

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390070

研究課題名（和文）PKC の機能破綻により発症する神経変性疾患モデル動物作製と解析および創薬への応用

研究課題名（英文）Production and analysis of model animals for neurodegenerative diseases caused by dysfunction of PKC and their use for drug design

研究代表者

齋藤 尚亮 (SAITO Naoaki)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授

研究者番号：60178499

研究成果の概要（和文）：

SCA14 およびパーキンソン病の発症メカニズムに関する PKC γ の働きについて細胞レベル・個体レベルでの解析を行った。その結果、①変異型 PKC γ はプルキンエ細胞内でアミロイド繊維状の凝集を形成すること、これらアミロイド形成はトレハロースにより抑制されることを見出した。②PKC γ の機能低下がパーキンソン病発症に関与する可能性が示された。その原因としてドパミン遊離の抑制と黒質のドパミン細胞数の減少が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Functional involvement of PKC γ in the etiology of SCA14 and Parkinson disease was studied in cells and animals. We found 1) mutant PKC γ s form amyloid-like fibrils in Purkinje cells and the formation was inhibited by trehalose, 2) dysfunction of PKC γ could cause Parkinson disease by the inhibition of dopamine release and the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：プロテインキナーゼ・神経変性疾患・モデル動物・創薬・細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

我々は、疾患の発症メカニズムを PKC のターゲティング機構の観点から解析し、その病態を明らかにしようとしてきた。その研究の中で小脳脊髄変性症 (SCA) 14 型の原因となる変異型 PKC γ の細胞生物学・酵素学的解析を行い、その発症メカニズムについて明らかにした。つまり、神経特異的なサブタイプである PKC γ 変異体は恒常的なリン酸化酵素

活性を持つにも関わらず、細胞刺激時に細胞膜に十分な時間留まることができないため、TRPC チャンネルのリン酸化ができず、細胞内の Ca²⁺ 濃度を適切に調節できないことを見出した。この遷延する Ca²⁺ 流入が小脳神経細胞の変性を引き起こし、SCA を発症する原因となりうることを示した (Adachi et al. 2008)。

さらに、上記のような PKC γ の Loss of

function以外にも、PKC γ 変異体による **Gain of Function** が発症に関与すると考え、その可能性についても検討した結果、PKC γ 変異体は、異常な二量体・多量体や細胞内凝集体を形成し、神経細胞死を導くことを明らかにした。同時に、初代培養 Purkinje 細胞においても、PKC γ 変異体が凝集体形成や樹状突起形成不全を起こすことなどを見出した。

これらの現象を個体レベルで検証するために、変異型 PKC γ を小脳 Purkinje 細胞特異的に発現するマウスを作製し、SCA の病態モデルマウスの作製を試みた。しかしながら、変異型 PKC γ の発現のみでは、マウスの生存期間内に SCA の症状を示すマウスを作製することは不可能であった。この原因として、我々は PKC γ の変異のみでは神経細胞死を導くには不十分である、また、本疾患は中年期に発症する症例が多いことから、加齢などによる別の因子と PKC γ の機能破綻が複合的に SCA14を発症させるのではないかと考えるに至った。つまり、その複合因子を同定し、変異型 PKC γ との機能関連を明らかにし、上記の変異型 PKC γ 発現マウスにおいてさらにその複合因子に遺伝子変異を加えることにより、はじめて SCA14 モデルマウスの作製が可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では PKC γ の機能破綻による2つの疾患、①小脳脊髄変性症、②パーキンソン病に焦点を当て、1) これら疾患発症におけるPKC γ の役割、発症メカニズムを明らかにするとともに、2) モデルマウスを作製し、病態・病理学的な検討を行い、3) 個体レベルでの薬物スクリーニング系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 小脳 Purkinje 細胞の変性を起こすために必要な複合因子の同定を行う。そのため、変異 PKC γ 特異的リン酸化基質、結合タンパク質の同定、および、加齢などにより Purkinje 細胞で変化し、細胞死を促進する因子の検討を行う
- 2) 変異 PKC γ を発現するマウスにおいて、上記因子についてさらに遺伝子操作し、SCA モデルマウスとしての可能性を検討する。
- 3) 黒質-線条体系ドパミン神経におけるPKC γ のリン酸化基質の同定、PKC γ 欠損によるドパミン遊離抑制の分子メカニズムの解明
- 4) モデルマウスを用いた2つの神経変性疾患治療薬の有効性の検討、スクリーニング系の確立

