

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年度 ~ 2010 年度

課題番号：20590999

研究課題名 (和文)

パーキンソン病における p62 による蛋白 sequestration とオートファジー

研究課題名 (英文)

p62-induced protein sequestration and autophagy in Parkinson's disease pathogenesis

研究代表者 中曾 一裕 (NAKASO KAZUHIRO)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：30379648

研究成果の概要 (和文)：パーキンソン病(PD)に代表される神経変性疾患の多くは、剖検脳において神経細胞内に各種凝集体を認めることを特徴とする。p62(A170)は凝集体の構成蛋白であり、不要な蛋白を一カ所に集め (sequestration) , オートファジーによる分解へ誘導すると考えられる。本研究で、プロテアソーム阻害下、あるいは α -synuclein 過剰発現下において、p62(A170)が転写レベルで誘導されることを明らかにした。また、p62(A170)が含まれる凝集体には LC3 などオートファジー関連因子も共存していることを示した。

研究成果の概要 (英文)：Most neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD) show neuronal inclusion body in the patient's brain. p62(A170) is one of the component proteins of the inclusion body, and it is believed that it plays an important role in the step of protein sequestration and induces unfolded proteins to the proteolysis by autophagy. In the present study, we clarified that p62(A170) was induced in the transcription level by proteasome inhibition or overexpression of alpha-synuclein. Furthermore, autophagy-related molecules, such as LC3, were colocalized with p62(A170) existing inclusion body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：p62(A170), Lewy 小体, 凝集体, sequestration, オートファジー, パーキンソン病,

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)に代表される神経変性疾患の多くは、剖検脳において神経細胞内に各種凝集体を認めることを特徴とする。これまで遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子産物

が各々の凝集体の構成成分であることが相次いで報告され、これらの凝集体の構成成分や形成機序を検討することは、病態の本質を理解する上で、極めて有用な戦略であると考えられる。申請者は 1996 年以来、筑波大学・

石井らとともに中枢神経系における p62 (A170)の研究を行ってきた。このタンパク質は元来、酸化ストレスにより誘導される分子として単離され、その後神経分化シグナルとの関連、抗アポトーシス効果などの報告が内外より相次いで出された。さらに近年申請者をはじめ多くの施設から、神経変性疾患における細胞内凝集体の構成成分であることが報告され、様々な変性疾患の凝集体・封入体形成における普遍的、共通メカニズムに p62(A170)が関連するのではないかと注目されている。申請者らのこれまでに発表した p62(A170)に関する論文も国内外から大きな注目を受けた(Nakaso K, Brain Res 2004;1012:42-51, Nakano T, Acta Neuropathol 2004;107:359-364, Nakaso K, 2006 BBRC;339:915-922)。さらに、p62 (A170)がオートファジー関連分子 LC3 と結合する事から、ユビキチンプロテアソーム系のみならず、オートファジーとも深く関与している可能性が示唆されており (Bjorkoy G, J cell Biol, 2005;171:603-614, Pankiv S, J Biol Cell 2007;282:24131-24145), 両タンパク分解系と凝集体形成の関連の中で、重要な役割を果たしていると考えられている。

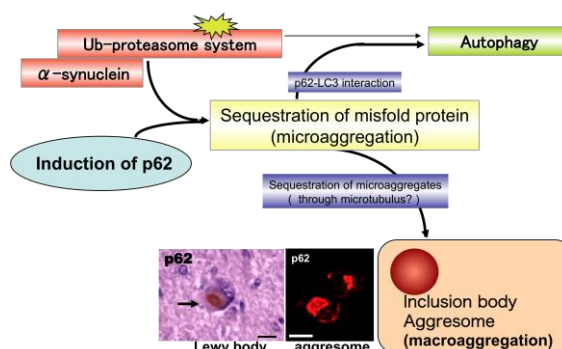
2. 研究の目的

神経変性疾患における細胞内凝集体の存在意義については未だ不明の点が多い。申請者のこれまでの研究で、PD モデルでは p62(A170)は凝集体形成促進の方向に作用し、細胞保護的な挙動を示した。ただ、未だその形成機序、存在意義については謎が多く、検討すべき点が多々残る状況であるが、申請者はこれまでの研究の流れの中から、p62(A170)は細胞内における不要蛋白を一ヶ所に誘導するような機能、すなわち“sequestration”の機能を有していると考えている。実際、細胞モデルでは p62(A170)を抑制すると、凝集体形成が阻害され、細胞毒性に脆弱になる。また、申請者は学会(MDSJ2007)において、p62(A170)によるプロテアソーム機能低下時の不要タンパク sequestration は、オートファジーによる分解へ効率よく導くための一種のストレス応答現象である可能性について発表した。

1990年代後半から、神経変性疾患におけるユビキチンプロテアソーム系の異常が注目を浴び、近年同様にオートファジー(ライソソーム系)異常による神経変性・細胞内凝集体形成が大きな注目を浴びている。実際には、上記2大タンパク分解系は相互にバランスをとりながら機能しているはずであり、申

