

機関番号：32676

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790852

研究課題名 (和文) ATP13A2 の分子機能探索と局在異常を伴う神経細胞死の機序解明

研究課題名 (英文) Research on molecular function of ATP13A2 and neuronal cell death causing altered localization of ATP13A2

研究代表者

里 史明 (SATO FUMIAKI)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10468580

研究成果の概要 (和文) : 家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである ATP13A2 が細胞内小器官の一つであるリソソームの膜に局在することを明らかとした。この遺伝子発現を抑制すると神経細胞由来の細胞でのみ細胞死が認められた。この時、リソソーム内酵素であるカセプシン D の活性が上昇しており、細胞内に異常構造物の蓄積を確認した。以上のことから ATP13A2 の変異によるパーキンソン病発症はリソソーム機能異常が原因であることが予想された。

研究成果の概要 (英文) : ATP13A2, identified as one of the causative gene product for familial parkinson's disease (PARK9), localized at lysosomal membrane. The suppression of *ATP13A2* expression led to apoptosis in SH-SY5Y cells. The defective expression also was increased an enzyme activity of cathepsins, especially cathepsin D. Moreover, electron microscopy showed the accumulation of high density large structure, which was immunoreacted with antibodies against lamp2 and cathepsin D, in SH-SY5Y cells. These data suggests that PARK9 caused by loss-of-function of ATP13A2 is associated with lysosomal dysfunction, resulting in cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患において神経細胞内に異常タンパク質の蓄積を認めることから、その発症と細胞内タンパク質分解機構との関連が注目されている。黒質ドーパミン神経の脱落を特徴とするパーキンソン病 (PD) においても、単一遺伝子異常で発症する家族性 PD (FPD) の原因遺伝子がタンパク質分解に関与することが知られている。

2. 研究の目的

FPD 原因タンパク質の一つである ATP13A2 は、ほとんど研究されていないため、その分子機能並びに FPD 発症機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ATP13A2 の細胞内局在の決定

① ATP13A2 の細胞内局在を検討するため、V5 タグまたは GFP 付加 ATP13A2 の作製を行い、

神経芽腫細胞 (SH-SY5Y 細胞) 内における ATP13A2 分子の局在を各種オルガネラマーカータンパクとの二重蛍光免疫染色で検討した。また、リソソーム膜タンパク質 Lamp2 と GFP-ATP13A2 を用い免疫電顕を行い、ATP13A2 の細胞内局在を決定した。

② 同様に V5 タグ付加した病原変異体の局在を蛍光免疫染色で検討した。

(2) ATP13A2 遺伝子発現抑制による細胞死機序の解明

ATP13A2 siRNA または shRNA を導入した SH-SY5Y 細胞または HepG2 細胞を用いて以下の実験を行った。

① 細胞死の判定

細胞死のタイプを判別する目的で、アネキシン V/PI 染色した細胞をフローサイトメトリーにて解析した。

② 上記の細胞死に対するシグナル伝達経路を検討するため、カスパーゼ 3 抗体を用いウエスタンブロットを行った。また、活性化カスパーゼ 3 と TUNEL の二重蛍光染色を行った。

③ 上記細胞死に対し、野生型または病原変異 ATP13A2 が細胞死を回復させるか否かをカスパーゼ 3 抗体を用いたウエスタンブロットにて検討した。

(3) ATP13A2 発現抑制下におけるリソソームへの影響

(2)と同様に ATP13A2 siRNA または shRNA を導入した SH-SY5Y 細胞または HepG2 細胞を用いて以下の実験を行った。

① ウエスタンブロット法でリソソーム膜タンパク、酵素の変動を検討した。同時に、カセプシン群の酵素活性を蛍光基質を用いて測定した。

② オートファジーとの関連を検討するため、オートファゴソームマーカーである LC3 とオートファジー依存的に分解される p62 の変化をウエスタンブロット法、並びに蛍光免疫染色で検討した。

③ リソソームの形態変化を観察する目的で、抗 Lamp1 及び 2、抗カセプシン D 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。また、電子顕微鏡観察によりリソソーム、オートファゴソームの変化を検討した。

4. 研究成果

(1) ATP13A2 の細胞内局在の決定

①各種オルガネラマーカーとの二重蛍光免疫染色の結果、ATP13A2 はリソソーム膜タンパク質である Lamp1 及び 2 と強く共局在した。(図 1)また、GFP 付加 ATP13A2 を導入した SH-SY5Y 細胞の免疫電顕では、GFP(矢頭)と Lamp2(矢印)のそれぞれのシグナルは同一膜上に検出されたことから、ATP13A2 はリソソーム膜に局在することが明らかとなった。(図 2)

