

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月18日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22590946

研究課題名（和文） チロシン水酸化酵素の細胞内安定性を調節する新規制御機構の解明と神経細胞死

研究課題名（英文） Regulating mechanism for intracellular stability of tyrosine hydroxylase and neurodegeneration

研究代表者

中島 昭 (NAKASHIMA AKIRA)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：20180276

研究成果の概要（和文）：

チロシン水酸化酵素（TH）の細胞内安定性の制御において、THのN末端領域に位置するセリン残基のリン酸化が重要な働きをしていることを明らかにした。この中で2つのセリン残基のリン酸化が、THがプロテアソーム分解を受ける際のトリガーとなる。また、脳蛋白質に大量に含まれる14-3-3蛋白質は、N末端におけるTHのリン酸化を介してTHの細胞内安定性を制御する重要な要因である。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that the phosphorylation of the N-terminal portion of tyrosine hydroxylase (TH) positively regulates the intracellular stability of the enzyme. The phosphorylation of two serine residues was shown to be a trigger for the proteasome digestion. Moreover, 14-3-3 protein which is major protein in mammalian brain is a critical factor in regulating TH stability by acting to promote the degradation of TH phosphorylated at its N-terminus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：神経分子病態学、パーキンソン病、チロシン水酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病の疾患遺伝子として α シヌクレインやパーキンが発見され、ユビキチン・プロテアソーム系を介した細胞内蛋白質の分解異常と、パーキンソン病発症との関連

性が注目されている。この一連の報告の中で、カテコールアミン生合成系律速酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）が、パーキンソン病の発症・進行において重要な役割を担っている可能性が指摘されている。

例えば、 α シヌクレインの蓄積が引き起こ

すドーパミン神経細胞内のアポトーシスは、TH 活性を阻害することにより抑制出来ること (Xu 2002)、 α シヌクレインは TH リン酸化を介して TH 活性を増加させることから (Drolet 2006)、 α シヌクレイン蓄積が誘発するアポトーシスには、TH の機能異常によるドーパ合成の促進が関与していることが推察される。

また、アポトーシスが生じたパーキンソン病モデルマウスの黒質ドーパミン神経では、Cyclin-dependent kinase-5 (CDK5) が増加していること (Neystat 2001)、CDK5 は TH の Ser31 のリン酸化を介して TH の細胞内安定性を増強することから (Moy 2004)、このアポトーシスには TH の細胞内安定性の過度の増加が関与する可能性が示唆される。

すなわち、神経細胞内での、TH の安定性や酵素活性の制御機構の異常により、カテコールアミンの生合成が促進して、大量のドーパミンキノン類発生によるミトコンドリア障害を介した神経細胞のアポトーシス誘発が推察される。

2. 研究の目的

パーキンソン病では中脳黒質ドーパミン神経が選択的に障害 (細胞死) されることから、この細胞死にチロシン水酸化酵素 (TH) の機能異常 (亢進) が関与する可能性が疑われているが、そのメカニズムは未だ不明である。最近、脳神経細胞内に存在する蛋白質の約 7% を占める 14-3-3 プロテインが、TH の安定性を制御する可能性が示唆され、加えて、この制御には他の細胞内蛋白質も必要とされる可能性も推定されている。TH の細胞内安定性を制御するメカニズムを同定し、このメカニズムとドーパミン神経細胞死との関連性を解明することが研究目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒトチロシン水酸化酵素 1 型 (hTH1) の細胞内安定性

①ヒスチジンタグ発現ベクターに hTH1 の cDNA を組み込む (wild-type および N 末端削除変異体作製)。

②変異体を培養細胞内に導入して、変異体の細胞内安定性を生化学的手法・免疫化学的手法で解析を行う。

(2) N 末端領域に結合する細胞内蛋白質の同定

①C 末端側にヒスチジンタグを付加出来る発現ベクターに hTH1 の cDNA を組み込む

(wild-type、N 末端から順次 10 残基ずつ削

除した変異体作製)。

②hTH1-ヒスチジンタグ蛋白質 (wild-type と変異体) に結合する培養細胞内の細胞内蛋白質をアミロースレジンを用いて分離する。

③プロテオミクス解析にて結合した細胞内蛋白質の同定を行う。

(3) 14-3-3 プロテイン、 α シヌクレインが TH に与える影響の解析

①上記蛋白質を選択的にダウンレギュレーションもしくは過剰発現させる。

②TH の細胞内での動態と細胞の変化を生化学的手法・免疫化学的手法で解析を行う。

(4) 細胞内分解系の抑制と促進

①培養細胞にプロテアソーム分解系のインヒビターまたは活性促進薬を加える。

②細胞内における TH の変化を生化学的手法・免疫化学的手法で解析を行う。

③オートファジー分解系についても同様に解析を行う。

4. 研究成果

(1) TH はオートファジー系ではなく、プロテアソーム系で分解されること、また、TH のセリン残基のリン酸化がそのトリガーとなることを明らかとした。

この結論は、プロテアソーム系のインヒビターを培養細胞に添加すると、リン酸化された TH が細胞内に蓄積する結果に基づいている。一方、この現象はオートファジー系のインヒビターの添加では観察されなかった。

(2) TH の N 末端領域に位置する 3 つのリン酸化部位、Ser19、Ser31、Ser40 の中で特に Ser19 のリン酸化は TH 分解に重要である。また、Ser40 のリン酸化も TH の分解開始のトリガーとなる可能性があることを明らかにした。

Ser19 と Ser40 が重要であるのは、プロテアソーム系のインヒビターに使用により、3 つのリン酸化部位の中の、Ser19 と Ser40 に特異的に観察された結果に基づいて結論した。

(3) α シヌクレインはリン酸化された Ser40 を介して TH の酵素活性を制御するが、TH の細胞内安定性への関与は認められなかった。

この結論は RNAi を用いた α シヌクレインのダウンレギュレーションが、TH の細胞内安定性に何ら影響を与えないとの観察に基づいている。

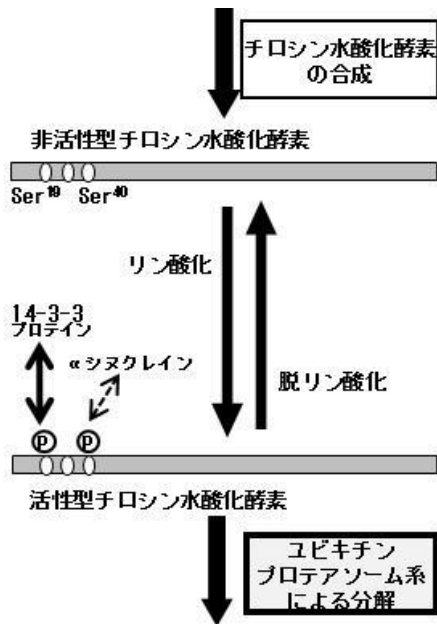
(4) 脳蛋白質の約 7%を占める 14-3-3 プロテインは Ser19 のリン酸化を介して TH の細胞内安定性を制御することを明らかにした。

RNAi を用いた 14-3-3 プロテインのダウンレギュレーションにより、細胞内での TH 安定性が上昇した。14-3-3 プロテインはリン酸化された Ser19 を介して TH と結合することが知られている。すなわち、14-3-3 プロテインはリン酸化された Ser19 を介して TH を分解する方向に働いていることが予想された。

また、14-3-3 プロテインの過剰発現により、PC12D 細胞の細胞質に Ser19 でリン酸化された TH からなる dense granule の形成が観察された。この結果からも、14-3-3 プロテインがリン酸化を介して TH の安定性に影響を与えていることが示唆された。

以上の成果から、TH の細胞内安定性に関して以下のメカニズムを想定している。すなわち、リン酸化は TH 活性を増強させるために必要であるが、一方、活性化された TH は分解されやすい状態になる (下図)。

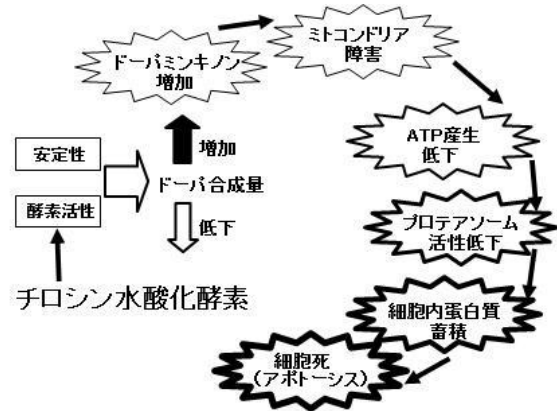
チロシン水酸化酵素の酵素活性と細胞内安定性：リン酸化と 14-3-3 プロテインによる制御機構



TH の合成と分解は的確にバランスが取れているために、細胞内の TH 存在量は一定値を保つことができる。本研究で明らかになったように、リン酸化を介した酵素活性の制御と分解の制御が正常であることにより、ドーパ (およびカテコールアミン) を細胞内に必要量供給することができる。しかし、このバ

ランスが崩れると、過剰のキノンの発生をもたらし、最終的に細胞死を誘発する可能性が予想される (下図)。

過剰なドーパ合成と細胞障害性キノン発生との関連



(5) 本成果に基づいて、今後更なる解明が求められる。14-3-3 プロテインが Ser19 でリン酸化された TH と反応すると、TH の分解が促進されるメカニズムについては、現時点では全く分かっていない。TH のプロテアソーム分解に関わる 14-3-3 プロテインの働きの解明、すなわち、新たな TH 制御機構の解明が必要不可欠である。このメカニズムの解明は、パーキンソン病などの神経変性疾患のみならず、統合失調症等のドーパミンが関与する疾患の発症メカニズム解明に重要な情報を提供する。

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 4 件)

(1) Nakashima A, Kaneko YS, Kodani Y, Mori K, Nagasaki H, Nagatsu T and Ota A. Intracellular stability of tyrosine hydroxylase: Phosphorylation and proteasomal digestion of the enzyme. Adv Pharmacol. 査読有, in press.

(2) Nakashima A. (2012) Proteasomal degradation of tyrosine hydroxylase and neurodegeneration. J Neurochem. 査読有, 120, 199-201.

(3) Nakashima A, Ota A, Kaneko YS, Mori K, Nagasaki H and Nagatsu T. (2012) A possible pathophysiological role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease suggested by postmortem brain

biochemistry: a contribution for the special 70th birthday symposium in honor of Prof. Peter Riederer. J Neural Transm. 査読有, 120, 49-45

- (4) Nakashima A, Mori K, Kaneko YS, Hayashi N, Nagatsu T and Ota A. (2011) Phosphorylation of the N-terminal portion of tyrosine hydroxylase triggers proteasomal digestion of the enzyme. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 407, 343-347.

[学会発表] (計4件)

- (1) Nakashima A, Kaneko YS, Mori K, Nagasaki H, Nagatsu T and Ota A. Phosphorylation and proteasomal digestion of tyrosine hydroxylase. The 11th Biennial Meeting of APSN and 55th Meeting of JSN, 2012, 10/1, Kobe, Japan
- (2) Nakashima A, Kaneko YS, Mori K, Nagasaki H, Nagatsu T and Ota A. Intracellular stability of tyrosine hydroxylase: phosphorylation and proteasomal digestion of the enzyme. The Tenth International Catecholamine Symposium, 2012, 9/11, Asilomar, CA. USA.
- (3) Nakashima A, Mori K, Kaneko YS, Nagasaki N, Nagatsu T and Ota A. Intracellular degradation and localization of tyrosine hydroxylase. 第89回日本生理学会大会, 2012, 3/30, 松本市
- (4) Nakashima A, Mori K, Kaneko YS, Nagasaki H, Hayashi H, Nagatsu T and Ota A. Intracellular degradation and localization of tyrosine hydroxylase; phosphorylation and proteasomal digestion of the enzyme. Society for Neuroscience, 2011, 11/13, 41th Annual Meeting, Washington D. C., USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 昭 (NAKASHIMA AKIRA)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：20180276

(2) 研究分担者

太田 明 (OTA AKIRA)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：10247637

(3) 連携研究者

林 宣宏 (HAYASHI NOBUHIRO)
東京工業大学・生命理工学研究科
研究者番号：80267955