

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16142

研究課題名(和文) Inactivation of Tau oligomer toxicity by G3BP1 and USP10 in Alzheimer's disease

研究課題名(英文) Inactivation of Tau oligomer toxicity by G3BP1 and USP10 in Alzheimer's disease

研究代表者

アニシモフ セルゲイ (Anisimov, Sergei)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：70867572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病は、脳の黒質におけるドーパミン作動性神経細胞の細胞死を特徴とする。私たちは、ドーパミン神経細胞由来の細胞株において、USP10タンパク質が抗酸化遺伝子群の転写活性化因子であるNrf2を活性化し、ドーパミンによる活性酸素の産生と細胞死を抑制することを発見した。その際、USP10はリン酸化p62 (p62/Ser-349)の量を増加させ、このp62/Ser-349がNrf2の抑制因子であるKeap1の分解を誘導し、Nrf2を活性化していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスは、パーキンソン病を始めとする、多くの神経変性疾患の病因や病態に関与している。今回の成果は、USP10が神経細胞の抗酸化活性を活性化する重要な因子であることを明らかにした。また、USP10が酸化ストレスに起因する疾患の治療標的として有望であることも示した。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease is characterized by cell death of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the brain. We found that in a cell line derived from dopaminergic neurons, USP10 protein activates Nrf2, a transcriptional activator of the antioxidant genes, to suppress dopamine-induced reactive oxygen species production and cell death. USP10 increased the amount of phosphorylated p62 (p62/Ser-349), which induces the degradation of Keap1, a repressor of Nrf2, and activates Nrf2.

研究分野：Neuroscience

キーワード：USP10 Nrf2 p62 Parkinsons disease

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) とパーキンソン病 (PD) は、それぞれ認知症および運動障害を主症状とする神経変性疾患である。ユビキチン化されたタンパク質のオリゴマー (多量体) が神経細胞に対して毒性を示し、AD や PD を含む、いくつかの神経変性疾患の発症に大きな役割を果たすという証拠が蓄積されつつある。タウと α -シヌクレインは、それぞれ家族性/孤発性 AD と家族性/孤発性 PD の原因タンパク質である。他の神経変性疾患と同様に、ユビキチン化したタウや α -シヌクレインのオリゴマーは神経細胞に毒性を示し、神経細胞の機能障害や細胞死を引き起こし、それぞれ AD や PD を発症させる。しかし、PD や AD の神経細胞において、タンパク質オリゴマーの毒性がどのようにして不活性化されるのか、また、どのタンパク質がタンパク質オリゴマーの毒性を不活性化するのかは不明である。

我々は、USP10 と p62 タンパク質が、ユビキチン化タンパク質のオリゴマーを大きな凝集体 (アグリソーム) に取り込み、その毒性を不活性化することを報告した。アグリソームはユビキチン化されたタンパク質の凝集体であり、ストレスに曝された細胞において、核近傍の細胞質に形成される。その場合、p62 はユビキチンの受容体であり、ユビキチン化されたタンパク質に結合し、小さな凝集体を細胞質に数多く形成させた。USP10 は、p62 に結合し、p62 とユビキチン化タンパク質の小さな凝集体を融合させ、1 つの大きな凝集体 (アグリソーム) を形成させた。毒性を持つユビキチン化蛋白質のオリゴマーも、このアグリソームに取り込まれた (高橋, 2018)。一方で、G3BP1 タンパク質は USP10 と結合し、USP10/p62 によるユビキチン化タンパク質の凝集体 (アグリソーム) 形成を阻害することを報告した (Anisimov, 2019)。

さらに、我々は、酸化剤で処理した非神経細胞由来の培養株において、USP10 が活性酸素種 (ROS) の産生と ROS 依存性アポトーシスを抑制することを報告した (高橋, 2013)。

これらのことから、私たちは、USP10/p62/G3BP1 による活性酸素産生の抑制とアグリソーム形成の誘導が、酸化ストレス下での、タウあるいは α -シヌクレインオリゴマーによる神経細胞の細胞死の抑制に重要な役割を果たすと考えた。これらを踏まえて、本研究では、PD や AD などの神経変性疾患における、USP10/p62/G3BP1 の役割を検討する。

2. 研究の目的

PD はドーパミン作動性神経細胞の選択的細胞死を特徴とする神経変性疾患である。興味深いことに、ドーパミンはドーパミン作動性神経細胞で産生される神経伝達物質であるが、ドーパミンが神経細胞内に過剰に蓄積すると、活性酸素の産生と酸化ストレスを引き起こし、神経細胞に毒性を示し、神経細胞死を誘導する。また、この細胞死が PD の発症に深く関与することが示唆されている。本研究では、USP10 がドーパミンによる神経細胞株の活性酸素依存性アポトーシスを抑制するのかを調べた。

