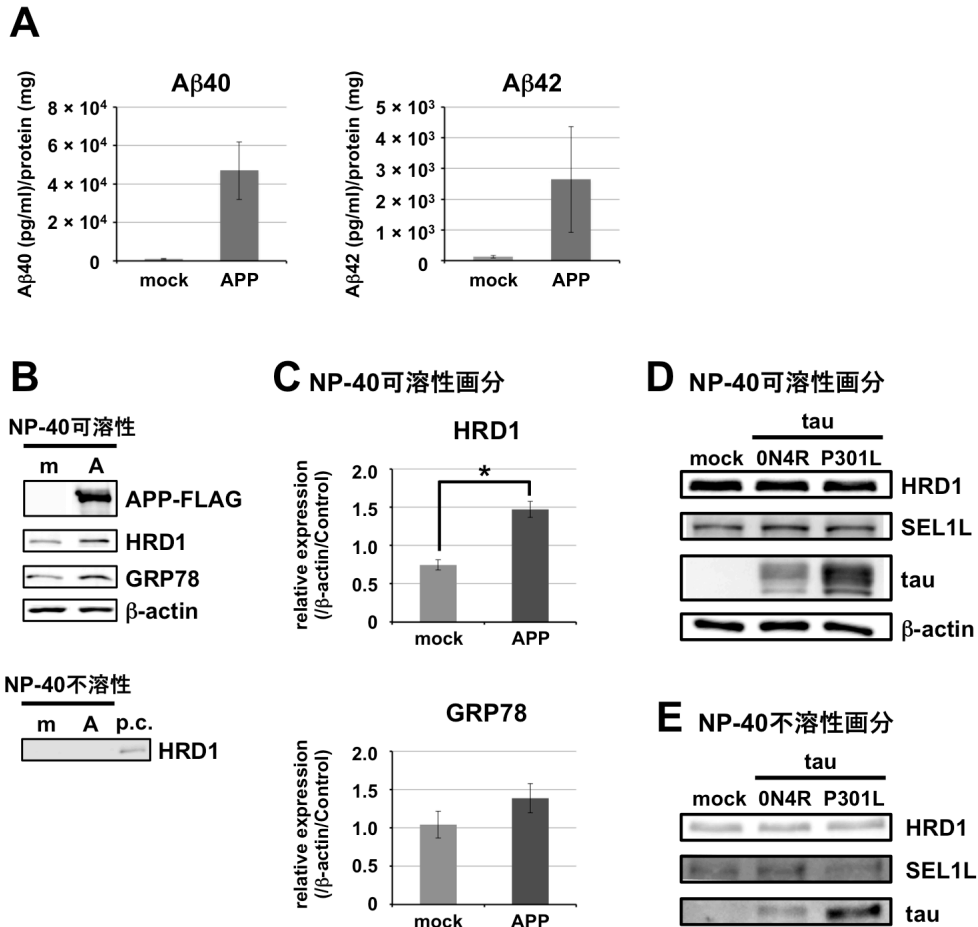


図 8. 培養細胞を用いた短期的な A β /tau 負荷による HRD1 タンパク質への影響

- (A) presenilin 2 を安定発現する Neuro-2a 細胞に、空ベクター (mock) または APP-FLAG 発現ベクターをリポフェクション法により形質移入した。形質移入後 24 時間における培養液中に放出された A β 量を ELISA 法により測定した。結果は、細胞より抽出した総タンパク質量 (mg) に対する A β 量 (pg) で示した。
- (B) 形質移入後 24 時間で回収した培養神経細胞よりタンパク質の抽出を行った。その後、Western blot 法を用いて、APP, HRD1, GRP78 および β -actin の検出を行った。
[略称 : p.c., positive control (HRD1 過剰発現細胞株) ; m, mock ; A, APP]
- (C) NP-40 可溶性画分における各バンドの定量は、解析ソフト Multi Gauge (Fijifilm) を用いて行い、データは β -actin で標準化を行った。また、結果は非形質移入細胞 (Control) における各タンパク質量に対する相対値として示した (mean \pm S.E. ; $n = 3$)。また、統計学的有意差は Student's t test によって判定を行った (mock vs. APP ; * $p < 0.05$)。

- (D) Neuro-2a 細胞に、空ベクター (mock)、野生型 tau (0N4R) 発現ベクターもしくは変異型 tau (P301L) 発現ベクターをリポフェクション法により形質移入した。形質移入後 24 時間で回収した培養神経細胞より、界面活性剤 NP-40 を用いてタンパク質の抽出を行った。その後、Western blot 法を用いて、HRD1, SEL1L, tau および β -actin の検出を行った。
- (E) (D) における NP-40 不溶性画分を SDS で可溶化し、同不溶性画分のタンパク質の抽出を行った。その後、Western blot 法を用いて、HRD1, SEL1L および tau の検出を行った。

