

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700407

研究課題名(和文) 変異 γ PKC による脊髄小脳変性症の小脳選択的発症メカニズムの解明研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism how mutant γ PKC causing spinocerebellar ataxia induces neurodegeneration specific to cerebellum.

研究代表者

関 貴弘 (SEKI TAKAHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50335650

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症 14 型を引き起こす変異 γ PKC により、小脳プルキンエ細胞(PC) 特異的な神経変性が引き起こされるメカニズムを解明するため、初代培養神経細胞の PC と PC 以外の神経細胞に変異 γ PKC を発現させた。他の神経と比較して、PC に発現させた変異 γ PKC の流動性が著しく低下していた。続いて、PC において変異 γ PKC に強く結合するタンパクとして、heat shock cognate protein 70 (Hsc70) が同定された。変異 γ PKC は PC において Hsc70 と強く結合し、その機能を障害することにより PC 特異的な神経変性を起こすと示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism how mutant γ PKC causing spinocerebellar ataxia induces neurodegeneration specific to cerebella Purkinje cells (PCs), we investigated molecular properties of mutant γ PKC in PCs and in non-PC neurons of cerebellar primary cultures. Compared with non-PC neurons, the mobility of mutant γ PKC was prominently reduced in PCs. Moreover, we identified heat shock cognate protein 70 (Hsc70) as a preferable binding protein to mutant γ PKC in PCs. These results suggest that mutant γ PKC preferably binds to Hsc70 and impairs its functions, leading to PC-selective neurodegeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学・神経薬理学

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：神経・精神疾患の病態と治療、脊髄小脳失調症、プルキンエ細胞、 γ PKC、Hsc70

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は小脳または脊髄性の運動失調を主症状とし、小脳や脊髄の神経核や伝導路に病変を持つ神経変性疾患の総称である。全体の約 40% は遺伝性であり、同定された原因遺伝子座の順に脊髄小脳失調症(SCA) 1 型、2 型と分類されている。近年、SCA の 14 型(SCA14) の原因遺伝子が protein

kinase C (PKC) の神経特異的分子種の γ PKC であると同定された。現在までに、異なる SCA14 家系から、様々なアミノ酸変異を伴う γ PKC 遺伝子変異が報告されている。しかしながら、変異 γ PKC が SCA を発症させる詳細な分子機序は明らかになっていない。

申請者らは γ PKC と green fluorescent protein (GFP) との融合タンパク質 (γ PKC-GFP) に

SCA14 の原因として特定された遺伝子変異を導入し、培養細胞に発現させたところ、変異 γ PKC-GFP は細胞質で凝集し、細胞死を誘発しやすいことが明らかとなった。一方で、マウス小脳初代神経培養において、SCA14 の主要な病変部位である小脳プルキンエ細胞 (PC) に変異 γ PKC-GFP を発現させると、凝集体は形成されるものの、凝集体の見られない細胞でも樹状突起の縮小が観察された。このような PC では、オリゴマーを形成した変異 γ PKC がトランスロケーション不良に陥ることにより、樹状突起における情報伝達異常が起こり、その結果として樹状突起縮小を引き起こすと考えられる。

2. 研究の目的

神経変性疾患では疾患特異的にある特定の神経系が侵される事が多いが、それを規定する分子機序はまったく明らかにされていない。SCA14 においても、 γ PKC は小脳では PC に特異的に存在するものの、大脳皮質、海馬などその他の部位の神経細胞にも強く発現することが知られている。しかし、SCA14 患者で障害を受けるのは小脳 PC のみであり、他の神経細胞の変性・脱落は確認されていない。これは変異 γ PKC が小脳で特異的に相互作用する分子が存在し、それが PC の脱落に重要な役割を果たしている可能性も考えられる。そこで、そのようなタンパク質の同定および変異 γ PKC との機能的相関を検討することにより、SCA14 において、 γ PKC の変異が何故小脳 PC 選択的な細胞死につながるのかの解明を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