請者は p62(A170)が sequestration 現象を介してオートファジーへの効率よい誘導を行っている可能性を想定し、その過程で p62(A170)-LC3 結合が重要ではないかと考えるに至っている。今回、培養細胞実験および p62(A170)KO マウスの実験により、p62(A170)の挙動を通じて、細胞レベルにとどまらず、臓器・個体レベルで p62(A170)によるタンパク sequestration とオートファジーの関連が明らかになることが期待される。

Schematic diagram of the role of p62 on protein degradation and on formation of inclusion body



3. 研究の方法

[1]実験的細胞内凝集体モデルを用いた研究

- 1)プロテアソーム阻害下での不要タンパク sequestration 機構の解明
- 2)p62(A170) 過剰発現細胞を用いた sequestration 機構の解明
- 3)α synuclein 過剰発現細胞を用いたタンパク sequestration 機構の解明
- 4)変異ユビキチン発現細胞を用いたタンパク sequestration 機構の解明

[2]p62(A170)KO マウスを用いた検討

- 1)p62(A170)KO マウス由来の皮膚線維芽細胞を用いた検討
- 2)p62(A170)KO マウス個体を用いた検討

[3]病理切片, 患者サンプルを用いた検討

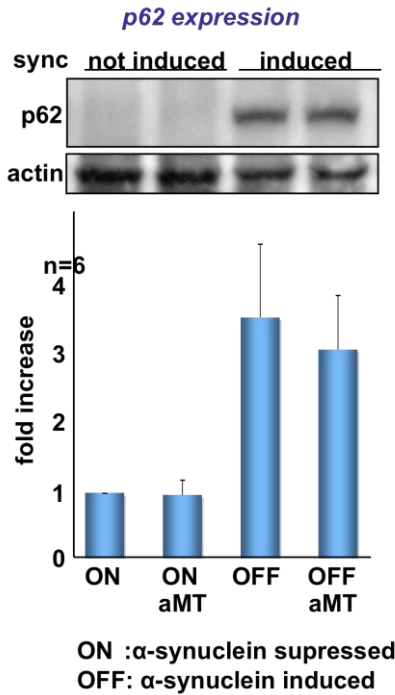
[4]p62(A170)発現増加作用のある薬剤の検索

4. 研究成果

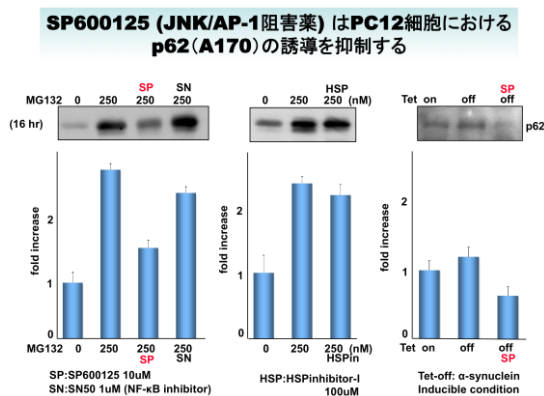
[1]実験的細胞内凝集体モデルを用いた研究

著者はこれまでに PC12 細胞を用い、プロテアソーム阻害による凝集体モデルを論文報告している。また、PC12 細胞に p62DsRed を恒常発現し、蛍光顕微鏡下で容易に

p62 (A170)の発現状況・局在を観察できる細胞株をすでに確立した。さらにαシヌクレイン発現を薬剤で調節可能なサイボウ株を樹立した。これらのモデルを用い、凝集体形成過程で p62 (A170)の発現量や細胞内分布の変化とともに、オートファジー関連分子との相互作用を検討した。αシヌクレイン過剰発現によりプロテアソーム活性が抑制され、p62 (A170)の発現量が上昇した。

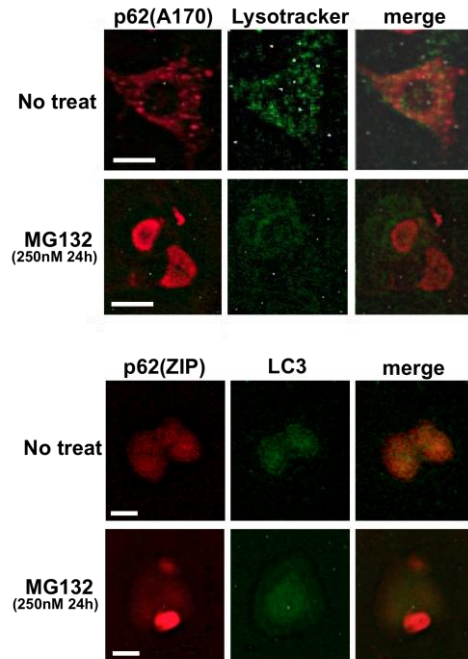


さらにαシヌクレインは主にリソソーム系(オートファジー)によって分解されていることを明らかにした。



著者は、不要なタンパクが貯留した際に一種のストレス応答として p62 (A170)が転写レベルで発現誘導される事を学会報告した。これまでに p62 の調節転写因子として知られる Nrf2 ではなく、むしろ他の転写因子 (MAPK の下流の転写因子) によって調節

