

機関番号：24303
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591007
 研究課題名（和文） α -シヌクレイン分解酵素ニューロシンの細胞内プロテアーゼ特性とその制御因子の検討
 研究課題名（英文）Exploration of intracellular protease property and control factors of neurosin with α -synuclein degrading activity
 研究代表者
 徳田 隆彦（TOKUDA TAKAHIKO）
 京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号：80242692

研究成果の概要（和文）： α -シヌクレインの分解活性を有するニューロシンの酵素学的特性および活性に影響を与える因子を培養細胞を用いて検討した。ニューロシンは細胞内では主として小胞体に局在し、培養上清中に分泌された。細胞外に分泌されたニューロシンには、セリンプロテアーゼ活性が認められ、 α -シヌクレイン分解活性を有していた。一方で細胞内に存在するニューロシンには酵素活性は認められなかった。ニューロシンは主として細部外プロテアーゼとして α -シヌクレインの分解に関与している可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated proteolytic activity and control factors of human neurosin using cultured cells. Heterologous expression of pre-pro-neurosin was localized to the endoplasmic reticulum and secreted. Extracellular neurosin had protease activity and can degrade α -synuclein. Meanwhile, intracellular neurosin did not have α -synuclein-degrading activity. These findings suggest that neurosin is involved in degradation of α -synuclein as an extracellular protease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経内科学、蛋白化学、細胞生物学
 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： α -シヌクレイン、ニューロシン、酵素、パーキンソン病、蛋白質分解

1. 研究開始当初の背景

(1)近年の生化学的及び分子遺伝学的研究によって、 α -シヌクレインがパーキンソン病の発症機序において重要な分子であることが示されている。(2)また、 α -シヌクレイン遺伝子の重複変異を有する家系の検討では、正常の α -シヌクレインでも過剰に発現するとパーキンソン病の原因になり、 α -シヌクレインの発現量が臨床的な重症度を決定することが報告されている。(3)一方で、パーキンソン病患者の大部分を占める孤発性パーキンソン病患者では α -シヌクレインの過剰産生は報告されておらず、その発症

には α -シヌクレインの産生と分解の不均衡状態が関与していると考えられる。(4)我々は α -シヌクレインの分解過程とパーキンソン病の発症との関連に注目し、従来から α -シヌクレインの分解活性を有するセリンプロテアーゼであるニューロシンの役割を試験管内の実験で検討してきた。その結果、ニューロシンは、試験管内で合成 α -シヌクレイン蛋白とインキュベーションすると、 α -シヌクレインの重合中心であるNACドメインを切断することを明らかにした。

2. 研究の目的

(1)ニューロシンの細胞内局在および細胞内での動態をヒト・ニューロシンを発現させた培養細胞系を用いて検討した。

(2)当初はニューロシンは細胞内で機能すると考えていたが、(1)の研究の過程でニューロシンが主として細胞外に分泌されることが明らかになったため、細胞内に存在するニューロシンおよび細胞外に分泌されたニューロシンのセリンプロテアーゼ活性を検討した。

(3)細胞内および細胞外のどちらのニューロシンが α -シヌクレイン分解活性を有するのかが検討した。

3. 研究の方法

(1)培養細胞系におけるニューロシンの細胞内局在および細胞内での動態の検討。Pre-pro-ニューロシンおよび pre-pro-ニューロシンと EGFP の融合蛋白質発現ベクター、さらに α -シヌクレイン発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクトして、ニューロシンおよびニューロシン-EGFP 発現細胞の細胞抽出液および 12 時間後、24 時間後の無血清培養上清を抗ニューロシン抗体 (MAB2008) によるウエスタンブロッティングで検討した。ニューロシン-EGFP 融合蛋白質を発現させた HEK293T 細胞では、ニューロシンの細胞内局在部位を蛍光顕微鏡で観察して解析した。

