

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06657

研究課題名(和文)パーキンソン病の病態におけるS1P受容体シグナルおよびエクソソーム放出の関与

研究課題名(英文)Involvement of S1P receptor signaling and exosome release on Parkinson's disease

研究代表者

岡田 太郎 (Okada, Taro)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80304088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに細胞外 α -シヌクレインによって細胞膜上のS1P1受容体とGiタンパク質の脱共役が起こることを示している。また、我々は多胞性エンドソームでのS1P1受容体とGiタンパク質の共役が、エクソソームへのタンパク質ソーティングに重要であることを示している。本研究では新たに、細胞外 α -シヌクレイン処理によって、エクソソームへのタンパク質ソーティングが阻害されることを初めて見出した。この α -シヌクレインの作用はS1P1受容体に特異的であり、そのメカニズムは、S1P1受容体を細胞膜ラフトから追い出すことによるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病の患者の神経細胞では α -シヌクレインの蓄積が報告されている。一方で神経細胞外の α -シヌクレインについてはその意義が不明であった。本研究結果より、細胞外 α -シヌクレインによりエクソソームへの積荷タンパク質ソーティングが抑制されることが初めて見出された。神経細胞内の α -シヌクレインやアミロイドタンパク質などはエクソソーム中にソーティングされ、細胞外に放出されることがクリアランスメカニズムとして機能しているという報告もあることから、今回の発見により、細胞外 α -シヌクレインにより細胞内 α -シヌクレインの蓄積が亢進する可能性が初めて提示された。

研究成果の概要(英文)：We already reported that extracellular alpha-synuclein inhibits S1P1 receptor-Gi protein coupling. We also reported S1P1 receptor activity on multivesicular endosomes (MVEs) is critical for the protein sorting into exosomes. In this study we showed the data that extracellular alpha-synuclein actually inhibits S1P1 receptor-Gi protein coupling in MVEs. Furthermore extracellular alpha-synuclein reduced the protein sorting in MVEs and ultimately CD63 level in the exosomes.

研究分野：細胞生物学

キーワード： α -シヌクレイン スフィンゴシン1リン酸受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エキソソームは直径50-100 nmの膜で包まれた細胞外顆粒で、細胞間情報伝達の担体として多くの注目を集めている。エキソソームの生成メカニズムについては、スフィンゴ脂質の代謝産物であるセラミドが多胞性エンドソーム(MVE)でのエキソソーム膜形成を引き起こすことがドイツの研究者らにより報告され注目されたが、エキソソームへのタンパク質等の積荷ソーティングメカニズムは不明であった。申請者らは、スフィンゴシン1-リン酸(S1P)の産生酵素スフィンゴシンキナーゼ(SPHK)の2つのサブタイプのうちSPHK2がエキソソーム系のMVEに特異的に集積してS1Pを産生し、MVE膜上に存在するS1P受容体1型(S1P1受容体)を持続的に活性化し、これがエキソソームへの積荷ソーティング過程において必須であることを初めて報告した。

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患であり、罹患神経細胞内にレビー小体と呼ばれる封入体が認められる。レビー小体の主要な構成タンパク質は α -シヌクレインであることから、本タンパク質がパーキンソン病の発症に関与する原因タンパク質であると考えられている。しかし、 α -シヌクレインの生理・病態機能に関してはほとんど分かっておらず、本タンパク質の機能解明が喫緊の課題となっている。また α -シヌクレインはエキソソームの積荷として神経細胞外に放出され、プリオンと同様に病原性が伝搬されるというモデルが提唱される一方で、この放出は神経細胞にとってのクリアランス経路であるという意見もあり、その生理的意義は不明である。

申請者らは、神経細胞外液に α -シヌクレインを添加することで、細胞遊走性が阻害されるという現象を見いだしてその解析を進める中で、S1P1受容体と三量体型Gタンパク質Giとのカップリングを α -シヌクレインが強力に阻害することを見いだした。