されている事が示唆された。また、p62 (A170)を含む凝集体はオートファジー関連因子である LC3 やリソソームマーカー、またオートファジーとの関連が示唆されている K63 ポリユビキチンと共存していることを示した。



[2] p62 (A170) KO マウス個体および皮膚線維芽細胞を用いた検討

筑波大学および複数の施設と共同で KO マウスを用いた研究を行い、検討中である。

また、筑波大学より p62 (A170) KO マウス由来の皮膚線維芽細胞の供与を受けている。KO マウス由来の細胞は、p62 (A170)の凝集体形成、分解過程への関わりを観察する上で、重要な情報を与える。同細胞を用い、p62 (A170) KO マウス線維芽細胞では凝集体形成状況が異なる可能性を示した。

[3] 病理切片を用いた検討

著者はこれまでに PD におけるレビー小体、認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症における神経細胞封入体、アルツハイマー病における神経原繊維変化において p62 陽性であることを示している。オートファジー関連因子との共存については検討中である。

[4] p62 (A170) 誘導剤の探索。

著者はこれまでにパーキンソン病治療薬 deprenyl (セレギリン) が転写因子 Nrf2 を介して p62 (A170)の発現誘導をもたらすことを示している。他の既存のパーキンソン病治療薬についても類似の検討を行ったが、有意な発現誘導は認められなかった。

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 5 件)

(1) Ren Y, Jiang H, Ma D, Nakaso K, Feng J.
Parkin degrades estrogen-related receptors to limit the expression of monoamine oxidases. Hum Mol Genet. 2011;20:1074-83.

(2) Ito S, Nakaso K, Imamura K, Takeshima T, Nakashima K.

Endogenous catecholamine enhances the dysfunction of unfolded protein response and alpha-synuclein oligomerization in PC12 cells overexpressing human alpha-synuclein. Neurosci Res. 2010;66:124-130.

(3) Ren Y, Jiang H, Yang F, Nakaso K, Feng J.
Parkin protects dopaminergic neurons against microtubule-depolymerizing toxins by attenuating microtubule-associated protein kinase activation. J Biol Chem. 2009; 284: 40009-40017.

(4) Imamura K, Takeshima T, Nakaso K, Ito S, Nakashima K.
Pramipexole has astrocyte-mediated neuroprotective effects against lactacystin toxicity. Neurosci Lett. 2008; 440: 97-102.

(5) Nakaso K, Ito S, Nakashima K.
Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. Neurosci Lett. 2008; 432: 146-150.

[学会発表] (計 6 件)

(1) Kazuhiro Nakaso, Satoru Ito, Keiko Imamura, Koji Doi, Takao Takeshima, Tetsuro Ishii, Kenji Nakashima,
The role of p62(A170) on the formation of intracellular aggregates in Parkinson's disease model.
SfN 38th Annual Meeting Neuroscience 2008
2008. Nov 15-19 (Washington DC, USA)

(2) 中曾一裕, 伊藤悟, 竹島多賀夫, 石井哲郎, 中島健二
 α -シヌクレイン, ハンチンチン過剰発現におけるプロテアソーム活性低下と p62(A170)の発現誘導
第 82 回日本生化学会大会 2009.10.21-24
(神戸)

(3) 中曾一裕, 伊藤悟, 中島健二

Toxicity, Oligomerization and Accumulation of alpha-synuclein in Catecholaminergic cells
第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12.9-12
(横浜)

(4) Kazuhiro Nakaso
Toxicity of Alpha-synuclein in Dopaminergic Cells: A Candidate of Therapeutic Target for Parkinson's Disease
Bit's 2nd Annual International Congress of Antibodies-2010
Mar 24-26, Beijing, China (シンポジウム)

(5) 中曾一裕, 片野諭, 山下敦, 石井哲郎, 松浦達也
パーキンソン病関連毒性下における p62(A170)の発現誘導と細胞保護作用
第5回臨床ストレス応答学会 2010.11.19-20
(徳島)

(6) 中曾一裕, 山下敦, 片野諭, 寺岡麻梨, 関子哲平, 楠本智章, 松浦達也
カテコラミン細胞における α -synucleinの毒性, 重合化, 蓄積
第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同学会 (BMB2010) 2010.12.7-10
(神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中曾 一裕 (NAKASO KAZUHIRO)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号 : 30379648

(3) 連携研究者

伊藤 悟 (ITO SATORU)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 20448195
(H20→H21)