

令和元年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19037

研究課題名(和文)ミトコンドリア呼吸制御機構の解析と神経変性疾患におけるその破綻

研究課題名(英文) Analysis of mitochondrial respiratory regulation mechanism and its failure in neurodegenerative disease

研究代表者

村田 等 (Murata, Hitoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：90579096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア呼吸制御に関わるSARM1のリン酸化制御機構について解析を行った。SARM1はパーキンソン病様症状を誘発するロテノンやパラコート刺激でリン酸化をうけた。リン酸化酵素はJNKであり、SARM1のリン酸化部位はSer548であった。SARM1はNADを分解する酵素活性を有しており、SARM1の活性化はNADの分解を通じてミトコンドリアのATP産生を抑制した。SARM1のNAD分解活性はSer548のAla変異によって減弱した。パーキンソン病患者由来の神経細胞ではSARM1のリン酸化レベルが健常者由来の神経細胞よりも高く、疾患の進行にSARM1の活性化が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の病態形成メカニズムを解明し、疾患の発症や進行を抑えることができる薬剤開発を目指して研究を行っている。今回我々はミトコンドリア呼吸を阻害し、神経軸索変性に関与するSARM1の研究を行い、新規にJNKを介したリン酸化制御機構を見出した。パーキンソン病患者由来の神経細胞ではSARM1のリン酸化が上昇しており、パーキンソン病の病態形成にSARM1の活性化が関与している可能性を見出した点に学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)： We analyzed regulation mechanism of SARM1 involved in mitochondrial respiratory regulation. SARM1 is phosphorylated by rotenone or praquat which induces Parkinson's disease-like symptoms. The kinase is JNK and the phosphorylation site of SARM1 is Ser548. SARM1 has an enzymatic activity to degrade NAD, and activation of SARM1 suppressed mitochondrial ATP production through degradation of NAD. The NAD degradation activity of SARM1 was attenuated by Ala mutation of Ser548. Phosphorylation levels of SARM1 in Parkinson's disease patient derived neurons were higher than in healthy donor derived neurons, suggesting that SARM1 activation may be involved in disease progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア SARM1 JNK パーキンソン病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は黒質から線条体に投射されるドーパミン作動性神経の変性・脱落を主な原因とする神経変性疾患の1つである。現在までドーパミン作動性神経の変性を抑制し、パーキンソン病の進行を抑える薬剤はなく、パーキンソン病の分子病態メカニズムを解明し薬剤開発につなげることが求められている。パーキンソン病患者由来の神経細胞ではミトコンドリア機能の低下が報告されているが、その原因はよくわかっていなかった。我々は家族性パーキンソン病原因遺伝子産物の1つである PINK1 の結合タンパク質の解析から新規に SARM1 を見出し、SARM1 がミトコンドリア呼吸を阻害し、ミトコンドリア機能の低下を誘発する知見を得ていた。

2. 研究の目的

本研究では細胞内での機能や制御機構がわかっていなかった SARM1 の解析を行い、どのようにして SARM1 がミトコンドリア呼吸を阻害しているのかを解明すること、そして SARM1 の制御機構の破綻がパーキンソン病などの神経変性疾患におけるミトコンドリア機能低下の1つの要因となりうるかどうかを解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞

解析に用いた細胞はヒト胎仔腎由来 HEK293T、ヒト神経芽腫 SH-SY5Y、健康人由来 iPS 細胞 (201B7、RIKEN BRC)、家族性パーキンソン病患者 (PARK2) 由来 iPS 細胞 (慶応義塾大学・岡野栄之先生より提供を受けた) である。HEK293T 細胞と SH-SY5Y 細胞は DMEM/F12-10%FBS 培地で培養を行った。iPS 細胞は DMEM/F12 に N2A、L-Glu、KSR、2-メルカプトエタノール、500 ng/ml bFGF を加えた培地で培養を行った。iPS 細胞は PSC Neural Induction Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて神経幹細胞への分化誘導を行い、その後 Neurobasal Plus Medium (Thermo Fisher Scientific) に B-27 Plus、GlutaMAX、CultureOne、アスコルビン酸を加えた培地を用いて神経細胞への分化誘導を行った。細胞へのプラスミド DNA のトランスフェクションは FuGENE-HD (Promega) を、siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

(2) ウェスタンブロッティング

様々な処理を行った細胞は SDS sample buffer を用いて溶解し、ウェスタンブロッティング様のサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE で展開した後、PVDF 膜への転写を行った。1 次抗体および HRP 標識 2 次抗体を加え、HRP 基質溶液と反応させ、バンドの検出を行った。

