

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21711

研究課題名（和文）細胞質タンパク質の核蓄積を指標にした新規パーキンソン病環境因子探索

研究課題名（英文）Exploration of novel environmental factors of Parkinson's disease

研究代表者

古武 弥一郎（Kotake, Yaichiro）

広島大学・医系科学研究科（薬）・教授

研究者番号：20335649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本来細胞質で分解されるp62タンパク質が特定の条件下で核に蓄積するという知見を基に、p62が核蓄積を引き起こす条件を探索する系を確立した。現在のところ低濃度MPP+のみが再現性よく核蓄積を引き起こすことが明らかとなった。一方、p62の核における機能を探るため、p62と結合するタンパク質を探索したところ、p62結合タンパク質としてタンパク質Xが見出されたため、その結合部位を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p62は選択的オートファジーの基質であり、細胞内でさまざまな役割を有する。そのため、期間内に挙げた研究成果を基に本研究がさらに発展し、p62核蓄積がどのような物質、どのような条件で起こるかが判明して核蓄積がもたらす影響の全貌が明らかになると、細胞生物学的に未解明の現象を解明する手がかりとなることが考えられる。また、パーキンソン病をはじめとする関連疾患の病態解明などにつながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Based on the finding that p62 protein, which is originally degraded in the cytoplasm, accumulates in the nucleus under specific conditions, we have established a system to search for conditions under which p62 causes nuclear accumulation. Currently, only low concentrations of MPP+ are found to cause nuclear accumulation with good reproducibility. On the other hand, to explore the function of p62 in the nucleus, we searched for proteins that bind to p62 and found protein X as a p62-binding protein, and identified its binding site.

研究分野：神経毒性学

キーワード：p62 核蓄積

1. 研究開始当初の背景

多くの疾患は遺伝的素因と環境要因の両者により発症する。代表的な神経変性疾患であるパーキンソン病 (PD) も例外ではなく、数%の単一遺伝子変異を発症原因とする家族性 PD を除くほとんどが孤発性 (非遺伝性) PD である。家族性 PD の原因遺伝子がコードするタンパク質の機能解析を基に PD 発症原因を探る研究が盛んに行われているが、孤発性 PD 発症の環境因子はおそらく非常に数が多く、それらが複合的に作用して発症することが予想され、まったく見当がつかないのが現状である。

これまで PD 発症に関する環境因子としてさまざまな物質が研究されてきた。特に環境中、食品中に存在する神経毒性物質、農薬などは、PD 発症に関する可能性が考えられてきたが、PD 発症に関する有力な手がかりはまったく見出されていない。その理由として、環境因子を探索する系が存在しないことが挙げられる。このような背景の中で申請者は、PD モデル作製に使用されてきた MPP⁺ (MPTP の活性代謝物) を低濃度用いて、高濃度では起こらない現象を探索した。(Miyara *et al.*, *J. Neurochem.*, 2016; Sakamoto *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017) その結果、穏やかな細胞死が起きる特定の条件において、本来細胞質でオートファジーにより選択的に分解されるタンパク質 p62 が核に蓄積するという可能性を見出した。過去の論文を精査したところ、p62 タンパク質がオートファジーの基質として報告され注目される以前に、PD 患者死後脳のドパミン神経細胞の核に蓄積しているタンパク質の 1 つとして p62 が報告されていた。

2. 研究の目的

本研究は、p62 が核に蓄積する条件およびそのメカニズムを解明し、核における p62 の作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) p62 核蓄積が起こる実験系の構築
p62 核蓄積を簡単にモニターするため、GFP-p62 を細胞にトランスフェクションし、GFP の核蓄積を調べる実験系を構築した。実験にはトランスフェクション効率を考慮し、HeLa 細胞を用いた。この細胞を用いて
- (2) p62 核蓄積検出の自動化高速化
多数の化学物質を効率よくスクリーニングを行うため、High Content Screening 装置である Opera Phenix (Perkin Elmer) を用いてアッセイの自動化高速化を行った。
- (3) p62 結合タンパク質の同定
核内において p62 と結合するタンパク質は核蓄積の原因となったり、p62 核蓄積を制御したりしている可能性が考えられる。そこで、核内において p62 と結合するタンパク質を同定することにより、核における機能を推測することにした。リコンビナント p62 タンパク質と細胞可溶化液あるいは核抽出液をインキュベートし、電気泳動後、LC-MS/MS を用いた解析により p62 結合タンパク質 X を同定した。また、両者が細胞内で結合していることを調べるため、HA-p62 と FLAG-X を細胞に共発現させ共免疫沈降法を用いて確認した。
- (4) p62 結合タンパク質 X の p62 結合部位同定
p62 結合タンパク質 X が p62 タンパク質のどの部位に結合するかを明らかにするため、さまざまなドメインを削った HA-p62 ベクターを作製し、FLAG-X と細胞に共発現させ、共免疫沈降を行い両者の結合を調べた。

