

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16525

研究課題名（和文）脱リン酸化酵素PP4c欠損による中枢神経変性のメカニズム解明

研究課題名（英文）Research on the mechanism of neuronal degeneration caused by protein phosphatase 4 deficiency.

研究代表者

松本 早紀子（Matsumoto, Sakiko）

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00789654

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：微小管ダイナミクスを制御するSer/Thr脱リン酸化酵素PP4cの欠損マウスは、海馬組織が進行性に萎縮する。この神経変性メカニズムを明らかにするため、はじめにPP4cの中枢神経における相互作用タンパク質として、数種類のTubulinを同定した。またPP4c欠損が海馬ニューロンにおいてシナプス関連タンパク質が発現減少することから、同じ微小管関連タンパクでシナプスに局在するシヌクレインに着目し、シヌクレインの新しい翻訳後修飾ヒドロキシ化を発見した。PP4c欠損によるシヌクレインのリン酸化亢進とそれに付随するヒドロキシ化によって海馬ニューロンの変性が誘発される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PP4c欠損マウスが示す海馬ニューロンの選択的かつ進行性の脱落は、アルツハイマー病における萎縮と類似している。PP4cと同じファミリーであるPP2Aはアルツハイマー病の原因であるtauタンパク質の脱リン酸化酵素である。さらに本研究において着目したシヌクレインもアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の発症に大きく関わる分子である。今後、PP4cの脱リン酸化活性とシヌクレインのリン酸化およびヒドロキシ化の間にある分子メカニズムが明らかになれば、アルツハイマー病の発症機構解明や治療法開発の重要な足がかりになることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Deficiency of PP4c, Ser/Thr protein phosphatase regulating microtubule dynamics, causes a progressive neurodegeneration of hippocampus in mice. To study the mechanism of this neuronal cell loss, we first identified that PP4c interacts with some tubulins in central nervous system, and found a dysregulation of the expression of synaptic protein in PP4c-deficient neurons. We focused on α -synuclein, a microtubule-associated protein, that is localized in synapses, and found a hydroxylation of α -synuclein as a new posttranslational modification, which was accompanied by a phosphorylation. These data suggest that PP4c-deficiency may cause the neuronal cell death through the excess phosphorylation and hydroxylation of α -synuclein in central nervous system.

研究分野：神経科学

キーワード：海馬 微小管 シヌクレイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Protein phosphatase 4 (PP4)は、Protein Phosphatase (PPP)ファミリーに属するセリン/スレオニン脱リン酸化酵素で、酵素活性を持つ触媒サブユニット(PP4c)と、それに結合する調節サブユニットが同定されている。近年、PP4cの脱リン酸化活性が分裂間期の微小管ダイナミクスを制御することが発見されたことから、微小管がより発達している神経細胞においてもPP4cが重大な機能を果たしている可能性が推測された。これまでに、PP4cが、発生期神経前駆細胞の増殖・分化に関わることが報告されているが、脳の成熟ニューロン特異的なPP4cの機能や基質は未だ明らかとなっていない。そこで、PP4cの中樞神経系の成熟ニューロンにおける機能の解明に迫るため、我々は独自にPP4cコンディショナルノックアウト(CKO)マウスを作製した。Cre-loxPシステムによって生後の大脳ニューロン特異的にPP4cを欠損させたところ、海馬組織が選択的かつ進行性に萎縮する驚くべき表現型を発見した(図1)。この現象から、PP4cが脱リン酸化活性を介して海馬ニューロンおよび海馬組織全体の生死を大きく左右する重要な機能をもつ可能性が浮上した。

2. 研究の目的

本研究課題では、PP4cの相互作用タンパク質を同定し、PP4c欠損による海馬ニューロンの細胞死および神経変性に至る分子メカニズムを解明することを目的とする。さらに、PP4c遺伝子とアルツハイマー病などのヒト神経変成疾患との関連性にも迫る。

3. 研究の方法

(1) 相互作用タンパク質の同定

PP4cと相互作用するタンパク質を探索するため、PP4c欠損で顕著な表現型を示す「海馬組織」からのタンパク抽出液とGST融合PP4cリコンビナントタンパク質を用いたPull down assayを行ない、得られた候補タンパク質の質量分析を行なった。

(2)PP4c欠損海馬ニューロンにおける表現型解析

PP4cCKOマウスの海馬ニューロンを培養し、レンチウイルス発現システムを用いてCreリコンビナーゼを発現させて、PP4c欠損ニューロンを作製した。微小管関連タンパク質およびシナプス関連タンパク質の発現をウェスタンブロットによって解析し、野生型ニューロンと比較した。

(3)αシヌクレインの翻訳後修飾の探索

αシヌクレインとチロシンヒドロキシラーゼのリコンビナントタンパク質を37度で反応させ、αシヌクレインをペプチドに加水分解したあと質量分析を行なった。

(4)ヒドロキシ化αシヌクレイン特異的抗体の作製と培養細胞における解析

ヒドロキシ化αシヌクレインのモノクローナル抗体をマウスを免疫して作製した。神経細胞の培養モデル細胞であるPC12細胞にレンチウイルス発現システムを用いてmCherry融合αシヌクレインを過剰発現させ、作製した抗体を用いてαシヌクレインのヒドロキシ化およびリン酸化をウェスタンブロットと免疫染色によって解析した。

4. 研究成果

PP4c の中枢神経における機能を探索するために、Cre-loxP システムを用いて脳の神経細胞で PP4c を欠損するマウスを作製した。PP4c CKO マウスの左脳室内に、Synapsin I プロモーター制御下でニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを強制発現するアデノ随伴ウイルス (AAV, 群馬大学医学系研究科平井宏和教授との共同研究にて作製) を注入したところ、同側の海馬が選択的かつ進行性に萎縮するという興味深い表現型を認めた (図 1)。この現象が PP4c 欠損によることを証明するため、PP4c 欠損マウスに対して PP4c を過剰発現させたところ、表現型がレスキューされ、海馬ニューロンの脱落が PP4c 欠損による特異的な現象であることがわかった。

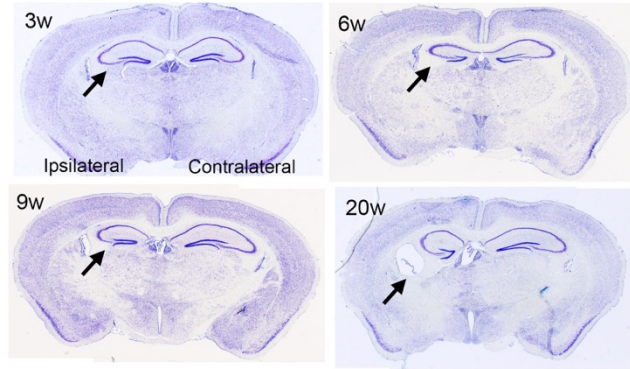


図 1 ニューロン特異的 PP4c 欠損マウスの表現型

SynapsinI プロモーター制御下でニューロン特異的に Cre を発現する AAV を左脳室に注入後 3, 6, 9, 20 週(w)の PP4c CKO マウス脳冠状断切片(ニッスル染色)。左側の海馬(矢印)が進行性に萎縮している。

この分子メカニズムに迫るため、本研究でははじめに PP4c の相互作用タンパク質の探索を行なった。マウス海馬組織のタンパク抽出液からリコンビナント PP4c タンパク質と相互作用するタンパク質を質量分析を用いて探索したところ、微小管を構成する β tubulin が同定された。PP4c は微小管のダイナミクスを制御することがすでに報告されており、神経細胞においても微小管の機能維持に関わっている可能性が示唆された。

次に、PP4c の表現型をさらに詳しく解析するために、PP4c CKO マウスから採取した海馬ニューロンを初代培養し、レンチウイルス発現システムを用いて mCherry 融合 Cre リコンビナーゼを発現させて、*in vitro* で PP4c 欠損ニューロンを作製した。この神経細胞の形態を観察した結果、野生型と比べてニューライトにおける tubulin の局在と突起の形態に差が認められた。そこで、これらの細胞のウェスタンブロットングを行なったところ、tubulin の発現量には差が認められなかったが、微小管関連タンパク質やシナプスタンパク質の発現が PP4c 欠損によって減少することが明らかになった (図 2)。

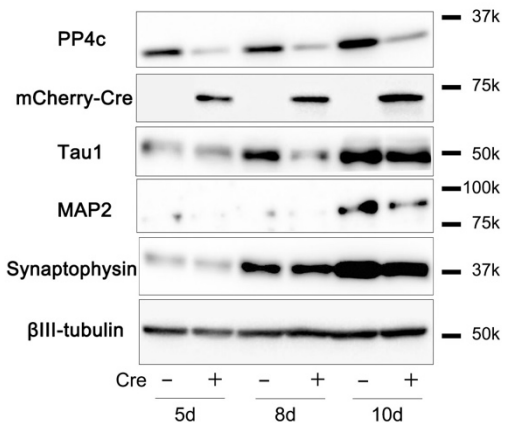


図 2 PP4c 欠損海馬ニューロンのウェスタンブロットング

PP4c CKO マウスの海馬ニューロン初代培養に mCherry 融合 Cre リコンビナーゼを発現させ、5, 8, 10 日後の細胞を用いて微小管関連タンパク質とシナプスタンパク質の発現を解析した。

海馬ニューロンでは α シヌクレインが高く発現していることが知られており、シナプス小胞や微小管とも相互作用があることがわかっている。 α シヌクレインの凝集は海馬組織に変性をもたらすレビー小体型認知症発症の原因であると考えられている。我々はい最近、独自に新しい α シヌクレインの翻訳後修飾として、136 番目チロシンがチロシンヒドロキシラーゼ (TH) によってヒドロキシ化されることを質量分析によって初めて同定した(図 3A)。海馬では CA3 領域において TH が発現しており、PP4c 欠損マウスより顕著な神経脱落部位と一致している。このヒドロキシ化 α シヌクレインを *in vivo* で検出するために、これを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を作製した。mCherry 融合 α シヌクレインを神経モデル細胞である PC12 細胞

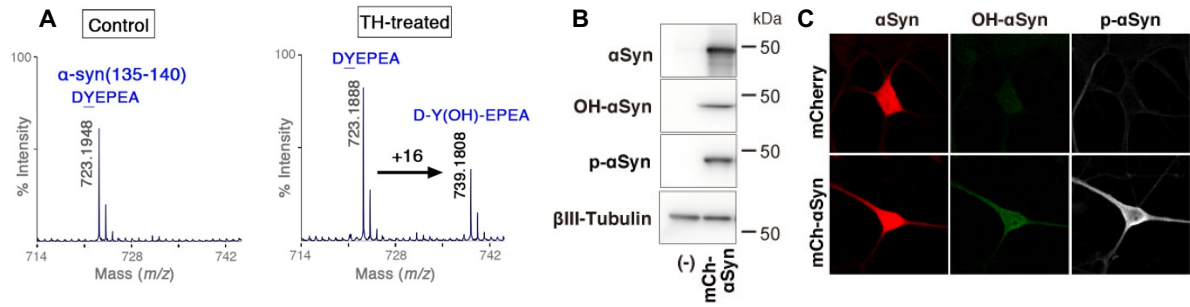


図3 THによる α -synuclein ヒドロキシ化修飾

(A)TH と反応して Y136 に酸素原子が付加した α シヌクレイン C 末端の MS 解析。(B)mCherry (mCh)融合 α シヌクレインを過剰発現した PC12 細胞の、ヒドロキシ化 α シヌクレイン(OH- α Syn)およびリン酸化シヌクレイン(p- α Syn)抗体を用いたウェスタンブロットニング。(C)mCherry のみ(上段)または mCh- α シヌクレイン(下段)を発現した PC12 細胞の免疫染色。

に過剰発現すると経時的にヒドロキシ化 α シヌクレインが増加することが明らかとなった(図 3B)。さらに、mCherry 融合 α シヌクレインをアデノ随伴ウイルス (AAV) で過剰発現させたマウスにおいても海馬組織を含む生体内で α シヌクレインがヒドロキシ化されることがわかった。加えて、PC12 細胞においては過剰発現した α シヌクレインのヒドロキシ化とリン酸化が同時に亢進することが明らかになった(図 3B, C)。これらの結果は現在論文にまとめて国際的な学術雑誌に投稿中である。

以上のことから、PP4c 欠損による α シヌクレインのリン酸化亢進とそれに付随するヒドロキシ化によって海馬ニューロンの変性が誘発される可能性が示唆された。今後は、PP4c の脱リン酸化活性と α シヌクレイン修飾の間にある分子機構の解明が必要である。 α シヌクレインはレビー小体型認知症をはじめとする多くの神経変性疾患の発症機構に関わっていることから、PP4c 欠損による海馬萎縮と異常な α シヌクレイン修飾の間の分子カスケードが明らかになれば、治療法開発の一助となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称 シヌクレイノパシー検出用バイオマーカー及びその利用 | 発明者 広常真治 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2022-037458 | 出願年 2022年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|