

Sigma-1 受容体の生理機能と筋萎縮性側索硬化症との関連

福永 浩司, 篠田 康晴

1. はじめに

Sigma-1 受容体 (Sig-1R) は (+)-SKF-10,047 と呼ばれる化合物の標的分子として同定され¹⁾, 一部のオピオイドや覚せい剤の結合分子でもあることからオピオイド受容体の一つと考えられていた。しかし, 一般的な麻薬拮抗薬であるナロキソンで阻害されないことから, 薬理学的特性によりオーファン受容体に分類されるユニークなタンパク質である²⁾。1990年代後半より, ヒトをはじめとした哺乳動物の Sig-1R 遺伝子が同定・クローニングされた³⁻⁵⁾。近年の研究により, Sig-1R がシャペロンタンパク質としてさまざまなタンパク質に結合し, その機能や発現を調節することが明らかとなってきた。一方で, オピオイドのみならずプロゲステロンなどの性ホルモン, 一部の抗うつ薬や抗精神病薬などが Sig-1R に結合すること, ミトコンドリアのカルシウム濃度調節に関わる IP₃R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) などのタンパク質を安定化するシャペロン活性を示すことから, その生理・薬理的機能が注目されている。さらに, アルツハイマー病や統合失調症などの中枢疾患と相関を示す Sig-1R の遺伝子多型が存在すること, 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) のある家系において Sig-1R の遺伝子変異が報告されたことから, これらの疾患における Sig-1R の病理学的役割が注目されている。本稿では, Sig-1R の持つシャペロンタンパク質としての機能や ALS との関連について紹介する。

2. Sig-1R のシャペロンタンパク質としての機能

Sig-1R は 223 アミノ酸からなる 2 回膜貫通型タンパク質であり, 全身で発現している (図 1A)^{3, 5, 6)}。細胞内では小胞体膜に局在するが, 小胞体の中でもとりわけミトコンド

リアに接する MAM (mitochondria-associated ER membrane) に豊富に存在している⁶⁾。MAM は小胞体とミトコンドリアの近接した領域で, mitofusin 1/mitofusin 2 複合体や VAPB (vesicle-associated membrane protein-associated protein B)-PTPIP51 (protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51) 複合体などが局在している^{7, 8)}。MAM において Sig-1R は IP₃R, BiP (binding immunoglobulin protein), IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)-GTPase, VDAC2 (voltage-dependent anion channel 2) などの機能分子に結合し, これら分子に対しシャペロン活性を示す⁹⁾。BiP 自身もシャペロン分子として機能するが, 生理的条件下では Sig-1R は BiP と会合している。細胞内 Ca²⁺ が低下したり, 細胞をコカイン, (+)ペンタゾシンなど Sig-1R アゴニストで刺激したりすると, Sig-1R は BiP と解離して, IP₃R など他の分子のシャペロン機能を発現する⁹⁾。IRE1 は小胞体ストレスセンサーとして機能することが知られているが, Sig-1R は IRE1 に結合しシャペロン活性を介し IRE1 を安定化し, 下流の XBP1 (X-box binding protein 1) の転写を促進し, 小胞体ストレスから細胞障害へのプロセスを抑制する¹⁰⁾。Sig-1R は Rac1-GTPase 活性を介して神経突起伸張やスパイン形成に関与する Rac1 に対してもシャペロン活性を示す。さらに, Sig-1R の刺激は Rac1 を介して細胞に適度な酸化ストレスを誘導することで細胞死に対して抑制的に働くことが示された¹¹⁾。Sig-1R アゴニストは種々の神経芽腫細胞において, 神経突起伸張を促進する。これらの神経突起伸張作用にも Rac1-GTPase 活性が関与すると考えられる。VDAC はミトコンドリア外膜に存在し, ミトコンドリア Ca²⁺ 輸送を担うと考えられているが, Marriott らは¹²⁾, Sig-1R と VDAC2 が共役して, ミトコンドリアへのコレステロール輸送を促進することを示した。このように MAM において Sig-1R は, 小胞体-ミトコンドリア間の Ca²⁺ 輸送やエネルギー産生, 脂質輸送など多彩な生理機能を調節していると考えられている^{6, 9-12)}。