以上の目的を達成するために以下の2点について研究を行った。

(1) 初代培養神経細胞を用いた PC 及び PC 以外の神経細胞における変異 γ PKC の分子特性の違い。

(2) 初代培養小脳 PC において、変異 γ PKC に強く結合するタンパク質の同定。

4. 研究成果

(1) 小脳初代培養にアデノウイルスベクターを用いて神経特異的プロモーターである NSE プロモーターの支配下に野生型(WT) γ PKC-GFP を発現させると、 γ PKC-GFP は発達した樹状突起で特徴づけられる PC だけではなく、多数の突起を持つ神経様細胞にも発現が観察された (図 1)。この両者はいずれも神経特異的のマーカである β 3-tubulin 抗体により免疫染色されることから、PC 以外の神経様細胞も神経細胞であることが確認された (non PC neuron)。

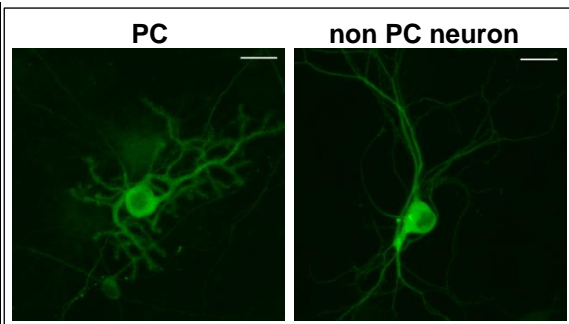
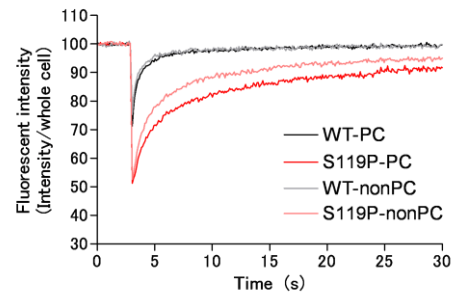


図1 小脳初代培養細胞におけるNSEプロモーター下での野生型(WT) γ PKC-GFP 発現

SCA14 の原因となる変異 γ PKC-GFP を同様に発現させ、PC 及び non-PC neuron のいずれにおいても凝集体は形成された。また、凝集体を有さない細胞において、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 解析を行い、PC 及び non-PC neuron における WT 及び変異(S119P 及び G128D) γ PKC-GFP の流動性を解析した。その結果、PC 及び non-PC neuron のいずれにおいても WT に比べ変異 γ PKC-GFP の流動性は低下していた。しかしながら、PCの方が non-PC neuron よりも流動性の低下は有意に大きかった (図 2)。

A. 退色部分の蛍光強度経時変化



B. 蛍光回復の half time

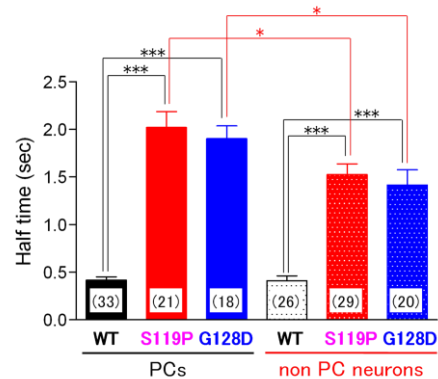


図2 小脳初代培養におけるPC 及び non PC neuron に発現させた γ PKC-GFP の FRAP 解析

Half time の増大は γ PKC-GFP の流動性が低下したことを反映している。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (unpaired t-test)。

この流動性の低下は変異 γ PKC-GFP のオリゴマー形成によるものであると考えていたが、PC と non-PC neuron における流動性の違いから、オリゴマーだけでなく、PC 選択的に変異 γ PKC-GFP に結合するタンパク質が存在することが示唆された。

