

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：23101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07757

研究課題名(和文) アグリソームによる シヌクレインのプリオン様増殖抑制機構

研究課題名(英文) Inhibition of prion-like amplification of α -synuclein by aggregates

研究代表者

葛城 美德 (Katsuragi, Yoshinori)

新潟県立看護大学・看護学部・准教授

研究者番号：60401759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)では異常型 α -シヌクレインの重合活性により、ドーパミンを分泌する大脳神経の死滅が引き起こされる。Nrf2は、抗酸化作用を持つ転写活性化因子であり、その機能障害は、PDを含む様々な疾患に関与する。我々はドーパミンが活性酸素種(ROS)の増加とそれによるアポトーシスを誘発するが、これらの効果をユビキチン特異的プロテアーゼ10(USP10)タンパク質が抑制することを見いだした。USP10は、Nrf2活性化因子p62と相互作用することでNrf2の抗酸化転写活性を刺激した。本研究により、USP10は神経細胞におけるNrf2抗酸化活性の重要な制御因子であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は異常型シヌクレインの増加によって脳のドーパミン神経細胞が減少することで起こるが、これまでの我々の研究から、USP10の機能低下がパーキンソン病の発症に関与することが示唆されていた。今回の研究で、USP10はドーパミンによる活性酸素種(ROS)増加を抑えることで、ドーパミン産生細胞のROSによる細胞死を抑えていることが明らかになった。USP10は抗酸化作用をもつ転写活性化因子であるNrf2の活性化を介してドーパミンによるROS上昇や細胞死を抑えていることが明らかとなったことから、USP10の活性化剤がパーキンソン病の予防薬や治療薬として活用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In Parkinson's disease (PD), the polymerization activity of aberrant α -synuclein causes the death of dopamine-secreting cerebral nerves. Nrf2 is a transcriptional activator with antioxidant properties whose dysfunction is implicated in a variety of diseases including PD. We found that dopamine induces an increase in reactive oxygen species (ROS) and consequent apoptosis, and that these effects are inhibited by the ubiquitin-specific protease 10 (USP10) protein activity by interacting with Nrf2 activator p62. This study indicates that USP10 is an important regulator of Nrf2 antioxidant activity in neurons.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Parkinson's disease ROS USP10 α -synuclein p62 Nrf2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は中脳黒質の神経細胞死を特徴とする難治性の神経変性疾患である。PDの主たる原因因子は α シヌクレイン(α S)である。異常構造を持つ α S(異常型 α S)の線維様凝集体がドパミン神経細胞に毒性を示し、PDを発症させる。近年、異常型 α Sの線維様凝集体がプリオン様増殖を示すことが明らかにされた。異常型 α Sは、正常型 α Sの構造を異常型に変化させて、増殖し、異常型 α Sの線維様凝集体を形成する(図1)。申請者は、この異常型 α Sのプリオン様増殖が、アグリソーム(異常型 α Sの線維様凝集体とは異なる、蛋白質凝集体)の形成によって抑制されることを見出した。さらに、この抑制に参与する、3つの分子(USP10, p62, G3BP1)を明らかにしていた。

2. 研究の目的

当初は USP10, p62, G3BP1 による異常型 α S の発生あるいは増殖について解析を進めていたが、ドパミンによる活性酸素種(ROS)増加を USP10 が抑えたことから、ドパミン神経細胞における USP10 の働きを調べ、USP10 による PD 発症抑制機序を明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

実験は USP10 や p62, Nrf2, Keap1 を siRNA によりノックダウンした SH-SY5Y 細胞を用いて行なった。ドパミンや酸化剤を加えることで生じる酸化ストレスや細胞死への影響、USP10 や p62, Nrf2, Keap1 へのタンパク質レベルでの影響をウエスタンブロットティングや免疫蛍光染色で確認した。また、mRNA の定量や ROS の定量も行った。

4. 研究成果

USP10 をノックダウンした SH-SY5Y 細胞ではドパミン添加によるアポトーシスが増加し、細胞数が顕著に減少した。次に、ROS を CM-H2DCFDA で定量した結果、USP10 のノックダウンにより、ドパミンによる ROS 上昇が増強されていることが確認された。さらに、NAC 添加によって USP10 のノックダウンによる ROS 上昇だけでなく細胞死も抑えられたことから、USP10 はドパミンによる ROS 上昇とそれによる細胞死の増加を抑える働きがあることがわかった。また、USP10 は、ドパミン以外の活性酸素産生物質に対しても ROS と細胞死の両方を抑え、USP10 が抗酸化作用を持つ遺伝子群の転写活性化因子である Nrf2 の活性化に寄与することがわかった。Nrf2 は Keap1 との相互作用によって平常時はユビキチン-プロテアソーム系によって分解されるが、ROS などの酸化剤に暴露されると、Keap1 自体の酸化や p62 による Keap1 の捕捉により、Nrf2 は安定化し、活性化することで、様々な抗酸化活性を持つ遺伝子群を転写する。USP10 のノックダウンによるドパミン処理した SH-SY5Y への効果が、Nrf2/Keap1/p62 による抗酸化経路によることが確認された。p62 は S349 がリン酸化されることで Nrf2 を強く活性化させることがわかっているが、USP10 のノックダウンにより、この p62 のリン酸化が減少した結果、Nrf2 の活性が抑えられていることが強く示唆された。USP10-KD 細胞におけるリン酸化された p62 (pS349) の減少が、ドパミン誘発細胞死と相関していたことから、この p62 のリン酸化の必要性を検証すべく、S349 のリン酸化型をミミックする S349E-p62 を USP10 ノックダウン細胞に発現させ、ドパミンによる細胞死への影響を調べた。その結果、USP10 ノックダウン時のドパミンによる細胞死は S349E-p62 の発現によって抑制されたが、このような効果は S349A-p62 では見られなかった。すなわち、ドパミンによる酸化ストレスやその後の細胞死を、USP10 は p62 のリン酸化を促進させることで Nrf2 を活性化させ、細胞死を抑えていることが示唆された。

