

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09320

研究課題名(和文)p62のリン酸化による α -synucleinオートファジー分解制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of autophagic degradation of alpha-synuclein by p62-phosphorylation

研究代表者

渡邊 義久 (Watanabe, Yoshihisa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50363990

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)：オートファジーレセプターp62のリン酸化制御解析を行い、HSF1の阻害剤や遺伝子ノックアウトにより、HSF1がp62のリン酸化制御に関与することを明らかにした。そして、それに伴い細胞内に蓄積したユビキチン化タンパク質の封入体形成も減少した。Ser349のリン酸化にCK1が関与することを発見した。また、HSP90阻害剤もリン酸化を抑制したが、HSP90のノックダウン実験の結果、HSP90AA1とHSP90AB1はp62のリン酸化に関与していなかった。
-シヌクレイン凝集体に局在するp62のリン酸化状態を調べたところ、Ser349のリン酸化は認められたが、Ser403のリン酸化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We studied the regulation of phosphorylation of autophagy receptor p62. Phosphorylation of p62 at Ser349 and Ser403 was suppressed by inhibition or gene knockout of heat shock factor 1 (HSF1). And then, they decreased inclusion formation of ubiquitinated proteins. Moreover, we identified that casein kinase 1 phosphorylated Ser-349 by the phosphorylation screening assay. HSP90 inhibitors also suppressed phosphorylation of p62. However, knock down of HSP90AA1 and HSP90AB1 could not reproduce this suppression, suggesting that HSP90 inhibitors suppress its phosphorylation through an indirect mechanism. Next, we examined p62 phosphorylation in HEK293 cells or mice striatum transformed with α -synuclein fibrils. p62 colocalized to α -Synuclein inclusions was phosphorylated at Ser349 but not at Ser403.

研究分野：神経内科学

キーワード：p62 オートファジー HSF1 パーキンソン病 α -シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病などシヌクレインopathyの発症原因である α -Synuclein (α -Syn) はプロテアソーム、マクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーなどにより分解されるが、これらが障害を受けると α -Syn 凝集体の蓄積が起きる。しかし、 α -Syn 分解の詳細な機序は解明されておらず、これらを明らかにすることは新たな治療薬の開発に繋がる。

これまで研究代表はタンパク質恒常性維持 (プロテオスタシス) 機構の中でもマクロオートファジーに注目し、神経変性疾患発症機序に関する研究を行ってきた(Watanabe et al. J Cell Sci 2011)。マクロオートファジーによる α -Syn 凝集体の選択的分解にオートファジーアダプタータンパク質 p62 の結合が必要であることを明らかにしてきた(Watanabe et al. PlosONE 2012)。そして最近、 α -Syn 凝集体を培養細胞またはマウス脳内で形成させた時、レビー小体様凝集体にリン酸化 p62 (Ser349/351) が局在することや α -Syn の過剰発現だけでリン酸化 p62 が増加することも発見した。p62 のリン酸化は基質との親和性に影響することから(Ichimura et al. Mol Cell 2013, Matsumoto et al. Mol Cell 2011)、マクロオートファジーによる α -Syn 代謝は p62 のリン酸化によって制御されている可能性が示唆された。

そこで本研究課題では p62 のリン酸化に着目して、 α -Syn のマクロオートファジーによる分解制御の詳細な機序を解明したい。特に、p62 のリン酸化パスウェイおよびその加齢による影響を解析することで、加齢に伴った発症や病態進行の機序を明らかにできる。そして、この解析結果を基に、遺伝子治療でこの分解パスウェイを亢進することにより新たな治療法の開発を試みる。

2. 研究の目的

細胞内に変性タンパク質が蓄積すると熱ショック因子 (HSF) が活性化され、熱ショックタンパク質の発現誘導 (ストレス応答) が起きる (Morimoto, Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2011)。このことから、この p62 リン酸化パスウェイにストレス応答が関与している可能性を考え、HSF1 阻害剤による p62 リン酸化の抑制を調べたところ、HSF1 を介したストレス応答が p62 リン酸化へ関与する結果を得た。この結果を踏まえ、下記項目を明らかにする。

- ・ HSF1 による p62 リン酸化の調節機構の解析
- ・ α -Syn 凝集体のマクロオートファジー分解における p62 リン酸化の役割を解明する
- ・ 加齢と α -Syn 分解の減弱化 (Sirtuin による HSF1 調節と p62 リン酸化の関連性)

