

# ユビキチンリガーゼ HRD1の家族性パーキンソン病 発症関連蛋白質に対する分解機構とその脳内局在の解析

## 学位論文内容の要旨

### はじめに

パーキンソン病などの神経変性疾患の原因の一つに小胞体ストレスが関与する可能性が報告されている。小胞体ストレスとは小胞体機能の障害に伴い、未成熟蛋白質が小胞体に蓄積する状態を指し、この状態が続くと細胞死に至る。HRD1は小胞体ストレスに対する防御機構の一つである小胞体関連分解(ERAD)に関与し、小胞体膜に局在するユビキチンリガーゼ(E3)として当研究室で同定された蛋白質である。ERADでは異常蛋白質が小胞体から細胞質へ排出され、HRD1を含むERAD関連E3によりユビキチン化され、プロテアソーム系による分解を受け、細胞保護作用を示す。

一方、Pael受容体は、ERAD関連E3、Parkinの分解基質の一つであり、折りたたみが難しく、Pael受容体の蓄積によって小胞体ストレスが起こる。家族性パーキンソン病の一つ、常染色体劣性若年性パーキンソン病(AR-JP)では、Parkinの機能欠失によりParkinのE3活性が消失し、Pael受容体が分解されずに小胞体内外に蓄積することで小胞体ストレス誘発性の細胞死が惹起され、ドパミン神経が脱落することが報告されている。

しかし、Parkinを欠失したマウスにおいてPael受容体がそれほど蓄積せず、ドパミン神経の脱落も起こらないことが報告されており、さらにRT-PCR-ELISAの結果からHRD1はPael受容体同様、黒質に局在することが判明したため、筆者はParkinの機能欠失の代償機構としてHRD1がPael受容体を分解しているのではないかと仮定し実験を行った(第1章)。また、他のERAD関連E3の報告から、HRD1にはE3活性以外にも機能を有する領域があるのではないかと推定し、HRD1のドメイン機能解析を行った(第2章)。さらに、HRD1の脳内局在については殆ど不明であり、今回マウス脳切片を用いてHRD1の脳内局在について検討を行った(第3章)。その結果、以下の成果を得た。

### 第1章. HRD1によるパーキンソン病関連蛋白質 Pael 受容体の分解促進

HRD1とPael受容体を細胞内に共発現させ免疫染色を行った結果、HRD1とPael受容体は小胞体で共局在することが判明した。Pael受容体を細胞内に発現させウェスタンブロットを行うと、本体の50 kDaのバンドのほかに高分子量のスメアなバンドが確認されるが、これは報告にあるユビキチン化されたPael受容体のみならず、Pael受容体の凝集体、aggregated formであることが示唆された。また、HRD1とPael受容体が相互作用するか検討した結果、HRD1はParkinとは異なり定常状態では相互作用せず、小胞体ストレスなどでPael受容体のaggregated formが蓄積したときに相互作用することが示唆された。

次に、Pael 受容体が HRD1 のどの領域と相互作用するかを検討するため、Pael 受容体と HRD1 変異体を用いた結合実験を行った。HRD1 はシグナルペプチド、膜貫通領域、E3 活性に必要な RING-finger 領域および proline-rich 領域から構成されるが、HRD1 と Pael 受容体との相互作用には HRD1 の proline-rich 領域が必要である可能性が示唆された。

また、HRD1 は Pael 受容体を *in vitro* でユビキチン化することが明らかとなり、Pael 受容体の分解促進に働くことが判明した。さらに HRD1 は Pael 受容体の蓄積によって起こる細胞死を抑制することも示された。

さらに筆者は HRD1 を誘導する転写因子の一つ、ATF6 が HRD1 の誘導を介して Pael 受容体の分解促進に働くのではないかと仮定し実験を行ったところ、ATF6 は Pael 受容体を分解促進し、同時に RNA 干渉によって HRD1 の発現抑制を行ったところ、Pael 受容体の aggregated form のみが蓄積したことから、HRD1 は Pael 受容体の aggregated form を選択的に分解する可能性が示唆された。

## 第 2 章. HRD1 の膜貫通領域および proline-rich 領域の機能解析

HRD1 の膜貫通領域は、ERAD 関連蛋白質の一つであり、小胞体からの変性蛋白質の排出に関与する Derlin-1 との類似点が多いため、HRD1 の膜貫通領域のみの変異体を用いて Pael 受容体を小胞体から細胞質側に移行させるか否かを検討した。その結果、細胞質画分で Pael 受容体が発見され、HRD1 の膜貫通領域は Pael 受容体を小胞体から細胞質側に移行させる可能性が示唆された。

さらに、HRD1 の膜貫通領域の機能として HRD1 の安定化に関与するかを、HRD1 の膜貫通領域の一部を欠失した変異体を用いて検討したところ、HRD1 の蛋白質量は減少し、HRD1 の安定化に膜貫通領域が必要であることが判明した。

次に、HRD1 の proline-rich 領域の役割について検討するため、HRD1 の proline-rich 領域以降を欠失した変異体を用いて検討した。その結果、Pael 受容体のユビキチン化は生じるが、分解促進には至らないことが判明し、proline-rich 領域は HRD1 による Pael 受容体の分解促進に影響を与える可能性が示唆された。