ところで我々は C 末端領域のシャペロンドメインを欠く Sig-1R のスプライシングバリエント Sig-1R short isoform (Sig-1SR) を見いだした (図 1)¹³⁾。この Sig-1SR はシャペロンドメインを欠くため IP₃R と相互作用できないと考えられる。他の MAM や形質膜における分子に対しても同様に結合せず, したがって, シャペロン活性を示さないと

東北大学大学院薬学研究科薬理学分野 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

Pathophysiological role of sigma-1 receptor in Amyotrophic lateral sclerosis

Kohji Fukunaga and Yasuharu Shinoda (Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aramaki-Aoba Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890106

© 2017 公益社団法人日本生化学会

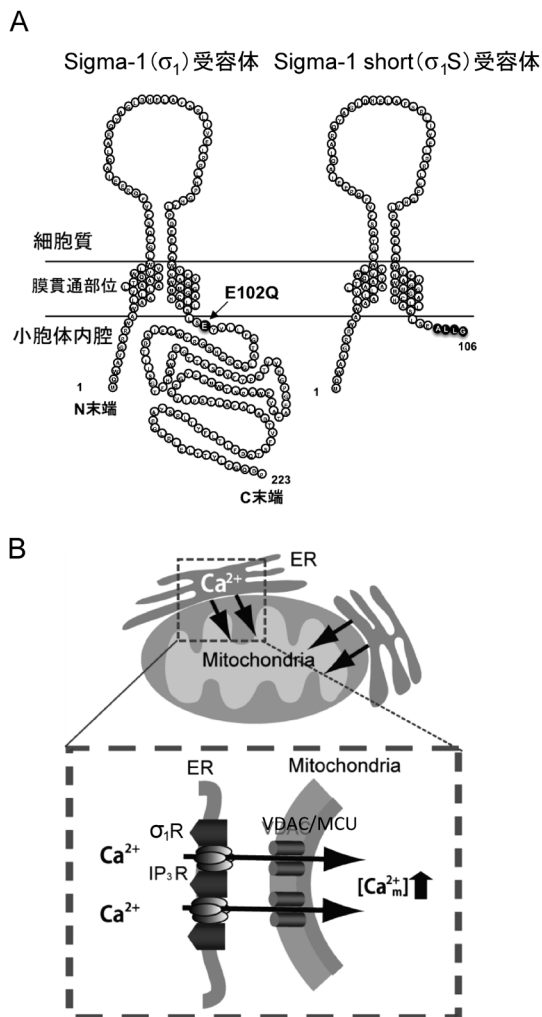


図1 Sig-1R および Sig-1SR の構造および IP₃ 受容体機能調節
(A) Sig-1R (σ_1 R) は、N 末端および C 末端を小胞体内腔に向けた形で小胞体膜に局在する⁶⁾。Sig-1R のスプライシングバリエントの Sig-1SR (σ_1 SR) をマウス脳ライブラリーから見いだした¹³⁾。フレームシフトに伴い終止コドンが生じるため、C 末端領域のシャペロン機能ドメインが欠失している。また矢印は、若年性 ALS 家系において見いだされた遺伝子変異に伴い生じるアミノ酸置換を表す¹⁵⁾。(B) Sig-1R は、小胞体とミトコンドリアが近接する MAM において、IP₃R を介した Ca²⁺ 輸送を調節する。ミトコンドリア膜に発現する VDAC あるいは MCU (mitochondrial calcium uniporter) は IP₃R と共役するミトコンドリア側の Ca²⁺ チャンネルの候補である。(図は文献 13 より改変)