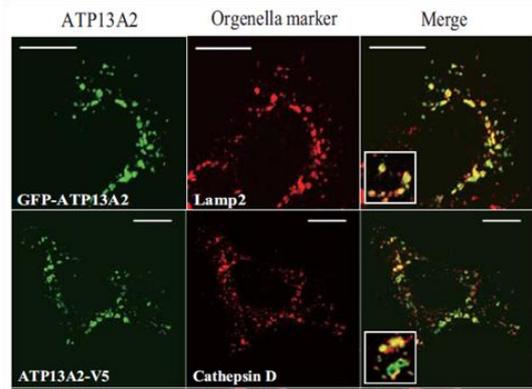


図 1 ATP13A2 と Lamp1 及び 2 の共局在

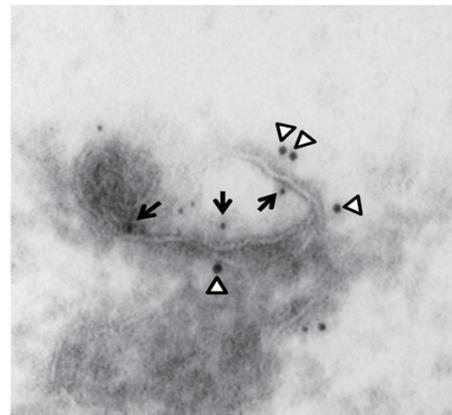


図 2 GFP-ATP13A2 と Lamp2 の免疫電顕

②①と同様の方法で、ATP13A2 病原変異体の細胞内局在を検討した。邦人唯一の患者から同定された F182L 始め 5 種の変異体の局在は、小胞体に局在する変異体 (F182L, G504R, 1306+5 G→A) と野生型と同様にリソソームに局在する変異体が存在した (T12M, G533R) (図 3)。

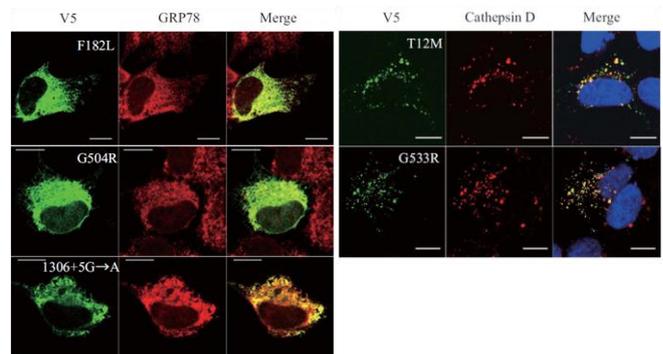


図3 病原変異体の局在

(2) ATP13A2 遺伝子発現抑制下における細胞死の機序解明

ATP13A2 siRNA (KD) により SH-SY5Y 細胞のみで継時的な細胞活性低下が認められたことから以下の実験を行った。

① アネキシン V と PI による染色で早期アポトーシスの検出を行った。HepG2 細胞においては、KD により早期アポトーシスが増加したがアネキシン陽性細胞は 5% 以下であった。しかしながら、SH-SY5Y 細胞において、KD により細胞死が約 5 倍増加し、25% 以上の細胞がアネキシン V 陽性であった。また、ATP13A2 shRNA により安定的に遺伝子発現を抑制した両細胞においても、HepG2 では細胞死は認められず、SH-SY5Y 細胞において約 30% の細胞死が認められた。しかしながら、PI 陽性細胞の増加は認められないことから、ATP13A2 の遺伝子発現抑制は、神経細胞に強くアポトーシスを誘導することが分かった。(図 4)

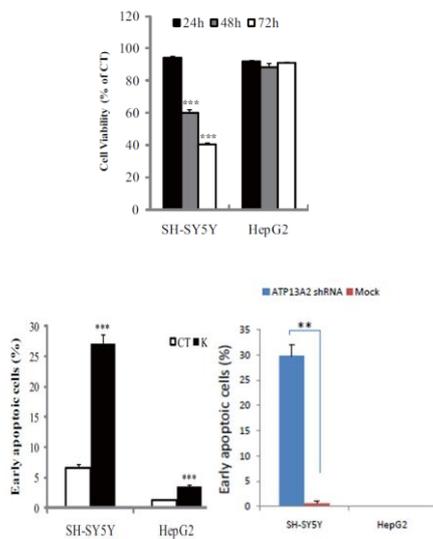


図4 KD時における細胞活性(上)と早期アポトーシスの増加(下)

② KD 時におけるカスパーゼ 3 の活性化をウエスタンブロット法で検討した結果、①同様に KD により SH-SY5Y 細胞でのみカスパーゼ 3 の活性化が認められ、HepG2 では認められなかった。SH-SY5Y 細胞の TUNEL/活性化カスパーゼ 3 抗体による免疫染色においても TUNEL/活性化カスパーゼ 3 陽性細胞の増加を認めた。これらのことから、KD による細胞死は、カスパーゼ 3 を介したアポトーシスである可能性

が考えられた。しかしながら、ミトコンドリアからのシトクローム c の逸脱、カスパーゼ 9 の活性化は認められず、ミトコンドリアを介したカスパーゼ経路によるアポトーシスではないことが予測された。(図 5)

③野生型 ATP13A2 と病原変異体の過剰発現による KD による細胞死の回復をカスパーゼ 3 の活性化を指標に検討した。KD による細胞死は、野生型の過剰発現で抑制されたが、病原変異体の過剰発現では回復しなかった。このことと (1)-②から、PARK9 発症は、病原変異体の細胞内局在変化が原因ではなく ATP13A2 の機能欠陥が原因であると考えられた。(図 6)