(3) ATP 量、NAD 量、ROS 量、ミトコンドリア呼吸能の解析

ATP 量の検出は CellTiter-Glo assay (Promega)、NAD 量の検出は NAD/NADH-Glo assay (Promega)、ROS 量の検出は ROS-Glo H₂O₂ assay (Promega) を用いた。

ミトコンドリア呼吸能の解析は XF96 Extracellular Flux analyzer (Seahorse Bioscience) を用いて行った。細胞は 20,000 個/well の条件で撒き、呼吸能測定のために 1.5 μ M oligomycin、0.25 μ M FCCP、0.5 μ M rotenone/antimycin A を加えて解析を行った。

(4) SARM1-FLAG の精製および NAD 分解活性の測定

HEK293 細胞に FLAG タグを付加した SARM1 もしくは SARM1 変異体を発現させ 24 時間培養を行った。1% Triton-X100 を含む細胞溶解液で細胞を溶かし、遠心後に上清を回収した。上清に anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA) を加え、4 で 2 時間反応させた。affinity gel を PBST および PBS で 3 回洗浄を行い、0.5 mg/ml FLAG ペプチドを加え 4 で 1 時間反応し、SARM1-FLAG を affinity gel から解離させた。SARM1-FLAG もしくは SARM1 変異体-FLAG 溶液に 1 μ M NAD を加え、37 で 30 分間反応させた。その後 NAD/NADH-Glo assay を用いて NAD 量を測定し、SARM1 の NAD 分解活性を検出した。

4. 研究成果

(1) リン酸化による SARM1 制御機構の解明

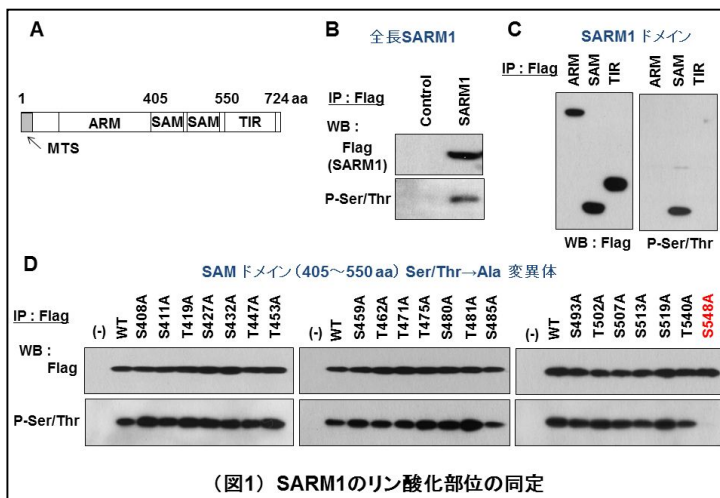
SARM は N 末端側にミトコンドリア移行シグナルと ARM ドメイン、中央部に SAM ドメイン、C 末端側に TIR ドメインを有するタンパク質である (図 1A)。SARM1 は細胞内に過剰発現させると ATP 合成を阻害する。我々はこの条件下で SARM1 がリン酸化されていることを見出し (図 1B)、SARM1 の活性がリン酸化によって制御されているのではないかと考え、リン酸化部位ならびにリン酸化酵素の同定を試みた。それぞれのドメインを含む形で SARM1 を 3 つの領域に分け、どの部分がリン酸化されているのかを解析した。その結果 SAM ドメインを含む領域がリン酸化されていることがわかった (図 1C)。この領域にはセリンが 12 個、スレオニンが 9 個含まれているので、これらのアミノ酸を 1 つずつアラニンに置換した変異体を作製し、リン酸化がなくなる変異体のスクリーニングを

行ったところ、セリン 548 番をアラニンに置換した場合にのみリン酸化が消失した(図 1 D)。これらの結果から SARM1 のリン酸化部位はセリン 548 番であることが判明した。

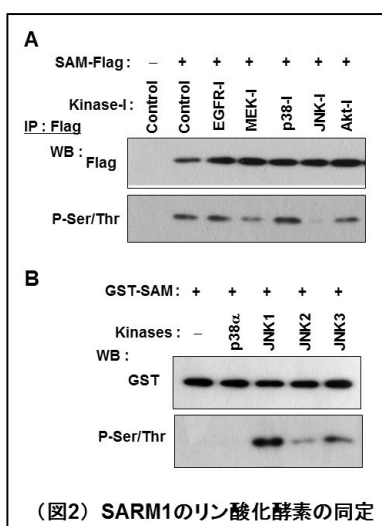
次に SARM1 のリン酸化酵素の同定を試みた。当初我々は SARM1 をリン酸化酵素 PINK1 の結合タンパク質として見出していたことから、PINK1 が SARM1 をリン酸化するのではないかと考え解析を行った。いくつかの条件を