考えられる。Sig-1R は MAM において IP₃R と複合体を形成して、ミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進する。一方、シャペロンドメインを欠く Sig-1SR はマウス終脳に広く発現するが、その生理機能は不明であった。Sig-1SR を神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞に過剰発現させると、Sig-1R 同様に長く伸びた伸展型ミトコンドリアの割合が増加し、小胞体-ミトコンドリア接合部の面積も上昇する (図 2)¹³⁾。したがって、Sig-1SR も Sig-1R と同様に MAM に存在し何らかの機能を持つと考えられた。CHO 細胞では、Sig-1R が

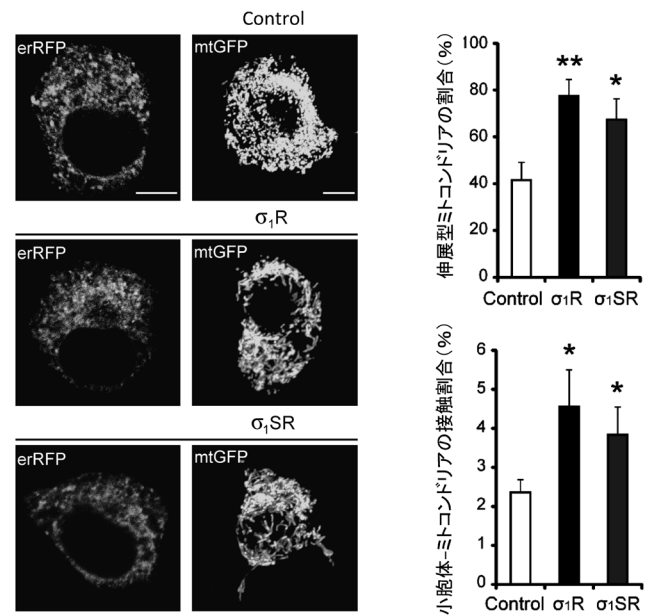


図2 Neuro2a 細胞の小胞体およびミトコンドリア形態に対する Sig-1R 発現および Sig-1SR 発現の影響
Sig-1R (σ_1 R) および Sig-1SR (σ_1 SR) をそれぞれ Neuro2a 細胞に発現させた。小胞体およびミトコンドリアをそれぞれ erRFP および mtGFP で標識した。発現させていない細胞と比較して、Sig-1R および Sig-1SR を発現させた細胞では、伸展型ミトコンドリアの割合が有意に上昇する。また MAM で表現される小胞体とミトコンドリアの接触割合も増加する。(図は文献 13 より改変)

MAM において IP₃R タイプ 3 (IP₃ 受容体の一つの型) と複合体を形成し、IP₃R を活性化することによりミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送に促進的に作用すること¹⁴⁾、Sig-1R 活性化剤がこの作用を増強することが示されている⁶⁾。そこで我々は Neuro2a 細胞に Sig-1R と Sig-1SR を過剰発現させて、ATP 受容体刺激によるミトコンドリアへの Ca²⁺ 流入を測定したところ、コントロール細胞に比べて Sig-1R 発現細胞では Ca²⁺ 流入量が上昇し、Sig-1SR 発現細胞では逆に低下した (図 3)。また、ATP 産生量についても Sig-1R と Sig-1SR の違いが観察された。無刺激の Sig-1R 発現細胞、Sig-1SR 発現細胞はともに ATP 産生量が上昇する。ところが、ツニカマイシン処理により小胞体ストレスを誘導すると Sig-1SR 発現細胞では Sig-1R 発現細胞と比較して顕著に ATP 産生量が低下した。その結果、Sig-1SR 発現では神経細胞死が増悪していることがわかった (図 3)¹³⁾。Sig-1SR は中枢神経系に発現が認められるが、脳虚血侵襲など神経細胞死が見られる状況でも発現変動は観察されていない。Sig-1SR の病態での役割は不明であるが、小胞体ストレスのない状況では Sig-1SR を強制発現すると ATP 産生を亢進させる (図 3B)。実際に、Neuro2a 細胞に発現させると、Sig-1R と同様に神経突起伸展作用がみられることから、非ストレス下では Sig-1SR 過剰発現は細胞を障害せ

