

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09315

研究課題名(和文) ドパミン存在下における シヌクレインの酸化修飾と細胞内安定性、細胞間伝播

研究課題名(英文) Association of between oxidative modification of alpha-synuclein under dopamine metabolism and intracellular stability or propagation

研究代表者

中曾 一裕 (NAKASO, Kazuhiro)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：30379648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： $\alpha$ -synuclein (syn) のドパミン存在下における酸化修飾と細胞内安定性・細胞間伝播の関係を検討した。ドパミン存在下で syn は127番メチオニン残基が酸化修飾されており、主にオートファジー/リソソーム系で分解されていた。syn の細胞外放出はエクソソームを介したものと、介していないもの両者が関与していたが、いずれの分泌においても、ドパミン代謝が存在している状態の方が、syn は積極的に放出されていた。127番メチオニン残基が酸化修飾された syn を特異的に認識する抗体を作成し、ドパミン存在下では syn の127番メチオニン残基が酸化修飾されていることを直接的に証明した。

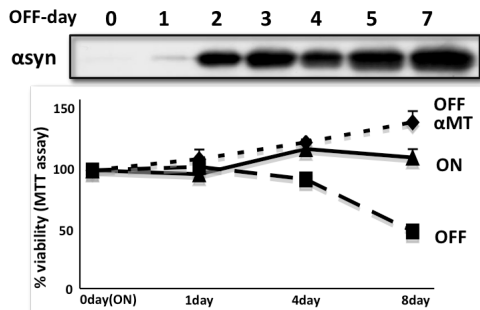
研究成果の概要(英文)：The association between oxidative modification of  $\alpha$ -synuclein under dopamine metabolism and intracellular stability or propagation of  $\alpha$ -synuclein was investigated.  $\alpha$ -Synuclein was oxidatively modified at 127th methionine residue under dopamine existing condition and was controlled its stability by autophagy/lysosome system. Secretion of  $\alpha$ -synuclein was dependent not only on exosome release but also on non-exosomal release. Secretion of  $\alpha$ -synuclein was enhanced under dopamine metabolism. In order to detect oxidative modification of  $\alpha$ -synuclein at 127th methionine residue, specific antibody against  $\alpha$ -synuclein including methionine sulfoxide was raised. Using this antibody oxidative modification of  $\alpha$ -synuclein was successfully detected.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 synuclein 細胞間伝播 酸化修飾

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)の分子病態における最重要関連分子のひとつである シヌクレイン (syn)はドパミン(DA)神経の細胞脆弱性に関わるだけでなく、Lewy 小体の主要構成成分として知られている。また近年、syn がプリオン様の細胞間伝播によりシヌクレインパチーの病変拡大に関係していることが注目されつつある。脳内には様々な神経細胞が存在するが、DA に代表されるカテコールアミン(CA)代謝に関わる神経細胞は様々な特殊性を持ち、syn との関連においても他の神経とは異なる挙動を示す。申請者は DA(CA)と PD 病態の関連を解析するために、syn 発現量と CA 代謝を同時にコントロール可能で、DA 存在下においてのみ syn 毒性を示すモデル細胞 PC12- syn-TetOFF 細胞を確立した(下図)。



Dox除去(OFF)で $\alpha$ synの発現量が徐々に増加し、細胞生存率が緩徐に低下する。 $\alpha$ MTによりカテコールアミン代謝を抑制すると $\alpha$ syn発現に伴う生存率低下が解除される(OFF- $\alpha$ MT)。

このモデル細胞(各種変異体細胞も含む)を用い、これまでに(1) syn の CA 代謝依存的細胞毒性、(2)CA 含有細胞における syn の 127 番メチオニン残基(127Met)の酸化修飾、(3)CA 含有細胞における syn 分解機構、(4)細胞内 syn の安定性と 127Met 酸化修飾の関係、などを継続的に研究している。さらに syn の研究においては、近年 Braak の仮説に端を発したプリオン様細胞間伝播に注目が集まっているが、申請者は CA 存在下における syn 酸化修飾は、syn 重合化・細胞毒性のトリガーとなるばかりでなく、細胞間伝播にも関与している可能性があると考えている。申請者のこれまでの初期検討では、syn の細胞外放出に対しては CA の影響は少なかったことから、細胞外からの侵入に関して CA の影響を検討する必要があると考えている。

