

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09745

研究課題名(和文) シヌクレインを介するヒストン修飾機構の解明

研究課題名(英文) Histone modification induced by alpha-synuclein

研究代表者

菅野 直人 (Sugeno, Naoto)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30509550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シヌクレインの核内における役割を調べる手がかりとして、まずシヌクレインが相互作用を持つ核内タンパクのスクリーニングを行った。質量分析の結果、神経分化において重要な役割を果たすBAF複合体のいくつかのコンポーネントとの会合が証明した。シヌクレインの過剰発現下では、BAF複合体が成熟せず、結果として神経細胞にとって必要となる遺伝子の発現が抑制されることが予想された。標的となる遺伝子をクロマチン免疫沈降後の次世代シーケンサー解析で網羅的スクリーニングを行い、細胞の機能維持において重要な遺伝子を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病発症の最大のリスクは加齢であり、現在進行中の高齢化社会において本疾患への対応は急務となっている。ドパミン補充療法が運動機能改善に役立つものの、一方でドパミン製剤による衝動制御障害は罹患者の生活を破壊するものであり発生を未然に防ぐ必要がある。本研究ではシヌクレインを出発点とした分子生物学的アプローチにより、衝動制御障害のリスクとなりうる遺伝子の発現変化が導かれることを見出した。今後、実臨床へと発展させることにより衝動制御障害のリスクを事前に知ることが可能となると思われる。

研究成果の概要(英文)：Alpha-synuclein (aS) is a key molecule to understand pathomechanisms underlying Parkinson's disease. Physiological intracellular localization of aS is mainly pre-synaptic membrane, but a part of aS reside nucleus. We focused on the function of aS in nucleus, especially in epigenomic regulation of neuronal genes. At the first step of this project, we tried to find out the aS-interacting proteins in nucleus, and successfully achieved because some of the components of BAF complex that actively work during neuronal differentiation, were significantly bonded with aS. Also, the enzyme that catalyzes histone methylation was also involve in this complex. Interestingly, altered histone modification targeted by the enzyme was enhanced by aS expression in differentiated SH-SY5Y cells. Finally, we identified some neuronal genes affected by the histone methylation.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 エピジェネティクス シヌクレイン

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD)はアルツハイマー病に次いで有病率が高い神経変性疾患である。錐体外路症状(無動、振戦、固縮)に対してはドパミン補充療法が有効であるが、自律神経症状やうつ・アンヘドニア、嗅覚低下といった非運動症状に対しては無効であり、さらに神経変性そのものを抑制しうる手段はいまだ存在しない。これまで、酸化的ストレス、ミトコンドリア障害説、ユビキチン・プロテアソーム経路の破綻など多様なアプローチより膨大な研究が行われてきたが、いまだパーキンソン病の神経変性機序は明らかとなっておらず、ただ  $\alpha$ -Synuclein (S) の果たす役割の重要性が繰り返し強調されてきた。Sは、その点突然変異、および二重・三重重複が常染色体優性遺伝パーキンソニズムの原因遺伝子であり、さらにパーキンソン病を特徴づける病理学的構造物であるレビー小体の主要構成成分である。我々は、これまで S の細胞内凝集体形成や細胞毒性に関して研究を進めてきたが、その生理的・病的機能に関してはいまだ不明な点も多い。細胞内局在の点において、S はシナプス前終末に豊富に存在するとされる一方、核にも局在が知られており (Mori et al. Brain Res 2002, Siddiqui et al., Free Radic Biol Med 2012) さらに一部の遺伝性変異が S の核移行を促進すると報告されている (Mbefo et al. JBC 2015)。核における S の機能に関しては、ヒストンタンパクのアセチル化に影響を与えている可能性や、DNA メチルトランスフェラーゼ 1 を細胞質へ局在化させる可能性が言及されているものの一定の見解は得られていなかった。

## 2. 研究の目的

本課題では核内 S の機能解析、特にエピジェネティクス制御に関する役割の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) シヌクレイン結合タンパクの探索

培養細胞である HEK293 細胞を用い、HA タグを付加した シヌクレインを恒常的に発現する細胞株を樹立。本研究に最適化した細胞分画法にて純粋な核分画抽出。HA タグ抗体を付加したセルロースビーズを用いて免疫沈降を行ったのち、HA ペプチドを用いて競合的に HA- シヌクレインを溶出。本サンプルを SDS-PAGE で分離し銀染色を行い、シヌクレイン非発現サンプルではみられないバンドが存在することを確認したのちに、nanoLC-MS/MS によるタンパクの網羅解析を施行。コントロールに比べ SpC 5 倍以上であるものを有意とした。得られた候補タンパクはウェスタンブロットで確認する。

### (2) ヒストン修飾の評価

テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、野生型 シヌクレインを発現誘導可能な SH-SY5Y 細胞株樹立。本細胞をレチノイン酸、続いて BDNF で処理することにより分化誘導を行い、この過程において シヌクレインの発現誘導を行う。分化誘導を行っていない群、分化誘導後の群、分化誘導中に シヌクレインを過剰発現させて群の 3 群を準備。各々の細胞は、Triton 可溶分画を除いた後で、酸で処理することによりヒストンタンパクを単離。それらを SDS-PAGE で分離し、修飾ヒストンタンパクに対する特異的抗体を用いることにより評価。

### (3) クロマチン免疫沈降と産物の次世代シーケンサー解析

前述の修飾ヒストンタンパクを用いて本研究に最適化したクロマチン免疫沈降を行い、得られた産物を次世代シーケンサーで解析。得られたデータはゲノム上にマッピング、ピーク検出し、コントロールと比較。

## 4. 研究成果

細胞培養の系において シヌクレインと結合する網羅解析したところ、103 の核内タンパクが同定された。そのうち転写調整に関与するものを選択し、ウェスタンブロットにおいて シヌクレインとの連関を確認した。確認されたタンパクの中には、極めて興味深いことに BAF 複合体の構成成分の一群があった。BAF 複合体は神経発生において重要な役割を果たす。さらに、本実験系ではここにヒストン修飾酵素が同時に存在していた。BAF 複合体は神経発生の過程において、その構成タンパクに変化が生じることが知られている。構成タンパクそれぞれのタンパクに対する免疫沈降によって複合体の構成を検討したところ、シヌクレインを神経細胞分化過程で強発現させると、複合体の構成変化が抑制されることが明らかとなった。さらに、先述のヒストン修飾酵素によって特異的に変化するヒストン修飾は、シヌクレインの存在下で有意に変化がみられた。本ヒストン修飾によって発現変化がもたらされうる遺伝子を同定するために、特異

的抗体を用いたクロマチン免疫沈降を試みた。得られたサンプルを次世代シーケンサー解析し標的となる遺伝子を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Shun, Hasegawa Takafumi, Suzuki Mari, Sugeno Naoto, Kobayashi Junpei, Ueyama Morio, Fukuda Mitsunori, Ido-Fujibayashi Akemi, Sekiguchi Kiyotoshi, Ezura Michinori, Kikuchi Akio, Baba Toru, Takeda Atsushi, Mochizuki Hideki, Nagai Yoshitaka, Aoki Masashi	4. 巻 27
2. 論文標題 Parkinson's disease-linked DNAJC13 mutation aggravates alpha-synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 823 ~ 836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Takafumi, Yoshida Shun, Sugeno Naoto, Kobayashi Junpei, Aoki Masashi	4. 巻 11
2. 論文標題 DnaJ/Hsp40 Family and Parkinson's Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Neurosci.	6. 最初と最後の頁 743 ~ 743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2017.00743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa T, Sugeno N, Kikuchi A, Baba T, Aoki M.	4. 巻 242
2. 論文標題 Membrane Trafficking Illuminates a Path to Parkinson's Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 63 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.242.63.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoto Sugeno, Takafumi Hasegawa, Junpei Kobayashi, Shun Yoshida, Michinori Ezura, Akio Kikuchi, Atsushi Takeda, Masashi Aoki
2. 発表標題 Alpha-synuclein interacting protein in nucleus
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoto Sugeno, Takafumi Hasegawa, Junpei Kobayashi, Shun Yoshida, Michinori Ezura, Akio Kikuchi, Atsushi Takeda, Masashi Aoki
2. 発表標題 Alpha-synuclein interacts with BAF complex in nucleus
3. 学会等名 第12回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoto Sugeno, Sandra Jackel, Aaron Voigt, Philipp Kahle
2. 発表標題 Alpha-synuclein enhances histone H3 lysine-9 dimethylation
3. 学会等名 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菅野 直人、長谷川 隆文、小林 潤平、吉田 隼、江面 道典、菊池 昭夫、武田 篤、青木 正志
2. 発表標題 -シヌクレイン核内結合タンパクの探索
3. 学会等名 MDSJ
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菅野 直人、長谷川 隆文	4. 発行年 2017年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 358 (292-299)
3. 書名 運動失調のみかた, 考えかた III-8 プリオン仮説	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----