

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659540

研究課題名(和文)神経細胞死におけるHsp70とその関連蛋白の意義

研究課題名(英文)Role of Hsp70 and its related molecules in neuronal death

研究代表者

三辺 義雄 (Minabe, Yoshio)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60181947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞死の機序に関しては不明な点が多い。本研究では熱ショック蛋白であるHsp70.1を中心とした蛋白質-膜脂質間相互作用を検索した。オートファジーに関わる分子連関を検索することで、リソソームの破裂により生じる神経細胞死の全容を究明した。その分子機構には、「calpain-mediated cleavage of carbonylated Hsp70.1」があることを発見した。Hsp70.1の機能がカルボニル化とカルパイン分解によって障害されるため、BMPとの結合が障害され、ASMの機能低下が起きる。その結果スフィンゴミエリンの分解が阻害され膜を安定化するセラミドが減少しリソソームは破裂する。

研究成果の概要(英文)：Using the monkey experimental paradigm, previously we reported that calpain-mediated cleavage of oxidized Hsp70.1 causes neurodegeneration in the hippocampal CA1 sector. However, the molecular mechanisms of the lysosomal destabilization/stabilization have not been elucidated. To elucidate whether regulation of lysosomal ASM could affect the neuronal fate, we analyzed Hsp70.1-BMP binding and ASM activity. We showed that Hsp70.1 being localized at the lysosomal membrane, lysosomal lipid BMP levels, and the lipid binding domain of Hsp70.1 are crucial for Hsp70.1-BMP binding. Calpain activation and a concomitant decrease in the lysosomal membrane localization of Hsp70.1 and BMP levels may diminish Hsp70.1-BMP binding, resulting in decreased ASM activity and lysosomal rupture with leakage of cathepsin B into the cytosol. Regulation of ASM activation in vivo by Hsp70.1-BMP affects lysosomal stability and neuronal survival or death after ischemia/reperfusion.

研究分野：神経精神医学

キーワード：認知症

## 1. 研究開始当初の背景

海馬 cornu Ammonis (CA1)のニューロンは記憶にかかわる重要な役割を担うが、一過性脳虚血/再灌流負荷に対しては脆弱性を示す。「カルパイン-カテプシン仮説」によれば、虚血中、CA1 ニューロンでは  $Ca^{2+}$  動員が生じて、 $\mu$ -カルパインが活性化される。活性型  $\mu$ -カルパインはリソソーム膜に移動して特定の基質を切断するため、膜の安定性が崩れリソソームは破裂する。その結果、カテプシン B、L、D などの加水分解酵素が細胞質中に放出され、細胞構成タンパクの分解により神経細胞死が起きる。しかし、リソソーム膜においてカルパインが基質としている蛋白は不明であった。

一方、リソソームの破裂を惹起する他の要因として、再灌流の際に起きるリソソーム内の鉄に触媒された酸化反応によって生じる膜リン脂質の過酸化が考えられる。鉄がフェントン反応によってミトコンドリア由来の  $H_2O_2$  をヒドロキシラジカル ( $HO^\cdot$ ) に転換する触媒作用を及ぼすことにより、 $HO^\cdot$  が異常に増える。強力な活性酸素である  $HO^\cdot$  はリソソーム膜の -6 系多価不飽和脂肪酸を酸化して、神経毒であるヒドロキシノネール (HNE) を作る。この HNE はリソソーム限界膜の安定化に関わる蛋白質をカルボニル化することにより、最終的にその機能障害を惹起する。しかし、HNE がカルボニル化する標的蛋白は従来特定されていなかった。

近年、熱ショック蛋白 (Hsp70.1) にはリソソーム膜の安定化作用もあることが癌細胞で報告された (Kirkegaard et al., Nature 463:549-43, 2010)。そこで、本研究では HNE やカルパインの基質として Hsp70.1 とその関連蛋白に注目し、リソソーム破裂の分子メカニズムについて検索した。

## 2. 研究の目的

サル海馬を対象とした申請者らが行ったプロテオミクス解析によって、活性化された  $\mu$ -カルパインの基質として Hsp70.1 が同定された。同時に、虚血後の CA1 において Hsp70.1 の酸化損傷が 10 倍以上も上昇し、活性中心にある Arg469 がカルボニル化を受けていることが判明した。(Oikawa, Yamashima et al., Free Radic Biol Med, 46:1472-7, 2009)