これまでに述べた syn に関する DA(あるいは CA)存在下における細胞毒性、タンパク質安定性、細胞間伝播に Met 残基の酸化(スルホキシド化)が関与しているとすれば、それに対する防御、治療の手段も考慮されるべきである。生

体内にはメチオニンスルホキシド(Met(O))を還元する防御系として Met(O)還元酵素 A および B (MsrA, MsrB)が存在する。これらのことから MsrA, B の発現を促進することが syn の PD 関連毒性を軽減すると考えられ、有力な新規治療ターゲットの候補である。

## 2. 研究の目的

本研究の前半では、主 PC12- syn-TetOFF 細胞モデルにおいて、DA(CA)と syn の共存がどのようなメカニズムで細胞死や細胞内安定性、凝集体形成、さらに細胞間伝播に関わるのかを検討する。特に、申請者は DA の酸化産物キノン体が syn の C 末端付近の Met 残基を修飾し Met(O)が形成されることにより DA 神経特異的な脆弱性が惹起されることを報告しており、この現象をさらに詳細に検証する。

- (1) syn の特定の Met 残基がなぜ Met(O)となりやすいのか、周辺アミノ酸配列の影響を検討。
- (2) Met(O)修飾された syn が可溶性オリゴマーを形成し、細胞脆弱性をもたらすメカニズムの検討。
- (3) syn 細胞間伝播において、DA(CA)による Met 残基酸化修飾の関与の検討。
- (4) Met(O)は、生体内では Met(O)還元酵素により可逆的に還元される。すなわち、syn の Met(O)修飾は治療的介入の余地を残す翻訳後修飾であると言える。この点に注目し、DA 神経における syn 毒性を軽減するための治療法研究。
- (5) Met(O)修飾 syn を特異的に認識する抗体を作製し、生化学的検討に加えて、剖検脳を用いた病理学的検討(Lewy 小体の染色性など)。
- (6) 線虫モデル、マウスモデルを用いた個体レベルでのフェノタイプ解析、治療研究。

これらを明らかにし、将来的に病態理解や新規治療ターゲットとなるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

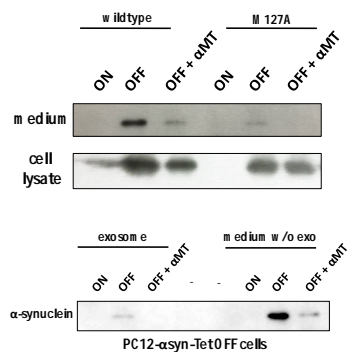
本研究は「DA 神経特異的な syn 修飾と細胞脆弱性・細胞間伝播と PD の病態」を明らかにすることであり、前半は細胞レベル研究、抗体作製、モデル動物の準備を中心に行った。特に、細胞レベルで(1) syn の Met(O)修飾詳細検討(細胞毒性、易凝集性、細胞間伝播との関連)、(2)防御系に関する検討(MsrA・B 活性化、競合ペプチド等による治療法開発の基礎研究)、(3)抗 Met(O) syn 抗体の作製、(4)モデル動物

(線虫, マウス) 準備と初期検討に重点を置く。後半は(5)モデル動物を用いた個体レベルでの詳細検討と, (6) Met(O) syn 抗体による生化学的・病理学的検討(剖検脳など)に重点を移す。その際に, syn 遺伝子改変とレセルピン投与による細胞内 DA 過剰状態, MsrA 欠失による Met(O)蓄積による毒性の誘発, を組み合わせることにより, 本課題の主要テーマ「DA 神経特異的な syn 修飾の病的意義」を検討する。

#### 4. 研究成果

syn発現量およびCA代謝を調節することが可能なPC12-TetOFF- syn細胞を用い, CA代謝と syn分解・安定性および細胞外分泌・細胞間伝播について検討を行った。synは本細胞モデルでは主にオートファジー/リソソーム系タンパク質分解により細胞内分解が行われていることを明らかにした。さらに, 細胞内発現量の他の要因である synの細胞外分泌についても検討した。synはCA代謝下では, 細胞外への放出が活発であった。分泌機構の検討として, エクソソームを介しての分泌および, 非エクソソーム性の分泌を検討した。その結果, 両分泌機構の関与が確認されたが, 量的には非エクソソーム性の分泌が多かった, これらの挙動には syn内の特定のメチオニンMet残基の酸化修飾が一部関係していた。synの細胞内への取り込みについては現在検討中である。