3. 研究の方法

① HSF1 による p62 リン酸化機構の解析

CRISPR/Cas9 を利用し HSF1 遺伝子をノックアウトした HeLa 細胞を作製した。そして、その細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理した後、ウエスタンブロットと免疫細胞化学により p62 の Ser-349 と Ser-403 のリン酸化を調べた。

② p62 リン酸化に関与するキナーゼの探索

HeLa 細胞を各種キナーゼ阻害剤と MG132 で処理した。その後、ウエスタンブロットで p62 のリン酸化を解析した。

③ α -シヌクレイン凝集体における p62 リン酸化動態

線維化した α -シヌクレインを HEK293 またはマウス脳 (線条体) へ導入し、細胞内で α -シヌクレイン凝集体を形成させた。その後、抗リン酸化 p62 抗体で免疫染色を行った。

④ HSP90 阻害剤による p62 リン酸化抑制の解析

HeLa 細胞を HSP90 阻害剤 (17-AAG, Geldanamycin) と MG132 で処理した。その後、細胞抽出液のウエスタンブロットを行い、p62 のリン酸化を解析した。

⑤ HSP90AA1 および AB1 ノックダウン細胞における p62 リン酸化解析

siRNA により HSP90AA1 および AB1 のノックダウンを行った。その後、MG132 処理を行い、ウエスタンブロットで p62 のリン酸化解析を行った。

⑥ ニコチンアミドによるサーチュイン活性化と p62 のリン酸化

HeLa 細胞を 2 μ M と MG132 で処理した。その後、細胞抽出液のウエスタンブロットを行い、p62 のリン酸化を解析した。

4. 研究成果

① HSF1_KO 細胞における p62 リン酸化の抑制

MG132 でユビキチン化タンパク質の蓄積が起きてても、HSF1_KO 細胞では p62 の Ser-349 と Ser-403 のリン酸化は誘導されなかった(図1)。また、HSF1_KO 細胞で HSF1 を強制発現させると、p62 のリン酸化が回復した。

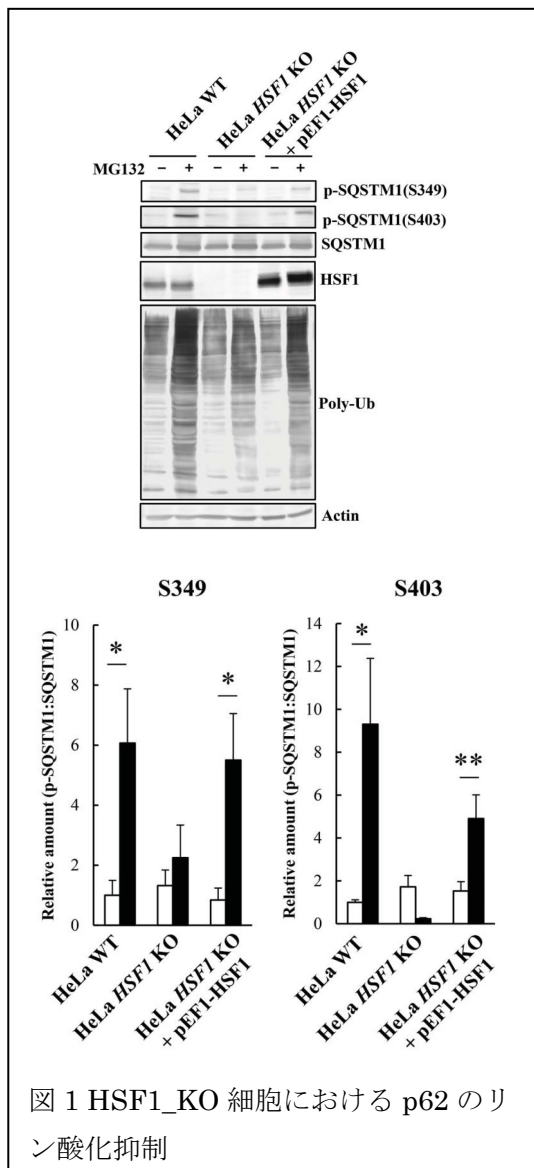
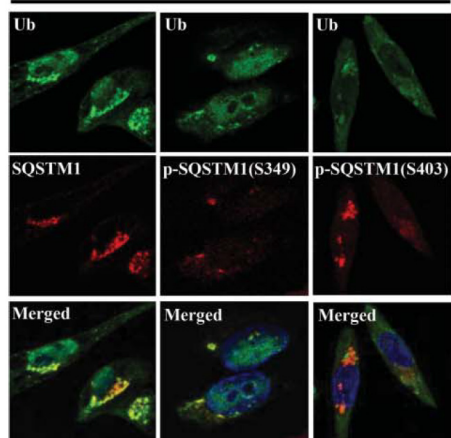