小脳においては、 γ PKC は PC 特異的に発現している。PC では内在性に発現する野生型 γ PKC と変異 γ PKC-GFP が結合することにより、変異 γ PKC-GFP の流動性が non PC neuron より低下した可能性が考えられる。そこで、PC 同様に内在性に γ PKC を発現する大脳皮質神経細胞に γ PKC-GFP を発現させ、同様の FRAP 解析を行った。その結果、小脳の神経細胞同様に大脳皮質の神経細胞でも変異 γ PKC-GFP の流動性は低下していた。しかし、その低下の程度は小脳 PC での低下に比べれば小さいものであった(図3)。内在性に γ PKC が発現している大脳皮質神経細胞でも流動性の低下が小さかったことより、小脳 PC では内在性 γ PKC とは異なる別のタンパク質と選択的に結合し、複合体を形成することにより、流動性がさらに低下したと示唆された。

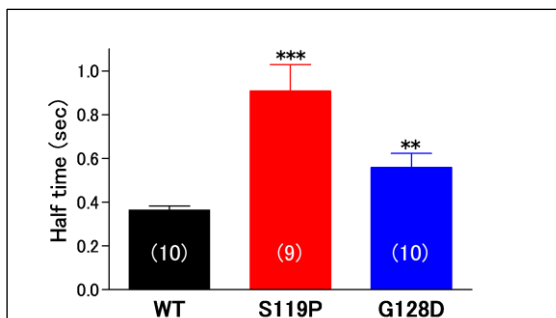


図3 大脳皮質神経細胞に発現させた γ PKC-GFP の FRAP 解析結果

変異 γ PKC-GFP の half time は WT よりも有意に増大していたが、それでも 1 sec 未満であり、小脳 PC での half time (約 2 sec) よりは明らかに小さかった。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs WT (unpaired t-test)。

(2) HaloTag (HT) システムを用いた pull down assay により、初代培養小脳 PC において、変異 γ PKC に強く結合するタンパク質の同定を試みた。 γ PKC に HT を融合させたタンパク質 (γ PKC-HT) を初代培養小脳 PC に発現させ、回収した cell lysate から γ PKC-HT を HT ligand と融合させたレジンをを用いて回収した。HT と HT ligand が共有結合するため、回収後熱処理を行っても γ PKC-HT はレジンから遊離せず、結合タンパク質のみが遊離するため、結合タンパク質の解析を効率的に行うことができる(図4)。回収した結合タンパク質を SDS-PAGE で分離後、銀染色により可視化し、変異 γ PKC と強く結合するタンパク質が存在するかどうかを検討した。

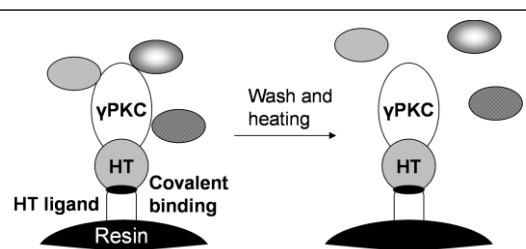


図4 γ PKC-HT 発現細胞 lysate からの pull down assay の模式図

その結果、95 kDa と 70 kDa の分子量マーカーの間に変異 γ PKC-HT と強く結合するタンパク質と思われるバンドが検出された(図5)。質量分析によりこのタンパク質は heat shock cognate protein 70 (Hsc70) であると同定された。

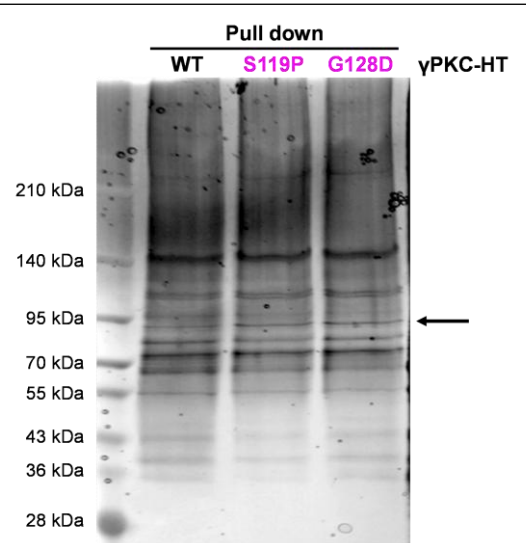
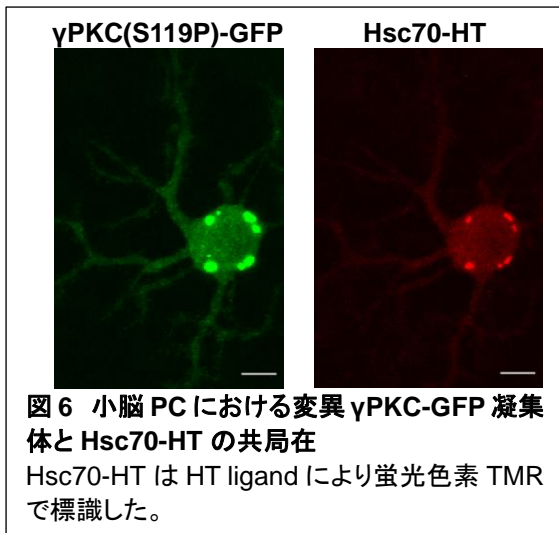


