

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03432

研究課題名(和文) アグリソームによる神経病原性蛋白質の不活化機構

研究課題名(英文) Mechanism of inactivation of neuropathogenic protein toxicity by aggresomes

研究代表者

藤井 雅寛 (FUJII, MASAHIRO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30183099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病は神経変性疾患である。これらの疾患では、それぞれの病因タンパク質である α -シヌクレイン、タウ、TDP-43が神経細胞内で凝集体を形成し、この凝集体が神経毒性を発揮して神経変性疾患を引き起こすとされている。これらの凝集体の形成には、ストレス顆粒やアグリソームが関与していることが示唆されている。ストレス顆粒やアグリソームは、様々なストレスによって誘導される細胞質内凝集体である。本研究では、USP10とG3BP1がストレス顆粒とアグリソームの形成を誘導し、 α -シヌクレイン、タウ、TDP-43の凝集体の形成を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病は、頻度の高い神経変性疾患である。これらの疾患では、病原性タンパク質の凝集体が神経に対して毒性を発揮し、疾患を引き起こす。本研究では、USP10とG3BP1タンパク質が、これら3つの疾患における病原性タンパク質の凝集に重要な役割を果たすことを明らかにした。この発見により、今後、神経変性疾患の病態解明と治療薬の開発が促進されることが期待される。タンパク質凝集体は、がんや感染症など、神経変性疾患以外の疾患においても重要な役割を担っている。したがって、本研究で得られた成果は、神経変性疾患以外の分野にも貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Alzheimer's disease are neurodegenerative diseases. In these diseases, the respective pathogenic proteins, α -synuclein, tau, and TDP-43, form aggregates in neurons, and these aggregates are believed to be neurotoxic and cause neurodegenerative diseases. It has been suggested that stress granules and aggresomes are involved in the formation of these pathogenic aggregates. Stress granules and aggresomes are intracytoplasmic aggregates induced by various stresses. In this study, we show that USP10 and G3BP1 induce the formation of stress granules and aggresomes and regulate the formation of α -synuclein, tau, and TDP-43 aggregates.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ALS TDP-43 USP10 ストレス顆粒 アグリソーム 活性酸素 アルツハイマー病 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経病源性タンパク質のオリゴマーは、神経細胞に対して毒性を持つ。これらのオリゴマーの毒性は、大きな凝集体(アグリソーム)を形成することによって、不活化される。アグリソームは様々なストレスによって誘導されるユビキチン陽性のタンパク質凝集体である。アグリソーム内の凝集分子はオートファジーによって分解される。一方、凝集したタンパク質が分解されないと、病的な凝集体を形成し、この凝集体が神経変性疾患の発症に関与していることが示唆されている。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)とパーキンソン病(PD)はタンパク質の凝集体によって引き起こされる神経変性疾患である。ALSは運動神経の機能不全と細胞死を特徴とする。TDP-43は家族性および孤発性ALSの原因遺伝子の1つである。ALSの運動神経にはTDP-43の凝集体が形成され、神経毒性を持ち、ALSを発症させる。シヌクレインは、家族性および孤発性PDの原因タンパク質である。ユビキチン化したシヌクレインの凝集体が黒質、線条体などのドーパミン神経細胞に形成され、毒性を持ち、PDを発症させる。このシヌクレインの凝集体はレビー小体と呼ばれている。レビー小体は、アグリソームと類似のメカニズムにより形成されると考えられている。

2. 研究の目的

研究代表者は、USP10、G3BP1およびG3BP2からなるタンパク質複合体が、TDP-43およびシヌクレインの凝集体形成を制御することを見いだした。本研究では、神経病源性タンパク質の細胞毒性、病原性および凝集体形成におけるUSP10、G3BP1、G3BP2複合体の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ノックダウン実験: 細胞株にUSP10、G3BP1のshort-hairpin RNA(siRNA)によって、それぞれの発現を低下させた細胞株(ノックダウン細胞)を樹立した。