3. 研究の方法

- 1) 細胞: SH-SY5Y 細胞はドーパミン作動性神経に由来する細胞株である。
- 2) 細胞死の計測: ドーパミンによる細胞死は、細胞内の脱水素酵素活性から生存細胞数 (死細

胞数)を計測する CCK-8 法で定量した。アポトーシスは、アポトーシスの指標である切断型 Caspase3 の発現量を免疫染色法で定量し、評価した。

- 3) ノックダウンによる蛋白質の発現抑制: 目的とする蛋白質に対応する siRNA を SH-SY5Y 細胞に遺伝子導入し、siRNA の標的蛋白質の発現量を低下させた (ノックダウン, KD)。siRNA を導入した SH-SY5Y 細胞をドーパミンで処理し、細胞毒性を定量し、細胞死関連蛋白質の発現量をウエスタンブロット法で調べた。
- 4) USP10 と p62 の結合の計測: p62 と USP10 の相互作用は、細胞をドーパミンで処理し、細胞抽出液を作製し、特異抗体を用いた共免疫沈降法とウエスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

SH-SY5Y 細胞において、USP10 の siRNA を用いて USP10 の発現をノックダウン (USP10-KD) し、さらにドーパミンで処理した。ドーパミンは、SH-SY5Y 細胞にアポトーシスを誘導し、このアポトーシスは USP10 の発現低下により促進された (図 1)。また、この細胞死が抗酸化剤 (NAC) 処理により抑制されたことから、ドーパミンによるアポトーシスは活性酸素の産生に関連していることが示唆された。

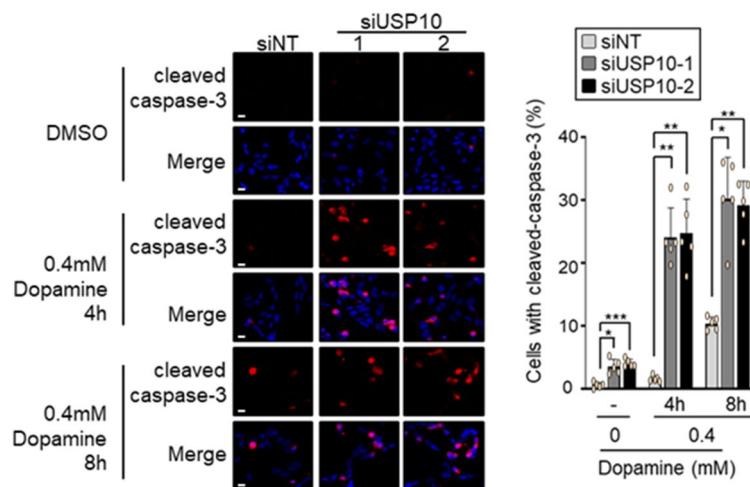


図 1. 神経細胞株で USP10 の発現が低下すると、ドーパミンによるアポトーシスが促進される。

Nrf2 は、酸化ストレスに応答し、抗酸化遺伝子群の発現を誘導する転写活性化因子である。また、Nrf2 が神経細胞の ROS 依存性細胞死を抑制することも知られている。Nrf2 活性は Keap1 タンパク質によって抑制され、p62 タンパク質によって活性化される。ドーパミンによる細胞死における Nrf2 と p62 の役割を調べるために、USP10-KD 細胞をドーパミンで処理し、Nrf2 と p62 のタンパク質量をウエスタンブロット法によって測定した。野生型細胞をドーパミンで処理すると、p62、Nrf2、HO-1 (Nrf2 の標的遺伝子) のタンパク質レベルが増加し、この増加は USP10-KD によって抑制された (図 2)。

SH-SY5Y のドーパミンによる細胞死は、USP10-KD と同様に、p62-KD あるいは Nrf2-KD によっても増加した。一方、ドーパミン処理による USP10-KD 細胞のアポトーシスは、Keap1-KD により減少した (図 3)。これらの結果から、USP10 は Nrf2 の抗酸化活性を促進することにより、ドーパミンによるアポトーシスを抑制し、神経細胞を保護するキープレイヤーであることが明らかとなった。

リン酸化した p62 (pp62/Ser349) は、リン酸化していない p62 よりも強く Keap1 に結合し、Keap1 の分解を誘導する。免疫沈降法を用いて、USP10-KD による pp62/Ser349 の量の変化を検

討した。ドーパミン処理の前後で、UP10-KD 細胞の pp62/Ser349 量は、野生型細胞よりも減少していた（図 4、黒矢印）。これらの結果は、USP10 が pp62/Ser349 の量を増加させることで Nrf2 活性を高めることを示唆している。

【今後の展望】

PD や AD などの神経変性疾患の病因や病態には、酸化ストレスが関与していることが広く知られている。本研究は、USP10 がドーパミン作動性神経細胞の酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することを明らかにした。従って、USP10 活性の低下が、PD や AD の病態を悪化させることが示唆される。また、Nrf2/Keap1/p62 システムに対する USP10 の活性が、PD,AD を始めとした酸化ストレス関連疾患の創薬ターゲットとしても有望であることを示した。

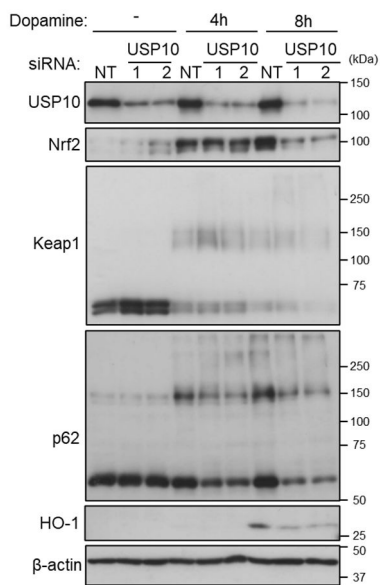


図 2. USP10 の発現低下により、ドーパミンによる Nrf2 と p62 レベルの上昇が抑制される。

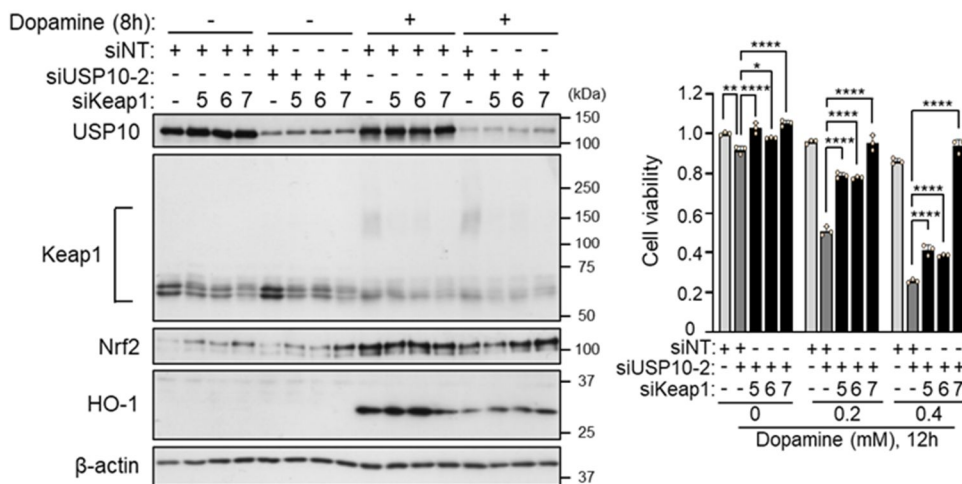


図 3. Keap1 の発現低下は、USP10 の発現低下によるドーパミン誘導性細胞死の増加を抑制する

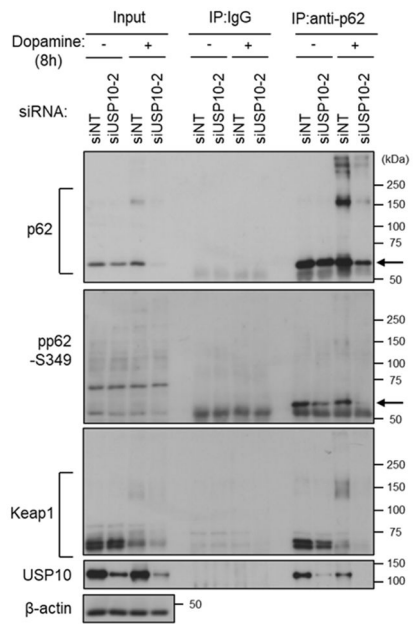


図 4. USP10 の発現が低下すると、リン酸化された p62 の量が減少する

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sango Junya, Kakihana Taichi, Takahashi Masahiko, Katsuragi Yoshinori, Anisimov Sergei, Komatsu Masaaki, Fujii Masahiro	4. 巻 298
2. 論文標題 USP10 inhibits the dopamine-induced reactive oxygen species-dependent apoptosis of neuronal cells by stimulating the antioxidant Nrf2 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101448 ~ 101448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101448	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山後 淳也、垣花 太一、葛城 美德、高橋 雅彦、Sergei Anisimov、小松雅明、藤井 雅寛
2. 発表標題 USP10はドーパミンが誘導する活性酸素依存性の神経細胞死をNrf2活性化によって抑制する
3. 学会等名 第43回神経組織培養研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山後 淳也、垣花 太一、葛城 美德、高橋 雅彦、Sergei Anisimov、小松雅明、藤井 雅寛
2. 発表標題 USP10はドーパミンが誘導する活性酸素依存性の神経細胞死をNrf2活性化によって抑制する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------