本研究により、USP10 は2つのメカニズムを通して Nrf2 の抗酸化活性を活性化することが考えられる。第一に、USP10 はホスファターゼやキナーゼなどの未知の分子(X)を介して p62 のリン酸化 (pp62-S349) を促進する。第二に、USP10 は SG 形成の阻害やリボソームタンパク質の脱ユビキチン化を通して、ドパミンによって誘導される Nrf2 の翻訳を促進する。

本研究により、今後、USP10 の活性化剤が開発されれば、PD の予防や治療薬として利用できる可能性が示された。(業績1)

< 研究成果 (業績) >

1) USP10 inhibits the dopamine-induced reactive oxygen species-dependent apoptosis of neuronal cells by stimulating the antioxidant Nrf2 activity.

Sango J, Kakihana T, Takahashi M, Katsuragi Y, Anisimov S, Komatsu M, Fujii M.

J Biol Chem. 2022 Jan;298(1):101448. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101448. Epub 2021 Nov 24.

2) USP10 Inhibits Aberrant Cytoplasmic Aggregation of TDP-43 by Promoting Stress Granule Clearance.

Takahashi M, Kitaura H, Kakita A, Kakihana T, Katsuragi Y, Onodera O, Iwakura Y,

Nawa H, Komatsu M, Fujii M.

Mol Cell Biol. 2022 Mar 17;42(3):e0039321. doi: 10.1128/MCB.00393-21. Epub 2022 Jan 10.

- 3) The optineurin/TIA1 pathway inhibits aberrant stress granule formation and reduces ubiquitinated TDP-43.

Kakahana T, Takahashi M, Katsuragi Y, Yamashita SI, Sango J, Kanki T, Onodera O, Fujii M.

iScience. 2021 Jun 17;24(7):102733. doi: 10.1016/j.isci.2021.102733. eCollection 2021 Jul 23.

- 4) Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry.

Watanabe K, Oka T, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M.

Nat Commun. 2023 Mar 31;14(1):1817. doi: 10.1038/s41467-023-37399-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sango Junya, Kakihana Taichi, Takahashi Masahiko, Katsuragi Yoshinori, Anisimov Sergei, Komatsu Masaaki, Fujii Masahiro	4. 巻 298
2. 論文標題 USP10 inhibits the dopamine-induced reactive oxygen species?dependent apoptosis of neuronal cells by stimulating the antioxidant Nrf2 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101448 ~ 101448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101448	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 -
1. 著者名 Takahashi Masahiko, Kitaura Hiroki, Kakita Akiyoshi, Kakihana Taichi, Katsuragi Yoshinori, Onodera Osamu, Iwakura Yuriko, Nawa Hiroyuki, Komatsu Masaaki, Fujii Masahiro	4. 巻 42
2. 論文標題 USP10 Inhibits Aberrant Cytoplasmic Aggregation of TDP-43 by Promoting Stress Granule Clearance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	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) 10.1128/MCB.00393-21	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 -
1. 著者名 Kakihana Taichi, Takahashi Masahiko, Katsuragi Yoshinori, Yamashita Shun-Ichi, Sango Junya, Kanki Tomotake, Onodera Osamu, Fujii Masahiro	4. 巻 24
2. 論文標題 The optineurin/TIA1 pathway inhibits aberrant stress granule formation and reduces ubiquitinated TDP-43	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102733 ~ 102733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102733	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 -
1. 著者名 Watanabe Kanako, Oka Tomoichiro, Takagi Hiroataka, Anisimov Sergei, Yamashita Shun-ichi, Katsuragi Yoshinori, Takahashi Masahiko, Higuchi Masaya, Kanki Tomotake, Saitoh Akihiko, Fujii Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-023-37399-8	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〕

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/news/2021/96880/>
筋萎縮性側索硬化症の原因となる病的なTDP-43凝集体の形成を抑制する分子を発見
<https://www.niigata-u.ac.jp/news/2022/99430/>
筋萎縮性側索硬化症において異常な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/news/2021/90284/>

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	野中 隆 (Nonaka Takashi) (30356258)	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・副参事研究員 (82609)	

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