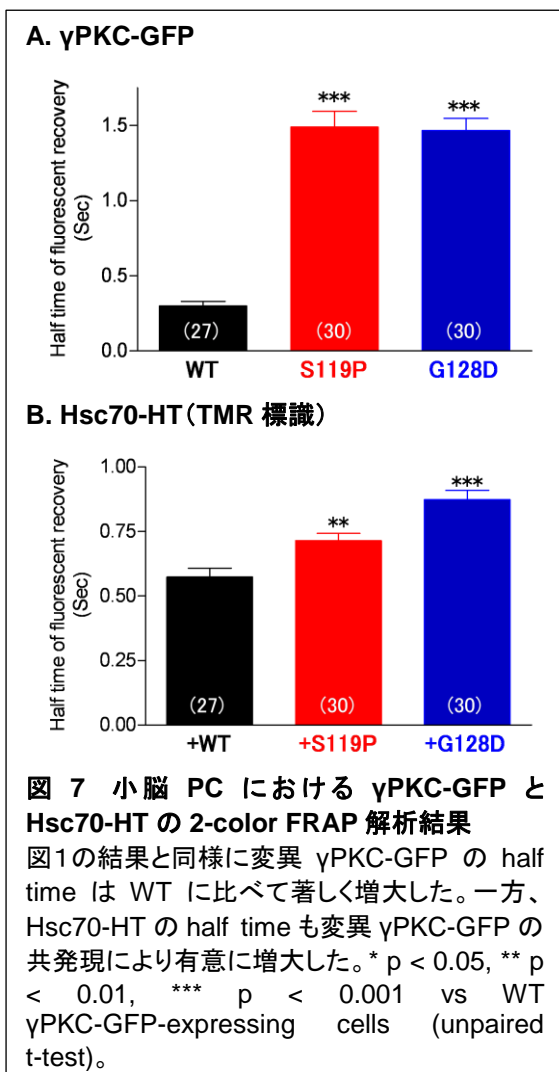
図5 γ PKC-HT 初代培養小脳 PC からの pull down assay の結果

WT よりも変異 γ PKC と強く結合するタンパク質が 95 kDa と 70 kDa の分子量マーカーの間の大きさに存在した(矢印)。

続いて、cell lysate ではなく、生きている PC 内で変異 γ PKC と Hsc70 が結合しているかを蛍光観察により検討した。HT システムでは、生細胞に発現させたタンパク質を蛍光色素が融合した HT ligand と反応させることで、蛍光標識することが可能である。そこで、初代培養小脳 PC に γ PKC-GFP と Hsc70-HT を共発現させ、Hsc70-HT を HT ligand を用いて赤色蛍光 TMR で標識し、GFP 蛍光と TMR 蛍光を生細胞で観察した。変異 γ PKC-GFP が凝集体を形成する PC では Hsc70-HT も凝集体に共局在していた(図6)。また、変異 γ PKC-GFP の凝集体を有さない細胞については、2-color FRAP を行うことで、変異 γ PKC-GFP と Hsc70-HT の相互作用を検討した。変異 γ PKC-GFP と Hsc70-HT が結合し複合体を形成すると Hsc70-HT の流動性が低下するはずである。2-color FRAP により、WT