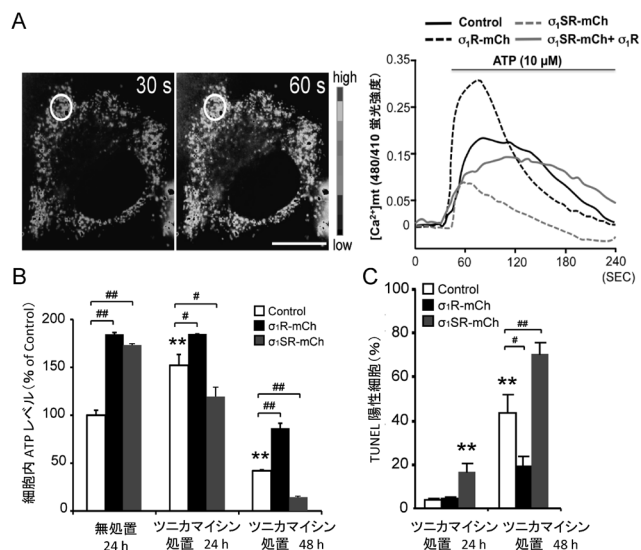


図3 Sig-1RおよびSig-1SRの発現がミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送に与える影響の検討

(A) Neuro2a細胞にミトコンドリア移行型Pericam- Ca^{2+} インジケータを発現させ、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を測定した。ATP刺激はGqタンパク質共役型受容体を介し、IP₃Rを活性化¹³⁾。無処置細胞(Control)に比較して、Sig-1R(σ_1R -mCherry)発現細胞ではミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入が促進され、Sig-1SR(σ_1SR -mCherry)発現細胞では抑制される。(B) Neuro2a細胞に σ_1R -mCherryあるいは σ_1SR -mCherryを発現して24時間後、ツニカマイシン処置(2 $\mu g/mL$)群では24, 48時間後に細胞内ATP量を測定した。 $^{**}P<0.01$ vs. 無処置群, $^{\#}P<0.05$, $^{###}P<0.01$ vs. Control。(C) Neuro2a細胞に σ_1R -mCherryあるいは σ_1SR -mCherryを発現して24時間後、ツニカマイシン処置(2 $\mu g/mL$)群では24, 48時間後にTUNEL陽性細胞数を測定して、神経細胞死を評価した。 $^{**}P<0.01$ vs. 無処置群, $^{\#}P<0.05$, $^{###}P<0.01$ vs. Control。(図はすべて文献13より改変)

ず、ATP産生を介し、何らかの機能を発揮しているものと考えられる¹³⁾。

3. 筋萎縮性側索硬化症に関連した遺伝子変異がSig-1Rの機能に与える影響

2011年、サウジアラビアの若年性筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の家系において、Sig-1Rをコードする遺伝子、*SIGMAR1*遺伝子に点突然変異が同定された¹⁵⁾。この変異により、102番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からグルタミン(E102Q)へと置換される(図1)。また、Sig-1Rの結晶構造解析から、この102番目のグルタミン酸は2回目の膜貫通領域とC末端シャペロンドメインの間に位置することや、近接する36番目のバリンや37番目のフェニルアラニンと水素結合を形成することがわかっている¹⁶⁾。同報告では、E102Q変異によりこれらの水素結合が失われ、Sig-1Rの構造安定性が失われる可能性が示された。

