

蛋白質品質管理機構と精神疾患 —シグマ1受容体の関与について—

工藤 喬

小胞体における蛋白質品質管理機構は unfolded protein response (UPR) といわれ、この破綻が精神疾患の発症に関与するとされている。今回我々は、シグマ1受容体の発現誘導がUPRの一翼を担うことを示し、統合失調症などではこの機構が障害されている可能性を指摘した。また、フルボキサミンがシグマ1受容体を発現誘導することが示され、抗小胞体ストレス効果すなわち蛋白質品質管理効果を発揮する薬として期待できることを提案する。

<索引用語：シグマ1受容体，小胞体ストレス，フルボキサミン，unfolded protein response (UPR)，脳梗塞>

はじめに

分泌蛋白質や膜蛋白質は、小胞体 (ER) に結合しているリボゾームで合成され、ER 内でフォールディングを受け、ゴルジ装置、細胞表面、あるいはリソゾームなどの最終目的地へ輸送され機能を果たすが、これら分泌系の蛋白質が正常な機能を果たすためには立体構造が正しいことが必要である。このように、ER は蛋白質の「組み立て工場」のような役割を担っており、「不良品」であるフォールディングが不正な蛋白質 (unfolded protein) が「出荷」されないように選別、すなわち「品質管理」を行い細胞の恒常性を保っている。特に ER ストレスといわれる恒常性を脅かすような種々の環境下では、unfolded protein が増加し、この「品質管理」が重要となってくる。これらの蛋白質品質管理機構は unfolded protein response (UPR) といわれているが、この機構の破綻はアポトーシスを起こし、精神疾患をはじめとした多くの疾患の病態過程に関与することが近年注目されている (図1)。今回、ER 膜上に存在するシグ

マ1受容体のUPRに対する関与を明らかにし、それを踏まえた新たな治療戦略について紹介する。なお、UPRおよびERストレスによるアポトーシスの詳細については拙論¹¹⁾を参照されたい。

I. シグマ1受容体

シグマ受容体は、 $\sigma 1$ 受容体と $\sigma 2$ 受容体の2つのサブタイプが同定されている¹³⁾。シグマ受容体遺伝子は、特にER膜上に固定された223個のアミノ酸の24-kDaの分子量蛋白質をコードしている^{13,22)}。近年、シグマ1受容体は、受容体、酵素、あるいはイオンチャンネルの活性化を調節する分子シャペロンという位置づけがなされるようになった^{7,8,20~22)}。一方、シグマ2受容体は、最近、プロゲステロン受容体膜成分^{13,24)}として同定されており、例えば、増殖、アポトーシス、樹状突起、シナプス形成および神経可塑性、シトクロムP450の活性化、あるいはステロイドのシグナル伝達などの多くの細胞事象に関与しているとされている^{2,12,18)}。シグマ1受容体は末梢器官に広く分布

