

平成30年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19019

研究課題名(和文) PKC機能破綻によるパーキンソン病の病態解明とパーキンソン病新規治療法への応用

研究課題名(英文) Investigation of Parkinsonism by PKC pathway disruption and application for the new treatment for Parkinson's disease

研究代表者

白藤 俊彦 (Shirafuji, Toshihiko)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・助教

研究者番号：30595765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PKC γ によるCysteine string protein alpha (CSP α)のリン酸化がドパミン神経終末でのHSP70シャペロン活性促進、神経細胞死防止に必要であることを証明した。PKC γ がCSP α の10番目と34番目のセリン(Ser)残基(Ser10/34)をリン酸化し、HSP70との結合が促進され、神経終末でのシャペロン活性を促進し、神経変性を免れることを証明した。CSP α のSer10, 34のリン酸欠損変異体はHSP70との結合が低下し、リン酸化模倣変異体はHSP70との結合が上昇することを証明した。

研究成果の概要(英文)：We focused on cysteine string protein alpha (CSP α), one of HSP40 localized on synaptic vesicles. We found that PKC γ phosphorylates CSP α at Serine10 and Ser34. Apoptosis was found to have been enhanced by the overexpression of a phosphorylation null mutant of CSP α , CSP α (S10A/S34A). The CSP α (S10A/S34A) mutant had a weaker interaction with HSP70 than WT CSP α , but a phosphomimetic CSP α (S10D/S34D) mutant had a stronger interaction with HSP70 than WT CSP α . Total levels of SNAP25, a main downstream of the HSP70 chaperone complex, was found to have decreased by the CSP α (S10A/S34A) mutant, through increased ubiquitination of SNAP25 in PC12 cells. In the striatum of 2-year-old PKC γ KO mice, decreased phosphorylation levels of CSP α and decreased SNAP25 protein levels were observed. These findings indicate the phosphorylation of CSP α by PKC γ may protect the presynaptic terminal from neurodegeneration. The PKC γ -CSP α -HSP70-SNAP25 axis may provide a new therapeutic target for the treatment of PD.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：PKC パーキンソン病 リン酸化 CSP α HSP70

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、中脳黒質のドーパミン神経細胞が変性する疾患である。神経変性疾患の中で最多の患者数であり、近年の高齢社会において、重要な社会問題となっている。

現在のパーキンソン病の治療法では変性した黒質ドーパミン産生細胞を直接保護するものはなく、対症療法的に不足するドーパミンを補うものが主体である。

自然発生のパーキンソン病モデルラットである AS/AGU ラットは遺伝子解析により、Protein kinase C γ (PKC γ) 遺伝子のナンセンス変異が原因であることが報告されていた。我々はこの AS/AGU ラットでは PKC γ ノックアウト (KO) に至ることを解明した。また、我々はラット以外にも PKC γ KO マウスでは線条体にて K⁺ 刺激によるドーパミン遊離が低下すること、黒質ドーパミン神経細胞数減少を認める等のパーキンソン病の所見を示すことも明らかにした。

PKC はセリン・スレオニンリン酸化酵素であるので、PKC γ KO マウスの線条体でリン酸化が低下する PKC γ 基質タンパク質がパーキンソン病発症に関わることを示唆している。

そこで、これらの PKC γ 基質タンパク質を網羅的に同定するために、ショットガンリン酸化プロテオームを行った。その結果、PKC γ KO マウス線条体にてリン酸化が低下し、ドーパミン遊離低下や細胞死を起こす基質タンパク質を 10 個同定した。

これらの 10 個の PKC γ 基質候補のタンパク質は、ドーパミン神経細胞のドーパミン遊離やドーパミン神経細胞変性に重要であることが想定された。

2. 研究の目的

PKC γ KO マウスの線条体を用いたショットガンリン酸化プロテオームで同定した基質は、パーキンソン病発症に関与する可能性が高いと考えられる。

そこで、同定した PKC γ 基質タンパク質のリン酸化とドーパミン遊離障害、ドーパミン神経細胞変性などのパーキンソン病発症の関連を分子レベルで解明し、その

PKC γ 基質の非リン酸化変異体やリン酸化の下流因子の遺伝子改変動物を作製し、PKC シグナル経路に着目したパーキンソン病に対する新規治療法を開発することを目的とした。

本研究によりできる治療法は、パーキンソン病の初期に障害されるドーパミン神経終末を保護することで、ドーパミン神経変性を防止するものであり、根本的なパーキンソン病治療につながる可能性が高い。

3. 研究の方法

PKC γ の機能破綻によるパーキンソン病の発症メカニズムの解明を解明するために、リン酸化プロテオームで同定した 10 個の PKC γ 基質候補の PKC によるリン酸化を確認した。

PKC γ 基質のうちで、特に、Cysteine string protein alpha (CSP α) に注目した。注目した理由は、神経変性疾患で初期に障害されるプレシナプス終末に局在すること、プレシナプス終末を変性から守るシャペロン分子であることである。

CSP α の非リン酸化変異体を用いて、ドーパミン神経細胞変性への影響、シャペロン機能への影響、主要なシャペロン機能を発揮する SNARE 複合体の一員である Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25) のポリユビキチン化とタンパク量について解析を行った。

その後、実際に PKC γ KO マウスの線条体を用いて、CSP α のリン酸化の変化、その下流にある SNAP25 の変化をタンパクレベルで確認した。

4. 研究成果

PKC γ による CSP α のリン酸化がドーパミン神経終末での heat shock protein 70 (HSP70) シャペロン活性促進、神経細胞死防止に必要であることを証明した。