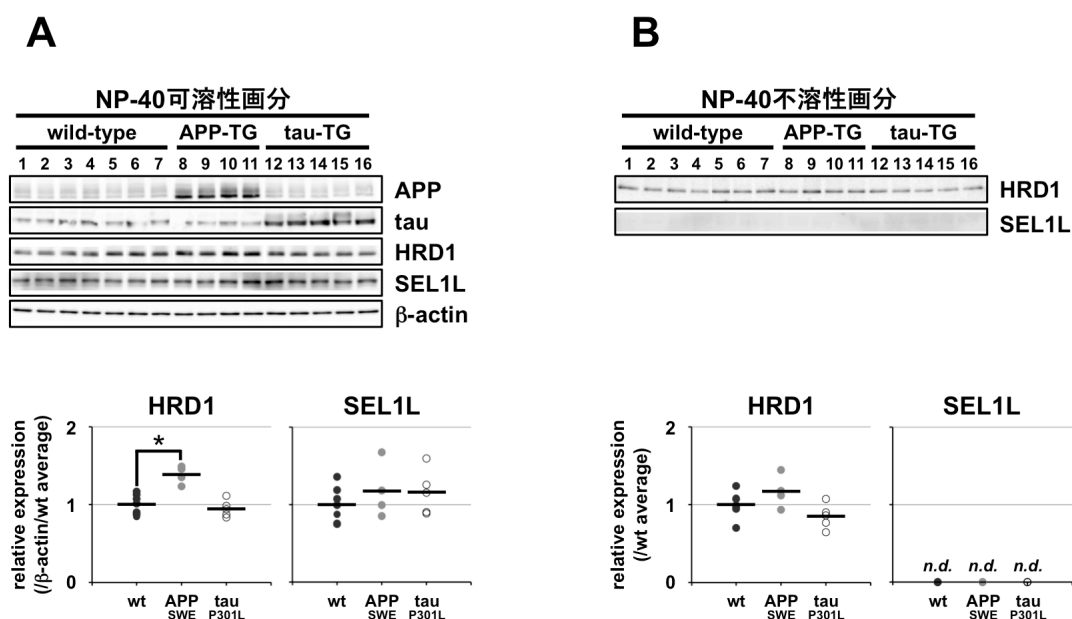
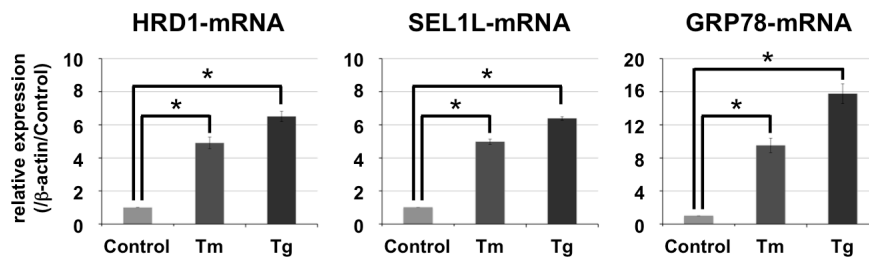


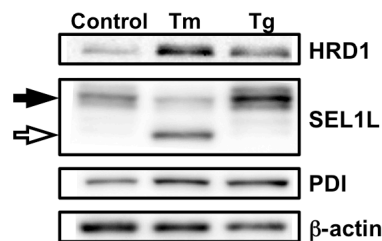
図 9. モデルマウスを用いた長期的な A β /tau 負荷による HRD1 タンパク質への影響

- (A) 生後 16-20 ヶ月齢におけるヒト変異型 APP 遺伝子導入マウス (Tg2576) およびヒト変異型 tau 遺伝子導入マウス的大脑皮質より、界面活性剤 NP-40 を用いてタンパク質の抽出を行った。その後、Western blot 法を用いて、APP, tau, HRD1, SEL1L および β -actin の検出を行った。各バンドの定量は、解析ソフト Multi Gauge (Fijifilm) を用いて行い、データは β -actin で標準化を行った。また、結果は wild-type の平均値に対する相対値として、ドットプロット (wildtype, $n = 7$; APP, $n = 4$; tau, $n = 5$) により示し、平均値は横線で示した。また、統計学的有意差は Bonferroni/Dunnett post hoc test を用いた一元配置分散分析 (one-way ANOVA) により判定した (wildtype vs. APP and tau ; * $p < 0.05$)。
- (B) (A) における NP-40 不溶性画分を SDS で可溶化し、同不溶性画分のタンパク質の抽出を行った。その後、Western blot 法を用いて、HRD1 および SEL1L の検出を行った。各バンドの定量は、解析ソフト Multi Gauge (Fijifilm) を用いて行った。また、結果は wild-type の平均値に対する相対値として、ドットプロット (wildtype, $n = 7$; APP, $n = 4$; tau, $n = 5$) により示し、平均値は横線で示した。また、統計学的有意差は Bonferroni/Dunnett post hoc test を用いた一元配置分散分析 (one-way ANOVA) により判定した (wildtype vs. APP and tau)。

A mRNA



B NP-40可溶性画分



C NP-40不溶性画分

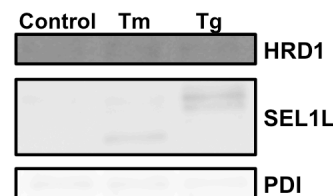


図 10. 小胞体ストレスによる HRD1 タンパク質への影響

- (A) Neuro-2a 細胞を tunicamycin (Tm ; 5 μ g/mL) もしくは thapsigargin (Tg ; 1 μ M) に 24 時間曝露した後, total RNA を抽出し, cDNA の合成を行った. その後, real-time PCR 法を用いて, HRD1, SEL1L, GRP78 および β -actin の mRNA 量を測定した. データは β -actin の mRNA 量で標準化を行い, 結果は Control を基準とした相対値として示した (mean \pm S.E. ; $n = 3$). また, 統計学的有意差は, Bonferroni/Dunnett post hoc test を用いた一元配置分散分析 (one-way ANOVA) により判定した (Control vs. Tm and Tg ; * $p < 0.05$).
- (B) tunicamycin (Tm ; 5 μ g/mL) もしくは thapsigargin (Tg ; 1 μ M) を 24 時間曝露した Neuro-2a 細胞より, 界面活性剤 NP-40 を用いてタンパク質の抽出を行った. その後, Western blot 法を用いて, HRD1, SEL1L, PDI および β -actin の検出を行った. また, 黒矢印は糖鎖付加型 (成熟型) の SEL1L タンパク質を示し, 白矢印は未成熟型の SEL1L タンパク質を示す.
- (C) (B)における NP-40 不溶性画分を SDS で可溶化し, 同不溶性画分のタンパク質の抽出を行った. その後, Western blot 法を用いて, HRD1, SEL1L および PDI の検出を行った.

