

平成27年度（第20回）
弘前大学医学部学術賞
奨励賞受賞論文

MIKI Y, TANJI K, MORI F, WAKABAYASHI K. Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2015 Feb; 74: 25-31.

ハンチントン病細胞モデルにおける Sigma-1 receptor を介した核内封入体の形成機序

弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座
三 木 康 生

【はじめに】

細胞内分解機構にはオートファジー・ライソソーム系およびユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) などが知られている。SIGMAR1 は小胞体 (ER) に存在する分子シャペロンであり、新生されたタンパク質の折り畳みだけでなく、異常タンパク質を ER から UPS に逆輸送し、分解する (ER 関連分解) ことにも関わっている¹⁾。我々は、ポリグルタミン病を含む種々の神経変性疾患剖検脳の病理組織学的検討ならびに培養細胞系を用いた検討を行い、①SIGMAR1 の蓄積は核内封入体を形成する神経変性疾患に共通する現象である、②SIGMAR1 は ER ストレスにより ER から核内に移行する、③核輸送を阻害する leptomycin B を投与すると SIGMAR1 は核内に蓄積する、ことを明らかにした²⁾。

そこで今回、SIGMAR1 が核内封入体として不溶化したタンパク質の分解に関与しているか否かについてハンチントン病 (HD) の細胞モデルを用い検討した。

【方法】

eGFP で標識された変異型 (Q74) および正常型 (Q23) ハンチンチン (Htt) 遺伝子を導入した HeLa 細胞を用いた。SIGMAR1 agonist, SIGMAR1 antagonist, leptomycin B, epoxomicin (選択的プロテアソーム阻害剤) などの各種試薬による刺激および SIGMAR1 siRNA 導入 4 時間後に Htt 遺伝子導入を行った。また、SIGMAR1 遺伝子の過剰発現時期を、変異型 Htt 遺伝子導入の 4 時間前、同時、4、12、24 時間後に分けて行った。

(1) 免疫細胞化学的検討

培養細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて固定し、SIGMAR1, ubiquitin, p62, LC3 に対する抗体を用い免疫染色を行った。さらに、変異型 Htt は nuclear body と共局在し、転写やスプライシングを抑制することが知られている。そこで、nuclear body である PML body, Cajal body, paraspeckle に対する抗体を用い免疫染色した。包埋する際、DAPI で核を標識した。

(2) 定量的検討

1 標本あたり弱拡大 10 視野を選び、①GFP 陽性細胞数 (= 変異型 Htt 導入細胞数) / DAPI 数 (= 全細

胞数), ②GFP 陽性凝集物を有する細胞/GFP 陽性細胞を半定量し, 統計学的に検討した.

(3) 生化学的検討

変異型 Htt 遺伝子を導入した HeLa 細胞において, GFP (SIGMAR1 agonist, SIGMAR1 antagonist, leptomycin B, epoxomicin, SIGMAR1 siRNA, SIGMAR1 遺伝子過剰発現群), オートファジー関連分子 (LC3, p62), ubiquitin をウェスタンブロット法で定量した. また, UPS 活性も併せて定量した.

【結果】

(1) 免疫細胞化学的検討

Q74を遺伝子導入した培養細胞においてのみ細胞質内および核内に変異型 Htt の凝集物が認められた. 核内凝集物のほとんどが SIGMAR1 陽性で, 少数が ubiquitin 陽性. 一方, 核内凝集物のいくつかは PML のみ陽性であった.

(2) 定量的検討

SIGMAR1 siRNA と epoxomicin の投与で細胞質内および核内凝集物の数が有意に増加した. Leptomycin B の投与でも核内凝集物が増加した.

(3) 生化学的検討

変異型 Htt は SIGMAR1 siRNA と epoxomicin 投与群で GFP の高分子量のバンドを認めた. Control siRNA 投与群と比較して, SIGMAR1 siRNA 投与群の LC3-II および p62 量には変化がなかったが, SIGMAR1 siRNA 投与群では有意に UPS 活性が低下していた. SIGMAR1 の過剰発現で細胞内凝集物の形成は有意に抑制された.

【考察】

本研究では, SIGMAR1 は変異型 Htt の核内凝集物のほとんどが陽性であり, 一部はユビキチン化されていた. さらに, 核内凝集物のいくつかは PML 陽性であった. PML body は転写の制御に関わり, UPS で分解される. 本研究における SIGMAR1 陽性の核内凝集物は UPS の分解対象であることが示唆された.

SIGMAR1 の機能を抑制することにより, 核内凝集物の数が増え, GFP で標識された変異型 Htt は不溶化していた. この現象は epoxomicin により再現され, leptomycin B の刺激により核内凝集物のみ増えた. さらに, UPS 活性は, SIGMAR1 の抑制により有意に減少した. SIGMAR1 は ER 関連分解に関わる ER シャペロンの一つであり, 細胞質と核との間を行き来する²⁾. これらの所見は, SIGMAR1 は変異型 Htt の分解に ER 関連分解を介して関わる事を示唆する.

ER のホメオスタシスはポリグルタミン病をはじめ様々な神経変性疾患において障害される. 変異型 Htt の蓄積は ER ストレスを引き起こし, HD の病初期から ER 関連分解の機能を障害する. 本研究では, SIGMAR1 の過剰発現によりプロテアソーム系の活性が低下し, 変異型 Htt の凝集物の形成は抑制された. これは SIGMAR1 が HD の初期から変異型 Htt の分解に関与している可能性を示唆する.

核内封入体はオートファジー特異的なタンパク質である LC3 や NBR1 陰性である³⁾. 一方, アグリソーム形成に関わる HDAC6 は核内封入体は陰性である⁴⁾. さらに, 変異型 Htt を遺伝子導入した培養細胞では, ユビキチンライゲースである San1p や UHRF-2 が核内のポリグルタミン分解を加速する⁵⁾. つまり, 核内外で異常タンパク質の分解経路は異なる可能性があり, 核内の異常タンパク質の分解には UPS が重要である.

SIGMAR1 は, 核内の異常タンパク質の分解に ER 関連分解を介して関わっている可能性が示唆された.

【参考文献】

- 1) Hayashi T, Tsai SY, Mori T et al. Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15:557-77.
- 2) Miki Y, Mori F, Kon T et al. Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 2014;34:148-58.
- 3) Mori F, Tanji K, Odagiri S et al. Autophagy-related proteins (p62, NBR1 and LC3) in intranuclear inclusions in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett* 2012;522:134-8.
- 4) Miki Y, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of histone deacetylase 6, an aggresome-related protein, is specific to Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions. *Neuropathology* 2011; 31:561-8.
- 5) Iwata A, Nagashima Y, Matsumoto L et al. Intranuclear degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 2009;284:9796-803.