そこで、活性型  $\mu$ -カルパインの生体内基質と過酸化脂質である HNE のカルボニル化の標的は、いずれも Hsp70.1 ではないかという作業仮説を立てて解析した。その結果、正常の Hsp70.1 はわずかしか分解されないが、カルボニル化 Hsp70.1 はカルパインによって顕著にしかも特異的に分解された。(Sahara and Yamashima, Biochem Biophys Res Commu, 393:806-81, 2010)

しかし、「なぜ、カルボニル化 Hsp70.1 が活性型  $\mu$ -カルパインにより切断されることで、リソソーム膜の破裂が起きるか？」は現在な

お不明である。そこで、Hsp70.1 とビス(モノアシルグリセロ)リン酸(BMP)、酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)間の分子相関に着目しつつ神経細胞死の分子機構を研究した。

## 3. 研究の方法

以下の3点に着目して Hsp70.1 の異常がリソソーム膜の破裂を惹起する分子メカニズムについて検索した。

### (1) カルパインによる Hsp70.1 分解のメカニズム

正常の Hsp70.1 は活性型  $\mu$ -カルパインによってわずかしか切断されないのに、酸化ストレスによってカルボニル化された Hsp70.1 は数倍以上も切断され易いのはなぜか？について、切断箇所のアミノ酸シーケンスの特徴や2次元構造の差異、ドメイン間の修飾などに注目して検索した。

### (2) ビス(モノアシルグリセロ)リン酸(BMP)と酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)の動態

BMP はリソソームに多い酸性リン脂質で、ホスファチジルグリセロールの構造異性体である。リソソーム内膜でアクチベーター蛋白である Hsp70.1 と結合することで ASM を活性化する。Hsp70.1 の機能障害によって BMP 膜表面の物性が変化する結果、ASM の加水分解機能の低下が生じ、膜を安定化するセラミドが減少しリソソームの破裂が生じる。本検索に際しては虚血性とアルツハイマー性の神経細胞死の異同に着目した。

### (3) セラミドとリソソーム膜安定性との関連

リソソーム膜のセラミド濃度が増加することによって、限界膜と隣接する細胞内小器官ないしアクチンフィラメントとの結合が強化されるために、膜が補強され物理的に安定化すると推定される。この考えに基づき、リソソーム膜内におけるセラミドの役割を分子レベルで解析し、膜の安定化/不安定化因子を探った。

### (4) 虚血サル脳とアルツハイマー剖検脳の比較

虚血サル脳とアルツハイマー剖検脳とを形態学的ならびにプロテオミクス解析により比較対照し、虚血性神経細胞死と変性性神経細胞死との異同を明らかにした。具体的には、虚血サル脳とアルツハイマー剖検脳とを対象として、通常染色(ヘマトキシリン-エオジン、クリューバー-バレラ、ト銀)を施した脳標本の光顕的観察を行った。また、Hsp70.1 を中心とした蛋白質-膜脂質間相互作用を解析し、オートファジーに関わる分子連関に着目しリソソーム破裂による神経細胞死のメカニズムについて検索した。

## 4. 研究成果

$\mu$ -calpain による生体内基質の切断と虚血後に生じるリソソーム膜の破裂とは、神経細胞死と密接に関連する。そこで、活性型

$\mu$ -calpain の生体内基質と HNE のカルボニル化の標的は、いずれも Hsp70.1 ではないかという作業仮説を立てて解析した処、これを裏付ける結果が得られた。すなわち、*in vitro* の酸化ストレスをかけた正常海馬 CA1 のホモジナイズに、活性型  $\mu$ -calpain を加えインキュベーションした後、Hsp70.1 の C 末端を認識する特異的な抗体を用いてイムノプロットを行い Hsp70.1 切断の有無とその程度とを検索した。その結果、無処理の Hsp70.1 はわずかしが分解されないのに対し、カルボニル化された Hsp70.1 は、HNE の濃度に関係なく活性型  $\mu$ -calpain によって顕著に分解された。生理的濃度の  $H_2O_2$  を用いた場合も同様であった。

以上より、リソソームの破裂機構が明らかになった。すなわち、虚血負荷により神経細胞内で  $Ca^{2+}$  動員が起きて、 $\mu$ -calpain が活性化される(1)。一方、再灌流によって生じた酸化ストレスによって過剰の  $H_2O_2$  が生じ、リソソーム内でフェントン反応によって強力な  $HO^{\cdot}$  に転換される。この  $HO^{\cdot}$  が膜リン脂質を構成する n-6 系の多価不飽和脂肪酸を攻撃し反応性の高い HNE が生じ(2)、これがリソソーム膜に移動した Hsp70.1 をカルボニル化する(3)。カルボニル化 Hsp70.1 は、活性化された  $\mu$ -calpain によって効率的に切断され(4)、リソソーム限界膜の破裂が起きる(5)。その結果、リソソーム内のカテプシンが細胞質へ放出され(6)神経細胞死が起きる(7)。