及び変異 γPKC-GFP と共発現させた Hsc70-HT の流動性を検討すると、WT 共発現時と比べ、変異 γPKC-GFP の共発現により Hsc70-HT の流動性が有意に低下することが明らかとなった (図 7)。以上の結果より、変異 γPKC は生きている PC においても Hsc70 と相互作用することが示唆された。



Hsc70 は小脳 PC に特異的に発現するタンパク質ではないが、小脳においては PC にもっとも豊富に存在することが報告されている。また、Hsc70 は分子シャペロンとしてタンパク質のフォールディングを助ける作用だけでなく、タンパク質分解経路の一つであるシャペロン介在性オートファジーに関与することも知られている。Hsc70 のシャペロン機能及びタンパク質分解機能が変異 γPKC との結合により影響を受けることで、小脳 PC 選択的な神経変性が引き起こされるのではないかと考えられる。

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 6 件)

- Harada, K., Hide, I., Seki, T., Tanaka, S., Nakata, Y. and Sakai, N.
Extracellular ATP differentially modulates Toll-like receptor 4-mediated cell survival and death of microglia.
J. Neurochem., **116**, 1138-1147 (2011)
- Seki, T., Abe-Seki, N., Kikawada, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N.
Effect of trehalose on the properties of mutant γPKC, which causes spinocerebellar ataxia type 14, in neuronal cell lines and cultured Purkinje cells.
J. Biol. Chem., **285**, 33252-33264 (2010)
- Seki, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Ogawa, K., Onji, T., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N.
Congo red, an amyloid-inhibiting compound, alleviates various types of cellular dysfunction triggered by mutant protein kinase Cγ that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) by inhibiting oligomerization and aggregation.
J. Pharmacol. Sci., **114**, 206-216 (2010)
- Yamamoto, K., Seki, T., Adachi, N., Takahashi, T., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N.
Mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) is selectively degraded by autophagy.
Genes Cells, **15**, 425-437 (2010)
- Nobukuni, M., Mochizuki, H., Okada, S., Kameyama, N., Tanaka, A., Yamamoto, H., Amano, T., Seki, T. and Sakai, N.
The C-terminal region of serotonin transporter is important for its trafficking and glycosylation.
J. Pharmacol. Sci., **111**, 392-404 (2009)

6. Seki, T., Shimahara, T., Yamamoto, K., Abe, N., Amano, T., Adachi, N., Takahashi, H., Kashiwagi, K., Saito, N. and Sakai, N. Mutant γ PKC found in spinocerebellar ataxia type 14 induces aggregate-independent maldevelopment of dendrites in primary cultured Purkinje cells. *Neurobiol. Dis.*, **33**, 260-273 (2009)

[学会発表] (計 25 件)

1. 関 貴弘、他 新規活性評価法を用いたシャペロン介在性オートファジー活性に対する脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKC の影響 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜市) 2011 年 3 月 24 日
2. 関 貴弘 変異 γ PKC による脊髄小脳失調症発症の分子メカニズム解明と治療薬探索 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜市) 2011 年 3 月 23 日
3. 隠地智也、他 脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKC の細胞毒性に対するシャペロン介在性オートファジーの影響 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜市) 2011 年 3 月 23 日
4. 藤原雅幸、他 ケミカルシャペロン 4-Phenyl Butylate (4-PBA) のセロトニントランスポーター機能に対する効果 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜市) 2011 年 3 月 23 日
5. 山本 光、他 RN46A 細胞において cAMP アナログの長期暴露はセロトニントランスポーターの取り込み活性を上昇させる 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜市) 2011 年 3 月 23 日
6. 藤原俊輔、他 Toll-like receptor 4 活性化ミクログリアからの TNF 遊離における P2X₇ 受容体の関与: 酸性 pH による制御 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜市) 2011 年 3 月 22 日
7. 関 貴弘、他 脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKC は heat shock cognate protein 70 (Hsc70) と結合し、そのリソソームへのトランスロケーションを抑制する BMB2010 (神戸) 2010 年 12 月 7 日
8. 隠地智也、他 脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKC の細胞毒性に対するシャペロン介在性オートファジーの影響 BMB2010 (神戸) 2010 年 12 月 7 日
9. 酒井規雄、他 神経細胞株におけるニコチン誘発性 PKC トランスロケーションの観察 第 118 回日本薬理学会近畿部会 (大阪) 2010 年 11 月 18 日