試したが、PINK1 が SARM1 をリン酸化するという結果は得られなかった。そこで他のリン酸化酵素のスクリーニングを行った。SARM1 のリン酸化部位であるセリン 548 番の次のアミノ酸がプロリンであることから、この配列を好んでリン酸化する MAP キナーゼに着目し、MAP キナーゼ阻害剤を用いてリン酸化解析を行った。その結果 JNK 阻害剤を添加した時に特に SARM1 のリン酸化が抑制された(図 2 A)。また JNK の siRNA による発現抑制によってもリン酸化は抑制され、逆に JNK の過剰発現によって SARM1 のリン酸化は増強された。JNK1 は 1-3 のファミリーがあるが、特に JNK1 が SARM1 を強くリン酸化した(図 2 B)。これらの結果から SARM1 のセリン 548 番をリン酸化する酵素は JNK であることが判明した。

内在性 SARM1 のセリン 548 番のリン酸化を特異的に検出するためにリン酸化 SARM1 検出抗体を作製して解析を行った。SARM1 のリン酸化は酸化ストレス剤でパーキンソン病様症状をひきおこすロテノンやパラコートへの曝露で増加したことから、酸化ストレス環境下で SARM1 がリン酸化によって活性化され、ATP 合成の阻害に關与することが示唆された。



(図1) SARM1のリン酸化部位の同定

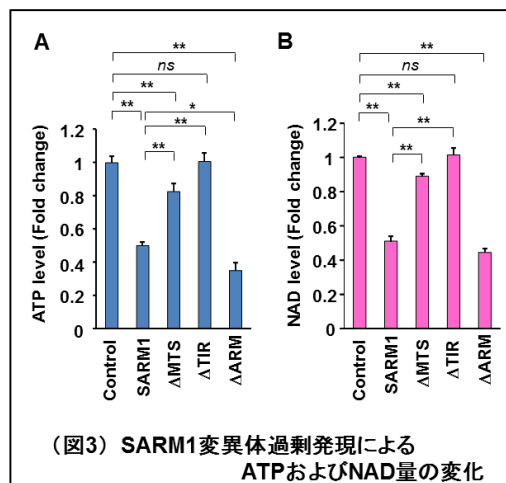


(図2) SARM1のリン酸化酵素の同定

(2) SARM1 を介したミトコンドリア呼吸制御機構の解析

SARM1 によるミトコンドリア呼吸制御機構について解析を行った。はじめに SARM1 に含まれるドメインを欠損させた変異体の比較を行った。SARM1 野生型の強制発現によってミトコンドリア呼吸が阻害され ATP 量の減少や活性酸素種 (ROS) 量の増加が確認されたが、SARM1 に含まれるミトコンドリア移行シグナルや TIR ドメインを欠損させるとこの活性は減弱した。一方 ARM ドメインを欠損させた場合は野生型とほとんど同じであった(図 3 A)。この研究の間に他グループから SARM1 は補酵素である NAD を分解する活性を有し、SARM1 の活性化が神経軸索変性に関与するという報告があった(*Neuron*, 93, 2017)。そこで SARM1 の強制発現後に NAD 量を測定したところ、報告のように NAD 量の低下が確認された(図 3 B)。また NAD の前駆体であるニコチンアミドリボシドを添加すると SARM1 の強制発現によって誘導される ATP 量の減少が緩和され、逆に NAD の合成に關わる NAMPT 阻害剤の添加は SARM1 誘導性の ATP 量減少を更に亢進させたことから、SARM1 は NAD の分解を介して ATP 合成阻害に關与していることが考えられる。

次に(1)で見出した SARM1 のリン酸化がミトコンドリア呼吸に及ぼす影響を解析した。NAD の分解やミトコンドリア呼吸阻害、ATP 合成の低下は SARM1 のセリン 548 番のアラニン変異、もしくは JNK 阻害剤添加による SARM1 のリン酸化阻害によって減弱した。一方、JNK 強制発現によって SARM1 のリン酸化を増強すると逆の現象が観察されたことから、JNK による SARM1 のセリン 548 番のリン酸化は SARM1 の NAD 分解活性を制御し、ミトコンドリア呼吸阻害に關与していることがわかった。