(2)ニューロシン発現細胞の培養上清のセリンプロテアーゼ活性の定量。培養上清を蛍光試薬を付加したセリンプロテアーゼの基質ペプチド (Boc-Gln-Ala-Arg-MCA、ペプチド研究所) と反応させ、酵素反応によって遊離した 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) を蛍光分光光度計を用いて励起波長 380nm、蛍光波長 440nm で測定した。

(3)培養上清中のニューロシンによる α -シヌクレイン分解過程の検討。合成 α -シヌクレインを上清中に添加し、ウエスタンブロッティングによって検証した。抗 α -シヌクレイン抗体は抗 α/β シヌクレイン・ポリクローナル抗体 N-19 (サンタクルーズ社) を用いた。

(4)細胞内ニューロシンのセリンプロテアーゼ活性はゼラチン・ザイモグラフィによって評価した。

(5)細胞内ニューロシンによる α -シヌクレイン分解活性の検討。pre-pro-ニューロシンと α -シヌクレインを HEK293T 細胞に共発現させて、 α -シヌクレインの分解断片の有無をウエスタンブロッティングによって検討した。

4. 研究成果

(1)培養細胞系におけるニューロシンの細胞内局在および細胞内での動態の検討。

①ニューロシンおよびニューロシン-EGFP 発現細胞におけるニューロシンの細胞内局在を蛍光顕微鏡によって観察したところ (図 1)、ニューロシンは ER マーカーと局在が一致していたが、ミトコンドリアマーカーとは一致せず、ライソソームマーカーとは一部で局在性の一致が認められた。

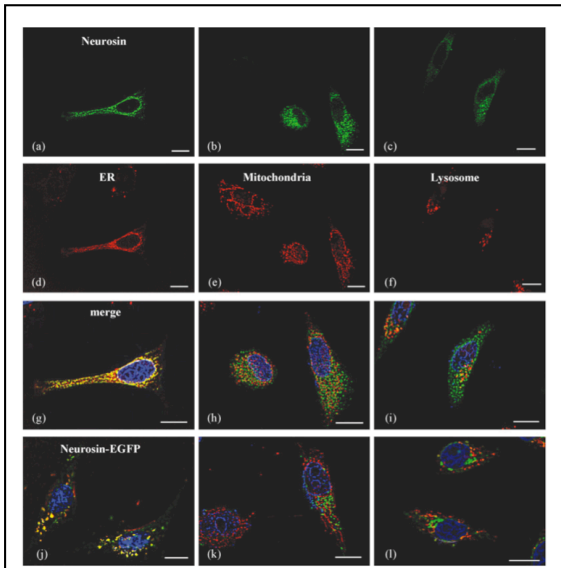


図 1. HeLa 細胞に発現させたニューロシン (a-i) およびニューロシン-EGFP (j-l)。ニューロシン抗体 (a-c)、小胞体マーカー (d,j)、ミトコンドリアマーカー (e,k)、ライソゾームマーカー (f,l) で細胞を染色。g-l はそれぞれのオルガネラマーカーと抗ニューロシン抗体染色像の重ね合わせ。

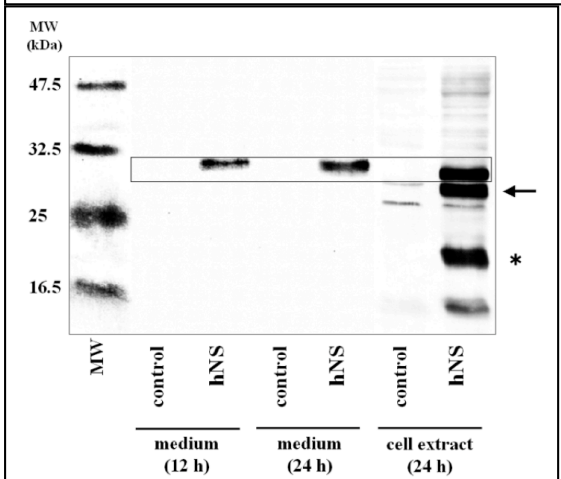


図 2. ニューロシン (hNS) を発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液 (cell extract) および培養上清 (medium) のウエスタンブロッティング