我々はさらに、ALSに関連したこのE102Q変異がSig-

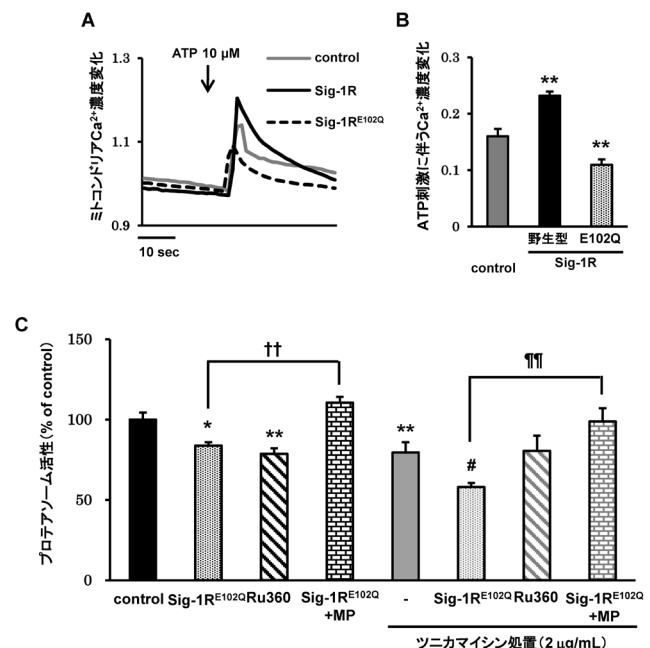


図4 Sig-1R^{E102Q}変異体の発現がミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送やプロテアソーム活性に与える影響

(A) Neuro2a細胞にミトコンドリア移行型Pericam- Ca^{2+} インジケータを発現させ、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を測定した。コントロール細胞に比べて、Sig-1R発現細胞ではATP刺激に伴うミトコンドリア Ca^{2+} 流入が上昇し、Sig-1R^{E102Q}発現細胞では低下した。(B) ATP刺激に伴う Ca^{2+} レベルの変化量を測定した。(C) 蛍光性基質のSuc-LLVY-AMCを用いてプロテアソーム活性を測定し、対照群に対する相対値で示した(励起/蛍光波長=355nm/460nm)。 $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs. control, $^{\#}P<0.05$ vs. ツニカマイシン処置細胞, $^{++}P<0.01$, $^{***}P<0.01$ 。(図は文献17より改変)

1Rの機能にどのように影響するのか検討した¹⁷⁾。まず、Sig-1R^{E102Q}変異体は野生型と異なりIP₃Rと結合性を示さず、また、野生型と異なり細胞内に凝集体を形成することがわかった¹⁷⁾。そこで、IP₃Rを介したミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を図3で示した同様のイメージング法により検討した(図4A, B)。その結果、野生型Sig-1Rの発現はミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を増加させた一方、Sig-1R^{E102Q}の発現は Ca^{2+} 輸送を低下させた。ミトコンドリア内の Ca^{2+} はクエン酸回路のいくつかの反応に関わる酵素活性に必要であり¹⁸⁾、クエン酸回路の下流の電子伝達系やエネルギー(ATP)産生に重要である。そこで、細胞のATP含量について検討したところ、Sig-1R^{E102Q}の発現はATP含量を有意に低下させることが明らかとなった¹⁷⁾。Sig-1R^{E102Q}はIP₃Rと解離する結果、ミトコンドリアへのカルシウム供給が低下し、ATP産生が低下したと考えられる。一方、凝集体を形成するメカニズムは不明である。

ATPは細胞内エネルギーとしてタンパク質の酵素活性や翻訳後修飾、さらには細胞内輸送等、細胞内の多彩な反応

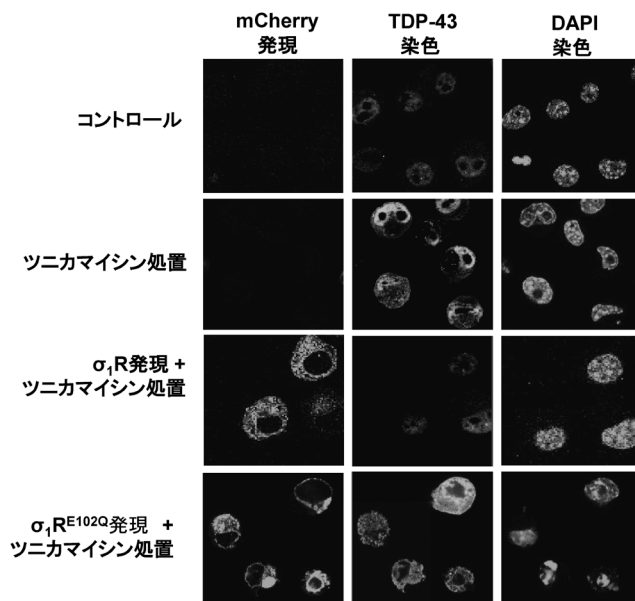


図5 Sig-1R^{E102Q}発現によるTDP-43の核外漏出
Neuro2a細胞をツニカマイシン処置（2μg/mL）で処理すると、核内に発現するTDP-43が一部細胞質に漏出する。σ₁R-mCherryを発現するとTDP43の核外漏出は完全に抑制される。一方、σ₁R^{E102Q}-mCherry発現細胞ではTDP43核外漏出が増強され、核形態も異常になる。（図は文献17より改変）

に必須である。我々はATP低下で障害されるユビキチン-プロテアソーム経路に着目した。この経路は、ALSを含むさまざまな神経変性疾患の病理学的特徴である細胞内の異常な凝集体（封入体）形成に関わる^{19,20}。Sig-1R^{E102Q}変異体を発現させると、ATP濃度低下に伴って、プロテアソーム活性が有意に低下した（図4C）。ミトコンドリア内膜でのCa²⁺取り込みを担うミトコンドリアカルシウム単一輸送体（MCU）の阻害薬であるRu360で処置すると、同様にプロテアソーム活性が低下した（図4C）。逆に細胞膜透過性が高く、クエン酸回路の基質であるメチルピルビン酸（MP）処置は、Sig-1R^{E102Q}発現細胞において、ATP産生を改善して、プロテアソーム活性の低下を抑制した（図4C）。さらに、ALS病態で亢進することが知られている小胞体ストレスをツニカマイシン処置により誘導した結果、非発現細胞のプロテアソーム活性は有意に低下し、Sig-1R^{E102Q}発現細胞では活性低下がさらに顕著であった（図4C）。以上の結果から、Sig-1R^{E102Q}の発現は、ミトコンドリアへのCa²⁺輸送を低下させ、ATP産生の低下とそれに起因するプロテアソーム活性の低下を引き起こすことが明らかとなった。

次に、RNAのスプライシングやmRNAの安定性などを調節するDNA結合する機能を有し、ALS患者において多くの遺伝子変異が見いだされている^{21,22}。TDP-43タンパク質の細胞内局在を検討した。TDP-43は正常な状態では