4. 研究成果

21年度にはまず、SCA14の発症メカニズムに関するPKC γ の働きについて細胞レベルでの検討およびパーキンソン病の発症メカニズムに関する細胞レベル・個体レベルでの検討を行った。

その結果、①SCA14に見られた変異型PKC γ を過剰発現させると、繊維芽細胞、神経由来培養細胞、培養小脳プルキンエ細胞内で凝集体を形成し、その凝集には、PKC γ のC1ドメインおよびキナーゼドメインの相互の結合が関与することを示した。またこの凝集体を電子顕微鏡下で観察するとアミロイド繊維状の凝集体を形成していることが明らかとなった。さらにこの凝集はシャペロンであるHsp70の発現により、その形成が抑制された。また、SCA14モデルマウスでは、生後1年以上で、プルキンエ細胞内に凝集体を持つようになった。これらの所見はSCA14発症メカニズムを解明する点、また治療薬の標的を見出す観点において非常に重要と考えられた。

②PKC γ ノックアウトマウスでは、明らかにメタアンフェタミンによるドパミン遊離が抑制され、12ヵ月後には黒質のドパミン細胞数が有意に減少していた。これらの所見は、パーキンソン病モデルラットであるAS/AGUラットの所見と極めて似ていた。しかしながら、ノックアウトマウスではドパミン含量、ドパミン代謝物の変化は認められなかった。PKC γ の機能低下がパーキンソン病発症に関与する可能性が示された。

22年度には、①SCA14モデルマウスを作製し、生後1年半以上観察したが、小脳失調症状、プルキンエ細胞脱落などの病的所見は見られなかった。しかし、生後1年後より、プルキンエ細胞内に凝集体を観察した。このような凝集体は、変異型PKC γ を過剰発現させた繊維芽細胞にも認められ、電子顕微鏡下で観察するとアミロイド繊維様の凝集体を形成していることが明らかとなった。また変異型PKC γ を精製し、37度にて放置するとthioflavin染色でも電子顕微鏡観察でも、アミロイド様線維を形成することが明らかとなった。これらの所見はSCA14の発症に、変異型PKC γ のアミロイド形成が関与することを示しており、治療薬の標的を見出す観点において非常に重要と考えられた。同時にこれらアミロイド形成を抑制する物質の検討を行い、候補物質としてトレハロースを見出した。

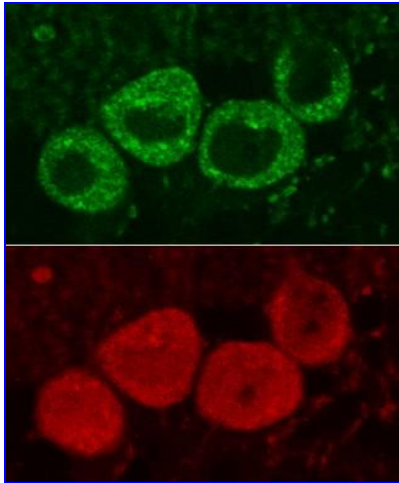


図1 SCA14モデルマウスのプルキンエ細胞内の凝集体

上段：GFP標識した変異型PKC γ

下段：Calbindin = Purkinje cell marker

②PKC γ ノックアウトマウスが、パーキンソン病モデルマウスとなりうることを報告した。また、PKC γ の機能低下がパーキンソン病発症に関与するメカニズムを明らかにするために、リン酸化プロテオーム解析を行い、PKC γ の線条体ドパミン神経における生理的な基質の探索を行った。