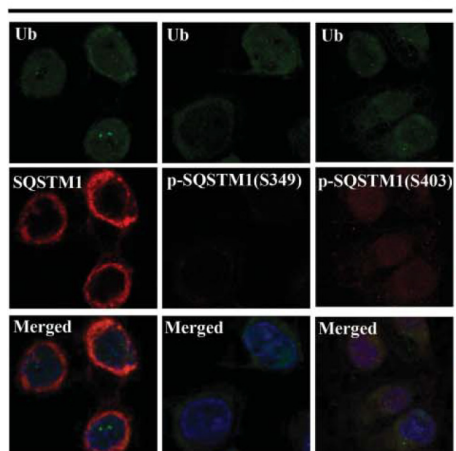
図1 HSF1_KO 細胞における p62 のリン酸化抑制

さらに、免疫細胞化学で p62 のリン酸化を観察したところ、HSF1_KO 細胞では p62 のリン酸化は抑制された。また、ユビキチン化タンパク質陽性の凝集体の形成も起きなかった(図2)。

HeLa WT (+MG132)



HeLa HSF1 KO (+MG132)



HeLa HSF1 KO + pEF1-HSF1 (+MG132)

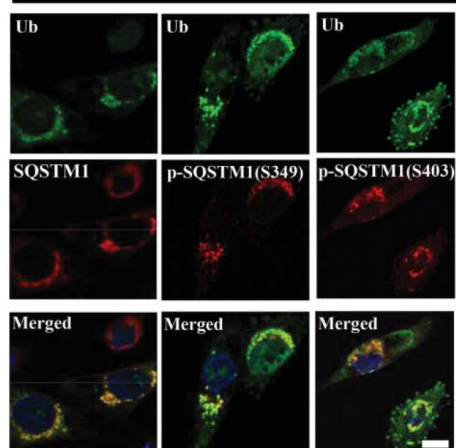


図2 HSF1_KO 細胞における p62 のリン酸化とユビキチン化タンパク質の凝集体形成の抑制

② p62 リン酸化に関与するキナーゼの探索
各種キナーゼ阻害剤で処理した細胞を MG132 処理を行い、p62 のリン酸化をウエス

タンブロットで調べた。ラパマイシン (mTORC1 阻害剤)、CKI-7 (CK1 阻害剤)、TBCA(CK2 阻害剤)により p62 Ser-349 のリン酸化は 60-30%に抑制された(図 3)。さらに、3 種類の阻害剤で同時に処理すると、p62 のリン酸化は完全に阻害された。さらに、p62 Ser403 のリン酸化は BX795 (TBK1 阻害剤)により完全に抑制された(図 4)。