申請者らの研究結果を総合すると、MVE内での濃度が何らかの理由で上昇した α -シヌクレインは、S1P1受容体とGiのカップリングを阻害することで、エキソソームへの積荷ソーティング(α -シヌクレイン自身を含む)を抑制し、エキソソームとして放出されず、その結果として同タンパク質の細胞内濃度の上昇が起こり、細胞内に有害なオリゴマーとして蓄積する可能性が想定される。その検証は科学的に重要であるのみならず、パーキンソン病の治療/予防ストラテジーを創出する上でもきわめて重要である。

2. 研究の目的

以上の背景より本研究では、パーキンソン病の病態にS1P受容体シグナル(受容体分子のパルミトイル化を含む)を介するエキソソーム放出が関与という仮説の検証を行うと共に、パーキンソン病の新規予防/治療ストラテジーの可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)法を用いてS1P1受容体とGiタンパク質とのカップリングを定量するアッセイ系を既に確立しているため、この手法を細胞内のMVEに応用することで、細胞外に添加した α -シヌクレインがMVEにおいてS1P1受容体とGiタンパク質とのカップリングを阻害していることを示す。また、細胞外の α -シヌクレインがMVEに集積することは、蛍光色素で標識した α -シヌクレインを細胞内に取り込ませて検討する。

(2) 細胞内MVEでのタンパク質ソーティングを定量するアッセイ系および、細胞外に放出されたエキソソームにソーティングされた特定のタンパク質を個々のエキソソーム毎に定量するアッセイ系を用いて、神経細胞からの α -シヌクレインの放出における細胞外 α -シヌクレインの影響について検討する。

4. 研究成果

(1) S1P1-CFPとG γ -YFPを発現させたSH-SY5Y細胞を用いてFRET解析を行ったところ、以前申請者らのグループが報告しているように細胞内MVE上でのS1P1受容体とG γ との結合(定常状態でのS1P1受容体とGiタンパク質の恒常的共役を示す)が認められた。細胞外に1 μ Mの組換え α -シヌクレインを添加して18時間培養することで、このMVE上でのS1P1受容体とGiタンパク質との共役は阻害されていた。また重要なことに、S1P2受容体で同様の実験を行ったところ、S1P2受容体もMVE上に存在しており恒常的なGタンパク質との共役が観察されるにもかかわらず、 α -シヌクレインによる阻害効果は認められなかった。すなわち、 α -シヌクレインの作用には特異性が見られることが明らかとなった。

さらにこの α -シヌクレインの作用メカニズムについて検討する中で、 α -シヌクレイン処理した細胞においては、S1P1受容体が細胞膜上で本来のラフト画分からラフト外へと除外さ

れていることを発見した (図1)。ラフト画分は各種のシグナル伝達分子が集積し、円滑なシグナル伝達を可能とする場であるとされている。したがって、ラフト画分からS1P1受容体が排除されることが、 α -シヌクレインによるS1P1受容体とGiタンパク質の共役阻害におけるメカニズムである可能性が示唆された。

さらに、この作用においては α -シヌクレインの配列に含まれるガングリオシド結合領域が重要な役割を果たしていることを、変異型 α -シヌクレインを用いて明らかにした。

