

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293060

研究課題名(和文) 神経変性疾患発症に関与するPKCリン酸化基質タンパク質の同定と創薬への応用

研究課題名(英文) Determination of PKC substrate involved in neurodegenerative diseases and its application for drug design

研究代表者

齋藤 尚亮 (SAITO, NAOAKI)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授

研究者番号：60178499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病治療薬の開発を目指し、線条体におけるPKC γ の基質の同定を行った。その結果PKCリン酸化モチーフを持つタンパク質、Connexin-43, Disk1, MADD, CSPa, Calnexin, Stathmin, bPIX, NogoA, Adducinを同定した。さらに、bPIXはPKC γ によりSer583, Ser340がリン酸化を受けDA遊離に関与すること Connexin-43, MADD, Calnexin, Adducinもそのリン酸化がドパミン遊離の調節に関与すること PKC γ によるCSPaのSer10リン酸化は細胞生存について重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We identified substrate proteins for PKC γ as a new drug target for Parkinson disease. Nine substrate proteins were identified: Connexin-43, Disk1, MADD, CSPa, Calnexin, Stathmin, bPIX, NogoA, Adducin. Furthermore, 1) Phosphorylation of Ser583, Ser340 of bPIX is involved in DA release, 2) Phosphorylation of Connexin-43, MADD, Calnexin and Adducin is also related to DA release, 3) Phosphorylation of Ser10 of CSPa is important for cell viability.

研究分野：神経薬理学

キーワード：リン酸化酵素 パーキンソン病 モデル動物 治療薬 リン酸化プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病のモデルラットとされる AS/AGUラットの研究から、PKC γ KOマウスがパーキンソン病のモデルになることを我々は提唱し、PKC γ KOマウスにおいても、刺激によるドーパミン遊離が優位に減少すること、生後12週には黒質ドーパミン細胞死が起こることも見出した。しかしながら、PKC γ KOマウスは、黒質線条体系以外でも多くの神経情報伝達機構の異常をもたらしているため、PKC γ KOマウスをパーキンソン病のモデルとして、薬物スクリーニングに使用することには問題があった。そこで、このPKCシグナルカスケードの異常によって発症するパーキンソン病モデルマウスを作製するために、まず、リン酸化プロテオームの手法を用いて、野生型とPKC γ KOマウスの線条体におけるリン酸化蛋白質について網羅的にスクリーニングを行った。その結果、野生型にのみで見つかった26個のリン酸化蛋白質は、パーキンソン病様症状を示す原因となるPKC γ の基質タンパク質である可能性が高いと考えるに至った。本研究では、このようにして見出された候補蛋白質のリン酸化による調節機構とパーキンソン病との関連を明らかにし、孤発性パーキンソン病のモデルマウスを作製し、治療薬を開発することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究ではリン酸化プロテオームを用いてPKC γ KOマウスの線条体で明らかにリン酸化が低下したタンパク質として見出された候補蛋白質の中で、特に伝達物質遊離に関連する **1) CSP α (cysteine string protein)**、**2) MADD(MAP kinase-activating death domain protein)**、**3) β PIX(Rho guanine nucleotide exchange factor 7)** に着目し、解析を行った。つまり、これらのタンパク質がPKC γ によってリン酸化されることにより、どのような機能修飾を受け、その結果、線条体においてドーパミン細胞の生理機能にどのような変化があるのかを解析することを目的とした。

本研究によって、これら新規PKC γ 基質タンパク質が新しいパーキンソン病治療薬の標的としての可能性を検討し、薬物スクリーニング系を確立し、新しい治療法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

PKC γ KOマウスでのリン酸化プロテオームで見出された線条体におけるPKC γ リン酸

化基質タンパク候補物質(未発表)のうち、CSP α 、MADD、 β PIXがパーキンソン病治療薬標的タンパクとして最も有力であると考え、これらの蛋白質に関して、PKCによるリン酸化部位の決定と機能調節、リン酸化によるドーパミン(DA)遊離機構の解明、各分子のリン酸化によるDA遊離の制御メカニズムの解明、リン酸化によるDA神経変性機構の解明、リン酸化抗体を用いた個体レベルでの確認とパーキンソン病治療薬のスクリーニング系の確立、新規パーキンソン病モデルマウスの作製と表現型解析を行う。これらの実験により、PKCシグナル経路が関与するパーキンソン病発症機構の解明とその創薬への応用を目指す。

4. 研究成果

黒質線条体のPKC γ の基質がリン酸化されなくなることがパーキンソン症状の原因であるという仮説をたて、PKC γ KOと野生型(WT)のマウス線条体を用い、PKC γ の基質の同定を目的として、リン酸化プロテオーム解析を行った。

まず、Ion intensityを用いた半定量的解析により、PKCリン酸化モチーフを持つ9個のタンパクを同定した。それらの中から、まず、このうち β PIXに着目して研究を行った。 β PIXは、Ser583はin vitro, in vivoで、Ser340はin vivoでPKC γ によりリン酸化された。また、PC12細胞でのDA遊離測定では、 β PIXノックダウンによるDA遊離低下を β PIX WTで回復できたのに対して、 β PIX Ser340Ala、Ser583Ala変異体では、DA遊離は回復しなかった。この事実は β PIXのSer340、Ser583のPKC γ リン酸化がDA遊離を調整することを示した。これらの結果は、 β PIXが黒質線条体におけるPKC γ の基質であり、DA遊離に関与することを示唆している。

さらに、Connexin-43、MADD、Calnexin、Adducinもそのリン酸化がドーパミン遊離の調節に関与することを見出した。

CSP α についても検討を行い、1) CSP α のSer10、34はPKC γ によりリン酸化を受ける。2) CSP α のSer10リン酸化はDA release(PC12細胞)には影響しない、3) CSP α のSer10リン酸化はPC12細胞での細胞生存に重要であることを見出した。

この研究の成果の意義

本研究のもっと意義深い点は、PKC γ のリン酸化基質タンパク質がパーキンソン病発症機序に関与する可能性を示唆した点であ

り、これらのタンパク質の機能制御がパーキンソン病の治療法の開発につながる可能性があることを示した。

今後の検討課題

1) β PIX などのリン酸化基質タンパク質のリン酸化部位に変異(非リン酸化型)を持つノックインマウスがパーキンソン症状を示すかどうかを解析する。

2) CSP α のリン酸化の下流の検討およびCSP α のリン酸化と細胞死の関連の検討。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Maeda J, Inoue K, Ichimura R, Takahashi M, Kodama Y, Saito N, Yoshida M. Essential role of constitutive androstane receptor in Ginkgo biloba extract induced liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis. Food Chem Toxicol. 2015 Jun 24;83:201-209. doi: 10.1016/j.fct.2015.06.010. 査読あり

2. Ueyama T, Sakuma M, Ninoyu Y, Hamada T, Dupuy C, Geiszt M, Leto TL, Saito N. The Extracellular A-loop of Dual Oxidases Affects the Specificity of Reactive Oxygen Species Release. J Biol Chem. 2015 290(10):6495-506. doi: 10.1074/jbc.M114.592717. 査読あり

3. Takahashi, H., Adachi, N., Shirafuji, T., Danno, S., Ueyama, T., Vendruscolo, M., Shuvaev, A.N., Sugimoto, T., Seki, T., Hamada, D., Irie, K., Hirai, H., Sakai, N. and Saito, N. Identification and characterization of PKC γ , a kinase associated with SCA14, as an amyloidogenic protein. Human Mol. Genetics. 24(2):525-39. 2015. doi: 10.1093/hmg/ddu472. 査読あり

4. Maillard, L., Saito, N., Hlawaty, H., Friand, V., Suffee, N., Chmielewski, F., Haddad, O., Laguillier, C., Guyot, E., Ueyama, T., Oudar, O., Sutton, A., Charnaux, N. RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKCa signaling pathway. Biology Open 3(10):995-1004. 2014 doi:10.1242/bio.20148227 査読あり

5. Makino-Okamura, C., Niki, Y., Takeuchi, S., Nishigori, C., Declercq, L., Yaroch D.B.,

and Saito, N. Heparin inhibits melanosome uptake and inflammatory response coupled with phagocytosis through blocking PI3k/Akt and MEK/ERK signaling pathways in human epidermal keratinocytes. Pigment Cell & Melanoma Research, 1063-74.2014 DOI: 10.1111/pcmr.12287 査読あり

6. Shirafuji, T., Ueyama, T., Yoshino, K-I., Takahashi, H., Adachi, N., Ago, Y., Koda, K., Nashida, T., Hiramatsu, N., Matsuda, T., Toda, T., Sakai, N., and Saito, N. The role of Pak-Interacting Exchange Factor- β phosphorylation at Serines 340 and 583 by PKC γ in dopamine release. J Neurosci. 34(28) 9268-9280, 2014. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4278-13.2014 査読あり

7. Maeda, J., Kijima, A., Inoue, K., Ishii, Y., Ichimura, R., Takasu, S., Kuroda, K., Matsushita, K., Kodama, Y., Saito, N., Umemura, T., and Yoshida, M. *In Vivo* Genotoxicity Assessment of Ginkgo biloba Extract Using the Comet, Micronucleus, and Gene Mutation Assay, Toxicological Sciences, 140, 298-306, 2014 doi: 10.1093/toxsci/kfu090 査読あり

8. Yamamoto, K., Seki, T., Yamamoto, H., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N. Deregulation of the actin cytoskeleton and macropinocytosis in response to phorbol ester by the mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 Frontiers in Physiology, 5:216(1-10),2014 doi: 10.3389/fphys.2014.00126. eCollection 2014. 査読あり

9. Shirai, Y and Saito, N. Diacylglycerol kinase as a possible therapeutic target for neuronal diseases. Journal of Biomedical Science, 21:28-28, 2014 査読あり

10. Kano, T., Kouzuki, T., Mizuno, S., Ueda, S., Yamanoue, M., Sakane, F., Saito, N. and Shirai, Y. Both the C1 domain and a basic amino acid cluster at C-terminus are important for neurite and branch induction ability of DGK β . Biochem. Biophys. Res. Commun, 447:89-94, 2014 doi:

10.1016/j.bbrc.2014.03.113. 査読あり

11. Sakuma, M., Shirai, Y., Ueyama, T., and Saito, N. Diacylglycerol kinase gamma regulates antigen-induced mast cell degranulation by mediating Ca²⁺ influxes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445(2):340-5, 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.197 査読あり

12. Ueyama, T., Sakaguchi, H., Nakamura, T., Goto, A., Morioka, S., Shimizu, A., Nakao, K., Hishikawa, Y., Ninoyu, Y., Kassai, H., Suetsug, J., Koji, T., Fritsch, B., Yonemura, S., Hisa, Y., Matsuda, M., Aiba, A., and Saito, N. Maintenance of stereocilia and apical junctional complexes by Cdc42 in cochlear hair cells, *J. Cell Sci.* 127:2040-2052, 2014 doi:10.1242/jcs.143602 査読あり

13. Ueyama, T., Son J, Kobayashi T, Hamada T, Nakamura T, Sakaguchi H, Shirafuji T., Saito N. Negative charges in the flexible N-terminal domain of Rho GDP-dissociation inhibitors (RhoGDIs) regulate the targeting of the RhoGDI-Rac1 complex to membranes. *J Immunol.* 191(5):2560-2569. 2013 doi:10.4049/jimmunol.1300209 査読あり

14. Ogawa, K., Seki, T., Onji, T., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N. Mutant γ PKC that causes spinocerebellar ataxia type 14 upregulates Hsp70, which protects cells from the mutant's cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440(1):25-30, 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.013. 査読あり

15. Wood, TR., Chow, RY., Hanes, CM., Zhang, X., Kashiwagi, K., Shirai, Y., Trebak, M., Loegering, DJ., Saito, N., and Lennartz, MR. PKC- ϵ pseudosubstrate and catalytic activity are necessary for membrane delivery during IgG-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 94:109-122, 2013 doi: 10.1189/jlb.1212634 査読あり

16. Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Shirai, Y., Saito, N., and Hara, H.

Increased seizure susceptibility in a mouse with diacylglycerol kinase β 2 deficiency. *Neuroscience & Medicine.* 4:117-122, 2013 査読あり

17. Suzuki, M., Iio, Y., Saito, N., and Fujimoto, T. Protein kinase C η is targeted to lipid droplets. *Histochem Cell Biol.* 139(4):505-11, 2013 doi: 10.1007/s00418-013-1083-z. 査読あり

18. Nishimoto, T., Kashiwagi, K., Saito, N., and Shirai, Y. Both C1B domain and pseudosubstrate region are necessary for saturated fatty acid membrane; distinct role of intramolecular domains for different translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 432 :384-388, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.048. 2013 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Protein kinase C and its involvement in neuronal diseases. Saito, N. 第 2 回 Neuroscience Network in Kobe シンポジウム、平成 28 年 2 月 19 日、兵庫県(口頭発表、英語)

2. 聴毛のインテグリティ維持の破綻により発症する難聴のメカニズム解明 上山健彦、齋藤尚亮 第 89 回日本薬理学会年会・シンポジウム、平成 28 年 3 月 9~11 日、神奈川県(口頭発表、日本語)

3. 脊髄小脳変性症 14 型における PKC γ のアミロイド様構造体の形成と治療法 足立直子、高橋英之、中園 葵、濱田大三、上山健彦、関 貴弘、酒井規雄、齋藤尚亮 第 89 回日本薬理学会年会、平成 28 年 3 月 9~11 日、神奈川県(口頭発表、英語)

4. 黒質線状体系における PKC γ 基質の解析: ドパミン遊離と神経細胞生存における PKC γ によるリン酸化の役割 白藤俊彦、上山健彦、吉野健一、足立直子、秀 和泉、田中 茂、齋藤尚亮、酒井規雄 第 89 回日本薬理学会年会・シンポジウム、平成 28 年 3 月 9~11 日、神奈川県(ポスター・日本語)

5. 脊髄小脳変性症 14 型における PKC γ のアミロイド様構造体の形成と疾患への関与

足立直子、高橋英之、白藤俊彦、上山健彦、Michele, Vendruscolo., 入江一浩、平井宏和、酒井規雄、齋藤尚亮 第 38 回日本神経科学大会、平成 27 年 7 月 28 ~ 31 日、兵庫県(口頭発表、英語)

6. Analysis of PKC γ substrates in nigro-striatum system by using phosphoproteome. Kaneoka, A., Shirafuji, T., Ueyama, T., Uwada, J., Yoshini, K., Adachi, N., Takahashi, H., Hide, I., Tanaka, S., Saito, N. and Sakai, N. 第 38 回日本神経科学大会、平成 27 年 7 月 28 ~ 31 日、兵庫県(口頭発表、英語)

7. Radial migration of cerebellar granule neuron regulated by Rac through a new signaling pathway. Ninoyu, Y., Ueyama, T., Nakamura, T., Ishii, T., Kohta, M., Kasahara, M., Sakaguchi, H., Hisa, Y., Kohmura, E., Aiba, A. and Saito, N. 日本薬理学会年会、平成 27 年 3 月 18 ~ 20 日、愛知県(口頭発表・日本語)

8. 生体防御に関する活性酸素産生酵素の食胞・頂側膜へのターゲティング及び会合メカニズム 上山健彦、齋藤尚亮 第 92 回日本生理学会大会、平成 27 年 3 月 21 ~ 23 日、兵庫県(口頭発表・日本語)

9. Both C1 domain and basic amino acid cluster at C-terminus are important for branching and neurite induction of DGK β . Shirai, Y., Takuya, K., Kouzuki, T., Ueda, S., Yamanoue, M., Sakane, F. and Saito, N. Neuro 2013、平成 25 年 6 月 20 ~ 23 日、京都府(ポスター発表・英語)

10. 黒質線条体系における PKC γ の基質の解析: β 2PIX リン酸化のドパミン遊離への役割 白藤俊彦、上山健彦、吉野健一、足立直子、高橋英之、香田 健、平松直樹、吾郷 由希夫、松田敏夫、酒井規雄、齋藤尚亮 第 124 回日本薬理学会近畿部会、平成 25 年 11 月 1 日、京都府(口頭発表・日本語)

11. アストロサイト特異的 Rac1 ノックアウトマウス(KO)により神経損傷後の機能回復促進 石井大嗣、上山健彦、坂本勲勇、執行美智子、久保山友晴、甲田将章、東田千尋、甲村英二、齋藤尚亮 第 124 回日本薬理学会近畿部会、平成 25 年 11 月 1 日、京都府(口頭発表・日本語)

12. クロマン環構造に着目した新規ジアシルグリセロールキナーゼ α 活性化剤の探索 林 大輝、芦田 均、上田修司、山之上 稔、齋藤尚亮、白井康仁 第 124 回日本薬理学会近畿部会、平成 25 年 11 月 1 日、京都府(口頭発表・日本語)

13. mTOR is involved both kinase-dependent and -independent pathways of DGK β -regulated neurite and branch induction. Kano, T., Nakai, H., Nakashima, A., Kikkawa, U., Saito, N., Takei, N., Ueda, S., Yamanoue, M. and Shirai, Y. Neuroscience 2013、平成 25 年 11 月 9 ~ 13 日、San Diego, California

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 尚亮 (SAITO, Naoaki)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授
研究者番号: 60178499

(2) 研究分担者

足立 直子 (ADACHI, Naoko)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・助教
研究者番号: 70604510

(3) 研究分担者

上山 健彦 (UEYAMA, Takehiko)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授
研究者番号: 80346254

(4) 連携研究者

白藤俊彦 (SHIRAFUJI, Toshihiko)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・研究員
研究者番号: 30595765