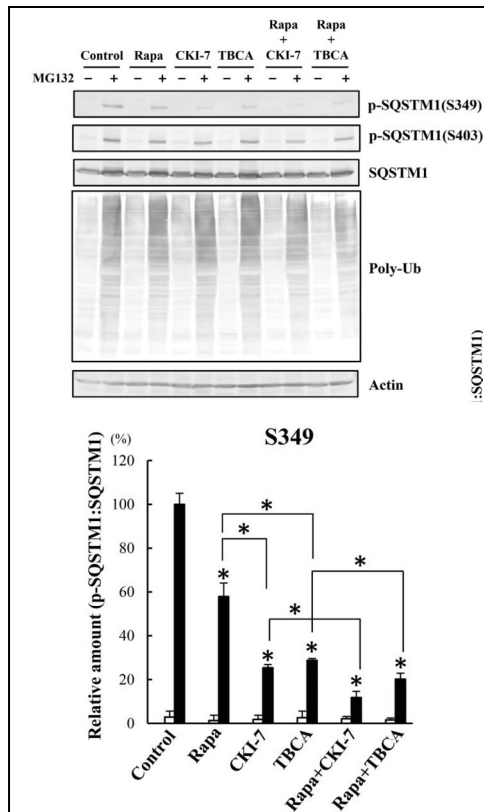


図 3 mTORC1, CK1, CK2 阻害剤による p62 Ser-349 のリン酸化抑制

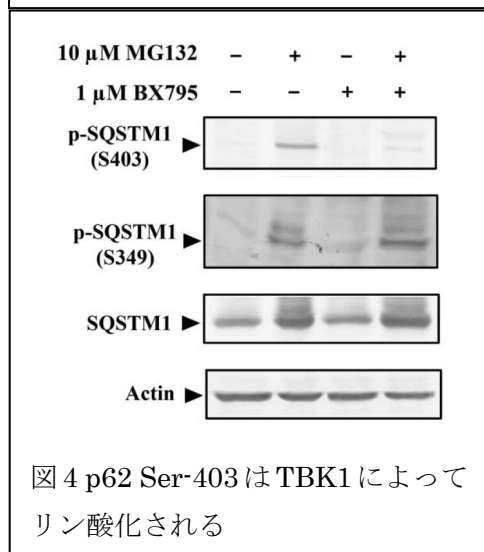


図 4 p62 Ser-403 は TBK1 によってリン酸化される

③ α-シヌクレイン凝集体における p62 リン酸化の動態

線維化した α-シヌクレインを HEK293 またはマウス脳 (線条体) へ導入し、細胞内で α-シヌクレイン凝集体を形成させた。その後、抗リン酸化 p62 抗体で免疫染色を行った。その結果、α-シヌクレイン凝集体に局在する p62 は Ser-349(マウス; Ser351)のリン酸化は起きていたが、Ser403(マウス; Ser-405)のリン酸化は起きていなかった。このことから、凝集体の種類により p62 のリン酸化が異なることが明らかとなった。

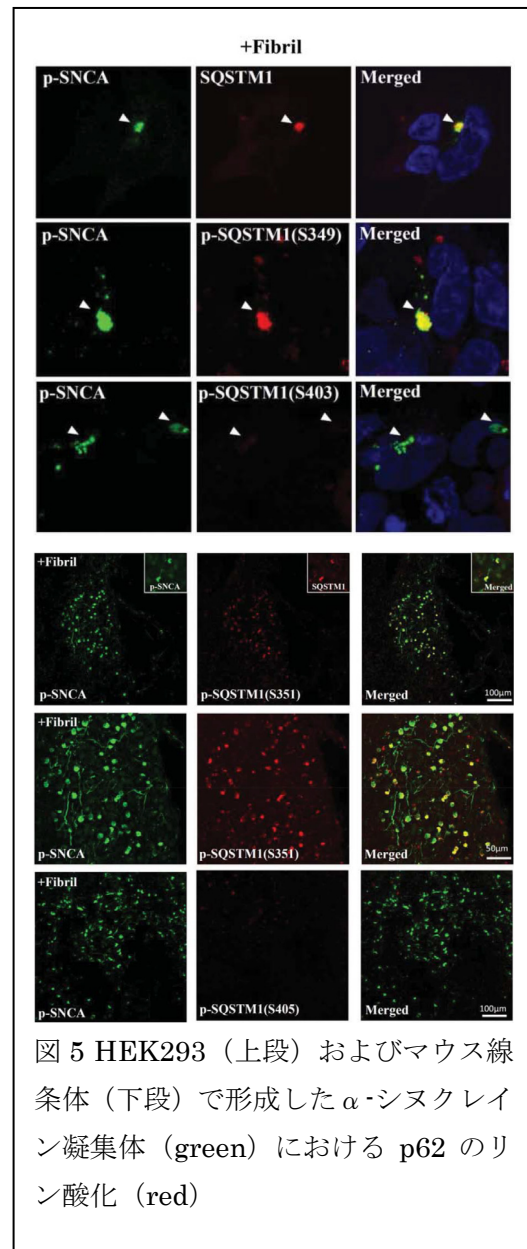


図 5 HEK293 (上段) およびマウス線条体 (下段) で形成した α-シヌクレイン凝集体 (green) における p62 のリン酸化 (red)