4. 研究成果

(1) **TDP-43の病的凝集体形成におけるストレス顆粒とアグリソームの役割**: 細胞株をプロテアソームの阻害剤で処理すると、まずストレス顆粒が形成され、ストレス顆粒の減少に伴って、アグリソームが形成された。ストレス顆粒は、ストレスによって形成が誘導される細胞質の凝集体である。このストレス顆粒にはG3BP1とUSP10が局在していた。細胞内のG3BP1の発現を低下させると、ストレス顆粒とアグリソームの形成がともに低下した。一方で、USP10の発現を低下させると、ストレス顆粒の減少が遅延し、アグリソームはほとんど形成されなくなった。定常状態では、TDP-43は主として核内に検出された。細胞株をプロテアソームの阻害剤で処理すると、TDP-43の一部が、ストレス顆粒に局在し、次に、アグリソームに局在した。G3BP1の発現を低下させると、TDP-43は、ストレス顆粒への局在が低下した。一方で、USP10の発現を低下させると、TDP-43は、アグリソームにはほとんど局在しなかった。TDP-43は細胞内で、G3BP1とUSP10に結合していた。TDP-43はRNA結合タンパク質であるが、RNAと結合しないTDP-43の変異体はUSP10/G3BP1に結合できず、ストレス顆粒への局在が低下し、アグリソームには局在しなかった。その代わりに、このTDP-43変異体は細胞質に不溶性の凝集体を形成した。また、細胞を亜硫酸(酸化剤)で処理すると、TDP-43はアセチル化され、RNA結合活性が低下することが知られている。アセチル化を模倣したTDP-43の変異体は、USP10と結合できず、ストレス下で細胞質に異常な凝集体を形成した。一方、孤発性ALS患者のTDP-43凝集体に、USP10は含まれていなかった。孤発性ALS患者のTDP-43はアセチル化されており、RNA結合活性が低下していることが報告されている。従って、アセチル化によりRNA結合活性が低下し、USP10に結合しないTDP-43

が ALS 患者で病的な凝集体を形成していることが示唆された。

(2) **USP10 はドーパミンによる ROS 依存性の神経細胞株の細胞死を抑制する** : SH-SY5Y はドーパミン応答性の神経細胞株である。SH-SY5Y 細胞において USP10 の発現をノックダウン (USP10-KD) し、ドーパミンで処理し、細胞死を定量した。ドーパミンは野生型 SH-SY5Y 細胞にアポトーシスを誘導し、このアポトーシスは USP10-KD により促進された。USP10-KD はドーパミンによる活性酸素の産生を増加させ、この活性酸素依存性のアポトーシスは抗酸化剤 (NAC) で処理することにより抑制された。

Nrf2/Keap1/p62 経路は抗酸化遺伝子群の発現を制御する。Nrf2 は転写活性化因子であり、神経細胞を含む多くの細胞種において、酸化ストレス下において、様々な抗酸化遺伝子の発現を誘導する。Nrf2 活性は、Keap1 と p62 によってそれぞれ負と正に制御されている。酸化ストレスに曝されていないときには、Keap1 が、ユビキチンライゲーズ複合体のアダプターとして、Nrf2 をユビキチン化し、Nrf2 の蛋白分解を誘導する。一方で、酸化ストレスに曝されると、p62 の 349 番目のセリンがリン酸化 (pp62/Ser349) され、pp62/Ser349 が Keap1 に強く結合し、Nrf2 から、Keap1 が遊離し、Nrf2 の蛋白分解を低下させる。そこで、Nrf2/Keap1/p62 経路に対する USP10 の作用を検討した。ドーパミンによる SH-SY5Y の細胞死は、p62 ノックダウンあるいは Nrf2 のノックダウンでも増加した。一方で、ドーパミン処理による USP10-KD 細胞の細胞死は Keap1-KD によって減少した。これらの結果は、USP10 が Nrf2/Keap1/p62 経路を介して、細胞死を抑制することを示唆した。

ドーパミン処理による、Nrf2/Keap1/p62 関連タンパク質の発現量の変化を検討した。野生型細胞では、ドーパミン処理後に、Nrf2 と p62 の蛋白量が増加したが、この増加は、USP10-KD 細胞では観察されなかった。さらに、USP10-KD 細胞では、pp62/Ser349 量が、ドーパミン処理前から低下し、Keap1 と p62 都の結合量が低下していた。従って、USP10 は、pp62/Ser349 の量を増加させることによって Nrf2 活性を高めることが示唆された。