## 第 3 章. HRD1 のマウス脳内局在

ddY 系雄性マウス脳切片を用いて、特に神経変性疾患に関与すると考えられる部位を中心に HRD1 の脳内組織分布について免疫染色法により検討した。その結果、HRD1 は緻密層を含む中脳黒質に広範囲に局在しており、さらに蛍光二重染色から HRD1 はドパミン神経の一部に局在していることも明らかとなった。また、HRD1 は海馬体（海馬・歯状回）、大脳皮質、線条体、淡蒼球および小脳プルキンエ細胞にも分布が認められた。一方、HRD1 はグリア細胞に発現は認められず、神経細胞に発現していることが判明した。

### まとめ

本研究より、HRD1 が家族性パーキンソン病関連蛋白質の一つである Pael 受容体の分解促進に働くことが判明したが、孤発性パーキンソン病において HRD1 がいかなる関与をするかが今後の課題となると考えられる。また、HRD1 は E3 活性のみならず、さまざまな機能を有する可能性が示唆され、ERAD に関与する他の分子との関連性についても検討する必要があると考えられる。また HRD1 の脳内局在より、HRD1 は黒質ドパミン神経の脱落を主徴とするパーキンソン病のみならず、他の神経変性疾患に対しても HRD1 が関与する可能性を示唆しており、HRD1 のターゲットとなる基質を探索することにより、このような疾患の原因蛋白質同定の糸口になり得ることが推測される。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 南 雅 文  
副査 教授 有 賀 寛 芳  
副査 准教授 上 原 孝  
副査 教授 松 本 健 一 (島根大学)

学位論文題名

## ユビキチンリガーゼ HRD1の家族性パーキンソン病

### 発症関連蛋白質に対する分解機構とその脳内局在の解析

小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) はリボソームで合成された蛋白質のうち、分泌蛋白質や膜蛋白質を取り込み、その折りたたみや糖鎖修飾を行い、蛋白質を成熟させる細胞内小器官である。細胞に ER の機能を阻害するストレスが負荷されたり、遺伝子変異による異常蛋白質が生成されると、成熟不完全な蛋白質 (unfolded protein) が ER に蓄積する。この状態を ER ストレスといい、この状態が持続すると細胞はアポトーシスを誘導して死に至る。これに対して細胞は ER 内の異常蛋白質の蓄積を防ぐため、①蛋白質の翻訳抑制、②ER シャペロンによる unfolded protein の修復、③unfolded protein を ER から排出・分解除去する小胞体関連分解 (ER-associated degradation; ERAD) という三つの防御機構 unfolded protein response (UPR) を作動させる。ERAD は、異常蛋白質を細胞質のユビキチン-プロテアソーム系に依存して分解する経路である。この経路では、まず異常蛋白質が ER から細胞質へトランスロコンを介し逆行輸送される。細胞質では、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) やその他の分子が協調的に働き、ER から排出された異常蛋白質をユビキチン化し、プロテアソームで分解する。

本論文では、ERAD に関与する酵母 Hrd1p のヒトホモログ HRD1 の機能に関して、1) HRD1 が ER ストレスに起因する家族性パーキンソン病 (AR-JP) の原因蛋白質、Pael 受容体 (Parkin associated endothelin-receptor like receptor; Pael-R) を分解除去する可能性、2) HRD1 分子の各ドメインの機能、3) HRD1 のマウス脳組織局在、について検討し、以下のような新しい知見を得ている。

1. HRD1 は細胞内において ER で Pael-R と共局在し、ER ストレスにより Pael-R と相互作用した。HRD1 は Pael-R のユビキチン化と分解を促進し、Pael-R の蓄積によって起こる細胞死を抑制した。さらに、転写因子 ATF6 は Pael-R の分解を促進し、HRD1 は ATF6 による Pael-R の凝集体の分解に関与した。
2. HRD1 の膜貫通領域は Pael-R の ER から細胞質への輸送に関与し、一方で膜貫通領域欠如により HRD1 の安定性が減少した。また、HRD1 の proline-rich 領域の欠如により、Pael-R のユビキチン化は起こるが、Pael-R の減少は起こらなかったため、proline-rich 領域はプロテアソームによる Pael-R の分解促進に関与する可能性が示唆された。
3. HRD1 はマウス脳内においてドパミン神経を含む黒質に局在した。また、HRD1 は海馬体 (海馬・歯状回)、大脳皮質、線条体、淡蒼球および小脳プルキン

工細胞にも局在した。HRD1の発現は神経細胞特異的であり、グリア細胞には発現していなかった。

以上の研究成果により、ユビキチンリガーゼHRD1が家族性パーキンソン病の原因蛋白質Pael-Rの分解促進に働くことを明らかにした。また、HRD1のドメイン機能解析から、HRD1はユビキチンリガーゼ活性だけでなく、膜貫通領域やproline-rich領域にも機能を有することを明らかにした。さらに、HRD1の脳における分布から、黒質ドパミン神経の変性を主徴とするパーキンソン病のみならず、他の神経変性疾患にもHRD1が関与する可能性があることを示した。

これを要するに、著者は、新規ユビキチンリガーゼHRD1の機能についての新知見を得たものであり、ユビキチン-プロテアソーム系の機能の分子レベルでの解明に貢献するところ大なるものがある。また、HRD1およびその関連タンパク質が種々の神経変性疾患の治療薬創製のためのターゲットとなる可能性を示したことも評価に値する。

よって著者は、北海道大学博士（薬学）の学位を授与される資格あるものと認める。