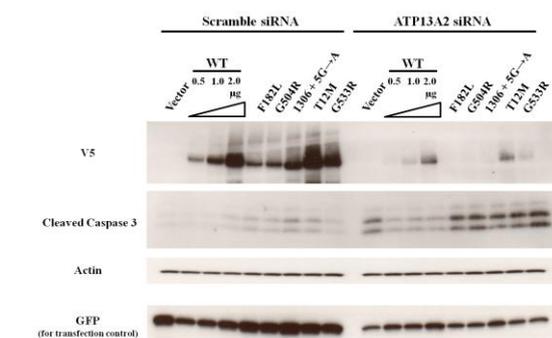


図6 野生型 ATP13A2 は KD による細胞死を回復する。

(3) KD によるリソソームへの影響

① KD 時の SH-SY5Y 細胞のリソソーム膜タンパク質 (Lamp1 及び 2) のタンパクレベルは上昇傾向を示した。カセプシン群では、カセプシン D のタンパクレベルでの上昇と有意な酵

素活性の増加を認めた。安定遺伝子発現抑制 SH-SY5Y 細胞ではカセプシン D 酵素活性の増加以外にカセプシン B 及び L の活性増加も認められた。(図 7)

② KD によるオートファジーの変動を検討する目的で LC3 及び p62 の変動をウエスタンブロット法で検討したが、これらのタンパク量に変動は認められなかった。さらに、抗 LC3 または、抗 p62 抗体を用い蛍光免疫染色を行ったがこれらの変動は認められないことから、ATP13A2 はオートファジーに関与しないことが考えられた。

③ KD によるリソソーム形態の変化を蛍光免疫染色で検討した結果、SH-SY5Y 細胞において、KD によって Lamp タンパク、カセプシン陽性の凝集体が観察された(図 8)。さらに、電子顕微鏡観察の結果、細胞内に電子密度の高い異常構造物を認めた(図 9)。安定遺伝子抑制細胞では、HepG2 と SH-SY5Y 細胞で異常構造物が観察された。これらのことから、ATP13A2 遺伝子発現抑制は、リソソーム機能異常を引き起こす可能性が考えられた。しかしながら、このリソソーム機能異常と細胞死との直接的な関わりは不明のままである。

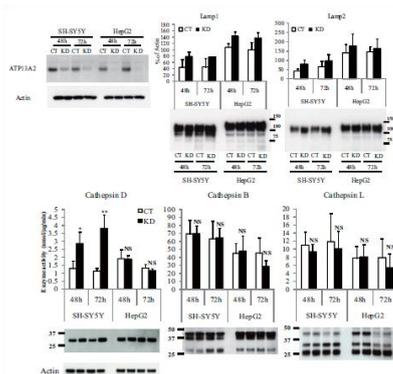


図 7 KD によるリソソーム関連タンパク群の変化とカセプシン酵素活性

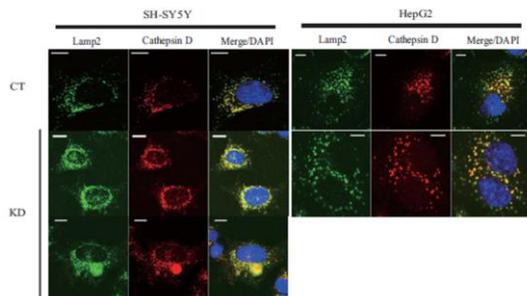


図 8 KD による Lamp2 とカセプシン D の凝集

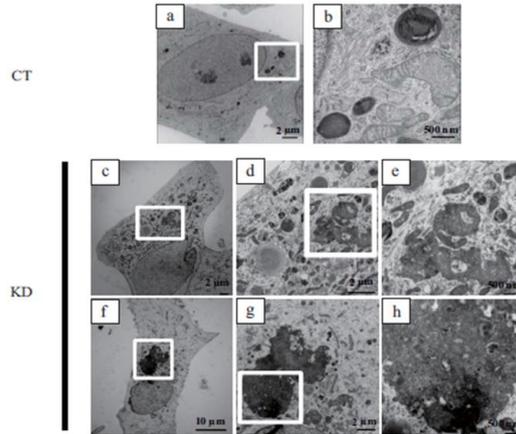


図 9 KD による細胞内異常構造物の出現

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)

[学会発表] (計 4 件)

① 里史明、PARK9 発症とリソソーム機能異常、第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 21 日、仙台国際センター

② 里史明、PARK9 発症とリソソーム機能異常、第 3 回パーキンソン病・運動障害コンgres、2009 年 10 月 9 日、品川プリンスホテル

③ 里史明、PARK9 発症とリソソーム機能異常、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 22 日、東京国際フォーラム

③ 里史明、家族性パーキンソン病遺伝子；PARK9 の遺伝子発現抑制は神経細胞死を引き起こす、2010 年 12 月 8 日、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里 史明 (SATO FUMIAKI)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10468580