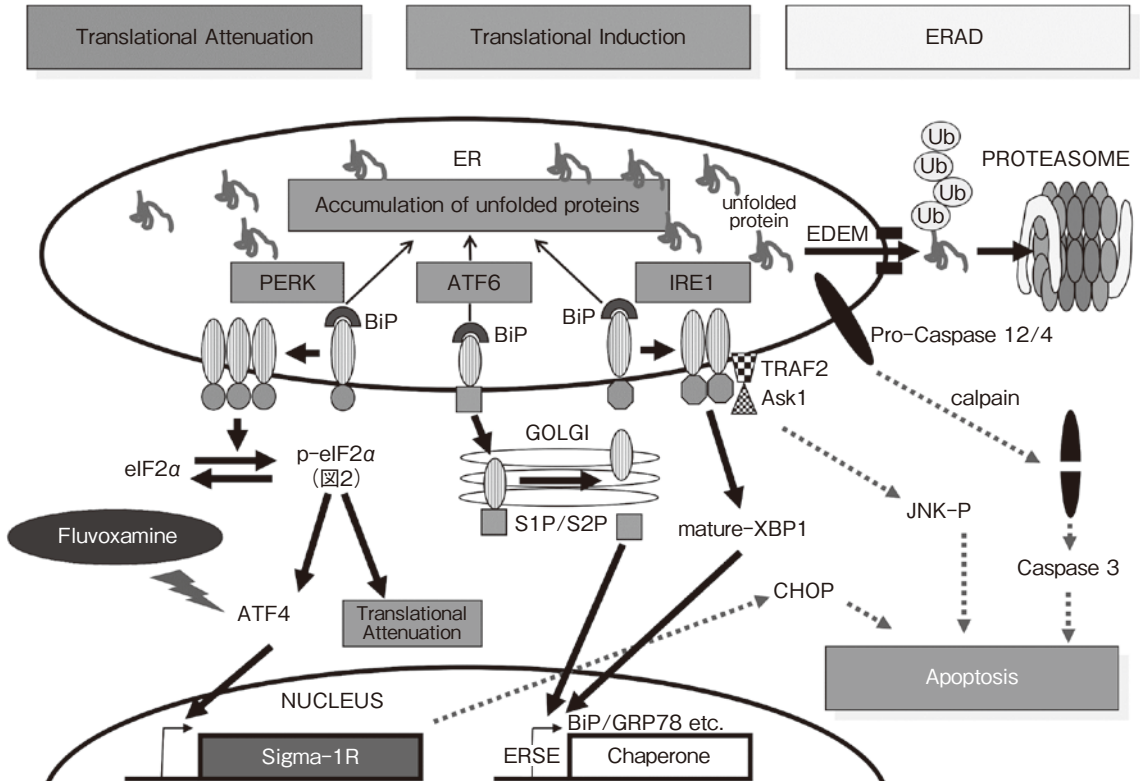


図1 UPRにおけるシグマ1受容体とフルボキサミンの位置づけ

ERストレスによって unfolded proteins が蓄積すると (accumulation of unfolded proteins), PERK, ATF6, あるいは IRE1 などの ER 膜上のトランスデューサーから BiP が解離し, 翻訳抑制 (translational attenuation), シャペロン蛋白発現 (translational induction), さらには小胞体関連分解 (ER associated degradation: ERAD) といった UPR (unfolded protein response) によって細胞の恒常性が保たれる。しかし, UPR が破綻すると, アポトーシスが発現して, 細胞死が起こる。シグマ1受容体は ATF4 の下流に位置し, ATF4 はフルボキサミンで誘導される。

し, 記憶, 感情, 感覚, および運動機能に關与する中枢神経系の異なる領域にも分布する^{3,9,16,23)}。しかし, 特定の神経ステロイドはシグマ1受容体と相互作用するが, シグマ1受容体に対する高親和性の内因性リガンドの正確な性質はまだ不明である¹³⁾。

この未同定のシグマ1受容体リガンドの調節作用が幅広いスペクトラムをもつことや, 中枢神経系および末梢器官におけるこの受容体が比較的広く分布することを踏まえ, この受容体に相互作用をする薬物が, 様々な疾患の潜在的な治療法として提案されてきた^{8,13,22)}。これらの多くは, 統合失調症, うつ病, 薬物依存, あるいは神経変性疾患

など, 精神医学領域のものである^{6,8,21)}。これらの病気の発症は, シグマ1受容体リガンドそのものの何らかの影響によるのではなく, シグマ1受容体のシャペロンとしての機能を必要とする標的分子が構造的不安定性を呈した時に起こると仮定されてきている^{4,20,21)}。その中で, シグマ1受容体の ER におけるシャペロン機能として ER からミトコンドリアへのカルシウム流出を調節する inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) 受容体の安定化が報告されている²²⁾。すなわち, シグマ1受容体はミトコンドリアと接する ER 膜 (mitochondria associated membrane: MAM) 上に存在し, 通常の静止状態ではシャペロンとしての機能を中止させ

ているが、病的なストレス状態になると不安定な IP₃受容体にバインドし IP₃受容体の分解を抑制して活性化し、ミトコンドリアへのカルシウム流出を調整して ER 内のカルシウム濃度低下を防御するとされている。MAM に存在するシグマ 1 受容体は ER シャペロン蛋白である BiP とバインドし、シグマ 1 受容体の配置転換を防いでいて、コカインなどのアゴニストによりシグマ 1 受容体が活性化すると BiP が離れて、核、細胞質膜、あるいは細胞外に配置転換されるとされている^{5,21)}。