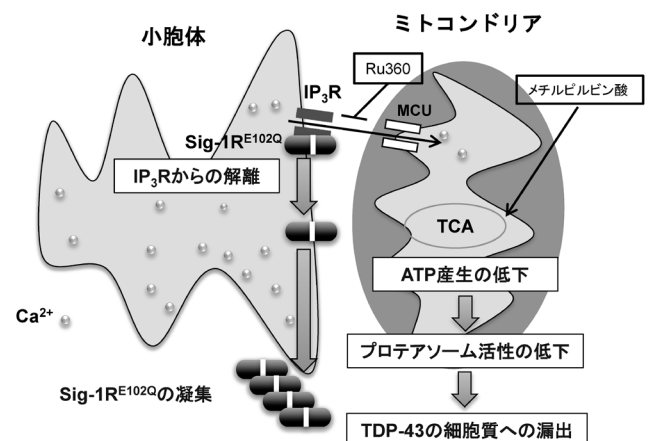


図6 Sig-1R^{E102Q}が神経細胞障害を引き起こすメカニズム
Sig-1R^{E102Q}は、IP₃Rとの結合活性を失い、小胞体膜からも解離する。その結果IP₃Rに対するシャペロン機能が低下し、ミトコンドリアへのCa²⁺輸送が障害され、エネルギー（ATP）産生低下が起こる。ATPの低下はプロテアソーム活性の低下を引き起こし、TDP-43の細胞質への漏出を引き起こすと考えられる。ミトコンドリアへのCa²⁺輸送を担うMCUの阻害薬Ru360処置でも同様のATP産生とTDP-43漏出が起こるので、Ca²⁺輸送低下が引き金になると考えられる。しかし、TDP43核外漏出のメカニズムは不明である。（図は文献17より改変）

主に核内に局在する一方で、ほぼすべてのALS患者の脊髄運動神経細胞において細胞質に異常なTDP-43の凝集体がみられることが報告されている²³。その結果、野生型Sig-1Rで得られた結果とは異なり、Sig-1R^{E102Q}変異体をNeuro2A細胞に発現させると内在性TDP-43が核から細胞質への漏出を引き起こすことが明らかになった（図5）。細胞質におけるTDP-43のクリアランスには、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー系が関与しているため²⁴、Sig-1R^{E102Q}変異体の発現は、ATP産生の低下に起因するユビキチン-プロテアソーム系の活性低下を介し、TDP-43が細胞質に蓄積するものと考えられる。以上の結果を図6にまとめた。Sig-1R^{E102Q}は、凝集体を形成しIP₃Rと解離することで、ミトコンドリアへのCa²⁺輸送障害を引き起こす。これにより、ミトコンドリアでのATP産生やプロテアソーム活性の低下が引き起こされ、TDP-43の細胞質への漏出が生じることで細胞毒性が引き起こされると考えられる。今後は、変異を導入したSig-1Rのノックインマウスなどを樹立して、Sig-1R^{E102Q}により引き起こされるALS発症のメカニズムをより詳細に解析する必要がある。

4. おわりに

ALSは、いったん発症すると劇的に症状が進行する疾患の一つで、現在根本的な治療薬は存在しない。昨年、これ

まで脳梗塞の治療薬として用いられてきたエダラボンが、適用を広げALS患者への処方についても認可された。エダラボンは活性酸素を取り除く薬剤で、ALSの代表的な病態メカニズムとして知られる酸化ストレスの亢進に対して有効であることが期待される。また、Sig-1R自体もALSの創薬ターゲットとして着目されており、ALSモデルマウスやモデル細胞においてSig-1Rアゴニストは病態を改善することが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。今後、神経変性疾患においてSig-1Rを標的にした治療薬が期待できる。