23年度には、①SCA14モデルマウスとして、変異型PKC γ をレンチウイルスを用いて、小脳に感染させたマウスを作製することを試みた。小脳失調症状、プルキンエ細胞脱落などの病理的所見は見られなかったが、プルキンエ細胞内およびその樹状突起内に凝集体を観察した。このような凝集体を電子顕微鏡で観察したところ、アミロイド繊維様の凝集体を形成していることが明らかとなった。また、変異型PKC γ を精製し、37度にて放置するとthioflavin染色でも電子顕微鏡観察でも、アミロイド様線維を形成したことなどからも、SCA14の発症に、変異型PKC γ のアミロイド形成が関与することが示された。これらの所見は、治療薬の標的を見出す観点において非常に重要と考えられた。

②PKC γ の機能低下がパーキンソン病発症に関与するメカニズムを明らかにするために、リン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、10種類のPKC γ 基質蛋白質を同定し、そのリン酸化部位、ドパミン遊離に与える影響などを調べ、これらの蛋白質のリン酸化が、パーキンソン病治療薬の標的となる可能性を検討した。

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)

〔雑誌論文〕(計18件)

- ①Tanabe A, Shiraiishi M, Negishi M, Saito N, Tanabe M, and Sasaki Y. MARCKS dephosphorylation is involved in bradykinin-induced neurite outgrowth in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Cell Physiol.* 227(2):618-629.2012
- ②Seki, T., Ken-ich Yoshino, K., Tanaka, S., Dohi, E., Onji, T., Yamamoto, K., Hide, I., Paulson, H.L., Saito, N., Sakai, N. Establishment of a Novel Fluorescence-Based Method to Evaluate Chaperone-Mediated Autophagy in a Single Neuron. *PLoS ONE* 7(2): e31232. 2012
- ③Matsubara, T., Ikeda, M., Kiso, Y., Sakuma, M., Yoshino, K-I., Sakane, F., Merida, I., Saito, N. and Shirai, Y. c-Abl tyrosine kinase regulates serum-induced nuclear export of diacylglycerol kinase by phosphorylation at Tyr218. *J. Biol. Chem.* 287: 5507-5517, 2012
- ④ Ueyama, T., Nakakita, J., Kobayashi, T., Kobayashi, T., Son, J-h., Sakaguchi, H., Leto, T., and Saito, N. Cooperation of p40phox with p47phox for Nox2 activation during Fc{lower case gamma}R-mediated phagocytosis --Mechanism for acquisition of p40phox PI(3)P binding--" *J. Biol. Chem.* 286, 40693. 40705, 2011
- ⑤Sakai, N., Saito, N. and Seki, T. Molecular pathophysiology of neurodegenerative disease caused by γ PKC mutations. *World J. Biological Psychiatry*, 12(S1) 95-98, 2011
- ⑥Seki, T., Adachi, N., Abe-Seki, N., Shimahara, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Saito, N. and Sakai, N. Elucidation of the Molecular Mechanism and Exploration of Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Caused by Mutant Protein Kinase Cy. *J Pharmacol Sci* 116, 239 . 247, 2011
- ⑦Shibata, Y., Kawada-Matsuo, M., Shirai, Y., Saito, N., Li. D., and Yamashita, Y. Streptococcus mutans diacylglycerol kinase homologue:a potential target for anti-caries chemotherapy. *J. Med. Microbiol.* 60:625-630, 2011
- ⑧Shirai, Y., Morioka, S., Sakuma, M., Yoshino, K., Otsuji, C., Sakai, N., Kashiwagi, K., Chida, K., Shirakawa, R., Horiuchi, H., Nishigori, C., Ueyama, T., Saito, N. Direct binding of RaIA to PKC η and its crucial role in morphological change during keratinocytes differentiation. *Mol. Biol. Cell* 22: 1340-1352, 2011

⑨Matsuo, A., Bellier, J-P, Nishimura, M., Yasuhara, O., Saito, N. and Kimura, H. Nuclear Choline Acetyltransferase Activates Transcription of a High-affinity Choline Transporter. *J. Biol. Chem.* 286, 5836-5845. 2011