II. シグマ 1 受容体と UPR

ER 内の unfolded proteins を検知し UPR を発現するトランスデューサーは ER 膜上に存在し、定常状態では BiP と結合して、unfolded proteins の蓄積、すなわち ER ストレスがかかると BiP の解離が起きて活性化される^{1,19)}。前章で述べたようにシグマ 1 受容体の活性化も UPR 発現と似ている。そこで、我々はシグマ 1 受容体と UPR の関連について検討することとなった。

まず、HEK293 (ヒト腎癌細胞) に ER ストレスを起こす tunicamycin (糖鎖付加阻害薬) を処理して、経時的にシグマ 1 受容体蛋白の発現を検討したところ、ER ストレスによりシグマ 1 受容体蛋白は誘導されることが示された (図 2)。この現象は、ER ストレスをかける薬剤を変えても、あるいは Neuro2a (マウス神経芽細胞腫) などの神経細胞に変えても同様に観察されることから普遍的な現象と考えられた。さらに、ER ストレス負荷後のシグマ 1 受容体 mRNA についても検討したところ、転写レベルで誘導がかかることが示された。この ER ストレスによってシグマ 1 受容体を誘導する転写因子は何であろうか？ HEK293 細胞に、ER ストレス下での主な転写因子である ATF4, ATF6, さらに XBP-1 をそれぞれ遺伝子導入して高発現させると、ATF4 の高発現でシグマ 1 受容体が誘導されることが示された。一方、siRNA で ATF4 をノックダウンした HEK293 細胞では ER ストレスをかけても、シグマ 1 受容体の誘導が観察されず、この現象は

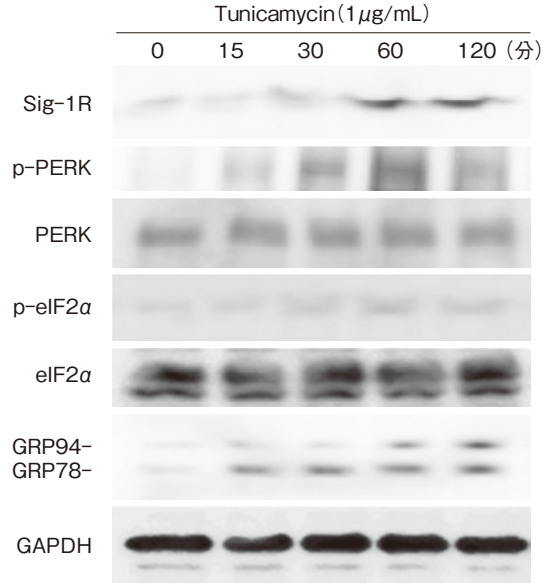


図 2 ER ストレスはシグマ 1 受容体を発現する HEK293 細胞に tunicamycin で ER ストレスを負荷すると (リン酸化 PERK : p-PERK, リン酸化 eIF2α : p-eIF2α, GRP78/94 の増加で示す), 経時的にシグマ 1 受容体が発現誘導される。GAPDH は内部標準。

ATF4 の転写因子活性が必要であることが確認された¹³⁾。

III. UPR としてのシグマ 1 受容体誘導

この ER ストレスを負荷した時に起こるシグマ 1 受容体誘導はいかなる意義をもっているのだろうか？ シグマ 1 受容体を HEK293 細胞に遺伝子導入して過剰発現させると、tunicamycin による ER ストレスに抵抗性を示し、細胞死が mock 導入細胞に比べて減少することが示された (図 3)。すなわち、ER ストレスによって誘導されたシグマ 1 受容体は一種の UPR として抗 ER ストレス効果をもたらすと考えられた¹⁷⁾。

統合失調症やアルコール依存症ではシグマ 1 受容体のプロモーター領域における遺伝子多型が報告されている (T-485A, GC-241-240TT)^{10,15)}。これら遺伝子多型をもったプロモーターと野生型のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子にヒューズしたレポーターアッセイ系を構築し、ER スト