②これらの細胞の細胞抽出液および無血清培養上清のウエスタンブロッティング (図 2) では、細胞抽出液中にはニューロシンの全長に相当するバンド (図 2, 矢印) が検出され、さ

らにニューロシンが糖鎖修飾を受けたものと推測されるやや分子量の大きいバンドが検出された(図2, 四角枠)。培養上清中では後者のバンドのみが検出された(図2, 四角枠)。細胞内にはニューロシンの分解産物と推測される抗ニューロシン抗体陽性の断片ペプチドが検出された(図2, アスタリスク)。以上の結果より、ニューロシンは細胞内では主として小胞体に局在し、細胞外に分泌されることが確認された。

(2)ニューロシン発現細胞の培養上清のセリンプロテアーゼ活性の定量。ニューロシンをトランスフェクトした細胞の培養上清中にはセリンプロテアーゼ活性が検出された。一方、ニューロシン-EGFPをトランスフェクトした細胞では培養上清中にプロテアーゼ活性が検出できなかった。

(3)培養上清中のニューロシンによる α -シヌクレイン分解過程の検討。ニューロシン発現細胞の培養上清中に添加した合成 α -シヌクレインは経時的に減少した(図3)。すなわち、細胞外に分泌されたニューロシンは α -シヌクレイン分解活性を有していることが確認された。

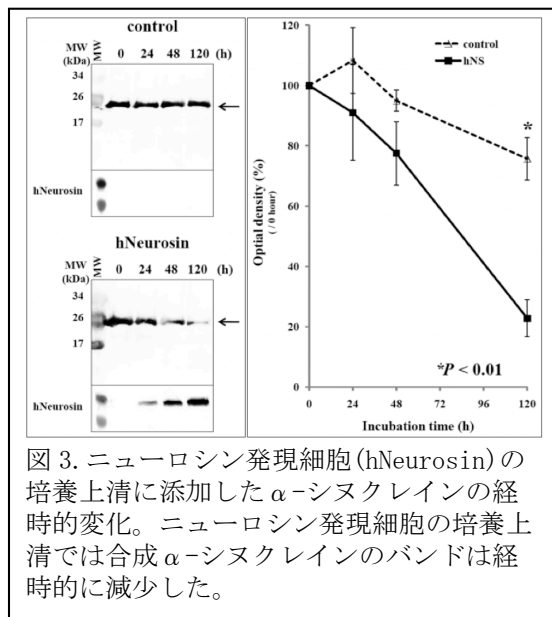


図3. ニューロシン発現細胞(hNeurosin)の培養上清に添加した α -シヌクレインの経時変化。ニューロシン発現細胞の培養上清では合成 α -シヌクレインのバンドは経時的に減少した。

(4)細胞内ニューロシンのセリンプロテアーゼ活性。ゼラチン・ザイモグラフィーによって検討した結果では、培養上清中のニューロシンに相当するバンドではゼラチンに対する分解が認められるのに対し、細胞抽出液中のニューロシンにはゼラチンに対する分解反応は認められなかった(図4)。

(5)細胞内ニューロシンによる α -シヌクレイン分解活性の検討。ニューロシンと α -シヌクレインを共発現させたHEK293T細胞のウェスタンブロットによる検討(図5)においても、細胞抽出液中に α -シヌクレインの分解産物は検出できなかった。以上から