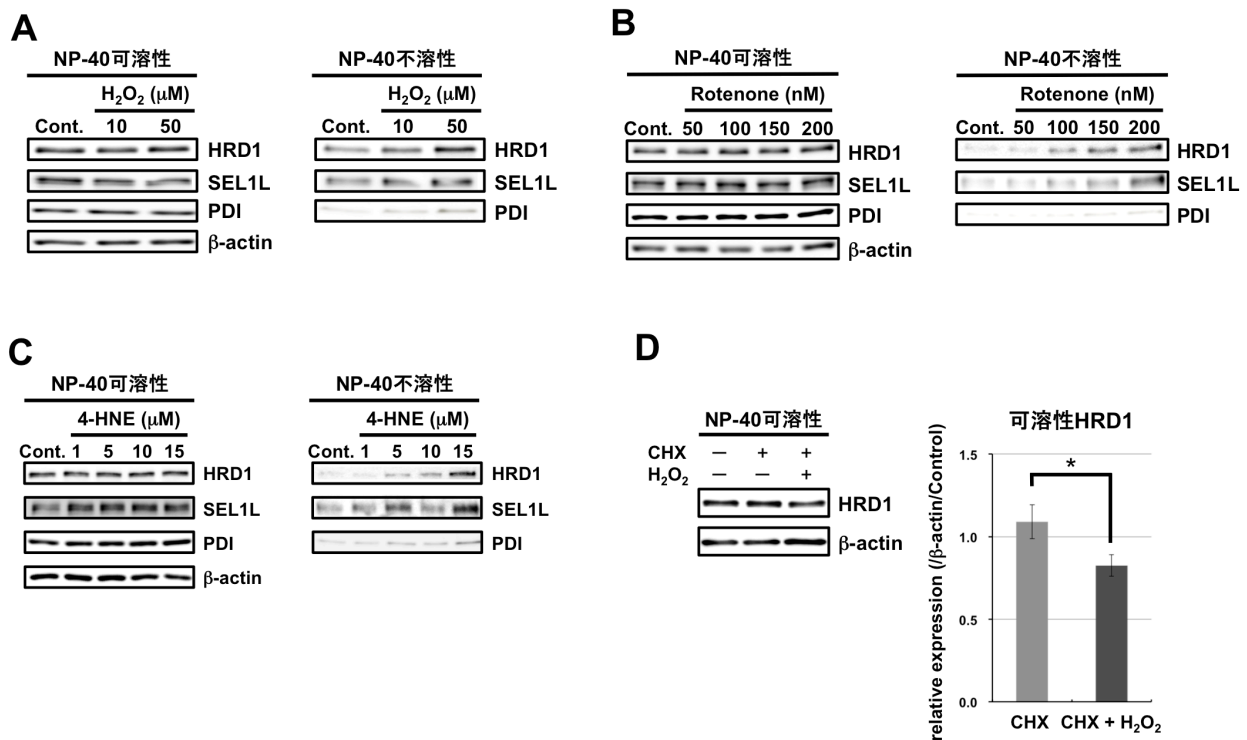


図 11. 酸化ストレスによる HRD1 タンパク質への影響

(A-C) SH-SY5Y 細胞を過酸化水素 (A : H₂O₂ ; 10-50 μM), rotenone (B : 50-200 nM) もしくは 4-hydroxy-2-nonenal (C : 4-HNE ; 1-15 μM) に 24 時間曝露した後, 各種界面活性剤を用いてタンパク質の抽出を行った. その後, Western blot 法を用いて, HRD1, SEL1L, PDI および β-actin の検出を行った.

(D) SH-SY5Y 細胞をタンパク質合成阻害薬である cycloheximide (CHX ; 25 μg/mL) に 5 分間曝露した後, 過酸化水素 (H₂O₂ ; 100 μM) の曝露を行った. H₂O₂ 曝露後 6 時間における細胞を回収し, 界面活性剤 NP-40 を用いてタンパク質の抽出を行った. その後, Western blot 法を用いて, HRD1 および β-actin の検出を行った. NP-40 可溶性画分における各バンドの定量は, 解析ソフト Multi Gauge (Fijifilm) を用いて行い, データは β-actin で標準化を行った. また, 結果は非処理細胞 (Control) における各タンパク質量に対する相対値として示した (mean ± S.E. ; n = 6). また, 統計学的有意差は Student's *t*-test によって判定を行った (CHX vs. CHX + H₂O₂ ; **p* < 0.05).