リソソーム内で Hsp70.1 と結合することで ASM を生理的に活性化している BMP の機能が、Hsp70.1 のカルボニル化とカルパインによる分解によって障害されることがわかった。その結果、BMP の機能障害によりスフィンゴミエリンの分解が阻害されリソソーム膜を安定化しているセラミドが減少するので、リソソーム膜は不安定化し破裂に至ることが証明できた。

一方、アルツハイマー剖検脳においては虚血サル脳にみられるのと同様の顆粒空包変性がみられたため、虚血サル脳を用いて生化学的な検索を行った。抗ヒト・BMP 抗体を用いて、一過性虚血/再灌流負荷前後のリソソーム BMP の量的変化をウエスタンブロッティングと免疫組織化学とで検索した。パイロットスタディ的に行った免疫組織化学では虚血前に比べて、虚血後 3 日目では BMP の染色性は明らかに低下していた。また、質量分析による「脂肪酸解析」では、一過性虚血/再灌流負荷前後 3 日目から 5 日目にかけて、リソソーム膜 BMP に含まれる C18:1 (オレイン酸)と C22:6 (ドコサヘキサエン酸: DHA)の含有量が有意に低下していた。

以上をまとめると、申請者らは従来の研究で神経細胞における酸化ストレスとカルパインの標的を「分子シャペロンとして機能す

ると共に、リソソーム膜安定化作用を持つ<熱ショック蛋白 Hsp70.1>」と特定した。本研究では Hsp70.1 を中心とした蛋白質-膜脂質間相互作用の解析を行った。その結果、オートファジーに関わる分子連関を検索することで、リソソームの破裂によって生じる神経細胞死の全容を明らかにした。今後、アルツハイマー病の新しい病因としてアミロイドに代わり脳虚血の関与が認知され、「カルパイン-カテプシン仮説」がますます注目されるであろう。一連の研究成果から治療ターゲットが一挙に定まり、現実的な対策が立てやすくなると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- 1) Heat shock protein 70.1 (Hsp70.1) affects neuronal cell fate by regulating lysosomal acid sphingomyelinase.  
Hong Zhu, Tanihiro Yoshimoto, Tetsumori Yamashima  
J. Biol. Chem. 289:27432-27443, 2014 (査読有) .
- 2) Calpain-Mediated Hsp70.1 Cleavage in Monkey CA1 after Ischemia Induces Similar 'Lysosomal Vesiculosis' to Alzheimer Neurons.  
Tetsumori Yamashima, Arumugam Mathivanan, Maryia Y. Dazortsava, Shota Sakai, Shota Kurimoto, Hong Zhu, Nozomi Funaki, Hanbai Liang, Françoise Hullin-Matsuda, Toshihide Kobayashi, Hiroyasu Akatsu, Hitoshi Takahashi, Yoshio Minabe  
J. Alzheimer's disease and Parkinsonism, 2014 (on-line) (査読有) .
- 3) Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain-cathepsin hypothesis'-- a perspective review. Yamashima T.  
Prog. Neurobiol. 105:1-23, 2013 (査読有) .

[学会発表](計 1 件)

山嶋哲盛: 虚血性と変性性の神経細胞死  
第 22 回海馬と高次脳機能学会  
平成 25 年 10 月 12 日、金沢 創作の森

[図書](計 3 件)

- 1) そのサラダ油が脳と体を壊してる  
山嶋哲盛 ダイナミックセラーズ出版  
1-245 ページ、2014 年  
そのサラダ油が脳と体を壊してる

- 2) 認知症が嫌なら油を変えよう！  
山嶋 哲盛 ダイナミックセラーズ出版  
1-243 ページ、2014 年
- 3) 「サラダ油」をやめれば、脳がボケずに  
血管も詰まらない！  
山嶋 哲盛 ワニブックス 1-224 ページ、  
2014 年

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三辺 義雄 (MINABE, Yoshio)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：60181947

##### (2) 研究分担者

山嶋 哲盛 (YAMASHIMA, Tetsumori)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：60135077

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：