この成果により、パーキンソン病患者のドーパミン神経で初めに障害される神経終末を CSP α のリン酸化を用いて HSP70 の活性を調節することで治療をすることができると示されたことになる。

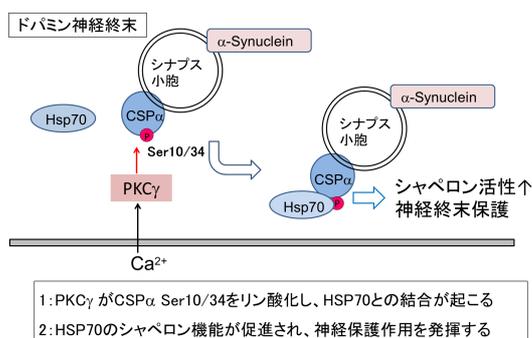
具体的には、PKC γ が CSP α の 10 番目と 34 番目のセリン (Ser) 残基 (Ser10/34) を

リン酸化することを示した。また、CSP α の Ser10, 34 のリン酸欠損変異体は HSP70 との結合が低下(シャペロン活性が低下)し、リン酸化模倣変異体は HSP70 との結合が上昇(シャペロン活性が上昇)することを証明した。その後、CSP α の主要ターゲットである SNAP25 のタンパクレベルの変化を調べた。

CSP α の Ser10, 34 のリン酸欠損変異体では SNAP25 のタンパク量が減少し、SNAP25 のポリユビキチン化も亢進していたので、CSP α のこれらのリン酸化が SNAP25 の安定性を実際に促進していることを証明した。

また、PKC γ KO マウスの線条体を用いて、実際に CSP α のリン酸化が低下していることを証明した。CSP α と HSP70 のターゲットである SNARE 複合体の1つである SNAP25 の低下を証明した。

(図は、本研究により解明された概要をまとめたものである。)



現在、CSP α の Ser34 に対する特異的リン酸化抗体を作製中であり、生体レベルでの CSP α リン酸化を確認する予定である。

また、今後、CSP α 非リン酸化、リン酸化模倣変異体を持つマウスを作製、解析する予定である。その後、これらの CSP α のリン酸化変異体を持つマウスを用いて、パーキンソン病のドパミン神経細胞の変性を防ぐための治療法開発を行う方針である。

また、すでに PKC γ KO マウスを用いて同定した線条体での PKC γ の基質10個のうちで、実際に MADD/DENN が PKC のリン酸化基質であることを同定しており、CSP α と同様に MADD/DENN リン酸化とパーキン

ソン病発症の関連についても解析を行う予定である。

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5件)

1. Shirafuji T (1 番目) 他 11 名
The Role of Cysteine String Protein Phosphorylation at Serine 10 and 34 by Protein Kinase C for Presynaptic Maintenance.

J Neurosci. 2018 Jan 10;38(2):278-290

(査読有)

2. Shirafuji T (1 番目)他 5 名
Validation of anti-CSP α , SNAP25, Tyrosine hydroxylase, Ubiquitin, cleaved caspase3, and pSer PKC motif antibodies for utilization in western blotting

Acta Histochem Cytochem 50(6):

177-180 2017 (査読有)

3. Shirafuji T (6 番目) 他 8 名
The Development of Screening Methods to Identify Drugs to Limit ER Stress Using Wild type and Mutant Serotonin Transporter.

Acta Histochem Cytochem

49(6):197-206. 2016 (査読有)

4. Miyagi T, Tanaka S, Hide I, Shirafuji T, Sakai N.

The Subcellular Dynamics of the Gs-Linked Receptor GPR3 Contribute to the Local Activation of PKA in Cerebellar Granular Neurons.

PLoS One 11(1):e0147466. 2016 (査読有)

5. Shirafuji T (8 番目),他 10 名
The Toll-like receptor 4-activated neuroprotective microglia subpopulation survives via granulocyte macrophage colony-stimulating factor and JAK2/STAT5 signaling.

Neurochem Int 93:82-94. 2016

(査読有)

[学会発表](計6件)

黒質線条体系における PKC γ 基質の解析: ドパミン遊離と神経細胞生存にお

けるPKC γ によるリン酸化の役割
第89回日本薬理学会年会薬理学会
2016年3月 発表者：白藤俊彦
PKC γ knockout Parkinsonian syndrome
model: The role of PKC γ for
Parkinsonian symptoms
第57回日本神経学会総会
2016年5月 発表者：白藤俊彦
黒質線条体系におけるPKC γ の基質の
解析: Cysteine string protein alpha
リン酸化の細胞生存での役割
第129回薬理学会近畿部会
2016年6月 発表者：白藤俊彦
Analysis of PKC γ substrates in the
nigro-striatum system: The role of
CSP α phosphorylation in the
neuronal survival
Neuroscience2016 annual meeting
2016年11月 San Diego
発表者：白藤俊彦
PKC γ によるCSP α リン酸化の神経細胞
生存における役割
第89回日本薬理学会年会
2017年3月 発表者：白藤俊彦
The role of Cysteine string protein
alpha (CSP α) phosphorylation at
Ser10 and Ser34 by PKC γ for the
presynaptic maintenance
第58回日本神経学会学術大会
2017年9月 発表者：白藤俊彦

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織
(1)研究代表者
白藤 俊彦 (SHIRAFUJI, Toshihiko)
広島大学・医歯薬保健学研究科・助教
研究者番号：30595765

(2)研究分担者
()
研究者番号：

(3)連携研究者
()
研究者番号：

(4)研究協力者
()