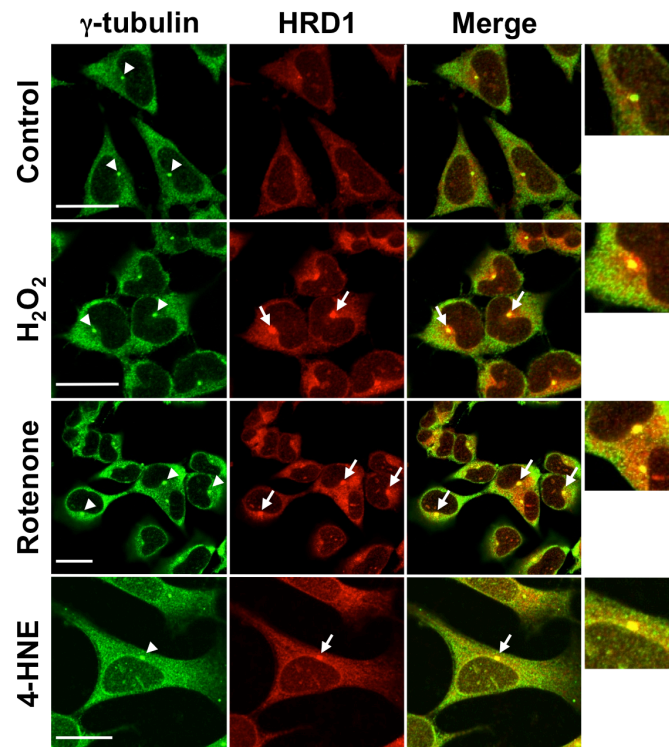


図 12. 酸化ストレスによる HRD1 タンパク質の凝集体形成

SH-SY5Y 細胞を過酸化水素 (H_2O_2 ; 10 μM), rotenone (10 nM) もしくは 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE; 15 μM) に 48 時間曝露した後, 蛍光免疫染色法により γ -tubulin (緑) および HRD1 (赤) の検出を行った. 検出および解析は, LSM510 META confocal microscope (Carl Zeiss AG) を用いて行った. スケールバーはそれぞれ 20 μm を示す. また, 矢頭は微小管形成中心を, 矢印は HRD1 タンパク質による aggresome を示す.

【考察】

第1章におけるヒト脳組織を用いた解析により、AD患者の死後大脳皮質において、異常構造を有したAPPの分解に寄与するユビキチンリガーゼHRD1が、特異的かつ有意に減少していることが明らかになった。また、ヒト脳組織におけるA β 蓄積量とHRD1タンパク質量との間には、高い相関関係が認められた。しかしながら、同相関関係（第1章；図7）のみでは、蓄積したA β による神経毒性が、HRD1タンパク質の不溶化や機能的なHRD1タンパク質の減少を引き起こし、これらがヒト大脳皮質における神経変性の引き金となったという可能性を否定できない。また、近年の報告では、神経細胞内で凝集したA β は、プロテアソームや脱ユビキチン化酵素の阻害を介してユビキチン-プロテアソーム系を障害する可能性が示唆されている【82, 83】。HRD1もユビキチン-プロテアソーム系の構成因子であることから、HRD1もまたA β による神経毒性の標的となり得る。すなわち、HRD1タンパク質の不溶化はA β による神経毒性に起因する可能性も否定されずにいた。この因果関係を検証するため、本研究では培養神経細胞を用いて、A β 負荷によるHRD1タンパク質量および不溶化への影響について解析を行った。preceinilin 2安定発現株に対し、APPを過剰発現させることで細胞にA β を負荷した結果、短期的なA β 負荷ではHRD1タンパク質の不溶化は起こらない可能性が示唆された（図8A, B）。しかしながら、この実験系ではヒト大脳皮質において数十年かけて蓄積したA β による神経毒性を再現するに至っていない。また、産生したA β がどのようなコンフォメーションを取っているのかは不明である。A β の神経毒性はコンフォメーションの違いにより強さが異なり、一般に、モノマー < オリゴマー < プロトフィブリルの順に毒性が強くなると報告されている【39】。上述の問題点を解消するため、本研究ではヒト変異型APP_{SWE}遺伝子導入マウス（Tg2576マウス）を用いて、長期的かつ多種のコンフォメーションを有したA β 負荷によるHRD1タンパク質量および不溶化への影響についても検討を行った。Tg2576マウスにおいては、生後12ヶ月齢以降に高度なA β の蓄積（アミロイドプラーク）が認められることが報告されている【71】。そこで本研究では、16~20ヶ月齢におけるTg2576マウスの大脳皮質に対して解析を行った結果、培養神経細胞を用いた解析結果と一貫して、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（図8, 9）。よって、本解析によりHRD1タンパク質の不溶化にはA β による神経毒性以外の因子が関与する可能性が示唆された。

ADの病態形成過程には、A β の他に、神経細胞内における過剰リン酸化tauの蓄積も深く関与すると考えられている。しかしながら、過剰リン酸化tauや凝集・蓄積したtauがERAD関連タンパク質に対してどのような影響を与えるのか不明であった。本研究では培養神経細胞を用いて、tau負荷によるHRD1タンパク質量および不溶化への影響について解析を行った。tauタンパク質アイソフォームの一つである0N4R（野生型tau）およびP301L（変異型tau）の過剰発

現により、細胞に tau を負荷した。その結果、HRD1 や SEL1L タンパク質の発現量等には変化が認められず、凝集・蓄積した tau は ERAD 関連タンパク質に影響を与えない可能性が示唆された (図 8)。また、ヒト変異型 tau 遺伝子導入マウス (JNPL3 マウス) を用いて、長期的な過剰リン酸化 tau の影響について解析を行った結果、培養神経細胞を用いた解析結果と同様に、tau 負荷による HRD1 タンパク質の不溶化は認められなかった (図 8, 9)。よって、これらの解析により HRD1 タンパク質の不溶化には A β および tau 以外の因子が関与する可能性が示唆された。我々は現在、免疫染色法を用いた AD 患者脳の解析により、細胞内における過剰リン酸化 tau (神経原線維変化部位) や老人斑近辺に局在する変性神経突起に HRD1 が共局在することを見出しており、HRD1 と tau の過剰リン酸化との関連性が示唆されている。一方、tau の過剰リン酸化は、主に小胞体ストレスに伴う GSK-3 β の過活性化に起因することが近年報告されている【84, 85】。これらは本研究成果とともに、小胞体におけるタンパク質品質管理機構の破綻が tau の過剰リン酸化や凝集・蓄積の引き金となり得ることを示唆している。加えて、本研究結果は、大脳皮質における A β の産生増加や tau の過剰リン酸化が生じる以前に HRD1 タンパク質が先行して減少する可能性を示唆するものであり、AD の病因論の点からも重要であると考えられる。