④ HSP90 阻害剤による p62 リン酸化の抑制

HeLa 細胞を HSP90 阻害剤 (2 μM 17-AAG または 10 μM Geldanamycin) と MG132 で 12h 処理し、ウエスタンブロットで p62 のリン酸化を調べた。その結果、17-AAG および Geldanamycin により p62 のリン酸化抑制された (図 6)。

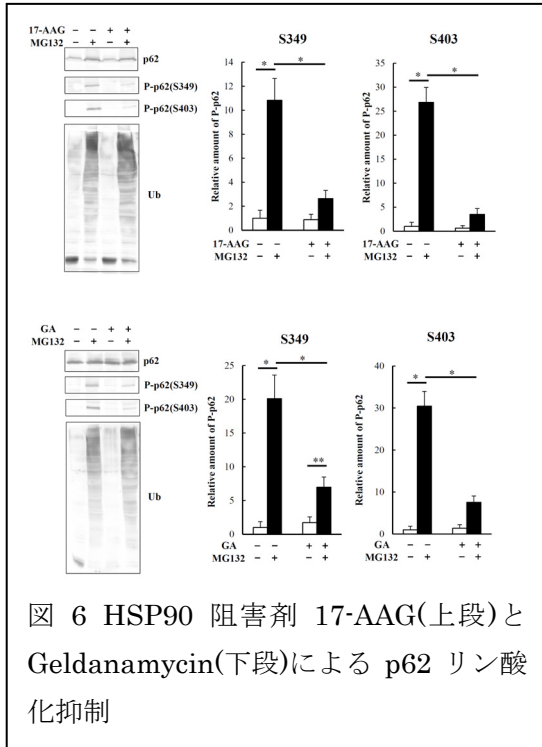


図 6 HSP90 阻害剤 17-AAG(上段)と Geldanamycin(下段)による p62 リン酸化抑制

⑤ HSP90AA1 および AB1 ノックダウン細胞における p62 のリン酸化

上述の実験より HSP90 阻害剤により p62 のリン酸化が抑制されたことから、HSP90 のノックダウンによる p62 のリン酸化抑制を確かめた。siRNA により HSP90AA1 または AB1 をノックダウンした後、MG132 処理を行った。ウエスタンブロットにより p62 のリン酸化を確かめたところ、リン酸化の抑制は認められなかった。さらに AA1 および AB1 ダブルノックダウンを行った場合でも抑制は起きなかった (図 7)。

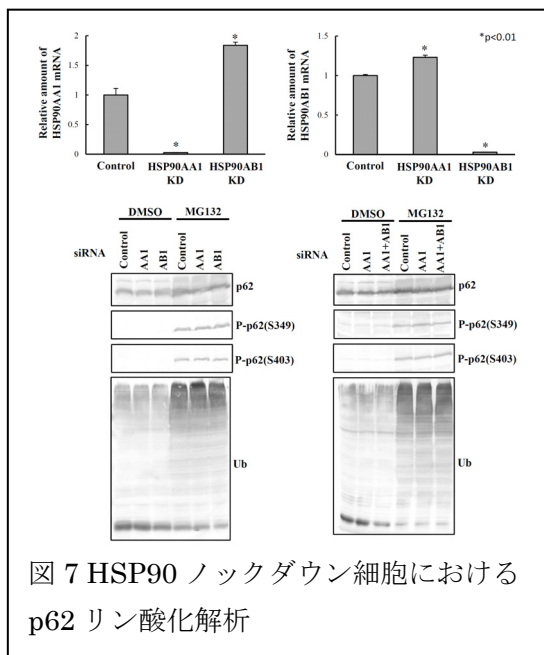


図 7 HSP90 ノックダウン細胞における p62 リン酸化解析

⑥ ニコチンアミドによるサーチュイン活性化と p62 のリン酸化

老化と p62 の関連性について解析するために、HeLa 細胞を 5mM のニコチンアミドと MG132 で処理し、ウエスタンブロットで p62 のリン酸化を解析した。ニコチンアミド処理によりサーチュインの活性化をしても、p62 のリン酸化に影響はなかった (図 8)。