細胞内のニューロシンは α -シヌクレイン分解活性も有していないと考えられた。

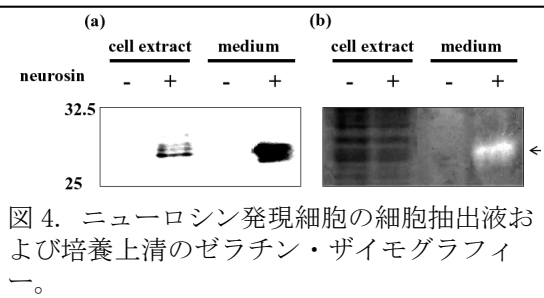


図4. ニューロシン発現細胞の細胞抽出液および培養上清のゼラチン・ザイモグラフィー。

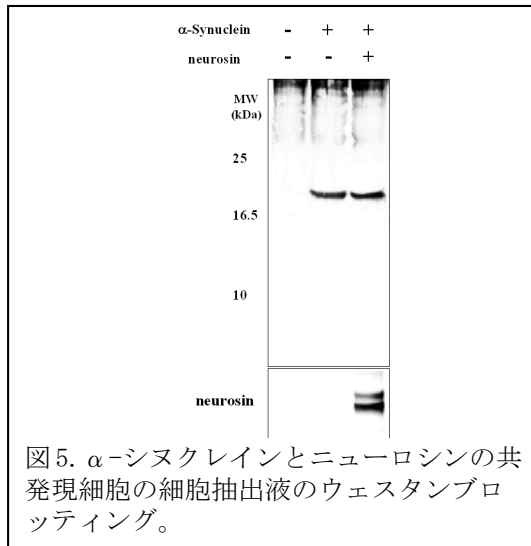


図5. α -シヌクレインとニューロシンの共発現細胞の細胞抽出液のウェスタンブロットティング。

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8件)

1. Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, (他6名): Detection of Elevated Levels of α -Synuclein Oligomers in CSF from Parkinson's Disease Patients. *Neurology* 75: 1766-1772, 2010. 査読有り
2. Tatebe H, Watanabe Y, Tokuda T (他4名, 7番目): Extracellular neurosin degrades α -synuclein in cultured cells. *Neurosci Res.* 67: 341-346, 2010. 査読有り
3. Kasuga K, Tokutake T, Tokuda T, (他5名, 5番目): Differential levels of α -synuclein, β -amyloid42, and tau in cerebrospinal fluids between patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81: 608-610, 2010. 査読有り
4. Noguchi-Shinohara M, Tokuda T, Yoshita M, (他5名): CSF α -synuclein levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Brain Res* 1251: 1-6, 2009. 査読有り
5. Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, (他6名):

Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol 117: 55-62, 2009. 査読有り

6. Kasai T, Tokuda T, Watanabe Y, (他4名): Cleavage of normal and pathological forms of alpha-synuclein by neurosin in vitro. Neurosci Lett 436: 52-56, 2008. 査読有り

[学会発表] (計4件)

1. 笠井高士, 徳田隆彦, 石神紀子, 中川正法, 坪井義夫: CJD患者髄液中では α -synucleinの断片ペプチドが増加している. 日本認知症学会学術集会(第27回), 前橋, 2008. 10. 10.
2. 建部陽嗣, 渡邊義久, 笠井高士, 徳田隆彦, 水野敏樹, 田中雅樹, 中川正法: Neurosinによる α -synuclein分解の解析. 日本神経科学大会(第32回), 名古屋, 2009. 9. 18.
3. 笠井高士, 建部陽嗣, 徳田隆彦, 渡邊義久, 田中雅樹: α -Synuclein分解酵素であるneurosinの細胞内動態の検討. カテコールアミンと神経疾患研究会(第17回), 東京, 2009. 4. 18.
4. 笠井高士, 建部陽嗣, 徳田隆彦, 石神紀子, 水野敏樹, 中川正法, 渡邊義久, 田中雅樹: α -synuclein分解酵素であるneurosinの細胞内動態の検討. 日本神経学会総会(第50回), 仙台, 2009. 5. 20.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 隆彦 (TOKUDA TAKAHIKO)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 80242692

(2) 研究分担者

渡邊 義久 (WATANABE YOSHIHISA)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50363990

水野 敏樹 (MIZUNO TOSHIKI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 30264782

中川 正法 (NAKAGAWA MASANORI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 50198040

(3) 連携研究者

笠井 高士 (KASAI TAKASHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 70516062