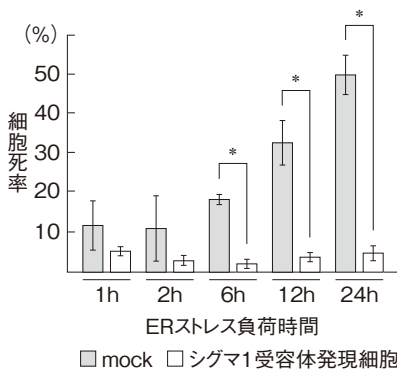


図3 シグマ1受容体の発現はERストレスによる細胞死を抑制する
シグマ1受容体を遺伝子導入したHEK293細胞では, tunicamycinによるERストレス負荷による細胞死が, 非導入細胞(mock)に比し, 抑制されている。
*: p<0.05

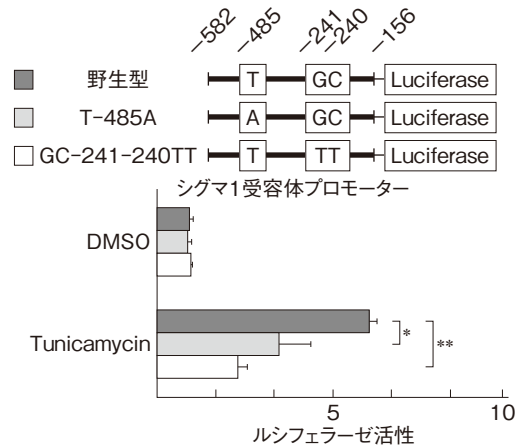


図4 シグマ1受容体のプロモーター領域の遺伝子多型はERストレスによる発現を抑制する
T-485A, GC-241-240TT, および野生型のシグマ1受容体のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子にヒューズし, tunicamycinによるERストレス負荷に対するシグマ1受容体の発現を検討すると, DMSO処理に比し野生型では発現上昇が観察されるが, 遺伝子多型ではそれが抑制されていた。
*: p<0.05, **: p<0.01

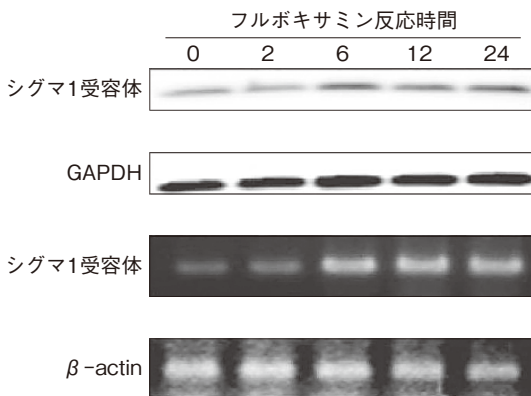


図5 フルボキサミンによるシグマ1受容体発現誘導
フルボキサミンはシグマ1受容体を蛋白レベル(上段)および転写レベル(下段)で経時的に発現誘導することが示された。GAPDHは蛋白解析の内部標準, beta-actinはmRNAの内部標準。

レスによるシグマ1受容体発現について検討した。これら多型をもったプロモーターでは野生型に比し, シグマ1受容体の発現が低く, ERストレスによるシグマ1受容体発現という生理的な反応が抑制されていることが, これらの精神疾患の病態に関与していることが示唆されている(図4)¹⁴⁾。

IV. フルボキサミンによるシグマ1受容体発現誘導

選択的セロトニン再取り込み阻害薬(selective serotonin reuptake inhibitor: SSRI)であるフルボキサミンはシグマ1受容体に親和性がきわめて高いといわれている。そこで, 我々が観察したシグマ1受容体の発現誘導とフルボキサミンの関連について検討した。驚いたことに, フルボキサミン自体がシグマ1受容体を発現誘導することが示された(図5)。

このフルボキサミンによるシグマ1受容体発現誘導の機序はいかなるものであろうか? 前述したようにERストレス下ではATF4によってシグマ1受容体が発現誘導を受ける。そこでATF4ノックダウン細胞にてフルボキサミンの効果を検討したところ, シグマ1受容体発現誘導がキャンセルされることが示された。一方, ATF4の直上に位置するeIF2αのリン酸化について検討したところ(図1参照), フルボキサミン投与によって

