

## 脳神経細胞の生死制御機構解明：新規因子発見と脳変性疾患モデル作出

### Studies on the Regulatory Mechanism of Neuronal Death: Isolation of Novel Factors and Title of Preparation of Model of Neurodegenerative Disease



野村 靖幸 (Yasuyuki Nomura)  
北海道大学・大学院医学研究科・招聘教員

研究の概要：脳変性疾患の根本的治療をめざし、脳ニューロン死制御機構に関する細胞分子生物学的研究を実施したところ、小胞体ストレスが誘導するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI)、ユビキリン、HRD1 がニューロン死を抑制すること、カスパーゼ結合タンパク質 GMEB1 もニューロン死を抑制すること、Pacl-R の小胞体への蓄積はニューロン死を惹起することを示した。また PDI、HRD1、GMEB1、Pacl-R の遺伝子改変マウスを作出しニューロン死への関与を実証した。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

医歯薬学／薬学・生物系薬学／薬理学

#### 1. 研究開始当初の背景・動機

高齢化社会において老人性疾患とくにアルツハイマー病、パーキンソン病ならびに、脳血管性認知症などの脳変性疾患患者の多発が危惧されている。しかし、これら疾患の発症機序の詳細に関し不明な点が多く残されており、診断・予防・治療の面からも早急な解明が求められている。

#### 2. 研究の目的

アルツハイマー病、パーキンソン病ならびに、脳血管性認知症などの脳疾患の発症、とくにニューロンの生死制御とその破綻に関わる新規因子の単離・同定、これら因子のニューロン死惹起への関与の細胞・分子機構、さらにこれら因子を移入／欠失した病態モデル動物、細胞を作出することにより、脳変性疾患を診断、予防、治療することを目指す。

#### 3. 研究の方法

ニューロンのアポトーシス惹起機構、ならびにニューロンと密接に相互作用するグリア細胞のアポトーシス惹起機構を解明するのみでなく、ニューロン・グリア細胞相関の観点から分子シャペロン、ニューロトロフィン、サイトカイン、細胞接着関連分子はもとより、これら以外の新規因子のニューロン死、グリア細胞死への関与などの機構を解明する。このように脳細胞死制御機構への遺伝子・分子生物学的な基礎的アプローチを行い、その成果を基盤に脳変性疾患の予防・治療薬に関する分子・薬理学的研究にまで発展させることを目指す。

#### 4. 研究の主な成果

##### (1) カスパーゼ結合タンパク質 GMEB1 の単離・同定と神経細胞死抑制効果

細胞死実行因子カスパーゼ-2の結合タンパク質として GMEB1 を同定し、イニシエーターカスパーゼのプロドメインに結合することで、多量体化（活性化）を負に調節している分子であること、低酸素などのストレスによるアポトーシスを抑制することを明らかにした。さらに、GMEB1 発現トランスジェニック (TG) マウスを作出し、中大脳動脈閉塞による脳虚血を施したところ、浮腫形成や梗塞巣形成が有意に軽減した。

##### (2) 低酸素負荷に伴うタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) とユビキリンの誘導と神経細胞死抑制

小胞体に存在するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は脳虚血/低酸素ストレスに応じて up-regulate される内在性細胞死抵抗因子であり、ユビキリンと結合・協調し変性タンパク質の除去に関わることを示した。さらに、PDI が細胞内で生成される一酸化窒素 (NO) によって S-ニトロシル化 (SNO) され、PDI の活性に必須な Cys 残基が標的となり PDI の酵素活性を著しく低下することを示した。初代培養神経細胞を NMDA 処理した際に SNO-PDI が認められ、細胞死に先んじたポリユビキチン化タンパク質の蓄積と小胞体ストレスが見られた。さらに、SNO-PDI はヒト弧発性神経変性疾患患者脳においても強く検出された。

[4. 研究の主な成果 (続き)]