文 献

- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., & Gilbert, P.E. (1976) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **197**, 517-532.
- Tam, S.W. & Cook, L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5618-5621.
- Hanner, M., Moebius, F.F., Flandorfer, A., Knaus, H.G., Striessnig, J., Kempner, E., & Glossmann, H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8072-8077.
- Prasad, P.D., Li, H.W., Fei, Y.J., Ganapathy, M.E., Fujita, T., Plumley, L.H., Yang-Feng, T.L., Leibach, F.H., & Ganapathy, V. (1998) *J. Neurochem.*, **70**, 443-451.
- Mei, J. & Pasternak, G.W. (2001) *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 349-355.
- Hayashi, T. & Su, T.P. (2007) *Cell*, **131**, 596-610.
- de Brito, O.M. & Scorrano, L. (2008) *Nature*, **456**, 605-610.
- De Vos, K.J., Mórotz, G.M., Stoica, R., Tudor, E.L., Lau, K.F., Ackerley, S., Warley, A., Shaw, C.E., & Miller, C.C. (2012) *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 1299-1311.
- Su, T.-P., Su, T.-C., Nakamura, Y., & Tsai, S.-Y. (2016) *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 262-278.
- Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, R., & Su, T.-P. (2013) *PLoS ONE*, **8**, e76941.
- Natsvlishvili, N., Gogvadze, N., Zhuravliova, E., & Mikeladze, D. (2015) *BMC Biochem.*, **16**, 11.
- Marriott, K.-S.C., Prasad, M., Thapliyal, V., & Bose, H.S. (2012) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **343**, 578-586.
- Shioda, N., Ishikawa, K., Tagashira, H., Ishizuka, T., Yawo, H., & Fukunaga, K. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 23318-23331.
- Mendes, C.C., Gomes, D.A., Thompson, M., Souto, N.C., Goes, T.S., Goes, A.M., Rodrigues, M.A., Gomez, M.V., Nathanson, M.H., & Leite, M.F. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40892-40900.
- Al-Saif, A., Al-Mohanna, F., & Bohlega, S. (2011) *Ann. Neurol.*, **70**, 913-919.
- Schmidt, H.R., Zheng, S., Gurbinar, E., Koehl, A., Manglik, A., & Kruse, A.C. (2016) *Nature*, **532**, 527-530.
- Tagashira, H., Shinoda, Y., Shioda, N., & Fukunaga, K. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3320-3334.
- Glancy, B. & Balaban, R.S. (2012) *Biochemistry*, **51**, 2959-2973.
- Taylor, J.P., Hardy, J., & Fischbeck, K.H. (2002) *Science*, **296**, 1991-1995.
- Blokhuys, A.M., Groen, E.J., Koppers, M., van den Berg, L.H., & Pasterkamp, R.J. (2013) *Acta Neuropathol.*, **125**, 777-794.
- Lee, E.B., Lee, V.M., & Trojanowski, J.Q. (2011) *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 38-50.
- Renton, A.E., Chiò, A., & Traynor, B.J. (2014) *Nat. Neurosci.*, **17**, 17-23.
- Ling, S.C., Polymenidou, M., & Cleveland, D.W. (2013) *Neuron*, **79**, 416-438.
- Scotter, E.L., Vance, C., Nishimura, A.L., Lee, Y.B., Chen, H.J., Urwin, H., Sardone, V., Mitchell, J.C., Rogelj, B., Rubinsztein, D.C., & Shaw, C.E. (2014) *J. Cell Sci.*, **127**, 1263-1278.
- Fukunaga, K., Shinoda, Y., & Tagashira, H. (2015) *J. Pharmacol. Sci.*, **127**, 36-41.
- Mancuso, R., Oliván, S., Rando, A., Casas, C., Osta, R., & Navarro, X. (2012) *Neurotherapeutics*, **9**, 814-826.
- Prause, J., Goswami, A., Katona, I., Roos, A., Schnitzler, M., Bushuven, E., Dreier, A., Buchkremer, S., Johann, S., Beyer, C., Deschauer, M., Troost, D., & Weis, J. (2013) *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 1581-1600.

著者寸描

●福永 浩司 (ふくなが こうじ)



東北大学大学院薬学研究科教授。医学博士。

■略歴 1955年鹿児島県に生る。80年熊本大学大学院薬学研究科修了。85年医学博士取得。88年米国バンダービルト大学ハワード・ヒューズ研究所博士研究員。90年熊本大学医学部講師。93年同助教授。2002年より現職。放送大学、浙江大学、蘇州大学客員教授。

■研究テーマと抱負 専門は神経薬理学で、アルツハイマー病・レビー小体病などの神経変性疾患の治療薬開発、精神遅滞・自閉症などの児童精神疾患のシナプス病態を研究しています。脳可塑性をターゲットにした創薬が目標です。

■ウェブサイト http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakuri/yakuri_top.html

■趣味 キャンプ、秘湯巡り。