10. Seki, T., et al. Mutant γ PKC causing spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) preferably interacts with heat shock cognate protein 70 (Hsc70) and affects its translocation to lysosome. *Neuroscience 2010* (San Diego, USA) 2010年11月14日
11. Tanaka, S., et al. Neural expression of G Protein-coupled receptors GPR3 modulates survival of cerebellar granular neurons under hypoxic conditions. *Neuroscience 2010* (San Diego, USA) 2010年11月14日
12. 原田佳奈、他 Toll-like receptor 4 および細胞外ATP によるミクログリアの細胞死/生存調節 第38回薬物活性シンポジウム (札幌市) 2010年11月12日
13. 原田佳奈、他 Toll-like receptor 4活性化ミクログリアの細胞死と生存の細胞外ATP による調節 Neuro2010 (神戸市) 2010年9月3日
14. 関 貴弘、他 脊髄小脳失調症14型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKCはheat shock cognate protein 70 (Hsc70) と結合し、そのリソソームへのトランスロケーションに影響を及ぼす Neuro2010 (神戸市) 2010年9月2日
15. 田中 茂、他 神経細胞に発現するG蛋白共役型受容体GPR3の低酸素下における神経細胞生存への関与 Neuro2010 (神戸市) 2010年9月2日
16. 山本和央、他 遺伝性脊髄小脳失調症14型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKCはフォルボールエステルによる中心体への局在変化と細胞膜での基質リン酸化能が低下していた 第117回日本薬理学会近畿部会 (徳島市) 2010年7月8日
17. 小川弘太、他 遺伝性脊髄小脳失調症14型 (SCA14) の原因となる γ PKCの特性に対するriluzoleの効果 第83回日本薬理学会年会 (大阪市) 2010年3月16日
18. 原田佳奈、他 細胞外ATPによるリポポリサッカライド活性化ミクログリアの生存調節 第83回日本薬理学会年会 (大阪市) 2010年3月16日
19. 関 貴弘、他 脊髄小脳失調症14型 (SCA14) の原因となる変異 γ PKCは初代培養小脳プルキンエ細胞樹状突起の縮小とスパインの減少を引き起こす 平成21年度 生理学研究所シナプス研究会 (岡崎市) 2009年12月14日
20. 関 貴弘、他 脊髄小脳失調症14型 (SCA14) を引き起こす変異 γ PKCがオートファジー性タンパク質分解に及ぼす影響 第32回日本分子生物学会年会 (横浜市) 2009年12月12日

21. 小川弘太、他 分子シャペロン・Hsp70は、脊髄小脳失調症14型 (SCA14) の原因である変異 γ PKCの凝集体形成、細胞毒性を抑制する 第116回日本薬理学会近畿部会 (大津市) 2009年11月13日
22. Seki, T., et al. EFFECT OF MUTANT γ PKC CAUSING SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 14 ON AUTOPHAGIC PROTEIN DEGRADATION. 5th International Symposium on Autophagy (大津市) 2009年9月26日
23. Seki, T., et al. Effect of mutant γ PKC causing spinocerebellar ataxia type 14 on chaperone-mediated autophagy. 第32回日本神経科学大会 (名古屋市) 2009年9月18日
24. 原田佳奈、他 細胞外ATPはミクログリアの生存を制御する 第115回日本薬理学会近畿部会 (金沢市) 2009年6月26日
25. 酒井規雄、他 プルキンエ細胞におけるSCA14変異 γ PKCの特性に対するトレハロースの影響 第50回日本神経学会総会 (仙台市) 2009年5月20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 貴弘 (SEKI TAKAHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号 : 50335650

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :