

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07058

研究課題名(和文) ほ乳動物細胞が内包する シヌクレイン蛋白質の凝集抑制機構の解明

研究課題名(英文) Study of intrinsic inhibitory mechanisms for alpha synuclein aggregation

研究代表者

高崎 輝恒 (Takasaki, Teruaki)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：30615539

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)：分裂酵母を遺伝子改変して作成した「パーキンソン病モデル細胞」を用いた解析により、抗てんかん薬として知られるバルプロ酸がパーキンソン病モデル細胞の細胞障害を顕著に増悪させることを見出した。ヒト神経細胞由来のcDNAライブラリから Syn凝集抑制因子を探索する試みについては良好な結果が得られなかったが、抗真菌作用をもつ化合物のひとつが Synの凝集化の抑制にはたらくことを見出した。さらに、遺伝学的解析を通じて、エンドサイトーシスのプロセスが Synの凝集化に深く関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進む日本社会において、パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の予防法・治療法の確立が喫緊の課題となっている。本研究では、抗てんかん薬として使用されるバルプロ酸がパーキンソン病の進行を早める可能性があることや、パーキンソン病の発症原因とされる Synの凝集化過程にエンドサイトーシス機構が関与すること、抗真菌作用をもつ化合物のひとつが Synの凝集化の抑制にはたらくことなどを見出した。これらの研究成果により、発症メカニズムの理解、および予防法・治療法の開発がさらに進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：Analysis using "Yeast model of Parkinson's disease (PD)" created by genetically-modified fission yeast revealed that valproic acid, which is an anti-epileptic drug, markedly exacerbated cytotoxicity in PD model cells. Although the attempt to search for Syn aggregation suppressors from a cDNA library prepared from human neuronal cells did not yield favorable results, we found that one of the antifungal reagents works to suppress Syn aggregation in fission yeast. Furthermore, through genetic analysis, we found that processes of endocytosis are deeply involved in Syn aggregation.

研究分野：分子生物学

キーワード：シヌクレイン synuclein パーキンソン病 S. pombe

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む日本社会において、アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の予防法・治療法の確立が、喫緊の課題となっている。

パーキンソン病患者の脳内には、シヌクレインタンパク質 (Syn) を主成分とする特徴的な凝集体が顕著に見られる。Synは、健常者の脳内にも豊富に存在するタンパク質であり、正常な細胞内では可溶性のモノマーとして存在するが、何らかの原因によって Synがオリゴマー化し、線維化した不溶性の凝集体へと成長することによって神経機能に障害がもたらされると考えられている。そのため、Synの凝集形成を防ぐことが、パーキンソン病の予防や治療において極めて重要であるが、そもそも、Synが何故凝集をはじめなのか、その凝集形成のきっかけとなる原因やメカニズムについては依然として多くの点が不明なままである。

これまでに我々の研究グループでは、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) にヒト由来の Synを強制発現させることによって「パーキンソン病モデル酵母」を作成し、Synの凝集体形成メカニズムの解析や、凝集抑制因子の探索を行ってきた。分裂酵母を解析系に用いる大きな利点の一つとして、哺乳類由来の培養細胞等と比べて、Synの凝集体形成を容易に誘導できることが挙げられる (一般に哺乳細胞では、あらかじめ *in vitro* で線維化させた Synを凝集核として導入する必要があるが、酵母ではこのような操作が必要ない)。そのため、これまでは利便性が高い解析系として分裂酵母を用いてきたが、ここであらためて、「なぜ分裂酵母では Syn凝集化が効率よくおこるのだろうか?」という疑問点に立ち戻ろうと考えた。言い換えれば、「なぜ哺乳類培養細胞では Syn凝集化が起きにくいのだろうか?」という疑問点である。

現在、国内外でパーキンソン病治療薬の開発を目指した研究が精力的に進められているが、それらの多くは「なぜ Synは凝集するのか?」という問いが根幹にあり、そのメカニズムの解明を通じて Syn凝集阻害薬の探索に注力されていると思われる。これに対し私は、「Synはそもそも凝集しやすいタンパク質である」と捉えなおし、「なぜ健常者の細胞内では Synは凝集しないのか?」という逆転の発想が必要ではないかと考えた。

以上の背景から本研究では、分裂酵母と哺乳動物細胞における Synの凝集形成効率の違いに着目し、『哺乳動物の細胞には、Synの凝集化を抑制する機構が基本ベースとして備わっているのではないかと (そして、その機構が老化などの過程によって破綻することをきっかけに、Synが凝集を始めるのではないかと)』との仮説を立て、Synの凝集形成過程の解析を試みる本研究計画の立案に至った。

### 2. 研究の目的

パーキンソン病の発症原因として Synの凝集化が深く関与すると考えられているが、健常者の脳内では可溶性のモノマーの状態として豊富に存在するはずの Synが、どのようなメカニズムで凝集化を始めるかについては依然として不明なままであり、原因究明が急がれている。本研究では、「哺乳動物細胞には Synの凝集化を抑制する内在機構が存在し、その機構が老化などの過程によって破綻することをきっかけに Synが凝集を始める」との仮説をたて、Synの凝集抑制機構の探索とメカニズムの解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) はじめに、分裂酵母を遺伝子改変して作成した「パーキンソン病モデル細胞」を用いて、Synの凝集形成を誘導する培養条件を確立するとともに、Syn凝集体がもたらす細胞毒性の評価系を確立する。

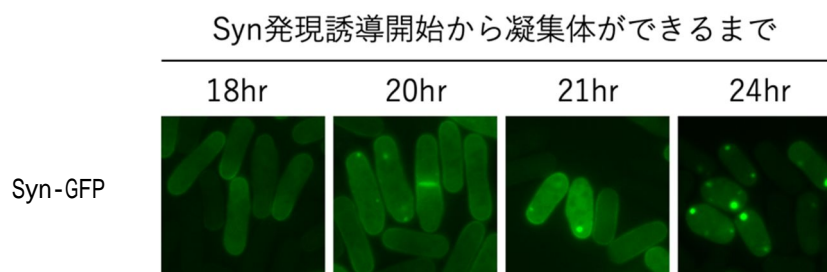
(2) つぎに、ヒト神経細胞由来のcDNAライブラリを作成し、上記のパーキンソン病モデル細胞に導入することによって、Synの凝集抑制作用を持つ因子を網羅的に探索する。

(3) さらに、上記のスクリーニングによって得られた凝集抑制因子の機能解析を行い、Synの凝集形成に至る一連のプロセスを解明する。

### 4. 研究成果

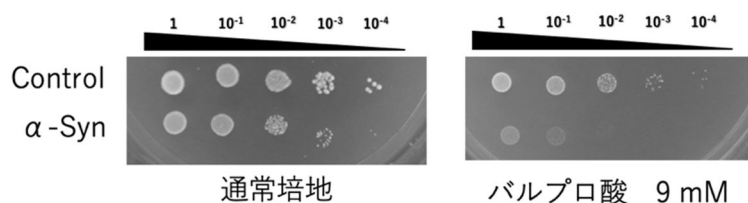
#### (1a) Syn凝集形成を誘導する培養条件の確立

分裂酵母内でSyn凝集体を形成させる培養条件のうち、もっとも安定した結果が得られる培養条件を検討した。結果として、thiamineの有無で発現誘導できる*nmt1*プロモーター下にSynuclein遺伝子を置いた人工遺伝子を、ゲノム上に挿入するよりも、染色体外プラスミドの状態酵母に持たせる方が良いことや、培地の組成、発現誘導を開始する時点での酵母の菌体量が結果に影響すること、などが明らかとなった。また、Syn凝集体が形成されるまでの様子を経時的に解析し、スクリーニング等の際の比較基準を作成した。



#### (1b) 毒性評価系の確立：バルプロ酸感受性の発見

Synを過剰発現させ凝集体を形成させた「パーキンソン病モデル酵母」は、野生株と比べてやや生育が低下する。しかし、その差はわずかであり、生育遅延の回復を指標に毒性抑制因子/凝集抑制因子のスクリーニングを行うのは極めて困難であった。そこで、Synの毒性を増強させる培養条件がないか検討した。培地中に、様々な薬剤や化合物を添加し生育を調べた結果、パーキンソン病モデル酵母は、抗てんかん薬として用いられるバルプロ酸に対して極めて脆弱になることが明らかとなった。



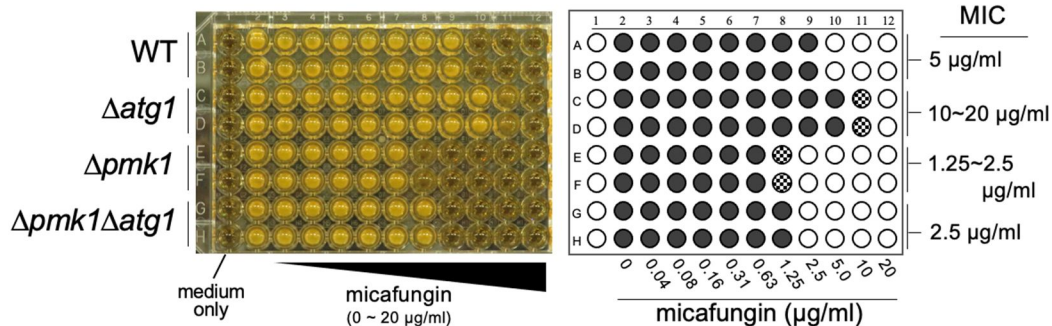
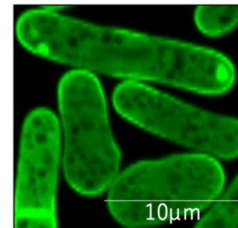
( 2 ) Syn凝集抑制因子の探索

ヒト神経芽細胞株SH-SY5YからRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成してパーキンソン病モデル酵母のバルプロ酸感受性をはじめとする各種表現型を軽減させる因子を探索しようと試みたが、期待した結果は得られなかった。

( 3 a ) オートファジーと Syn凝集形成との関わり

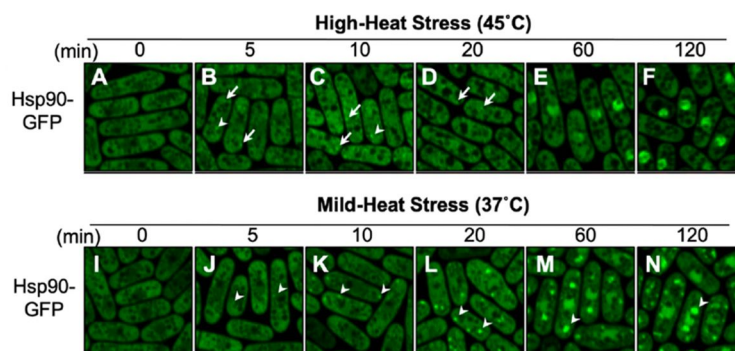
一般に、細胞内における異常なタンパク質凝集体の除去には、シャペロンタンパク質やオートファジーが関与すると考えられている。そこでまず、オートファジーと Syn凝集形成との関わりについて解析を行なった。その結果、オートファジーに必須なAtg1を欠損した細胞においても、野生株と同様の Syn凝集体が観察された。また、Atg1以外の他のオートファジー制御因子についての解析を行う過程で、各ATG因子とPmk1 MAPK経路との間に遺伝学的関係性があることを見出し、microPublication誌にて発表した。さらに、Atg1が、ミカファンギンや Ca添加培地において、細胞致死性の制御に関与することを見出し、Microbial Cell誌にて発表した。

*Δatg1* 細胞における aSynの凝集



( 3 b ) 分子シャペロンHsp90と Syn凝集形成との関わり

上述のように、細胞内における異常なタンパク質凝集体の除去には、分子シャペロンが関わるものが多く知られている。そこで、分子シャペロンHsp90に焦点をあて解析を行なった。これまで、Hsp90は熱ストレスによって発現上昇することが明らかにされていたが、局在変化等の詳細については不明な点が多かった。本研究において、通常の培養温度30°Cでは、Hsp90は主に細胞質に分散して分布するが、45°Cではストレス顆粒に局在すること、また、37°Cではストレス顆粒の存在しない部位に凝集体を形成するなど、温度によって特徴的な局在様式を示すことを見出した。また、いずれの熱ストレス条件下においても約60分ほどで、Hsp90の核へ蓄積が生じることを見出した。これらの知見は、microPublication誌にて発表した。

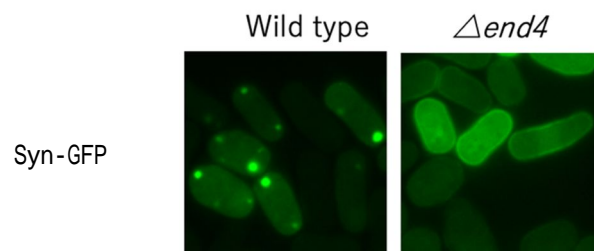


(3c) Syn凝集形成を阻害する薬剤の発見

Synの凝集形成に影響を与える薬剤スクリーニングを実施し、抗真菌作用をもつ化合物のひとつが Synの凝集化の抑制にはたらくことを見出した。どのような作用機序で Synの凝集抑制に寄与しているかは現在解析を進めている途中である。

(3d) エンドサイトーシスと Syn凝集形成との関わり

膜染色試薬FM4-64でパーキンソン病モデル酵母を染色すると、Syn凝集体も顕著に染色されるようになることから、凝集体中には細胞膜成分が取り込まれている可能性が高いことが示唆された。そこで、エンドサイトーシスに関与する因子のノックアウト細胞において Syn凝集体の形成を観察したところ、顕著に形成抑制が見られた。これにより、Synの凝集形成過程においてエンドサイトーシスが関与する可能性が見出された(未発表)。今後更なる解析を進めていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Teruaki Takasaki, Naofumi Tomimoto, Takumi Ikehata, Ryosuke Satoh, Reiko Sugiura                                | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Distinct spatiotemporal distribution of Hsp90 under high-heat and mild-heat stress conditions in fission yeast | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>micropub.biology  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.17912/micropub.biology.000388   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Takasaki T, Utsumi R, Shimada E, Tomimoto N, Satoh R, Sugiura R.                        | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Autophagy-related genes genetically interact with Pmk1 MAPK signaling in fission yeast | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>microPublication Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.17912/micropub.biology.000618                                       | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Teruaki Takasaki, Ryosuke Utsumi, Erika Shimada, Asuka Bamba, Kanako Hagihara, Ryosuke Satoh, and Reiko Sugiura                 | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Atg1, a key regulator of autophagy, functions to promote MAPK activation and cell death upon calcium overload in fission yeast | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>Microbial Cell  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>垂井 祐大、高崎 輝恒、杉本 恵崇、黒崎 亮、佐藤 亮介、杉浦 麗子  |
| 2. 発表標題<br>分裂酵母モデル系を用いた シヌクレイン凝集体の細胞毒性を増強する因子の探索 ~パーキンソン病治療薬を目指した シヌクレイン凝集抑制因子の探索に向けて~ |
| 3. 学会等名<br>第71回 日本薬学会関西支部総会・大会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>杉本 恵崇、高崎 輝恒、黒崎 亮、垂井 祐大、巽 祐司、佐藤 亮介、杉浦 麗子                       |
| 2. 発表標題<br>分裂酵母モデル系を用いた $\alpha$ -シヌクレインの凝集や細胞障害を抑制する医薬品の探索とその作用メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名<br>第140回 日本薬理学会近畿部会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>杉本 恵崇、高崎 輝恒、黒崎 亮、垂井 祐大、巽 祐司、佐藤 亮介、杉浦 麗子                |
| 2. 発表標題<br>分裂酵母モデル系を用いた $\alpha$ -シヌクレインの凝集抑制や細胞障害の軽減を目的とした医薬品の探索 |
| 3. 学会等名<br>第44回 日本分子生物学会年会（国際学会）                                  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>巽 祐司、高崎 輝恒、杉本 恵崇、黒崎 亮、山田 南、壽 美月、佐藤 亮介、杉浦 麗子 |
| 2. 発表標題<br>$\alpha$ -synが引き起こす細胞死を増強する細胞内輸送経路のステップの特定  |
| 3. 学会等名<br>第142回日本薬理学会近畿部会                             |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山田 南、高崎 輝恒、杉本 恵崇、黒崎 亮、巽 祐司、壽 美月、佐藤 亮介、杉浦 麗子     |
| 2. 発表標題<br>細胞内輸送と糖鎖修飾に着目した $\alpha$ -シヌクレインによる細胞傷害メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名<br>第142回日本薬理学会近畿部会                                 |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>杉本 恵崇, 高崎 輝恒, 黒崎 亮, 巽 祐司, 山田 南, 佐藤 亮介, 杉浦 麗子                                    |
| 2. 発表標題<br>Lewy小体病の発症機序の解明に向けた $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -Syn)の凝集能低下型変異タンパク質を発現する分裂酵母株の作成 |
| 3. 学会等名<br>第45回日本分子生物学会年会(国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Teruaki Takasaki, Golam Iftakhar Khandakar, Sae Kamiyama, Ryosuke Satoh, Reiko Sugiura   |
| 2. 発表標題<br>ERK: A DOUBLE-EDGED SWORD IN CANCER. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer                                    |
| 3. 学会等名<br>The Protein Phosphatases Conference Jointly hosted by FASEB and the Japanese Association for Protein Phosphatase Research (JAPPR) (招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takasaki T, Sugimoto Y, Kurosaki R, Satoh R, and Sugiura R  |
| 2. 発表標題<br>Unraveling the mechanism of $\alpha$ -Synuclein aggregation and its application to target Parkinson's disease using fission yeast as a model system |
| 3. 学会等名<br>The 11th International Fission Yeast Meeting (POMBE2023 Hiroshima)(国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|