

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500331

研究課題名 (和文) チロシン水酸化酵素の機能発現の新たな制御機構の解明と神経疾患治療法の開発

研究課題名 (英文) Elucidation of novel molecular regulatory mechanisms underlying tyrosine hydroxylase functional expression and development of therapeutics for the CNS neurodegenerative disorders

研究代表者 山國 徹 (YAMAKUNI TOHRU)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：30333793

研究成果の概要 (和文)：

中脳黒質ドパミン神経変性疾患であるパーキンソン病の新規治療法の開発を目指し、本研究では、私たちが発見したドパミン合成酵素チロシン水酸化酵素 (TH) の機能発現を増大させる新規制御因子 V-1 に着目して、V-1 による TH の制御機構を精査した。その結果、V-1、これに結合する細胞骨格制御因子 CapZ β_2 、および未熟な細胞の増殖・分化を制御する pref-1/DLK1 の発現を抑えると、TH の転写活性が抑制され、さらに TH タンパク質レベルの低下が認められた。また、V-1 と CapZ β_2 の発現を抑えると pref-1/DLK1 の発現が低下した。つまり、V-1 による TH 遺伝子発現制御には細胞骨格制御因子 CapZ を介した pref-1/DLK1 依存的なメカニズムが関与することを初めて突き止めた。

研究成果の概要 (英文)：

V-1 is 13 kDa protein with four ankyrin-repeats for specific molecular interaction with CapZ, an actin capping protein, which was originally identified by us as a developmentally regulated protein in murine postnatal brains. Our recent *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that V-1 can positively control gene transcription of tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme for catecholamine biosynthesis, thereby promoting catecholamine production in catecholaminergic cells. In the present study, we tried to elucidate the molecular mechanism underlying control of TH gene expression by V-1 in PC12D cells, a rat adrenal pheochromocytoma cell line endogenously expressing TH protein, using siRNAs for V-1, CapZ and pref-1/DLK1, because the pref-1/DLK1 gene expression is observed to be up-regulated by V-1 in MC3T3-G2/PA6 cells, a mouse preadipocyte cell line. Knockdown of V-1 and CapZ with each siRNA for the both genes resulted in a decrease in TH protein level, accompanied by down-regulation of the expression of pref-1/DLK1 protein, whereas actin protein level showed no changes, as assayed by Western blot analyses. Consistently, it was shown that knockdown of pref-1/DLK1 caused decreased expression of TH protein. Moreover, TH gene transcription is decreased by knockdown of V-1, CapZ and pref-1/DLK1 with each of siRNAs for the three genes, when determined by reporter gene assay. These findings suggest that V-1 may control TH gene expression via pref-1/DLK1 protein in co-operation with CapZ, the actin cytoskeletal regulator, in the CNS catecholaminergic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学 神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療

1. 研究開始当初の背景

私たちは、独自のアプローチで発見した中脳黒質ドパミン神経細胞を含む神経系や内分泌系で発現する、新規タンパク質 V-1 がカテコラミンの生合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) 等の遺伝子発現の増強によりカテコラミンの合成を促進し、その一方で神経幹細胞から神経細胞を新生させることを見出した。そこで、本タンパク質をパーキンソン病 (PD) の治療法の開発に応用することを考えた。

2. 研究の目的

TH の機能発現の新規制御因子として働く V-1 に着目して、それによる TH の機能発現の新しい制御機構の解明と本タンパク質の生理機能に関する新しいアイデアを基盤とする PD の治療法の開発を目指とした。

3. 研究の方法

PC12D 細胞を 2×10^5 cells/35-mm dish で播種し 2 日間培養後、オフターゲット効果のないラット V-1、CapZ β_2 および、pref-1/DLK1 の siRNA で 2 日間処置しノックダウンした。なお、ネガティブコントロール siRNA としては、ヒト、マウスおよびラットの既知遺伝子の配列に対して相同性を有しない配列を選択し、設計されたノンターゲットネガティブコントロールを用いた。各 siRNA でのノックダウンの効果は RT-PCR およびウエスタンブロット法で確認した。また、ノックダウンの TH の転写活性への効果の評価にはレポーター遺伝子アッセイ法を用いた。なお、アクチン線維は Alexa Fluor 546 標識ファロイジンで染色した。

4. 研究成果

(1) V-1 結合タンパク質である細胞骨格制御因子 CapZ $\alpha\beta$ はアクチン線維の一方の末端 (プラス端) に結合してその線維末端へのアクチンモノマーの付加を阻害する。他方、アンキリンリピート・タンパク質である V-1 は、副腎褐色細胞腫由来細胞において、そのリピート配列を介して CapZ に結合してそのアクチン結合部位をマスクする。これにより、CapZ はアクチン線維末端に結合できなくなる。その結果、細胞内には CapZ フリーのアクチン線維の量が増え、アクチンモノマーが付加され易くなり、アクチン線維形成が促進される。2010 年私たちはこのような V-1 の作用メカニズムを名古屋大学と共同で世界で初めて解明し、その成果を論文発表した (*PLoS Biology* 8(7): e1000416, 2010)。

(2) V-1、CapZ β_2 および、pref-1/DLK1 のノックダウンの TH 転写レベルへの影響を検討するため、各 siRNA とラット TH 遺伝子の転写開始点から上流 9 kbp のプロモーター領域を持つレポーター遺伝子 pTH-Luc をコトランスフェクションして、48 時間後 Luc の活性を測定した。その結果、V-1、CapZ β_2

および pref-1/DLK1 のノックダウンにより TH 転写活性は顕著に抑制され、TH タンパク質レベルの低下も認められた。また、V-1 および CapZ β_2 のノックダウンは pref-1/DLK1 の発現レベルを低下させた。さらに、V-1 ノックダウンは細胞内ドパミン含量を有意に低下させた。つまり、V-1 による TH 遺伝子発現制御には CapZ 依存的なメカニズムが存在すること、これには pref-1/DLK1 が関与することを突き止めた。V-1 トランスジェニックマウスでは TH タンパク質レベルが上昇することから、本発見は V-1/CapZ 複合体による TH 遺伝子発現調節機構、すなわち細胞骨格制御因子によるドパミン合成酵素 TH の転写制御に関わる新たな生体内調節機構の存在が示唆された。

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 14 件)

1. Nakanishi K, Kawahata I, Sun W, Wang Y, Yoshida M, Ohizumi Y and Yamakuni T. Shishihakuhito, a traditional Chinese medicine for atopic dermatitis, suppresses NGF-induced neurite extension by inhibition of MEK/ERK signaling in PC12D cells. *J. Trad. Med.* **28**, 16-21 (2011). 「査読有」
2. Takeda T, Minakata S, Kawahata I, Kitazawa M, Koike R, Narita A, Ota M, Yamakuni T, Maeda Y, and Nitani Y. Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation—steric and allosteric inhibition. *PLoS Biology* **8**(7): e1000416 (2010). 「査読有」
3. Kakizaki A, Oka N, Tachikawa E, Miyate Y, Takahashi K, Yamamoto T, Taira E, Ohizumi Y, and Yamakuni T. V-1, a Positive Regulator of Tyrosine Hydroxylase Gene Expression, Promotes Maitotoxin- and Palytoxin-induced Norepinephrine Secretion in PC12D Cells. *Pharmacometric* **78**, 67-71 (2010). 「査読有」
4. Zhang H, Toyohira Y, Ueno S, Shinohara Y, Itoh H, Furuno Y, Yamakuni T, Tsutsumi M, Takahashi K and Yanagihara N. Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *J. Neurochem.* **114**, 1030-1038 (2010). 「査読有」
5. 山國 徹