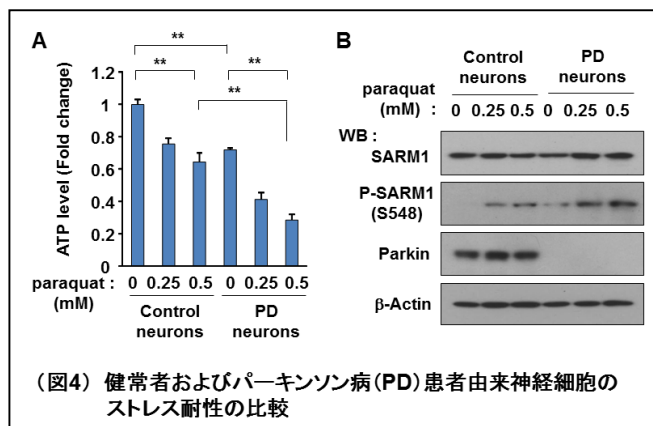


(図3) SARM1変異体過剰発現による ATPおよびNAD量の変化

(3) 神経細胞における SARM1 の働き

神経細胞内での SARM1 の働きを解明するために、健常者及びパーキンソン病患者由来 iPS 細胞を神経細胞に分化誘導し解析を行った。はじめに神経細胞にロテノンやパラコートを追加し、比較を行った。パーキンソン病患者由来の神経細胞は健常者由来神経細胞に比較してストレスに脆弱であり、細胞死や軸索変性の割合が高かった(図 4 A)。またパーキンソン病患者由来の神経細胞では SARM1 のリン酸化レベルが高く、酸化ストレスへの曝露でリン酸化レベルが更に高くなった(図 4 B)。SARM1 のリン酸化は JNK 阻害剤の添加で抑制され、それに伴い細胞死や軸索変性も抑制された。またパラコートを投与したパーキンソン病モデルマウスの中脳においても SARM1 のリン酸化の上昇が確認された。

これらの結果から SARM1 のミトコンドリア呼吸阻害活性は JNK によるリン酸化によって制御されており、パーキンソン病の病態形成に関与している可能性が示唆された。今後 SARM1 の活性化を阻害する薬剤を開発し、パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の進行抑制のために効果を発揮するかどうかを検討していきたい。



(図4) 健常者およびパーキンソン病(PD)患者由来神経細胞のストレス耐性の比較

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Murata H, Khine CC, Nishikawa A, Yamamoto KI, Kinoshita R, Sakaguchi M.

c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated phosphorylation of SARM1 regulates NAD⁺ cleavage activity to inhibit mitochondrial respiration.

J Biol Chem, 293(49):18933-18943, 2018, 査読有, doi: 10.1074/jbc.RA118.004578.

Sakaguchi M, Kinoshita R, Putranto EW, Ruma IMW, Sumardika IW, Youyi C, Tomonobu N, Yamamoto KI, Murata H.

Signal Diversity of Receptor for Advanced Glycation End Products.

Acta Med Okayama, 71(6):459-465., 2017, 査読有, doi: 10.18926/AMO/55582.

[学会発表](計 9 件)

村田等、山本健一、木下理恵、阪口政清

JNK によるリン酸化は SARM1 の NAD 分解活性を制御し、ミトコンドリア呼吸阻害を誘導する、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

村田等、山本健一、木下理恵、阪口政清

健常者及びパーキンソン病患者 iPS 細胞由来の神経細胞を用いたミトコンドリア機能解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

村田等、西川茜、高松仁志、山本健一、木下理恵、阪口政清

ミトコンドリア呼吸鎖複合体への作用を介した SARM1 の神経細胞死誘導

第 90 回日本組織培養学会大会、2017 年

村田等、西川茜、山本健一、木下理恵、阪口政清

神経細胞死・軸索変性に関する SARM1 のリン酸化制御

第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

Murata H, Yamamoto K, Kinoshita R, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M

PINK1 regulation of mitochondrial homeostasis and cell survival.

World congress on in vitro biology、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：リン酸化 SARM1、抗体、SARM1 リン酸化阻害剤、神経変性疾患の予防又は治療薬、スクリーニング方法、SARM1 改変体及び使用

発明者：村田 等、阪口 政清、木下 理恵、山本 健一

権利者：国立大学法人 岡山大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/011418

出願年：2017 年

国内外の別：国外

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.okayama-u.ac.jp/user/cellbiol/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。