4. 研究成果

- (1) p62 核蓄積が起こる実験系の構築
GFP-p62 を発現させた HeLa 細胞は、特定の条件で核移行することが確認され、p62 核蓄積のモニター細胞として利用可能であることが明らかとなった。そこでこの細胞を用いて、本来細胞質でオートファジーにより選択的に分解されるタンパク質 p62 が核に蓄積するという現象が他の条件によっても起こるか調べた。
当初、細胞培養メディアウムをグルコース飢餓かつアミノ酸飢餓となる PBS(+)とし、かつミ

トコンドリア脱 共役剤である CCCP (50 μ M) を曝露した際に、p62 核蓄積が認められる可能性が考えられたため、この再現性を確かめた。その結果、この条件では、GFP-p62 のみならず p62 を結合していない GFP でも核移行が認められたため、PBS(+)およびミトコンドリア脱共役剤の組み合わせは、低濃度 MPP⁺ と異なり p62 核蓄積を誘導する条件ではないことが明らかとなった。

(2) p62 核蓄積検出の自動化高速化

Opera Phenix を用いた p62 核蓄積評価系の実験条件が最適化された。この条件を用いて引き続き低濃度 MPP⁺ と同様の p62 核蓄積が認められる条件の探索を行っているが、現在のところ再現性よく p62 核蓄積を引き起こす物質は MPP⁺ である。

(3) p62 結合タンパク質の同定

リコンビナント p62 タンパク質と細胞可溶化液あるいは核抽出液をインキュベートし、p62 結合核タンパク質を探索し、新規 p62 核内結合タンパク質 X を見出した。HA-p62 と FLAG-X を細胞に共発現させ共免疫沈降法を用いて確認したところ、抗 HA 抗体で免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体で WB を行った場合にも、両者を入れ替えて行った場合にもバンドが認められたことから、p62 とタンパク質 X が細胞内で結合していることが明らかとなった。

(4) p62 結合タンパク質 X の p62 結合部位同定

p62 はオートファジーの選択的基質であるだけでなく、さまざまなタンパク質と結合し、さまざまな役割を果たす多機能タンパク質である。p62 核蓄積の影響を考える上で、核における結合タンパク質を同定することは重要である。そこで、p62 は PB1、UBA ドメインにおいて多くのタンパク質と相互作用することが知られている。そこで X が p62 タンパク質のどの部位に結合するかを調べた結果、PB1 ドメイン、ZZ ドメインを含む p62 の N 末端側で X と結合することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kidoguchi Naohiro, Ishida Keishi, Sanoh Seigo, Miyara Masatsugu, Kotake Yaichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Triphenyltin inhibits GA-binding protein nuclear translocation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 33 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.7.33	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 Sanoh Seigo, Hanada Hideki, Kashiwagi Keiko, Mori Tsukasa, Goto-Inoue Naoko, Suzuki Ken-ichi T., Mori Junpei, Nakamura Naoki, Yamamoto Takashi, Kitamura Shigeyuki, Kotake Yaichiro, Sugihara Kazumi, Ohta Shigeru, Kashiwagi Akihiko	4. 巻 228
2. 論文標題 Amiodarone bioconcentration and suppression of metamorphosis in Xenopus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 105623 ~ 105623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2020.105623	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 Yabuki Ayaka, Miyara Masatsugu, Umeda-Miyara Kanae, Takao Saya, Sanoh Seigo, Kotake Yaichiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Mit/TFE family members suppress L-leucyl-L-leucine methyl ester-induced cell death	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 143 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.143	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0件

〔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
---------	---------