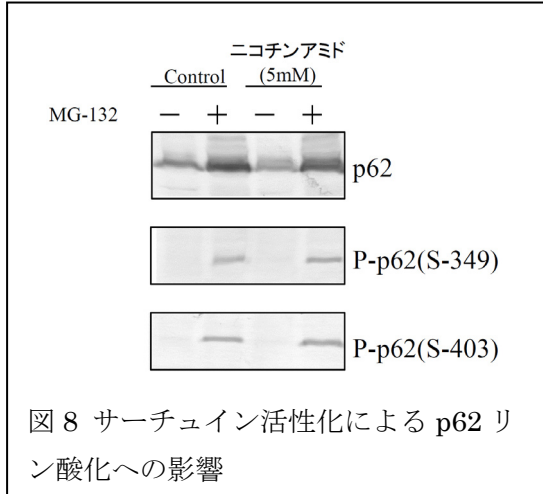


図 8 サーチュイン活性化による p62 リン酸化への影響

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 2 件)

- ① Watanabe Y, Tsujimura A, Taguchi K, Tanaka M. HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis. *Autophagy*. 13; 133-148 (2017) 査読有 DOI: 10.1080/15548627.2016.1248018
- ② Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J Comp Neuro*. 524; 1236-1258 (2016) 査読有 DOI: 10.1002/cne.23901

[学会発表] (計 1 4 件)

- ① 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. 神経細胞間伝播性 α -シヌクレインの分離・同定とその解析. 2018 年 3 月 28 日-30 日. 第 123 回日本解剖学会総会・学術集会東京.
- ② 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍糸球体細胞の解析. 第 93 回日本解剖学会近畿支部学術集会. 2017 年 11 月 25 日. 大津市.

- ③ 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍糸球体細胞の解析. 第7回4大学連携研究フォーラム. 2017年11月14日. 京都.
- ④ 渡邊義久、辻村敦、田口勝敏、田中雅樹. HSF1によるオートファジーレセプターp62活性化調節機構の解明. 第12回臨床ストレス応答学会大会. 2017年11月4日-5日. 東京.
- ⑤ 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍糸球体細胞の解析. 第122回日本解剖学会総会・学術集会. 2017年3月28日. 長崎市.
- ⑥ 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍糸球体細胞の解析. 第6回4大学連携研究フォーラム. 2016年12月7日. 京都市.
- ⑦ 辻村敦、渡邊義久、田口勝敏、田中雅樹. 細胞内 α シヌクレイン凝集体の形成/分解サイクルと細胞生存への影響について. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日-12月2日. 横浜市.
- ⑧ Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Characterization of alpha-synuclein-enriched periglomerular cells in the olfactory bulb. Neuroscience 2016. Nov. 12-16, 2016. San Diego.
- ⑨ 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. Characterization of α -synuclein-enriched periglomerular cells in the mouse olfactory bulb. 第39回日本神経科学学会大会. 2016年7月20日-22日. 横浜.
- ⑩ 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. Characterization of alpha-synuclein-enriched periglomerular cells in the mouse olfactory bulb. 第121回日本解剖学会・全国学術集会. 2016年3月28-30日. 郡山市.
- ⑪ 渡邊義久、辻村敦、田口勝敏、田中雅樹. 熱ショック因子1 (HSF1)を介した p62 のリン酸化制御は不良蛋白質の封入体形成に関与する. 第38回日本分子生物学会年会. 2015年12月1日-4日. 神戸市.
- ⑫ 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹. パーキンソン病関連分子 α -Synuclein が示す多様な脳内発現プロファイルについて. 日本解剖学会・近畿支部会. 2015年11月28日. 京都市.
- ⑬ 渡邊義久. HSF1による p62 のリン酸化と封入体形成の制御. 第9回オートファジー研究会. 2015年11月16日-17日. 淡路島.
- ⑭ 渡邊義久、辻村敦、田口勝敏、田中雅樹. カテプシンBによる線維化 α -シヌクレインの凝集体形成活性の促進. 第38回日本神経科学大会. 2015年7月28-30日. 神戸.

〔図書〕 (計1件)

- ① Watanabe, Y and Tanaka, M. Regulation of autophagy by the HSF1-mediated stress response pathway. In: Alexzander A A Asea and Stuart K editors. Heat Shock Proteins and Stress. (Springer Publishers, New York) *in press*. (2018) DOI: 10.1007/978-3-319-90725-3

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

成果発表

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/cellbio/>

<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2016/files/13041.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 義久 (WATANABE, Yoshihisa)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 50363990

(2) 研究分担者

徳田 隆彦 (TOKUDA, Takahiko)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80242692

(3) 連携研究者

辻村 敦 (TSUJIMURA, Atsushi)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50236890

(4) 研究協力者

()