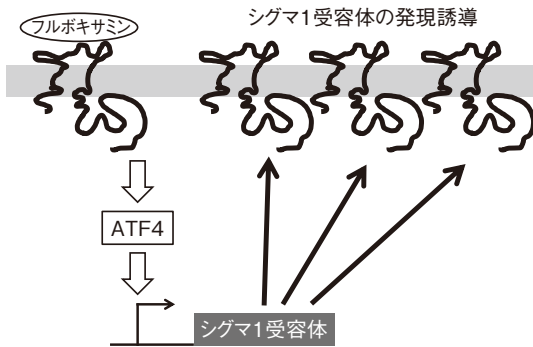


図6 フルボキサミンによるシグマ1受容体発現誘導
フルボキサミンはシグマ1受容体に結合し、それによってATF4を誘導する。誘導されたATF4はシグマ1受容体プロモーターに作用して発現誘導を起こす。

リン酸化のレベルは変化しないことも示された。これらを総合すると、フルボキサミンは直接ATF4を誘導し、シグマ1受容体の発現誘導につながることを示唆された(図1)。このフルボキサミンによるATF4誘導の機序は詳細不明であるが、シグマ1受容体のノックアウトMEF細胞(マウス胎児線維芽細胞)やシグマ1受容体の特異的阻害薬であるNE-100を共存させておくと、ATF4誘導が観察されなくなることから、親和性の強いフルボキサミンはシグマ1受容体を介してATF4を誘導し、このATF4がさらにシグマ1受容体を発現誘導する機序が示唆される(図6)¹⁷⁾。

V. フルボキサミンの抗ERストレス効果

前述したように、シグマ1受容体の発現は抗ERストレス効果をもたらすため、フルボキサミンにも抗ERストレス効果が期待できる。実際、神経芽細胞腫にフルボキサミンを投与しておくともERストレスによる神経細胞死を軽減できることが示された。さらに、マウスの中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルを用いてフルボキサミンの抗ERストレス効果について検討した。脳梗塞巣のペネンブラ領域ではERストレスが起き、梗塞巣の拡大につながるとされているが、フルボキサミンの腹腔内投与により、閉塞24時間後の梗塞巣が減少していた(図7)¹⁷⁾。

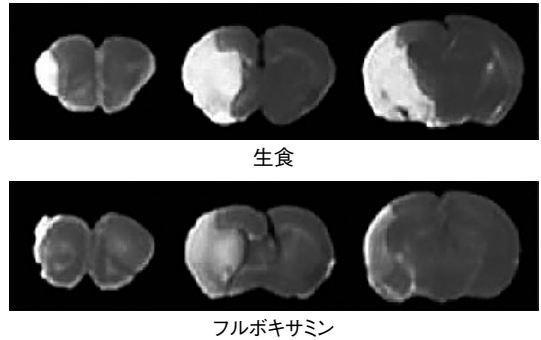


図7 中大脳動脈閉塞による脳梗塞巣
一侧の中大脳動脈を栓子で閉塞し、24時間後に脳切片をTTC染色した(白色部が脳梗塞巣)。フルボキサミン投与群では生食投与群に比し、梗塞巣の減少が観察される。

おわりに

蛋白質品質管理機構であるUPRにおけるシグマ1受容体の関与を中心に述べた。今回紹介したシグマ1受容体の発現誘導は一種のUPRと捉えられる。統合失調症などで報告があるシグマ1受容体プロモーターの遺伝子多型はこの生理的ともいべきUPRの発現を減弱させ何らかの病態過程に関与していることが示唆された。

さらにフルボキサミンがシグマ1受容体を発現誘導することが示され、従来のSSRIとは違う機序での、抗ERストレス効果、すなわち蛋白質品質管理効果が期待されることを報告した。フルボキサミンは十数年臨床現場で使われてきた薬であり、安価で安全な新しい治療薬となる可能性がある。

なお、本論文に関連して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., et al: Dynamic interaction of GRP78/BiP and the ER stress transducers in the unfolded protein response. *Nat Cell Biol*, 2; 326-332, 2000
- 2) Cahill, M. A.: Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 105; 16-36, 2007
- 3) Harada, Y., Hara, H., Sukamoto, T.: Receptor

binding profiles of KB-5492, a novel anti-ulcer agent, at sigma receptors in guinea-pig brain. *Eur J Pharmacol*, 256 ; 321-328, 1994