また、HRD1 タンパク質の不溶化機構を検討する上で、AD 患者の大脳皮質が小胞体ストレス状態にあった点を考慮することは重要である。Neuro-2a 細胞を小胞体ストレス誘導試薬である tunicamycin (糖鎖合成阻害薬) および thapsigargin (小胞体 Ca²⁺ポンプ阻害薬) を曝露した際、小胞体ストレス応答による HRD1-mRNA および 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 タンパク質の不溶化は認められなかった (図 10)。上述の A β 負荷実験においては、A β 負荷により小胞体ストレスが惹起され、HRD1 タンパク質が誘導されたこと (図 8, 9) を考慮すると、A β に起因する小胞体ストレスに対し、神経細胞は小胞体ストレス応答によって HRD1 を誘導することで、神経細胞死から細胞を保護する可能性が推察された。また、AD 患者脳に認められる神経変性は、HRD1 タンパク質が不溶化することで機能的な HRD1 タンパク質が減少し、小胞体ストレス防御機構が破綻した結果生じる可能性も示唆された。よって今後は、HRD1 発現抑制下における A β 負荷の影響を検討することで、A β による神経変性機構に HRD1 がどのように寄与するかを明らかにする必要がある。

一方、AD の病理過程においては、近年 Okamoto 等により、AD 患者の大脳皮質においてはアミロイド沈着血管近傍に微小梗塞が多発することが報告されており【74】、AD の病態形成時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注目されている。すなわち、AD の病態形成過程における酸化ストレスによって HRD1 タンパク質が不溶化したことで、A β の産生が増加した可能性が推察される。そこで、本研究においては、SH-SY5Y 細胞を酸化ストレス誘導試薬である H₂O₂ や rotenone, 4-HNE などに曝露することで、酸化ストレスによる HRD1 タンパ

ク質への影響について解析を行った。その結果、酸化ストレス誘導試薬は濃度依存的に HRD1 および SEL1L タンパク質の不溶化を惹起することが明らかになった (図 11A-C)。

一方、小胞体膜画分 (NP-40 可溶性画分) における HRD1 タンパク質量には、有意な変化が認められなかったことから、酸化ストレスによる小胞体ストレス応答の活性化や、一時的な新規タンパク質合成の促進に基づく HRD1 タンパク質の発現維持が示唆された。しかしながら、tunicamycin および thapsigargin による小胞体ストレス応答時と比較して、短期的な H_2O_2 の曝露による ERAD 関連遺伝子の誘導量は少なく、小胞体ストレス応答の惹起には至っていないことが明らかになった (データ未提示)。一方、cycloheximide による新規タンパク質合成の抑制下にて、小胞体膜画分における HRD1 タンパク質量は H_2O_2 への曝露によって有意に減少することが明らかになった (図 11D)。よって、短期的な酸化ストレスに基づくタンパク質不溶化による機能的な HRD1 の減少は、新規タンパク質合成が促進されることにより発現量が維持されることが示唆された。また、細胞内におけるタンパク質の代謝能やプロテアソームの酵素活性は、加齢に伴い低下することが知られており【86】、高齢期における長期的な酸化ストレスが HRD1 タンパク質の不溶化や、これに伴う機能的 HRD1 タンパク質の減少に対して、大きなリスクとなる興味深い可能性を示唆している。よって今後、分化した神経細胞や初代培養細胞、さらには高齢マウスを用いて、長期的な酸化ストレスによる HRD1 減少機序および A β 産生への影響についても検討する必要があると考える。一方、AD 患者脳は小胞体ストレスや酸化ストレスなど、種々のストレスに曝されていることが明らかとなっており、HRD1 タンパク質の減少機序には複合的なストレスの関与も推測されることから、HRD1 タンパク質の減少機序には酸化ストレスの他に小胞体ストレスが寄与する可能性は高い。よって、今後は複合的なストレス (酸化ストレスと小胞体ストレスの同時負荷) による HRD1 タンパク質への影響を検討する必要がある。

また、HRD1 タンパク質は酸化ストレス薬である 4-HNE によっても不溶化したことから、HRD1 タンパク質の不溶化には 4-HNE や一酸化窒素 (nitric oxide ; NO) などの酸化的修飾が寄与する可能性が推察される。4-HNE や acrolein などの不飽和アルデヒドは、タンパク質中のシステイン残基やヒスチジン残基、およびリジン残基と反応し、比較的安定なマイケル付加体を形成することが報告されている【87-89】。SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) を用いた HRD1 タンパク質の立体構造予測 (ホモロジーモデリング) により、HRD1 の酵素活性部位である RING-finger 領域は、亜鉛イオンを配位し、その配位に必要な複数のシステイン残基とヒスチジン残基がタンパク質の表面に露出していることが明らかになっている。よって、RING-finger 領域におけるこれら複数のアミノ酸残基が 4-HNE などの酸化的修飾の標的残基となることが推測される。近年の報告では、HRD1 と同様の RING 型ユビキチンリガーゼである Parkin や XIAP の酵素活性が、RING-finger 領域に対する S-ニトロシル化 (酸化的修飾) によって制御されることが明らかになっている他、これらの修飾が同タンパク質の凝集体形成に繋

る可能性が示唆されている【90-92】。本研究の蛍光免疫二重染色法を用いた解析では、HRD1 タンパク質が酸化ストレスの負荷により、小胞体膜上から aggresome へと移行し、これらがタンパク質不溶化の原因となる可能性が示唆された (図 12)。一般に、HRD1 は小胞体膜上において機能し、変性した HRD1 は ERAD 機構によって分解・除去されと考えられている。また、aggresome は変性したタンパク質を主要な構成因子とすることが知られているため【93】、aggresome に局在する HRD1 タンパク質は、酸化ストレスによって不可逆的な酸化的損傷を受け、ユビキチンリガーゼとしての機能、すなわち、酵素活性を失ったタンパク質であることが推察される。