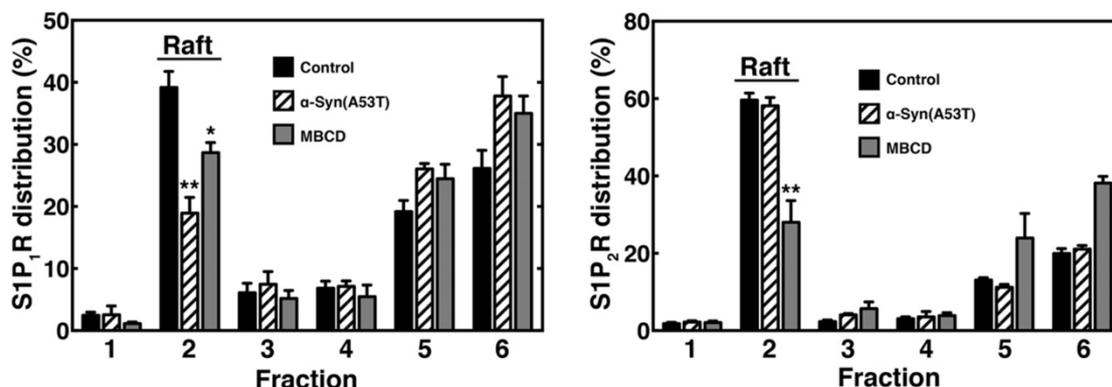


図1 S1P1受容体およびS1P2受容体のラフト画分への局在と各々に対する α -シヌクレインの作用

S1P1-YFPあるいはS1P2-GFPを発現させたSH-SY5Y細胞を α -シヌクレインあるいは細胞膜からコレステロールを枯渇させることでラフト構造を破壊するMBCDで処理し、密度勾配遠心法でラフト画分(フラクション2)を分離した。S1P1受容体のラフト画分での局在が α -シヌクレイン処理およびMBCD処理で低下している。一方でS1P2受容体の局在はMBCDのみで低下している点に注目。

(2) 神経細胞であるSH-SY5Y細胞を α -シヌクレインで18時間処理している間に細胞上清へと放出されるエクソソームを遠心法にて回収し、エクソソームにソーティングされるタンパク質としてよく知られているCD63の含量を測定したところ、 α -シヌクレイン処理によってエクソソーム中のCD63含量が低下し、 α -シヌクレインによるS1P1受容体-Gi脱共役により確かにMVE上でのソーティング阻害が起こっていることが確認された(図2)

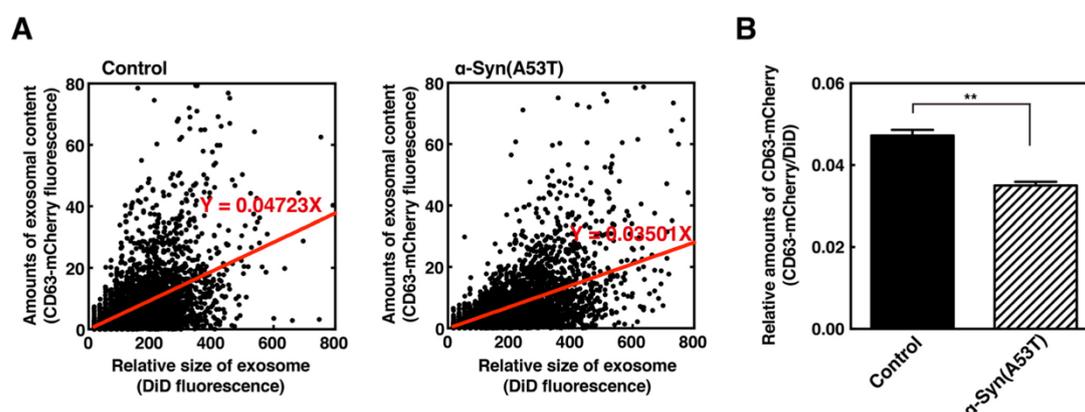


図2 SH-SY5Y細胞から放出されたエクソソーム中のCD63含量に対する細胞外 α -シヌクレインの効果

Aでは横軸を個々のエクソソーム上でのDiD染色(エクソソーム中の総脂質量を反映)、縦軸をCD63量として、ドットプロット表示している。 α -シヌクレイン処理によってエクソソームの数や総脂質量に変化がないにもかかわらずCD63量が減少し、赤線の傾きが低下していることに注目。Bはその定量結果を示したもの。

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 0件）

1. 著者名 Kajimoto T, Caliman AD, Tobias IS, Okada T, Pilo CA, Van AN, Andrew McCammon J, Nakamura SI, Newton AC	4. 巻 12
2. 論文標題 Activation of Atypical Protein Kinase C by Sphingosine 1-phosphate Revealed by an aPKC-specific Activity Reporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aat6662	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 該当する

1. 著者名 Badawy Shaymaa Mohamed Mohamed, Okada Taro, Kajimoto Taketoshi, Hirase Mitsuhiro, Matovelo Shubi Ambwene, Nakamura Shunsuke, Yoshida Daisuke, Ijuin Takeshi, Nakamura Shun-ichi	4. 巻 293
2. 論文標題 Extracellular α -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8208 ~ 8216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.001986	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
---------	---------