

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19430

研究課題名(和文) S1Pシグナルを介したパーキンソン病の病態解析

研究課題名(英文) Analysis on pathogenesis of Parkinson's disease through S1P signaling

研究代表者

中村 俊一 (Nakamura, Shun-ichi)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40155833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の原因タンパク質 α -Synはパーキンソン病患者の血清や脳脊髄液中に健常者に比べ高濃度存在することから、細胞外 α -Synの細胞効果を調べた。その結果、細胞外 α -Synは細胞膜の脂質ラフトからS1P1受容体を駆逐し、S1P1受容体とGiタンパク質との脱連関(アンカップリング)を引き起こすことを見出した。その結果、エキソソーム小胞への積荷(細胞内 α -Syn)輸送が阻害され細胞内 α -Syn濃度が上昇する可能性が示唆された。更にS1PはPKC と調節結合し活性化することから、S1P/PKC シグナルを介したりソゾーム機能調節により細胞内 α -Syn濃度が調節され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

パーキンソン病の9割以上を占める特発性パーキンソン病の病態解析は進んでいない。本研究の特徴はパーキンソン病の原因タンパク質 シヌクレイン (α -Syn) が患者の血清に高濃度に存在し、病気の進展に關与する可能性に着目し、細胞外 α -Synの有するシグナル伝達系への変容能力を見出した点にある。特に細胞外 α -Synが細胞内小胞膜上のS1P1受容体に作用し、Giタンパク質の活性化を阻害することで、エキソソームとして α -Synの放出が減少し、細胞内濃度上昇を来すことを示した。本研究はパーキンソン病の病態の理解に寄与し、分子標的治療薬開発に向けた緒となる結果を提供できた。

研究成果の概要(英文)： α -Synuclein (α -Syn), a key protein associated with the pathogenesis of Parkinson's disease, exists in higher concentrations in the plasma and cerebrospinal fluids than in healthy counterparts. We studied the effect of extracellular α -Syn on cellular functions and found that it drove S1P1 receptor out of lipid rafts of the plasma membranes, which resulted in uncoupling of the receptor from Gi protein. This result suggests that extracellular α -Syn causes the inhibition of cargo (cellular α -Syn) sorting into exosomal vesicles, leading to the increase in cytoplasmic concentrations of cellular α -Syn. Furthermore, we found that S1P directly bound to and activate PKC, which suggests that S1P/PKC signaling may regulate the cytoplasmic concentrations of α -Syn through the modulation of lysosomal function.

研究分野：生化学

キーワード：スフィンゴシン1 燐酸 S1P受容体 シヌクレイン パーキンソン病 レビー小体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで2番目に頻度の高い進行性神経変性疾患であり、黒質におけるドパミン作動性神経細胞の選択的喪失と、Lewy 小体と呼ばれる α -シヌクレイン (α -Syn) 陽性封入体の存在を病理学的特徴とする。 α -Syn は140アミノ酸から成るタンパク質で、生体内では特定の構造をとらないが、膜の脂質と結合することによりオリゴマーや線維状凝集体を形成しうる。その発現は神経細胞において高く、特にシナプス終末に集積している。最近の研究では、 α -Syn が培養細胞から開口放出あるいはエキソソームによって放出されること、そして実際に脳脊髄液や血漿中で α -Syn が検出されることが明らかとなっている。加えて、 α -Syn は細胞から細胞へと伝達されて凝集体の形成と神経細胞死を引き起こすことも実験的に示されている。しかし、パーキンソン病の原因と細胞外 α -Syn の関連については不明である。我々は最近、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞において細胞外 α -Syn が血小板由来増殖因子 (PDGF) 誘因性の細胞遊走を阻害することを報告した。更にそのメカニズムを解析したところ、細胞外 α -Syn はアクチン重合を調節する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質のうち Rac1 を特異的に阻害することを見出した。今後、細胞外 α -Syn から Rac1 活性化阻害の分子機序の解明が重要な鍵となるであろう。

2. 研究の目的

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患であり、病理所見で罹患神経細胞内にレビー小体と呼ばれる α -Syn を主成分とした封入体が認められるのが特徴である。パーキンソン病の9割以上を占める特発性パーキンソン病の病態解析は進んでいないが、同疾患患者の血清に α -Syn が健常者に比べ高濃度存在することが報告されている。我々はこれまでに、細胞外 α -シヌクレインが S1P₁ 受容体に作用し、同受容体に関連した Gi タンパク質シグナルを遮断することを発見した。更に我々は S1P₁ 受容体に関連した Gi タンパク質シグナルがエキソソーム小胞への積荷 (α -シヌクレイン) 輸送に必須であることを見出している。本研究では α -Syn による S1P₁ 受容体 / Gi タンパク質シグナルの遮断によるレビー小体形成を実験的に証明することで、パーキンソン病の病態解析を行うことを目的にしている。

3. 研究の方法

<細胞外 α -Syn によるエキソソーム小胞への積荷(内在性 α -Syn)阻害の証明>

α -シヌクレイン-GST を α -Syn-mCherry 発現 SH-SY5Y 細胞に作用させ、MVE への積荷輸送として α -Syn-mCherry の MVE への集積を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、細胞外の α -Syn が細胞内の α -Syn-mCherry の MVE への輸送を阻害することを証明する。この際内在性 α -Syn 輸送を調べるために、実験で使用した細胞培養液からエキソソームを精製し、この中に含まれる α -シヌクレイン量を免疫プロット法にて定量する。内在性 α -Syn と α -Syn-mCherry は分子量の違いから区別する。また、陽性コントロールとしてエキソソーム小胞への積荷マーカーとして知られる CD63-mCherry を発現した細胞でも同様な実験を行い、 α -Syn-mCherry と比較した。

<S1P による各種タンパク質リン酸化酵素活性測定>

S1P の標的分子としてリソゾーム機能調節に関与することが知られるタンパク質リン酸化

酵素（cPKC, nPKC, aPKC, AKT など）に照準を合わせ、これらのタンパク質リン酸化酵素に対する特異的基質（酵素に存在する擬基質領域）をプローブに用い、スクリーニングを行った。このスクリーニングの原理は基質プローブがリン酸化を受けることにより引き起こされる構造変化を1分子 FRET による蛍光変化として検出するものである。S1P による活性化の際は予め細胞に caged S1P を細胞内に取り込ませた後、紫外線照射することにより S1P 刺激を行った。

4. 研究成果

パーキンソン病の病態解析に関しては、ほとんどの研究が全体の数%を占める家族性パーキンソン病（ α -SynやPARKIN等の変異による）をモデルにしているが、全体の9割以上を占める特発性パーキンソン病の病態解析は進んでいないのが現状である。我々は特発性パーキンソン病患者の血清や脳脊髄液中に健常者に比べ高濃度の α -Synが存在することをヒントに、細胞外の α -Synの機能を調べる過程で、偶然同タンパク質がS1P₁受容体の脱連関を引き起こすことを見出した。そこで本研究ではパーキンソン病の病態に於けるS1Pシグナルの関与を特に本疾患の原因タンパク質と考えられる α -Synの病態機能を中心にレビー小体形成メカニズムを解明することを目的に研究を進めてきた。初年度の研究結果から α -Synを細胞に添加することによりS1P₁受容体が細胞膜の「情報ステーション」脂質ラフト画分から駆逐されることにより、S1P₁受容体とGiタンパク質との脱連関（アンカップリング）が引き起こされることを見出した（1）。

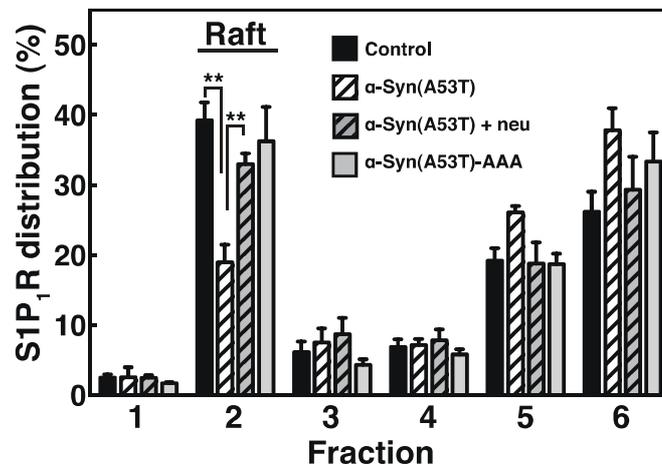


図1 細胞外 α -SynによるS1P₁受容体の脂質ラフト画分からの駆逐
細胞外 α -Synにより脂質ラフト画分(Fraction 2)でのS1P₁受容体の減少する。この効果は細胞をノイラミニダーゼ処理でシアル酸を減少させたり、 α -Synのガングリオシド結合領域を欠損させると消失した。

しかしながら、このアンカップリングは α -Synを細胞内で発現させた場合は認められず、細胞膜の外側に多く存在する脂質、特にガングリオシドとの結合が重要な役割を果たしているものと推測している。細胞外のタンパク質が細胞膜のガングリオシドと結合し、細胞の正常な情報伝達を攪乱する例は蜂毒マストパランなどでも見られる。また、パーキンソン病患者にガングリオシド製剤を投与すると患者の運動機能が亢進したとする報告もあり、今後更に細胞外 α -Synとガングリオシドの関係を解析する必要がある。令和元年度は本研究の最終年に当たることを鑑み、パーキンソン病に特徴的なレビー小体形成に於けるS1Pシグナルの関与を証明することに焦点を合わせた。レビー小体は α -Synを主要

な構成タンパク質として形成される層状構造を有する封入体であり、パーキンソン病のみならず、レビー小体認知症など近縁の疾患でも見られ、最近ではレビー小体を特徴とする疾患をまとめて α -Syn病として扱う方向もある。我々は昨年度までの研究結果から細胞外 α -Synが多小胞エンドソーム (MVE) 膜に存在するS1P₁受容体に作用し、同受容体に関連したGiタンパク質シグナルを遮断することを発見した。このことから、細胞外の α -SynによりMVEへの積荷(細胞内 α -Syn)輸送が阻害され細胞内 α -Synの濃度上昇をきたすことが示唆された。他方、MVEはオートファゴソームなどと共にリソゾームと融合し、分解されることも知られる。この分解系への影響も細胞内 α -Syn濃度の調節に重要な影響を有している。従来より酵母からヒトに於けるまで種を超えてリソゾーム機能が(液胞を含む)がS1Pシグナルにより調節されていることが知られる。また、これまでの国内外の研究からリソゾーム機能にはPKCやAKTなどのタンパク質リン酸化酵素が関与していることが知られる。そこでS1Pの標的分子としてこれらのタンパク質リン酸化酵素 (protein kinase, PK) に照準を合わせ、各種PKの特異的基質をプローブに用い、スクリーニングを行った。このスクリーニングの原理は基質プローブがリン酸化を受けることにより引き起こされる構造変化を1分子FRETによる蛍光変化として検出するものである。このセンサープローブを用いて我々は最近、S1Pと直接結合し、活性化されるPKとしてprotein kinase C (PKC) を同定した(2)。今後S1P/PKCシグナルを介したリソゾーム機能調節機構を解明し、細胞内 α -Synの濃度調節機構を解明してゆきたい。

<引用文献>

- (1) Badawy, S. M. M., Okada, T., Kajimoto, T., Hirase, M., Matovelo, S. A., Nakamura, S., Yoshida, D., Ijuin, T., and Nakamura, S. (2018) Extracellular α -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 293, 8208-8216
- (2) Kajimoto, T., Caliman, A.D., Tobias, I.S., Okada, T., Pilo, C.A., Van, A.N., Andrew McCammon, J., Nakamura, S., and Newton, A.C. Activation of atypical protein kinase C by sphingosine 1-phosphate revealed by an aPKC-specific activity reporter. *Sci Signal*, 12, pii: eaat6662 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Badawy Shaymaa Mohamed Mohamed, Okada Taro, Kajimoto Taketoshi, Hirase Mitsuhiro, Matovelo Shubi Ambwene, Nakamura Shunsuke, Yoshida Daisuke, Ijuin Takeshi, Nakamura Shun-ichi	4. 巻 293
2. 論文標題 Extracellular α -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8208 ~ 8216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.001986	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 Kajimoto T, Caliman AD, Tobias IS, Okada T, Pilo CA, Van AN, Andrew McCammon J, Nakamura SI, Newton AC	4. 巻 12(562)
2. 論文標題 Activation of Atypical Protein Kinase C by Sphingosine 1-phosphate Revealed by an aPKCspecific Activity Reporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 eaat6662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aat6662.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村俊一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 337
3. 書名 セラミド研究の新展開	

〔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
研究分担者	伊集院 壮 (Ijuin Takeshi) (00361626)	神戸大学・医学研究科・助教 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梶本 武利 (Kajimoto Taketoshi) (00509953)	神戸大学・医学研究科・助教 (14501)	
研究分担者	岡田 太郎 (Okada Taro) (80304088)	神戸大学・医学研究科・准教授 (14501)	