- アミロイドβペプチドの凝集・毒性発現の分子メカニズムの解明と低分子化合物による阻害:アルツハイマー病の克服に向けて 薬学雑誌 **130**, 493-494 (2010) 「査読有」
6. 山國 徹、中島 晶、大泉 康
陳皮の抗認知症成分ノビレチンによるアミロイドβペプチド(Aβ)の神経毒性発現抑制とAβ誘発性記憶障害改善 薬学雑誌 **130**, 517-520 (2010). 「査読有」
 7. Tagaya S, Suetake Y, Yoshida K, Shimura S, Ohizumi Y and Yamakuni T. Search for Herbal Extracts with the Activity to Stimulate Tyrosine Hydroxylase Gene Transcription in PC12D Cells. *Pharmacometrics*, **77**, 131-135 (2009). 「査読有」
 8. Nakajima A., Saigusa D., Tetsu N., Yamakuni T., Tomioka Y. & Hishinuma T. Neurobehavioral effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, in mice. *Toxicol. Lett.* **189**, 78-83 (2009). 「査読有」
 9. Md. Al Rahim, Nakajima A., Saigusa D., Tetsu N., Maruyama Y., Shibuya, M., Yamakoshi H., Tomioka Y., Iwabuchi Y. Ohizumi Y. & Yamakuni T. 4'-Demethylnobiletin, a bioactive metabolite of nobiletin enhancing PKA/ERK/CREB signaling, rescues learning impairment associated with NMDA receptor antagonism via stimulation of the ERK cascade. *Biochemistry* **48**, 7713-7721 (2009). 「査読有」
 10. Yamamoto Y., Shioda N., Han F., Moriguchi S., Nakajima A., Yokosuka A., Mimaki Y., Sashida Y., Yamakuni T., Ohizumi Y. & Fukunaga K. Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation. *Brain Res.* **1292**, 218-229 (2009). 「査読有」
 11. Wakabayashi M., Sakurai E., Yanai K., Umemura K., Yoshida M., Ohizumi Y. & Yamakuni T. Shishihakuhto, a traditional Chinese medicine for atopic dermatitis, inhibits IgE-mediated histamine release from rat RBL-2H3 basophilic leukocyte cells. *J. Trad. Med.*, **26**, 44-49, (2009). 「査読有」
 12. Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T & Ohizumi Y Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and Aβ pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 739-744 (2008). 「査読有」
 13. Md. Al Rahim, Nakajima A, Misawa N, Shindo K, Adachi K, Shizuri Y, Ohizumi Y & Yamakuni T. A novel diol-derivative of chalcone produced by bioconversion, 3-(2,3-dihydroxyphenyl)-1-phenylpropan-1-one, activates PKA/MEK/ERK signaling and antagonizes Aβ-inhibition of the cascade in cultured rat CNS neurons. *Eur.J.Pharmacol.* **600**, 10-17 (2008). 「査読有」
 14. Matsuzaki, K., Miyazaki, K., Sakai, S., Yawo, H., Nakata, N., Moriguchi, S., Fukunaga, K., Yokosuka, A., Sashida, Y., Mimaki, Y., Yamakuni T. & Yasushi Ohizumi, Y. Nobiletin, a citrus flavonoid with neurotrophic action, augments protein kinase A-mediated phosphorylation of the AMPA receptor subunit, GluR1, and the postsynaptic receptor response to glutamate in murine hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, **578**, 194-200 (2008). 「査読有」
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 川畑伊知郎、森田淳一、山國 徹 新規アクチンダイナミックスの制御因子V-1/CapZ 複合体によるチロシン水酸化酵素の発現制御機構 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 23 日 (横浜)
 - ② 川畑伊知郎、森田淳一、山國 徹 V-1/CapZ によるアクチンダイナミックスの制御機構とチロシン水酸化酵素の発現調節の関連性 第 49 回日本薬学会東北支部大会 2010 年 10 月 24 日 (郡山)
 - ③ 山國 徹 ノビレチンの抗アルツハイマー病活性を薬効基盤とする漢方薬・陳皮による認知症克服へのアプローチ 第 31 回和漢医薬学総合研究所特別セミナー (招待講演) 2010 年 10 月 22 日 (富山)
 - ④ 森田淳一、金京梅、中島晶、阿部誠也、山岸祐輔、陳嘉春、大泉康、富岡佳久、山國 徹 CapZ を介したチロシン水酸化酵素遺伝子発現の新規調節メカニズムの解析 第 130 回日本薬学会年会 2010 年 3 月 28 日 (岡山)
 - ⑤ 森田淳一、中島晶、阿部誠也、山岸祐輔、金京梅、陳嘉春、大泉康、富岡佳久、山國 徹 チロシン水酸化酵素遺伝子発現調節機構における Ank リピートを持つ新規促進因子 V-1 の作用メカニズムの生化学的・分子生物学的解析 第 48 回日本薬学会東北支部大会 2009 年 10 月 18 日 (仙台)
- [図書] (計 1 件)

- ① 日本薬理学会 実験薬理学シリーズ第1巻「創薬、育薬、病態解明のための実践行動薬理学」(金芳堂) 山國 徹, 中島 晶, 大泉 康 「陳皮成分 nobiletin の抗認知症作用の行動薬理的証明と機能性食品開発への応用」(2010)

[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

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山國 徹 (YAMAKUNI TOHRU)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：30333793

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

蠣崎 淳 (KAKIZAKI ATSUSHI)
岩手医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70458173