4) Hayashi, T., Maurice, T., Su, T. P. : Ca^{2+} signaling via sigma 1-receptors : novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca^{2+} concentration. *J Pharmacol Exp Ther*, 293 ; 788-798, 2000

5) Hayashi, T., Su, T. P. : Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma 1 binding sites) in NG108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 306 ; 726-733, 2003

6) Hayashi, T., Su, T. P. : Sigma-1 receptor ligands : potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs*, 18 ; 269-284, 2004

7) Hayashi, T., Su, T. P. : Cholesterol at the endoplasmic reticulum : roles of the sigma-1 receptor chaperone and implications thereof in human diseases. *Subcell Biochem*, 51 ; 381-398, 2010

8) Hayashi, T., Tsai, S. Y., Mori, T., et al : Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin Ther Targets*, 15 ; 557-577, 2011

9) Hellewell, S. B., Bruce, A., Feinstein, G., et al : Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors : characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur J Pharmacol*, 268 ; 9-18, 1994

10) Ishiguro, H., Ohtsuki, T., Toru, M., et al : Association between polymorphisms in the type 1 sigma receptor gene and schizophrenia. *Neurosci Lett*, 257 ; 45-48, 1998

11) 工藤 喬 : 小胞体ストレスと精神神経疾患. *精神経誌*, 114 ; 115-123, 2012

12) Losel, R. M., Besong, D., Peluso, J. J., et al : Progesterone receptor membrane component 1-many tasks for a versatile protein. *Steroids*, 73 ; 929-934, 2008

13) Maurice, T., Su, T. P. : The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther*, 124 ; 195-206, 2009

14) Mitsuda, T., Omi, T., Tanimukai, H., et al : Sigma-

1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 415 ; 519-525, 2011

15) Miyatake, R., Furukawa, A., Matsushita, S., et al : Functional polymorphisms in the sigma1 receptor gene associated with alcoholism. *Biol Psychiatry*, 55 ; 85-90, 2004

16) Novakova, M., Ela, C., Barg, J., et al : Inotropic action of sigma receptor ligands in isolated cardiac myocytes from adult rats. *Eur J Pharmacol*, 286 ; 19-30, 1995

17) Omi, T., Tanimukai, H., Kanayama, D., et al : Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor. *Cell Death Dis*, 5 ; e1332, 2014

18) Rohe, H. J., Ahmed, I. S., Twist, K. E., et al : PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1) : a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol Ther*, 121 ; 14-19, 2009

19) Shen, J., Snapp, E. L., Lippincott-Schwartz, J., et al : Stable binding of ATF6 to BiP in endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol*, 25 ; 921-932, 2005

20) Su, T. P., Hayashi, T. : Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors : towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction. *Curr Med Chem*, 10 ; 2073-2080, 2003

21) Su, T. P., Hayashi, T., Maurice, T., et al : The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol Sci*, 31 ; 557-566, 2010

22) Tsai, S. Y., Hayashi, T., Mori, T., et al : Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 9 ; 184-189, 2009

23) Wolfe Jr., S. A., Culp, S. G., De Souza, E. B. : Sigma-receptors in endocrine organs : identification, characterization, and autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, testis, and ovary. *Endocrinology*, 124 ; 1160-1172, 1989

24) Xu, J., Zeng, C., Chu, W., et al : Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nat Commun*, 2 ; 380, 2011

Protein Quality Control and Psychiatric Disorder
—Involvement of Sigma-1 Receptor—

Takashi KUDO

Osaka University Health Care Center

The protein quality control mechanism in the endoplasmic reticulum is referred to as the unfolded protein response (UPR), and its failure may be involved in the onset of some psychiatric disorders. We showed that induction of the sigma-1 receptor plays a role in the UPR, and suggested the possibility that this mechanism is impaired in disorders such as schizophrenia. We also demonstrated that fluvoxamine induces expression of the sigma-1 receptor. Therefore, it has the potential to be developed as a drug which exerts an anti-ER-stress effect, i. e., protein quality control effect.

<Author's abstract>

<**Keywords** : sigma-1 receptor, endoplasmic reticulum (ER) stress, fluvoxamine, unfolded protein response (UPR), cerebral infarction >