**カテコールアミンによるMet127の酸化修飾はα-synucleinの細胞外分泌に関係している**



形態学的な検討では synを成分の一部とする細胞内凝集体の構成成分としてMet(O)還元酵素(酸化修飾Met残基を還元することができる)も構成成分のひとつであることを明らかにした。さらに, 生化学的にCA存在下では synとMet(O)還元酵素と共局在していることを明らかにし, CA存在下における synの細胞内蓄積にMet酸化が関与している可能性が示唆された。synのCA代謝下における毒性および細胞内安定性・蓄積

を検討するために, 線虫モデルを用いた運動能, 病理形態学的検討を開始したが, 有用なsyn発現線虫を得ることができなかった。synの127番目のMet残基が酸化した synを特異的に認識する抗体を作成した。この抗体により, CA存在下においてMet(O)を含んだ synが増加していることを直接的に証明した。

#### 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 6 件)

1. Horikoshi Y, Kamizaki K, Hanaki T, Morimoto M, Kitagawa Y, Nakaso K, Kusumoto C, Matura T.  $\alpha$ -Tocopherol promotes HaCaT keratinocyte wound repair through the regulation of polarity proteins leading to the polarized cell migration. *Biofactores* 2018; 44: 180-191. (査読あり)

2. Nakaso K, Horikoshi Y, Takahashi T, Hanaki T, Nakasone M, Kitagawa Y, Koike T, Matura T. Estrogen receptor-mediated effect of  $\alpha$ -tocotrienol prevents neurotoxicity and motor deficit in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett* 2016; 610: 117-122. (査読あり)

3. Kim SH, Shahani N, Bae BI, Sbdio JI, Chung Y, Nakaso K, Paul BD, Sawa A. Allele-specific regulation of mutant Huntingtin by Wig1, a downstream target of p53. *Hum Mol Genet* 2016; 25: 2514-2524. (査読あり)

4. Takahashi T, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Yamakawa M, Nakasone M, Kitagawa Y, Koike T, Matura T. Rice Bran Dietary Supplementation Improves Neurological Symptoms and Loss of Purkinje Cells in Vitamin E-Deficient Mice. *Yonago Acta Medica* 2016; 59: 188-195. (査読あり)

5. Nakasone M, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Kitagawa Y, Takahashi T, Inagaki Y, Matura T. Preconditioning by Low Dose LPS Prevents Subsequent LPS-Induced Severe Liver Injury via Nrf2 Activation in Mice. *Yonago Acta Medica* 2016; 59: 223-231. (査読あり)

6. Hanaki T, Horikoshi Y, Nakaso K, Nakasone M, Kitagawa Y, Amisaki M, Arai Y, Tokuyasu N, Sakamoto T, Honjo S, Saito H, Ikeguchi M, Yamashita K, Ohno S, Matsura T. Nicotine enhances the malignant potential of human pancreatic cancer cells via activation of atypical protein kinase C. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1860: 2404-2415. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1. 中曽一裕, ほか. 抗酸化能だけではないビタミンEの効果 トコトリエノールのシグナル伝達を介した細胞保護機序 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017, 12. 16-19

2. Nakaso K, et al. Oxidative modification of synuclein by dopamine induces cellular vulnerability and secretion of synuclein. Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting 2018. 11 11-15. Washington DC

3. Nakaso K, et al. Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in synuclein causes cytotoxicity and accumulation of synuclein. XXIII World Congress of Neurology 2017. 2017.9.16-21. Kyoto

4. 中曽一裕, ほか. パーキンソン病関連分子 synucleinの酸化修飾は細胞脆弱性と細胞間の病原タンパク質伝播に関係している. 第70回日本酸化ストレス学会学術集会 2017. 6.28-29 つくば

5. 中曽一裕, ほか. パーキンソン病モデル細胞・動物に対するビタミンE同族体 トコトリエノールの効果. 第89回日本生化学会大会 2016.9.25-27 仙台

6. 高橋徹, 中曽一裕, ほか. 米糠成分による神経系保護効果およびマウス運動機能・短気記憶への効果第27回ビタミンE研究会 2016.1.8-9 高松

7. 中曽一裕, ほか. Oxidative modification of alpha synuclein and protective factor methionine sulfoxide reductase in molecular pathogenesis of Parkinson's disease BMB2015 2015.12.1-4 神戸

8. 中曽一裕, ほか. Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in alpha synuclein. 第56回日本神経学会学術大会 2015.5.20-23. 新潟

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://tottoritougoubunshi.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中曽 一裕 ( NAKASO, Kazuhiro )

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号:30379648

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし