

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461296

研究課題名(和文) プロテアソーム分解系によるチロシン水酸化酵素の安定性制御機構の解明と神経細胞死

研究課題名(英文) Intracellular stability of tyrosine hydroxylase regulated by proteasomal degradation of the enzyme and neurodegeneration of dopaminergic cells

研究代表者

中島 昭 (NAKASHIMA, AKIRA)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：20180276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、タンパク質の分解異常がパーキンソン病のような神経変性疾患の1つの原因であることが想定されている。加えてパーキンソン病ではドーパミン神経の変性を特徴とするため、ドーパミン代謝過程で生じるキノン類による細胞障害が注目されている。チロシン水酸化酵素はユビキチン化されてプロテアソーム分解され、この分解はSer19のリン酸化が引き金になることを本研究において証明した。本酵素のリン酸化は酵素活性を促進させるため、リン酸化による本酵素の細胞内分解の促進はドーパミン合成の点では相反する反応となる。酵素活性と分解の制御バランスの異常がドーパミン神経の障害発生において鍵となることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Recently, abnormality of the degradation of intracellular proteins has been suspected to be a major cause of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Again, the primary pathology of Parkinson's disease is degeneration of the dopamine neuron, and then degeneration is suspected to result from by quinones derived from dopamine. In this study, we clarified that the inhibition of deubiquitinating activity enhances the proteasomal degradation of tyrosine hydroxylase (TH) and that the phosphorylation of Ser19 is a trigger for the degradation. The increased degradation of TH molecule by its phosphorylation is opposite action for its increased activity by its phosphorylation on dopamine synthesis. The study indicates that the balance of the degradation and the activity might be critical for degeneration of the dopamine neuron.

研究分野：神経化学

キーワード：チロシン水酸化酵素 プロテアソーム分解 14-3-3プロテイン リン酸化

1. 研究開始当初の背景

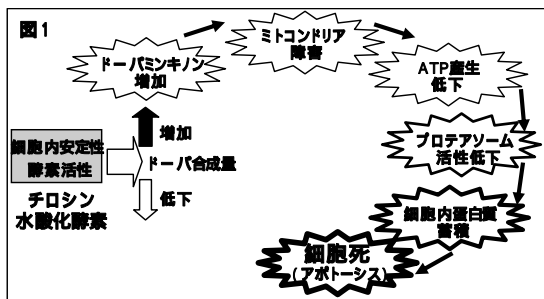
パーキンソン病は代表的な神経変性疾患であり、中脳黒質におけるドーパミン産生細胞であるドーパミン神経の選択的な障害が特徴である。パーキンソン病の疾患遺伝子として α シヌクレインやパーキンが発見され、ユビキチン・プロテアソーム系を介した細胞内タンパク質の分解異常とパーキンソン病発症との関連性が注目されている(文献)

一方、パーキンソン病の原因を解明するために行われた多くの報告において、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。

しかしながら、パーキンソン病で見られる中脳の黒質の選択的な脱落、すなわち TH が局在してドーパミン合成が行われている部位が選択的な障害を受ける理由については、未だ明確な答えがない。

2. 研究の目的

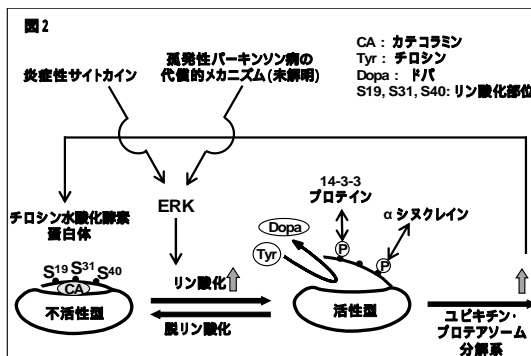
チロシン水酸化酵素(TH)の局在によりドーパミン合成が行われている細胞が選択的な障害を受ける理由に関しての、我々の考え方を図1に示す。



カテコールアミン系の律速酵素である TH により合成されるドーパミンが、その代謝過程で酸化を受け、ドーパミンキノン類が産生される。このドーパミンキノン類は、ミトコンドリア障害を引き起こす原因物質(細胞毒性)の一つであることが知られており、ドーパミンの産生過剰は細胞毒性を生じさせる可能性が極めて高い(文献)

また、TH はリン酸化による酵素活性制御調節を受け、また細胞内における本酵素の分解制御に関してもリン酸化が重要である(文献)。すなわち、図2に示すように、TH のリン酸化により本酵素によるドーパミン合成が促進される一方、プロテアソーム分解系による TH 分解が促進させる可能性がある。しかし、何らかの異常が生じて TH の分解が抑制されると、細胞内における TH の蓄積量が増加して、ドーパミンの合成量が増加する。

その結果、ドーパミンキノンが蓄積しやすくなり細胞障害が生じる。加えて、細胞数が減少して産生されるドーパミン量が低下すれば、細胞はより多くのドーパミンを産生する必要が生じて、更なる TH のリン酸化が生じる。すなわち、この連鎖が繰り返されるため更に細胞が障害を受ける。これが我々の考え(仮説)である。



(1) TH がリン酸化されると、本酵素の細胞内での分解が促進されることが報告されている(文献)。一方、リン酸化部位は Ser19、Ser31、Ser40 の3か所あり、細胞内分解においてどのリン酸化部位が重要であるかについては不明である。各リン酸化部位と、細胞内分解の関連性を明確にする。

(2) リン酸化された TH に結合して TH の酵素活性を調節することが知られている 14-3-3 プロテインが、TH の細胞内安定性(分解性)に影響を与える可能性が以前行った我々の実験において示唆された。一方、14-3-3 プロテインは α シヌクレインと複合体を形成し、E3 ユビキチンリガーゼであるパーキンの活性を制御することから、ユビキチン・プロテアソーム分解系と深く関わっていることが報告されている(文献)

すなわち、TH の細胞内安定性はプロテアソーム分解系により決定され、加えて 14-3-3 プロテインと α シヌクレインは TH のリン酸化を介してプロテアソーム分解系を制御している可能性が推察される。

そこで、TH の細胞内安定性(分解)における 14-3-3 プロテインの役割を解明する。

(3) 14-3-3 プロテインおよび α シヌクレインは、TH のリン酸化を制御するシャペロンプロテインであることが知られている。このシャペロンプロテインが TH のリン酸化を制御する目的として、酵素活性制御メカニズムに焦点が当てられ、研究が進められてきた。

そこで、酵素活性の制御のみならず、細胞内分解の制御を含めてリン酸化の役割を明確にすることが重要であると考え、これを本研究の最終的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

ドーパミン合成のモデル細胞として PC12D 細胞を用いた。細胞内の TH、14-3-3 プロテイン等については、SDS-PAGE・ウェスタンブロット後の免疫染色によるタンパク質量の定量、Phos-tag PAGE とウェスタンブロットを組み合わせたリン酸化の解析、免疫染色した標本のレーザー顕微鏡による観察などを主な解析手段として用いた。

(2) プロテアソーム分解の抑制

プロテアソーム分解阻害剤である Lactacystin、MG-132 を PC12D 細胞に反応させて、細胞内における TH の変動を解析した。

(3) プロテアソーム分解の促進

USP14 による脱ユビキチン化活性を阻害する薬剤等を用いて、プロテアソーム分解の促進を誘導した後、上記の方法を用いて、TH、14-3-3 プロテインなどの細胞内タンパク質の変動を解析した。

(4) TH のリン酸化の誘導

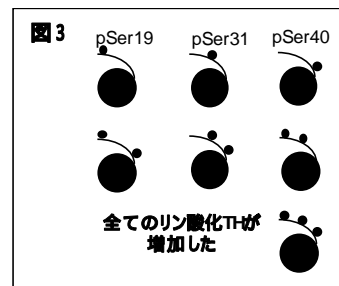
TH の Ser19 のリン酸化を特異的に誘導する Anisomycin、Ser40 のリン酸化を特異的に誘導する Forskolin、を用いてプロテアソーム分解を誘導した後、(1)の方法を用いて、TH、14-3-3 プロテインなどの細胞内タンパク質の変動を解析した。

(5) シャペロンプロテイン(14-3-3 プロテイン等)の抑制

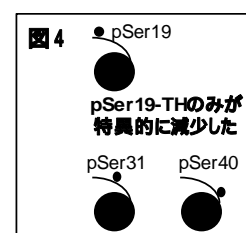
当初 RNAi を用いて 14-3-3 プロテイン等の発現量を抑える実験を行ったが、抑制が 50% 程度と、十分な抑制効果が得られなかった。そこで、14-3-3 プロテインの活性を特異的に阻害するペプチドおよび合成阻害薬を用いて活性を阻害した。細胞内タンパク質の解析は上記の方法を用いた。

4. 研究成果

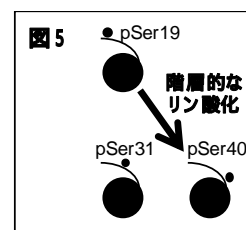
(1) PC12D 細胞において、プロテアソーム分解阻害薬を添加すると、Ser19、Ser31、もしくは Ser40 でリン酸化された TH が増加した。短時間では TH のリン酸化は 1 個所でのみ生じているが、反応時間が長時間になると、2 個所、3 個所でリン酸化された TH の増加が生じた(図 3)。また、用いるプロテアソーム分解阻害薬の種類を変えると、リン酸化された TH の増加パターンに違いがみられることが明らかとなった。



(2) 脱ユビキチン活性を阻害することでプロテアソーム分解を促進させると、Ser19 でリン酸化されたチロシン水酸化酵素が細胞内から特異的に消失した(図 4)。一方、Ser31、Ser40 におけるリン酸化ではこの消失は生じなかった。



(3) TH のリン酸化は階層的に生じることが知られている(例えば Ser19 のリン酸化は Ser40 のリン酸化を促進する、図 5、文献)。すなわち、長時間プロテアソーム分解を阻害すると、1つのリン酸化が他のリン酸化を誘導してしまう可能性があり、(1)の結果の解釈が困難となる。すなわち(1)と(2)の結果を総合して判断すると、(2)の結果の方が信憑性が高く、TH 分解のトリガーは Ser19 のリン酸化であると推定される。



(4) 特異的なペプチド阻害薬および合成阻害薬を用いて 14-3-3 プロテイン活性を阻害することにより、TH の PC12D 細胞内濃度を変化させることができる可能性があることを明らかにした。これにより、TH の細胞内分解性における 14-3-3 プロテインの必要性が示唆されるわけであるが、現時点では可能性であり確定するには至っていない。

(5) 14-3-3 プロテインにより制御される TH の Ser19 のリン酸化は、Ser40 のリン酸化とともに酵素活性調節に着目して研究が進められてきた。本研究では、Ser19 のリン酸化、続いて起こるユビキチン化、それに伴うプロ

テアソーム分解という視点で進められた。リン酸化は酵素活性を促進してドーパミン合成が促進される一方で、リン酸化は本酵素の細胞内分解を誘導・促進してすることによりドーパミン合成が抑制される点で相反する結果を生み出す。正常な状態では、細胞内で酵素活性調節とタンパク質分解調節がバランスをとっていることが示唆されることから、この調節バランスの重要性を提起した。

<引用文献>

K.S McNaught. Proteasomal dysfunction in sporadic Parkinson's disease. *Neurology*. 66 (2006) S37-S49.

D.S. Goldstein. Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 126 (2013) 591-60.

I. Kawahata. Accumulation of phosphorylated tyrosine hydroxylase into insoluble protein aggregates by inhibition of an ubiquitin-proteasome system in PC12D cells. *J. Neural Transm*. 116 (2009) 1571-1578.

M. A. Lopez Verrilli. Angiotensin-(1-7) through AT receptors mediates tyrosine hydroxylase degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Neurochem*. 109 (2009) 326-335.

A. Nakashima. Phosphorylation of the N-terminal portion of tyrosine hydroxylase triggers proteasomal digestion of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 407 (2011) 343-347.

S. Sato. 14-3-3eta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase, *EMBO J*. 25 (2006) 211-221.

I.T. Lehmann. Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 281 (2006) 17644-17651.

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)

Akira Nakashima, Syuhei Ohnuma, Yoko S. Kaneko, Yu Kodani, Hiroshi Nagasaki, Toshiharu Nagatsu and Akira Ota. (2016) Inhibition of deubiquitinating activity of USP14 decreases tyrosine hydroxylase phosphorylated at Ser19 in PC12D cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 472(4): 598-602. (査読有)

Syuhei Ohnuma, Yuri Nonaka, Yoko S. Kaneko, Yu Kodani, Hiroshi Nagasaki, Toshiharu Nagatsu, Akira Ota and Akira

Nakashima. (2015) Degradation rate of tyrosine hydroxylase by ubiquitin-proteasome pathway. *J Physiol Sci*. 65, S174. (査読なし)

Yoko S Kaneko, Takeshi Takayanagi, Hiroshi Nagasaki, Yu Kodani, Akira Nakashima, Keiji Mori, Atsushi Suzuki, Mitsuyasu Itoh, Kazunao Kondo, Toshiharu Nagatsu, Miyuki Ota and Akira Ota. (2015) Aripiprazole increases NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 and heme oxygenase-1 in PC12 cells. *J Neural Transm*, 122(6):757-772. (査読有)

Yoko S Kaneko, Akira Ota, Akira Nakashima, Hiroshi Nagasaki, Yu Kodani, Keiji Mori and Toshiharu Nagatsu. (2014) Lipopolysaccharide treatment arrests the cell cycle of BV-2 microglial cells in G₁ phase and protects them from UV light-induced apoptosis. *J Neural Transm*. 122, 187-199. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

第 92 回日本生理学会大会 (2015.3, 神戸)
Syuhei Ohnuma, Yuri Nonaka, Yoko S. Kaneko, Yu Kodani, Hiroshi Nagasaki, Toshiharu Nagatsu, Akira Ota and Akira Nakashima. Degradation rate of tyrosine hydroxylase by ubiquitin-proteasome pathway.

第 91 回日本生理学会大会 (2014.3, 鹿児島)
Yoko S. Kaneko, Akira Nakashima, Hiroshi Nagasaki, Yu Kodani and Akira Ota. UV-induced apoptosis is inhibited in LPS-activated BV-02.

[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・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・名誉教授
研究者番号：10247637

(3)連携研究者

()
研究者番号：