(3) **G3BP1 はユビキチン化タンパク質の発現量および凝集体形成を減少させる** : HeLa 細胞株で G3BP1 の発現を低下させると、細胞内のユビキチン化タンパク質の量が有意に増加した。嚢胞性線維症 (CF) は、特定の腺から異常な分泌物が分泌され、肺や消化管などの臓器を損傷する遺伝性疾患である。cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) のアミノ酸欠失変異タンパク質 (CFTR- F508) は CF の原因分子である。CFTR- F508 は細胞内でユビキチン化され、アグリソームを形成する。G3BP1-KD 細胞に CFTR- F508 を発現するプラスミドを導入し、CFTR- F508 に対する G3BP1-KD の作用を解析した。G3BP1-KD により、CFTR- F508 の蛋白量と凝集体形成が増加した。その際、G3BP1-KD は CFTR- F508 のユビキチン化量を増加させた。シヌクレインでも同様の実験を実施した。G3BP1-KD はユビキチン化したシヌクレインの量を増加させた。以上の結果は、G3BP1 がユビキチン化タンパク質の蛋白分解を促進し、ユビキチン化タンパク質の量と凝集体形成を抑制していることを示唆した。

G3BP1 は USP10 と p62 に結合する。USP10 と p62 は協調して、ユビキチン化タンパク質の凝集体形成を誘導する。USP10 をノックダウンすると、G3BP1-KD による CFTR- F508 の発現量と凝集体形成の増加が低下した。同様に、p62 のノックダウンも G3BP1-KD による CFTR- F508 の発現量と凝集体形成の増加を低下させた。これらの結果は、G3BP1 が、p62 と USP10 によるユビキチン化タンパク質の凝集体形成を抑制し、ユビキチン化タンパク質の分解を誘導していることを示唆した。プロテアソーム活性を調べたところ、G3BP1-KD がプロテアソーム活性を阻害することが示された。

HeLa 細胞の細胞増殖に対する CFTR- F508 の作用を、Cell counting kit-8 で定量した。CFTR- F508 を細胞に発現しても、細胞増殖の抑制は観察されなかった。G3BP1-KD 細胞に CFTR- F508 を発現しても、細胞増殖は低下しなかった。一方で、p62-KD あるいは USP10-KD 細胞に、CFTR- F508 を発現すると、細胞増殖が低下し、この細胞増殖の低下は、G3BP1-KD とのダブルノックダウンによってさらに増強された。G3BP1-KD が CFTR- F508 の凝集体形成を誘導し、この凝集体形成を USP10-KD あるいは p62-KD が抑制することを踏まえて、以上の結果は、ユビキチン化 CFTR- F508 の細胞増殖低下作用が CFTR- F508 の凝集体形成によって抑制されていること、また、この凝集体形成を介した抑制に G3BP1, p62 および USP10 が関与することを示唆した。