近年、ミトコンドリアの機能障害下では A β 誘導性の小胞体ストレスが亢進することや、小胞体-ミトコンドリア間のクロストークが A β による小胞体ストレス誘導性アポトーシスに深く関与することが報告されている【94, 95】。さらに、ミトコンドリア障害による酸化ストレスの誘発が、AD 発症における重要な病因であることが示唆されている【96】。これらの報告は、A β と酸化ストレスの深い関連性 (A β 誘導性酸化ストレスの存在) を示唆しているが、本研究では、HRD1 タンパク質の不溶化は酸化ストレス負荷時においてのみ認められた。一方、本研究により、HRD1 は A β に起因する神経毒性に対して、一種の防御因子として作用する可能性が見出されており、酸化ストレスによる HRD1 の不溶化が、ERAD 機構の破綻や、A β の産生増加および A β 誘導性酸化ストレスとの悪循環形成に深く関与すると推察される。また、この悪循環による A β の凝集・蓄積や小胞体ストレスの誘発は、神経変性や神経脱落を促進させ、これらが AD 発症の原因となる可能性を示唆するものである。

【総括】

本研究では、ユビキチンリガーゼ HRD1 を介した APP の代謝分解機構に着目し、AD 発症の原因として ERAD 機構の機能破綻を仮定した上で解析を行った。

第1章では、AD 患者における ERAD 機構の破綻を検討するため、ヒト死後大脳皮質を用いて、小胞体ストレス応答関連遺伝子および関連タンパク質の発現解析を行った。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 の代謝分解に寄与する ERAD 関連タンパク質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、タンパク質不溶化により特異的かつ有意に減少する可能性が示唆された。さらに、ヒト脳組織における HRD1 タンパク質の減少は A β の産生増加に寄与する可能性も示唆された。

第2章では、AD の発症機構の解明に向け、HRD1 タンパク質の減少機序の究明を試みた。培養神経細胞およびモデルマウスを用いた解析では、A β の産生増加に伴い、小胞体膜画分 (NP-40 可溶性画分) における機能的な HRD1 タンパク質が増加することが明らかになった。また、AD 関連因子 (A β ・tau) および各種ストレス (酸化ストレス・小胞体ストレス) の内、HRD1 タンパク質は酸化ストレスによってのみ不溶化することが明らかとなった。さらに、酸化ストレスに基づく酸化的損傷により HRD1 タンパク質が aggresome を形成することで、小胞体に局在する機能的な HRD1 タンパク質の減少が生じる可能性が示唆された。

本研究において、HRD1 は A β に起因する神経毒性に対して、一種の防御因子として作用する可能性が見出されており、酸化ストレスによる HRD1 の不溶化が ERAD 機構の破綻や、A β の産生増加および A β 誘導性酸化ストレスとの悪循環形成に深く関与すると推察された。また、同悪循環による A β の凝集・蓄積や小胞体ストレスの誘発は、神経変性や神経脱落を促進させ、これらが AD 発症の原因となる可能性を示唆するものである。本研究の成果は、これまで個々に捉えられていた AD における病理学的特徴 (A β および過剰リン酸化 tau の蓄積、小胞体ストレスおよび酸化ストレス) を関連付ける可能性を秘めており、従来特定されていなかった A β のターゲットや、生体における A β および過剰リン酸化 tau の産生増加機構、さらには神経変性・脱落機構を解明する一助となると考えられる。一研究者として、HRD1 減少機序の究明により、AD 病態の解明や早期診断法および根本的治療法が確立されることを願うばかりである。

【参考文献】

- 1) Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005; **74**: 739-89.
- 2) Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; **8**: 519-29.
- 3) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000; **403**: 98-103.
- 4) Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 13935-40.
- 5) Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 2004; **165**: 347-56.
- 6) Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev.* 2006; **86**: 1133-49.
- 7) Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 2012; **197**: 857-67.
- 8) Hamada H, Suzuki M, Yuasa S, Mimura N, Shinozuka N, Takada Y, Suzuki M, Nishino T, Nakaya H, Koseki H, Aoe T. Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 2004; **24**: 8007-17.
- 9) Tohmonda T, Miyauchi Y, Ghosh R, Yoda M, Uchikawa S, Takito J, Morioka H, Nakamura M, Iwawaki T, Chiba K, Toyama Y, Urano F, Horiuchi K. The IRE1α-XBP1 pathway is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of Osterix. *EMBO Rep.* 2011; **12**: 451-7.
- 10) Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol.* 2009; **11**: 1205-11.
- 11) Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, Lee JW, Ackerman SL. Protein accumulation and

- neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat Genet.* 2005; **37**: 974-9.
- 12) Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004; **306**: 457-61.
 - 13) Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, Bundo M, Kasahara T, Kusumi I, Tsujita T, Okazaki Y, Nanko S, Kunugi H, Sasaki T, Kato T. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet.* 2003; **35**: 171-5.
 - 14) Ardley HC, Robinson PA. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* 2005; **41**: 15-30.
 - 15) Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; **3**: 246-55.
 - 16) Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA. Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem.* 1982; **257**: 2543-8.
 - 17) Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; **67**: 425-79.
 - 18) Kaneko M, Nomura Y. ER signaling in unfolded protein response. *Life Sci.* 2003; **74**: 199-205.
 - 19) Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; **10**: 398-409.
 - 20) Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 2009; **78**: 399-434.
 - 21) Marín I. Ancient origin of animal U-box ubiquitin ligases. *BMC Evol Biol.* 2010; **10**: 331.
 - 22) Tamura T, Cormier JH, Hebert DN. Sweet bays of ERAD. *Trends Biochem Sci.* 2008; **33**: 298-300.
 - 23) Ismail N, Ng DT. Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble! *Cell.* 2006; **126**: 237-9.
 - 24) Kaneko M, Ishiguro M, Niinuma Y, Uesugi M, Nomura Y. Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation. *FEBS Lett.* 2002; **532**: 147-52.
 - 25) Omura T, Kaneko M, Tabei N, Okuma Y, Nomura Y. Immunohistochemical localization of a ubiquitin ligase HRD1 in murine brain. *J Neurosci Res.* 2008; **86**: 1577-87.
 - 26) Kawada K, Kaneko M, Nomura Y, Mimori S, Hamana H, Ogita K, Murayama T, Fujino H, Okuma Y. Expression of the ubiquitin ligase HRD1 in neural stem/progenitor cells of the adult mouse brain. *J Pharmacol Sci.* 2011; **117**: 208-12.
 - 27) Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. Differential contributions of

- ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem.* 2004; **136**: 343-50.
- 28) 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.* 2007; **581**: 5355-60.
 - 29) Yamamoto K, Suzuki N, Wada T, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Mori K. Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. *J Biochem.* 2008; **144**: 477-86.
 - 30) Kikkert M, Doolman R, Dai M, Avner R, Hassink G, van Voorden S, Thanedar S, Roitelman J, Chau V, Wiertz E. Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 3525-34.
 - 31) Yamasaki S, Yagishita N, Sasaki T, Nakazawa M, Kato Y, Yamadera T, Bae E, Toriyama S, Ikeda R, Zhang L, Fujitani K, Yoo E, Tsuchimochi K, Ohta T, Araya N, Fujita H, Aratani S, Eguchi K, Komiya S, Maruyama I, Higashi N, Sato M, Senoo H, Ochi T, Yokoyama S, Amano T, Kim J, Gay S, Fukamizu A, Nishioka K, Tanaka K, Nakajima T. Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *EMBO J.* 2007; **26**: 113-22.
 - 32) Burr ML, Cano F, Svobodova S, Boyle LH, Boname JM, Lehner PJ. HRD1 and UBE2J1 target misfolded MHC class I heavy chains for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; **108**: 2034-9.
 - 33) Wang H, Li Q, Shen Y, Sun A, Zhu X, Fang S, Shen Y. The ubiquitin ligase Hrd1 promotes degradation of the Z variant alpha 1-antitrypsin and increases its solubility. *Mol Cell Biochem.* 2011; **346**: 137-45.
 - 34) 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-beta generation. *J Neurosci.* 2010; **30**: 3924-32.
 - 35) 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.* 2006; **99**: 1456-69.
 - 36) Apodaca J, Kim I, Rao H. Cellular tolerance of prion protein PrP in yeast involves proteolysis and the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; **347**: 319-26.
 - 37) Yang H, Zhong X, Ballar P, Luo S, Shen Y, Rubinsztein DC, Monteiro MJ, Fang S.

- Ubiquitin ligase Hrd1 enhances the degradation and suppresses the toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin. *Exp Cell Res*. 2007; **313**: 538-50.
- 38) Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008; **283**: 29615-9.
 - 39) Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 32046-53.
 - 40) Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience*. 2006; **143**: 461-75.
 - 41) Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1997; **20**: 154-9.
 - 42) Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; **297**: 353-6.
 - 43) Morishima-Kawashima M, Oshima N, Ogata H, Yamaguchi H, Yoshimura M, Sugihara S, Ihara Y. Effect of apolipoprotein E allele epsilon4 on the initial phase of amyloid beta-protein accumulation in the human brain. *Am J Pathol*. 2000; **157**: 2093-9.
 - 44) Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*. 2000; **6**: 143-50.
 - 45) Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*. 2001; **292**: 1550-2.
 - 46) Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med*. 2005; **11**: 434-9.
 - 47) Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC. Region-specific reduction of Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res*. 2002; **70**: 493-500.
 - 48) Higuchi M, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med*. 2002; **2**: 131-50.
 - 49) Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 2002; **3**: 285-98.

- 50) D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96**: 5598-603.
- 51) Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 2001; **24**: 1121-59.
- 52) Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett*. 1996; **203**: 33-6.
- 53) Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; **90**: 7789-93.
- 54) Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1997; **41**: 17-24.
- 55) Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999; **45**: 358-68.
- 56) Shi Y, Vattam KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*. 1998; **18**: 7499-509.
- 57) Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999; **397**: 271-4.
- 58) Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000; **5**: 897-904.
- 59) Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000; **2**: 326-32.
- 60) Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*. 2002; **3**: 99-111.
- 61) Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 1999; **10**: 3787-99.

- 62) Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001; **107**: 881-91.
- 63) Eriksson KK, Vago R, Calanca V, Galli C, Paganetti P, Molinari M. EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 44600-5.
- 64) Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 2003; **23**: 7448-59.
- 65) Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002; **16**: 1345-55.
- 66) Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol*. 2002; **318**: 1351-65.
- 67) Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 45495-502.
- 68) Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007; **129**: 1337-49.
- 69) McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001; **21**: 1249-59.
- 70) Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M. Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*. 2004; **28**: 67-78.
- 71) Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 2006; **440**: 352-7.
- 72) Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with

- reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; **102**: 6990-5.
- 73) Bing G, Nguyen XV, Liu M, Markesbery WR, Sun A. Biophysical and biochemical characterization of the intrinsic fluorescence from neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging*. 2006; **27**: 823-30.
 - 74) Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H. Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *Neuroreport*. 2009; **20**: 990-6.
 - 75) Drake J, Petroze R, Castegna A, Ding Q, Keller JN, Markesbery WR, Lovell MA, Butterfield DA. 4-Hydroxynonenal oxidatively modifies histones: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2004; **356**: 155-8.
 - 76) Dang TN, Arseneault M, Murthy V, Ramassamy C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Curr Mol Pharmacol*. 2010; **3**: 66-78.
 - 77) Pettazzoni P, Pizzimenti S, Toaldo C, Sotomayor P, Tagliavacca L, Liu S, Wang D, Minelli R, Ellis L, Atadja P, Ciamporzero E, Dianzani MU, Barrera G, Pili R. Induction of cell cycle arrest and DNA damage by the HDAC inhibitor panobinostat (LBH589) and the lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 2011; **50**: 313-22.
 - 78) Bodur C, Kutuk O, Tezil T, Basaga H. Inactivation of Bcl-2 through I κ B kinase (IKK)-dependent phosphorylation mediates apoptosis upon exposure to 4-hydroxynonenal (HNE). *J Cell Physiol*. 2012; **227**: 3556-65.
 - 79) Riederer BM, Leuba G, Vernay A, Riederer IM. The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011; **236**: 268-76.
 - 80) McNaught KS, Shashidharan P, Perl DP, Jenner P, Olanow CW. Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci*. 2002; **16**: 2136-48.
 - 81) Li G, Jiang H, Chang M, Xie H, Hu L. HDAC6 α -tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2011; **304**: 1-8.
 - 82) Gregori L, Fuchs C, Figueiredo-Pereira ME, Van Nostrand WE, Goldgaber D. Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J Biol Chem*. 1995; **270**: 19702-8.
 - 83) Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK. Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci*. 2006; **26**: 4277-88.
 - 84) Liu SJ, Zhang AH, Li HL, Wang Q, Deng HM, Netzer WJ, Xu H, Wang JZ. Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial

- memory. *J Neurochem*. 2003; **87**: 1333-44.
- 85) Liu ZC, Fu ZQ, Song J, Zhang JY, Wei YP, Chu J, Han L, Qu N, Wang JZ, Tian Q. Bip enhanced the association of GSK-3 β with tau during ER stress both in vivo and in vitro. *J Alzheimers Dis*. 2012; **29**: 727-40.
 - 86) Löw P. The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *Gen Comp Endocrinol*. 2011; **172**: 39-43.
 - 87) Chavez J, Chung WG, Miranda CL, Singhal M, Stevens JF, Maier CS. Site-specific protein adducts of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human THP-1 monocytic cells: protein carbonylation is diminished by ascorbic acid. *Chem Res Toxicol*. 2010; **23**: 37-47.
 - 88) Cai J, Bhatnagar A, Pierce WM Jr. Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts. *Chem Res Toxicol*. 2009; **22**: 708-16.
 - 89) Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1998; **273**: 16058-66.
 - 90) Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*. 2004; **304**: 1328-31.
 - 91) Yao D, Gu Z, Nakamura T, Shi ZQ, Ma Y, Gaston B, Palmer LA, Rockenstein EM, Zhang Z, Masliah E, Uehara T, Lipton SA. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; **101**: 10810-4.
 - 92) Nakamura T, Wang L, Wong CC, Scott FL, Eckelman BP, Han X, Tzitzilonis C, Meng F, Gu Z, Holland EA, Clemente AT, Okamoto S, Salvesen GS, Riek R, Yates JR 3rd, Lipton SA. Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death. *Mol Cell*. 2010; **39**: 184-95.
 - 93) Wang C, Ko HS, Thomas B, Tsang F, Chew KC, Tay SP, Ho MW, Lim TM, Soong TW, Pletnikova O, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL. Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet*. 2005; **14**: 3885-97.
 - 94) Costa RO, Ferreiro E, Martins I, Santana I, Cardoso SM, Oliveira CR, Pereira CM. Amyloid β -induced ER stress is enhanced under mitochondrial dysfunction conditions. *Neurobiol Aging*. 2012; **33**: 824.e5-16.
 - 95) Costa RO, Ferreiro E, Cardoso SM, Oliveira CR, Pereira CM. ER stress-mediated apoptotic pathway induced by A β peptide requires the presence of functional mitochondria. *J Alzheimers Dis*. 2010; **20**: 625-36.

- 96) Lee HP, Pancholi N, Esposito L, Previll LA, Wang X, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Early induction of oxidative stress in mouse model of Alzheimer disease with reduced mitochondrial superoxide dismutase activity. *PLoS One*. 2012; **7**: e28033.

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました千葉科学大学薬学部薬理学研究室 大熊康修教授に心より感謝致します。また、研究室配属当初より、直接の御指導を戴きました岐阜薬科大学薬学部薬物治療学研究室 金子雅幸講師に深く感謝致します。そして、数々の御助言を戴きました千葉科学大学薬学部薬理学研究室 川田浩一講師、千葉科学大学薬学部薬化学研究室 三森盛亮助手、京都大学医学部付属病院薬剤部 大村友博助教に深謝致します。

数々の御指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究科 野村靖幸名誉教授に深く感謝致します。本研究の遂行に御協力下さいました京都薬科大学薬学部病態生理学分野 北村佳久准教授、京都薬科大学薬学部病態生理学分野 高田和幸助教、同志社大学神経病理学研究室 井原康夫教授、同志社大学神経病理学研究室 宮坂知宏助教に深く感謝致します。

本学位論文を審査していただきました千葉科学大学薬学部病態生化学研究室 柏木敬子教授、千葉科学大学薬学部薬物動態学研究室 細川正清教授、千葉科学大学薬学部臨床薬剤学 榎渕泰宏教授に深く感謝致します。

日々実験でお世話になりました千葉科学大学薬学部薬理学研究室の皆様へ感謝致します。中でも、日々の研究だけではなく、本研究室の運営や学生実習にも積極的に取り組んで下さった小野口雅之氏、東野俊作氏、杉岡夏実氏、山森正嗣氏に深く感謝致します。

最後に、私を支えてくれた両親や家族、大切な友人に深く感謝致します。千葉科学大学での研究生活は多くの方々の御協力により充実した日々を送ることができました。そして、このように学位論文をまとめることができたことに深く感謝致します。誠にありがとうございました。

【主論文目録】

本学位論文は下記の学術論文による.

1. 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).
2. 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).

【審査委員】

本学位論文の審査は千葉科学大学で指名された下記の審査員によって行われた。

主査	千葉科学大学教授	大熊 康修
副査	千葉科学大学教授	柏木 敬子
副査	千葉科学大学教授	細川 正清
副査	千葉科学大学教授	桒刈 泰宏