⑩Kakefuda K., Oyagi A., Ishisaka M., Tsuruma K., Shimazawa M., Yokota K., Shirai Y., Horie K., Saito N., Takeda J. and Hara H. Diacylglycerol kinase knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. *PLoS One* 5(10): e13447. 2010

⑪Yanase Y., Hide, I., Mihara, S., Shirai, Y., Saito, N., Nakata, Y., Hide, M., and Sakai, N. A critical role of conventional protein kinase C in morphological changes of rodent mast cells. *Immunol. Cell. Biol.* 89(1):149-59, 2010

⑫Mukai, R., Shirai, Y., Saito, N., Fukuda, I., Nishiumi, S., Yoshida, K., Ashida, H. Suppression mechanisms of flavonoids on aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 134-141, 2010

⑬Seki, T., Abe-Seki, N., Kikawada, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N., and Sakai, N. The effect of trehalose on the properties of mutant PKC, which causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14), in neuronal cell lines and cultured Purkinje cells. *J. Biol. Chem.* 285: 33252-33264, 2010

⑭Kawasaki, T., Ueyama, T., Lange, I., Feske, S., Saito, N. PKC-induced phosphorylation of Orai1 regulates intracellular Ca²⁺ level via store operated Ca²⁺-channel. *J. Biol. Chem.* 285(33):25720-30, 2010

⑮Shirai, Y., Kozuki, T., Kakefuda, K., Moriguchi, S., Oyagi, A., Horie, K., Shimazawa, M., Fukunaga, K., Takeda, J., Saito, N., Hara, H. Essential role of diacylglycerol kinase beta (DGKb) in neurite spine formation, contributing to cognitive function including spatial and long-term memory. *PLoS One.* 5(7):e11602. 2010

⑯Yamamoto, K., Seki, T., Adachi, N., Takahashi, T., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N., Sakai, N. Mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) is selectively degraded by autophagy. *Genes to Cells* 15:425-38 2010

⑰Kodama, N., Mizuno, S., Nanba, H. and Saito, N. Potential Antitumor Activity of a Low Molecular Weight Protein Fraction (MLP-Fraction)

from *Grifola frondosa* through Enhancement of Cytokine Production. *Journal of Medicinal Food.*13:20-30, 2010

⑱Toyohira, Y., Ueno, S., Tsutsui, M., Itho, H., Sakai, N., Saito, N., Takahashi, K., and Yanagihara, N. Stimulatory effects of the soy phytoestrogen genistein on noradrenalin transporter and serotonin transporter activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 516-524, 2010.

[学会発表] (計5件)

- ① 細胞内シグナル分子の可視化と細胞機能 齋藤尚亮 第89回日本生理学大会、平成24年3月30～31日、松本(招待講演・日本語)
- ② PKC γ ノックアウトは黒質線条体ドパミン神経系の異常をもたらす 白藤俊彦、足立直子、高橋英之、香田 健、梨子田哲明、吾郷由希夫、松田敏夫、齋藤尚亮 第118回日本薬理学会近畿部会、2010年11月19日、大阪(口演、日本語)
- ③ Visualization of PKC targeting and its involvement in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia. Saito, N. 第51回日本組織細胞化学会、2010年9月4～5日、東京(口演、英語)
- ④ PKC targeting and its involvement in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia. Saito, N. 14th International congress of Endocrinology, (Kyoto, Japan), March, 2010 (招待講演・口頭・英語)
- ⑤ Molecular pathophysiology of spinocerebellar ataxia type14(SCA14), a hereditary neurodegenerative disease caused by PKC mutations. Sakai, N., Seki, T., Adachi, N., Takahashi, H. and Saito, N. Japan-Taiwan joint symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. (Kobe, Japan), November 11～12, 2009 (口頭・英語)

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-saito/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 尚亮 (SAITO NAOAKI)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授

研究者番号：60178499

(2) 研究分担者

平成21年度

白井 康仁 (SHIRAI YASUHIRO)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授

研究者番号：60263399

平成 22-23 年度

上山 健彦 (UEYAMA TAKEHIKO)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授

研究者番号：80346254