【今後の展望】

USP10 が シヌクレインの凝集体形成を促進することが示唆された。USP10 の抑制剤は、シヌクレインの凝集体形成を抑制することが期待できる。USP10 の抑制剤の開発を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Taha MS, Haghghi F, Stefanski A, Nakhaei-Rad S, Kazemein Jasemi NS, Al Kabbani MA, Gorg B, Fujii M, Lang PA, Haussinger D, Piekorz RP, Stuhler K, Ahmadian MR.	4. 巻 288(3)
2. 論文標題 Novel FMRP interaction networks linked to cellular stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 837-860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15443	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 Maeda N, Matsuda A, Otsuguro S, Takahashi M, Fujii M, Maenaka K.	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Antitumor Effect of Sugar-Modified Cytosine Nucleosides on Growth of Adult T-Cell Leukemia Cells in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines8040658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Piatnitskaia Svetlana, Takahashi Masahiko, Kitaura Hiroki, Katsuragi Yoshinori, Kakihana Taichi, Zhang Lu, Kakita Akiyoshi, Iwakura Yuri, Nawa Hiroyuki, Miura Takeshi, Ikeuchi Takeshi, Hara Toshifumi, Fujii Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 USP10 is a critical factor for Tau-positive stress granule formation in neuronal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47033-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Anisimov Sergei, Takahashi Masahiko, Kakihana Taichi, Katsuragi Yoshinori, Kitaura Hiroki, Zhang Lu, Kakita Akiyoshi, Fujii Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 G3BP1 inhibits ubiquitinated protein aggregations induced by p62 and USP10	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46237-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sarkar Bidhan, Nishikata Ichiro, Nakahata Shingo, Ichikawa Tomonaga, Shiraga Toshiyuki, Saha Hasi Rani, Fujii Masahiro, Tanaka Yuetsu, Shimoda Kazuya, Morishita Kazuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Degradation of p47 by autophagy contributes to CADM1 overexpression in ATLL cells through the activation of NF- B	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39424-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichikawa Tomonaga, Nakahata Shingo, Fujii Masahiro, Iha Hidekatsu, Shimoda Kazuya, Morishita Kazuhiro	4. 巻 1865
2. 論文標題 The regulation of NDRG2 expression during ATLL development after HTLV-1 infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 2633 ~ 2646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2019.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤井雅寛
2. 発表標題 ウイルス研究は面白い； ウイルス性神経疾患に基づいたパーキンソン病の発症機構の解析
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会学術集会 第57回日本細菌学会中部支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井雅寛
2. 発表標題 ウイルス性および非ウイルス性神経変性疾患の発症機構
3. 学会等名 第42回神経組織培養研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井雅寛
2. 発表標題 Aberrant cytoplasmic aggregation of TDP-43 is prevented by interaction with G3BP1 and USP10
3. 学会等名 日本神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junya Sango ¹ , Taichi Kakihana ¹ , Yoshinori Katsuragi, Masahiko Takahashi, Sergei Anisimov, Masahiro Fujii
2. 発表標題 USP10 inhibits dopamine-induced ROS-dependent apoptosis of neuronal cells through Nrf2/Keap1/p62 pathway
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 雅彦、北浦 弘樹、柿田 明美、垣花 太一、葛城 美德、小山 哲秀、小野寺 理、岩倉 百合子、那波 宏之、小松 雅明、藤井 雅寛
2. 発表標題 G3BP1およびUSP10はTDP-43との相互作用により異常な細胞質のTDP-43凝集を防ぐ
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiko Takahashi, Hiroki Kitaura, Akiyoshi Kakita, Taichi Kakihana, Yoshinori Katsuragi, Yuriko Iwakura, Hiroyuki Nawa, Masaya Higuchi, Masaaki Komatsu, Masahiro Fujii
2. 発表標題 USP10 promotes aggresome formation to induce α -synuclein aggregation and Lewy body but not GCI
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiko Takahashi, Hiroki Kitaura, Akiyoshi Kakita, Taichi Kakihana, Yoshinori Katsuragi, Yuriko Iwakura, Hiroyuki Nawa, Masaya Higuchi, Masaaki Komatsu, Masahiro Fujii
2. 発表標題 USP10 is a critical factor in α -synuclein aggregation, aggresome and Lewy body formations but not GCI
3. 学会等名 World Congress of Neurology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Svetlana Piatnitskaia, Masahiko Takahashi, Hiroki Kitaura, Yoshinori Katsuragi, Taichi Kakihana, Akiyoshi Kakita, Yuriko Iwakura, Hiroyuki Nawa, Takeshi Miura, Takeshi Ikeuchi, Toshifumi Hara, Masahiro Fujii
2. 発表標題 USP10 promotes Tau aggregation through stress granule formation in neuronal cells
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Anisimov, Masahiko Takahashi, Yoshinori Katsuragi, Taichi Kakihana, Hiroki Kitaura, Akiyoshi Kakita, Masahiro Fujii
2. 発表標題 G3BP1 inhibits ubiquitinated protein aggregations induced by p62 and USP10
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiko Takahashi, Hiroki Kitaura, Akiyoshi Kakita, Taichi Kakihana, Yoshinori Katsuragi, Yuriko Iwakura, Hiroyuki Nawa, Masaya Higuchi, Masaaki Komatsu, Masahiro Fujii
2. 発表標題 USP10 is a critical factor for aggresome formation to induce α -synuclein aggregation and Lewy body but not GCI
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページで、以下の研究内容を紹介した。
(1) パーキンソン病の病原性蛋白質のコピキチン化と凝集体形成を抑制している蛋白質を同定
<https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2019/09/topi20190910.pdf>
(2) アルツハイマー病の原因蛋白質タウの凝集体形成を開始させる分子を同定
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31332267/>
(3) パーキンソン病において神経病原因蛋白質を不活化する蛋白質を同定
https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/11/301107_re.pdf
(4) ドーパミン神経細胞の細胞死を抑制する新たな分子を発見
<https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/11/211125rs.pdf>
(5) 筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であるTDP-43に結合し、病的なTDP-43凝集体の形成を抑制する分子を発見
<https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/01/220117rs.pdf>
(6) 筋萎縮性側索硬化症においてTDP-43蛋白質の分解を誘導し、異常なTDP-43凝集体の形成を抑制する分子メカニズムを解明
<https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/06/210629rs.pdf>
<https://www.niigata-u.ac.jp/en/news/8768/>

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
研究 分担者	長谷川 成人 (HASEGAWA Makoto) (10251232)	公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・分野長 (82609)	
研究 分担者	柿田 明美 (KAKITA Yoshimi) (80281012)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	

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
---------	---------