(3) 小胞体ストレス誘導ヒト新規タンパク質 HRD1 の同定: HRD1 とケミカルシャペロンの神経細胞死抑制効果

変性タンパク質の分解を促進する小胞体関連分解 (ERAD) に関与するユビキチンリガーゼである HRD1 が脳の神経細胞特異的に発現していることを明らかにし、家族性パーキンソン病関連タンパク質 Pael-R およびアルツハイマー病関連タンパク質 APP を HRD1 がユビキチン化し、分解を促進することを示した。また、HRD1 の TG マウスを作成した。

ケミカルシャペロンの 4-フェニル酪酸 (4-PBA) は小胞体ストレスによる細胞死を抑制すること、さらに、Pael-R 蓄積による小胞体ストレスを抑制することを示した。

(4) 脳神経変性疾患・小胞体ストレスに対する自然免疫系 TLR 受容体の機能解析

細菌由来 CpG DNA は iNOS 発現を誘導し、MyD88 および MAP kinase カスケードを介することを明らかにし、転写因子の STAT3 の活性化を細菌内毒素の LPS が惹起することを見出した。また、小胞体ストレスが関与する細胞死に PI3 kinase/Akt 系の活性低下が関与することを示した。

(5) パーキンソン病発症への小胞体ストレスと Pael-R、およびミトコンドリア (HtrA2/Omi) の関与の検討

家族性若年性パーキンソン病 AR-JP の病因遺伝子 Parkin の基質として同定した Pael-R をショウジョウバエ脳に導入することで、ドパミンニューロンが変性するパーキンソン病モデルを作出した。また Pael-R を発現するアデノウイルスを Parkin ノックアウト (KO) マウスに導入することにより、黒質ドパミンニューロンが Pael-R の毒性に対して脆弱であること、さらに Parkin KO マウスと Pael-R TG マウスを交配して作出したマウスでは、黒質および青斑核のカテコールアミンニューロン選択的脱落が認められた。

HtrA2/Omi はミトコンドリア膜間スペースに局在し、アポトーシス刺激に応じて細胞質に放出され、アポトーシス阻害タンパク質 (IAP) に結合してその活性を阻害する細胞死誘導因子であることを見出した。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

1) ニトロシル化 PDI のニューロン死惹起機構とアルツハイマー病やパーキンソン病発症への関わりを患者脳で示した。

2) 小胞体のストレス誘導タンパク質 PDI、ユビキリン、HRD1 を同定し、そのニューロン死抑制機構を示し、基礎細胞分子生物学の進歩に寄与した。

3) パーキンソン病発症とドパミンニューロン死への Pael-R の関与を示し、治療法に大きな示唆を与えた。

4) 以上の知見を Nature, J. Biol. Chem. 誌等に発表し、国際的に高い評価を得た。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z-Q., Gu, Z., Ma, Y., Maslah, E., **Nomura, Y.** and Lipton, S.A. S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. Nature, 441, 513-517 (2006).
2. Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., Takahashi, R., Fujitani, N., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, T. and **Nomura, Y.**, A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin, J. Neurochem., 99, 1456-1469 (2006).
3. Kubota, K., Niinuma, Y., Kaneko, M., Okuma, Y., Sugai, M., Omura, T., Uesugi, M., Uehara, T., Hosoi, T. and **Nomura, Y.**, Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. J. Neurochem. 97, 1259-1268 (2006).
4. Tsuruma, K., Nakagawa, T., Morimoto, N., Minami, M., Hara, H., Uehara, T. and **Nomura, Y.**, Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 binds to initiator procaspases and inhibits ischemia-induced apoptosis and neuronal injury. J. Biol. Chem., 281, 11397-11404 (2006).
5. Ko, H. S., Uehara, T., Tsuruma, K. and **Nomura, Y.**, Ubiquitin interacts with ubiquitylated proteins and proteasome through its ubiquitin-associated and ubiquitin-like domains. FEBS Lett. 566, 110-114 (2004).
6. Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R. and Lu, B., Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in Drosophila. Neuron, 37, 911-924 (2003).