

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06801

研究課題名（和文）脊髄小脳変性症でのPKCリン酸化を介した神経保護機構の解明と新規治療法への応用

研究課題名（英文）Neuroprotective mechanisms mediated by PKC phosphorylation in spinocerebellar degeneration and their application to novel therapies.

研究代表者

白藤 俊彦（Shirafuji, Toshihiko）

神戸大学・医学研究科・特命講師

研究者番号：30595765

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）：過去の報告より、PKC活性増加がSCAの小脳プルキンエ細胞に共通する神経保護機構であることが示唆される。

本研究で小脳プルキンエ細胞におけるPKC基質として、VCP、PLEKHG4を同定した。PKCリン酸化部位がそれぞれ、Ser770とSer27、Ser677であることを確認した。

PLEKHG4のリン酸化変異体とRAC1、CDC42との相互作用を解析し、リン酸化が相互作用に重要であった。PLEKHG4 S27とS677リン酸化はRAC1、CDC42の機能を介して小脳プルキンエ細胞保護作用を示すことが示唆される。一方、VCP S770リン酸化が細胞死に關与するデータは得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小脳プルキンエ細胞にPLEKHG4、VCPともに発現するので、小脳プルキンエ細胞保護作用のあるPKC活性化の基質が解明された。また、PLEKHG4については、RAC1/CDC42との結合がリン酸化で調整されることが解明された。これらのことは小脳プルキンエ細胞でのPKCリン酸化シグナルの一端が解明されたことになり、SCAの病態解明、治療法開発に資するものである。

研究成果の概要（英文）：Previous reports suggest that increased PKC activity is a common neuroprotective mechanism in cerebellar Purkinje cells in SCA.

In the present study, we identified VCP and PLEKHG4 as PKC substrates in cerebellar Purkinje cells, with PKC phosphorylation sites at Ser770 and Ser27, Ser677 respectively.

The interaction of PLEKHG4 phosphorylation mutants with RAC1 and CDC42 was analysed and phosphorylation was critical for the interaction, suggesting that PLEKHG4 S27 and S677 phosphorylation exerts cerebellar Purkinje cell protection via RAC1 and CDC42 function. In contrast, no data were obtained on the involvement of VCP S770 phosphorylation in cell death.

研究分野：病態神経学

キーワード：PKC SCA 脊髄小脳変性症 リン酸化 VCP PLEKHG4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎え、加齢とともに発症する脊髄小脳変性症 (SCA) などの神経変性疾患の治療法を確立することは喫緊の課題である。SCA は主にポリグルタミン伸長や遺伝子変異などの病因があるが、結果的に小脳プルキンエ細胞変性をひき起こし、変性を防ぐ方法は確立していない。SCA 研究は病因に着目したものがほとんどであり、SCA を横断的・統合的に理解する研究はなく、病因でなく小脳プルキンエ細胞の細胞保護因子に着目した治療法も存在しない。共同研究を行っているミシガン大学の Shakkottai 博士らが 2018 年に SCA1, 2, 14 のマウスモデル、ヒト患者において、小脳で Protein kinase C (PKC) リン酸化亢進が共通して起こり、神経保護的に働くことを解明した (Hum Mol Genet 2018 27(8): 1396-1410, Acta Neuropathol Commun. 2018; 6(1): 99)。SCA1,2 はポリグルタミン伸長、SCA14 は遺伝子変異に伴う SCA であるので、病因が異なる SCA 小脳で共通して PKC リン酸化が亢進している。PKC 活性増加は様々な原因の SCA に直面した小脳プルキンエ細胞に共通して備わる神経保護機構であり、SCA の病因による神経毒性に対抗するが、加齢とともにバランスが崩れ、小脳プルキンエ細胞変性を発症することが示唆される。SCA の病因へのアプローチによる治療でなく、小脳プルキンエ細胞が持つ PKC リン酸化を介した防御因子を解明し、神経保護作用のあるシグナル経路をターゲットにした新規治療法が開発できると考えるに至った。

2. 研究の目的

様々な病因による SCA マウス小脳を用いてプロテオームにより横断的・統合的な解析を行い、PKC リン酸化を介した小脳プルキンエ細胞保護シグナルを解明し、小脳プルキンエ細胞が持つ防御因子に着目した新規 SCA 治療法を開発することを目的とする

3. 研究の方法

1. 小脳プルキンエ細胞における PKC 基質の同定:

当初はリン酸化プロテオームを用いる予定だったが、文献や過去のデータから小脳プルキンエ細胞に発現して、かつ SCA 発症に関与する可能性がある蛋白質を対象にして解析を行った。具体的には Pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G4 (PLEKHG4), Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein 5 (ELOVL5), Golgin A5 (GOLGA5), Mitochondrial Fission Regulator 1 (MTFR1L), NSFL1 cofactor p47 (NSFL1C), Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 70 (TOMM70), phospholipase D family member 3 (PLD3), interferon related developmental regulator 1 (IFRD1)を対象とした。FLAG 融合した plasmid を作製し、COS7 細胞に発現させ、PKC 刺激薬 TPA を処置し、その後、IP:FLAG を行い、IB pSer PKC 抗体 (PKC による Ser リン酸化を認識する) をもちいた。

2. リン酸化部位の決定:

PLEKHG4, VCP の PKC リン酸化候補部位を PhosphoSitePlus を用いて決定し、それぞれ SA 変異体のプラスミドを作製した。COS7 細胞に発現させ、PKC 刺激薬 TPA を処置し、その後、IP:FLAG を行い、IB pSer PKC 抗体 (PKC による Ser リン酸化を認識する) をもちいた。

3. 機能解析、表現型への影響解析:

・VCP はすでに S770 が ATPase 活性に重要との報告があり、タウ凝集をへらすとの報告もあるので、S770 リン酸化が SCA のプルキンエ細胞死に重要である可能性を考え、アポトーシスに与

える影響を調べた。VCP のリン酸化欠損変異体(S770A)、模倣変異体(S770D)を作製して、細胞に発現させ、IB: c.caspase7, c.PARP, poly Ub, GDF15 などを行った。また、SCA ではER ストレス亢進するので、Thapsigargin, Tunicamycin などの ER ストレス誘発薬も用いた。

・PLEKHG4 は RAC1 , CDC42 の guanine nucleotide exchange factors (GEF)なので、RAC1. CDC42 との結合がリン酸化により変化するかを調べた。リン酸化欠損変異体 (S27A/S677A)、リン酸化模倣変異体(S27D/S677D)を作製して、細胞に FLAG-PLEKHG4 WT, MT と RAC1/CDC42-GFP を発現させ、IP: FLAG を行い、IB: GFP, FLAG を行った。

4. 研究成果

1. 小脳プルキンエ細胞における PKC 基質の同定:

PLEKHG4, ELOVL5, GOLGA5, MTFR1L, NSFL1C, TOMM70, PLD3, IFRD1 のなかで、PLEKHG4 と NSFL1C のサンプルで pSer PKC のバンドを認めた。PLEKHG4 は大きさが一致したが、NSFL1C のレーンでは NSFL1C の大きさよりも大きいバンドであった。詳細な解析により、これは NSFL1C と相互作用する VCP であることが分かった。

以上のように、小脳プルキンエ細胞の PKC 基質候補として PLEKHG4 と VCP を同定した。

2. PLEKHG4, VCP のリン酸化部位の同定

PLEKHG4 では S27 と S677, VCP では S770 が PKC のリン酸化部位であることを解明した。

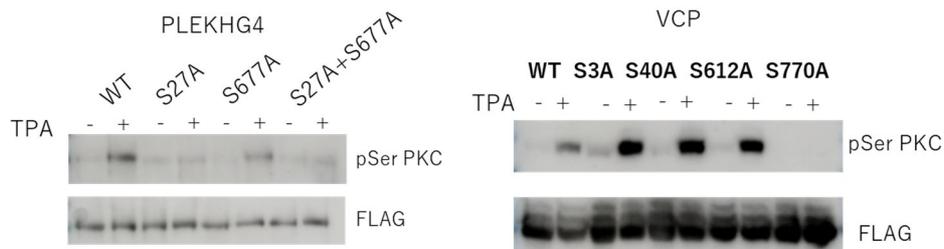


図2. リン酸化部位の同定

PLEKHG4, VCP のリン酸化部位の候補のSA変異体を用いて図1と同様の実験を行い、それぞれのPKCによるリン酸化部位を同定した。PLEKHG4はSer27とS677, VCPはS770がPKCのリン酸化部位だった。

3. リン酸化変異体の機能確認

PLEKHG4 S27+S677: PLEKHG4 は CDC42/RAC1 の GEF なので、これらのリン酸化により相互作用が変化するか否かを確認した。結果としては、SA 変異体で結合が低下し、SD 変異体では結合が回復した。

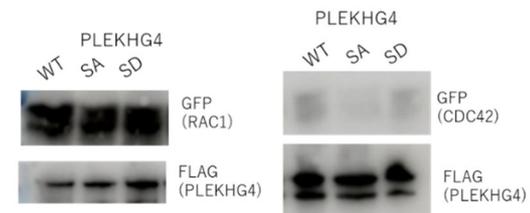


図3. PLEKHG4リン酸化変異体とRAC1, CDC42との相互作用

PLEKHG4 WT, S27A/S677A (SA), S27D/S677D (SD) と RAC1/CDC42 を共発現させ、IP: FLAG をし、IB: GFP/FLAG を行った。ともにSAでWTに比較して相互作用が低下した。

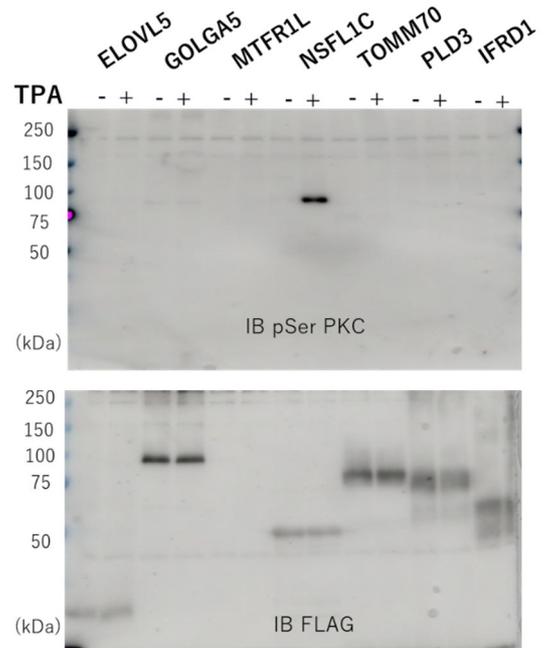


図1. 候補蛋白質がPKC基質であるかの確認

7種類のFLAGタグ融合蛋白質をCOS7細胞に発現し、PKC刺激薬TPAで刺激後、IP:FLAG, IB pSer PKCを行った。NSFL1CのレーンでPKCリン酸化亢進を認めた。結果的にはこれはNSFL1Cと相互作用するVCPのリン酸化だった。

VCP S770: VCP は ATPase であり、ER ストレスを軽減する方向へはたらくので、SA 変異体で ER ストレスが亢進し、アポトーシスが促進すると考え、IB で調べた。KD + ER ストレス薬では c. caspase7, cPARP, polyUb, GDF15 増加を確認できたが、リン酸化変異体ではこれらに大きな変化を認めなかった。

まとめると、小脳プルキンエ細胞における PKC 基質として PLEKHG4, VCP を同定した。また、PLEKHG4 においては S27, S677 リン酸化が RAC1, CDC42 との相互作用を変化させることを解明した。VCP においては、S770 はアポトーシス・細胞死には大きな影響を認めなかった。SCA における細胞保護的な PKC のはたらきのターゲットとしてこれらの蛋白質が重要である可能性が示唆される。ヒト SCA 小脳組織における PKC による PLEKHG4, VCP リン酸化の解析は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kaizuka Takeshi, Hirouchi Taisei, Saneyoshi Takeo, Shirafuji Toshihiko, Collins Mark O., Grant Seth G. N., Hayashi Yasunori, Takumi Toru	4. 巻 22
2. 論文標題 FAM81A is a postsynaptic protein that regulates the condensation of postsynaptic proteins via liquid?liquid phase separation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3002006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3002006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白藤俊彦
2. 発表標題 PERIOD2 (PER2)のリン酸化スイッチによる気分・概日リズムの制御機構の解明
3. 学会等名 第143回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2023年～2024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
研究分担者	上山 健彦 (Ueyama Takehiko) (80346254)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授 (14501)	

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
---------	---------