

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20707

研究課題名(和文)パーキンソン病でのセレンホメオスタシス攪乱におけるセレノプロテインPの役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of selenoproteinP in disturbance of selenium homeostasis in Parkinson's disease.

研究代表者

金子 尚志(Kaneko, Takayuki)

東北大学・薬学研究科・助手

研究者番号：20907993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、パーキンソン病態におけるセレノプロテインPの役割について検討を行った。細胞を用いない試験管内の実験において、毒性の高い Synuclein fibril形成をセレノプロテインPが抑制することを見出した。一方で、培養細胞では、テトラサイクリン応答 Syn発現細胞を樹立し、本細胞に Syn fibrilをプロテイントランスフェクションすることで、Syn凝集形成評価系を構築した。本実験系において SePまたは亜セレン酸によってセレンを供給すると、細胞内での Synfibrilの形成加速が抑制されたことから、セレン供給は何らかの Syn凝集形成抑制作用を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

振戦や認知機能の低下などを主症状とするパーキンソン病(PD)患者脳では、Synucleinを中心とするタンパク質凝集体であるレビー小体が形成される。本研究では、セレン運搬タンパク質であるセレノプロテインP(SeP)によるPD病態形成への寄与を明らかにすることを目的とした。試験管内および培養細胞をもちいた実験系において、セレノプロテインPは、セレン供給作用および Synucleinとの直接的な相互作用を介して Synucleinの凝集形成を抑制する可能性を見出した。本成果で得られた、パーキンソン病態におけるセレン恒常性を理解することで、魅力的な治療ターゲットへとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of Selenoprotein P in the pathogenesis of Parkinson's disease. In an in vitro experimental system without cells, we found that Selenoprotein P inhibits the formation of Synuclein fibrils induced by Synuclein. On the other hand, in cultured cells, we established a tetracycline-inducible Synuclein-expressing cell line and constructed an evaluation system for Synuclein aggregation formation in the cell culture system by protein transfection of Synuclein fibrils. Supplying selenium through SeP or selenite in this experimental system resulted in the suppression of accelerated Synuclein fibril formation within the cells, suggesting that selenium supplementation may have some inhibitory effect on Synuclein aggregation formation.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 セレノプロテインP セレン 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

セレノプロテイン P (SeP) はセレンをセレノシステインとして 10 個含む極めて特殊なセレノプロテインであり、血漿中総セレンの 50%以上を占め、全身へとセレンを輸送する役割を持つ。SeP は、血液循環を介して全身へと輸送されることで、各組織でのセレン源として機能し、セレン存在下でのみ合成される生体内抗酸化タンパク質であるグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx4) やチオレドキシシンレダクターゼ (TrxR) の素材として利用される。SeP による全身へのセレン供給は、セレンホメオスタシスの維持、ひいては全身のレドックスバランスを制御する上で極めて重要である。セレノシステインは本来終止コドン UTR としてコードされており、3'UTR 側に SECIS (Sec insertion sequence) が存在する場合においてセレノシステインとして挿入される。タンパク質発現に汎用される大腸菌では、SECIS が ORF 内に存在するため、リコンビナント体の調製がほとんど不可能であり、研究が進んでこなかった。

振戦や認知機能の低下などを主症状とするパーキンソン病は、高齢化に伴い発症率が増加する難治性疾患で、有効な治療薬・治療標的が望まれている。PD 患者脳の神経細胞では、シヌクレイン (Syn) を含むタンパク質凝集体であるレビー小体が観察されており、それによって酸化ストレスや小胞体ストレスを介した神経毒性が誘導され、さらに凝集が加速する。このことから Syn を中心とする凝集メカニズムを明らかにすることで、新たな PD 治療薬となると考えられる。近年、レビー小体中に SeP が含まれることが報告された。異常凝集されたタンパク質は、その機能を失うことが多く報告されていることから、PD 患者能では SeP がレビー小体に取り込まれ異常凝集体を形成することで機能を喪失し、セレンホメオスタシスの破綻を介して細胞内レドックスバランスが攪乱されると仮説を立てた。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では SeP 機能不全によるセレンホメオスタシスの破綻が PD 病態進行にどのように関与するかを分子レベルで理解することを目指した。本研究課題では、PD 病態時の SeP の振る舞いを明らかにすることでその病態生理学的意義を理解し、新たな治療標的を同定することを目的とした。

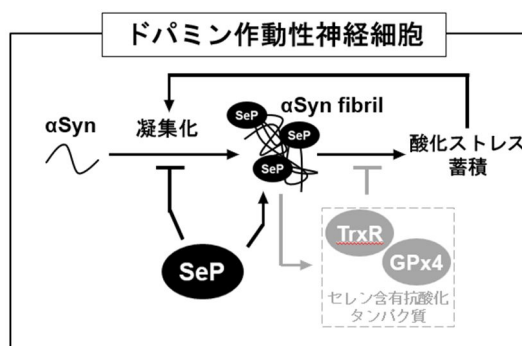
3. 研究の方法

これまでに汎用されている Synuclein の in vitro での凝集形成アッセイ系を用いて検討した。本系に、種々の遷移金属や SeP を添加することで、酸化ストレスで負荷された場合の Synuclein 凝集形成過程における SeP の役割を検討した。培養細胞を用いた実験系では、レンチウイルスベクターによってテトラサイクリン応答 Synuclein 発現細胞を樹立し、さらに Synuclein fibril をプロテイントランスフェクションすることで、培養細胞における Synuclein 凝集形成系を構築した。本系を用いて、細胞へのセレン供給または SeP 添加が Synuclein 凝集形成における役割を検討した。

4. 研究成果

上述した in vitro での凝集形成アッセイ系において、通常条件下では分子量が増加した Synuclein fibril が形成され、酸化ストレス負荷または遷移金属添加によって凝集形成が促進した。本系において、SeP を添加することで Synuclein fibril の形成が抑制されることを見出した。以上の事実から、SeP は Synuclein と直接的に作用することによって、毒性の高い Synuclein fibril 形成が抑制されることがわかった。

培養細胞系において、種々の酸化ストレス誘導剤で処理し、細胞に添加した SeP が不溶化するか検討したところ、複数種の酸化ストレス誘導剤で SeP が 1% TritonX-100 不溶性画分へと移行することがわかった。このとき、脂溶性の酸化ストレス誘導剤で特に強く凝集することが確認された。続いて、SeP が Synuclein の凝集形成に影響を与えるか検討したところ、それぞれを導入した細胞での免疫染色によって、SeP が Synuclein 凝集体の中に局在することを確認した。さらに、上述の Synuclein fibril 形成系では、SeP もしくは無機のセレン供給体である亜セレン酸の処理によって、Synuclein の形成が抑制された。一方で、ドキシサイクリンで Syn 発現を誘導した細胞に SeP を添加すると、細胞



本研究から想定されるスキーム

内 SeP 取り込み量が減少しており、セレン含有抗酸化タンパク質である GPx1 や GPx4 の発現増加が抑制されることがわかった。以上の結果から、細胞を用いた実験系においても、SeP は Syn 凝集体の形成を抑制する可能性が示された。亜セレン酸でも同様の効果が認められたことから、本作用は GPx や TrxR などの発現増加を介した細胞内抗酸化能増加によるものと考えられる。その一方で、SeP 自身も Synuclein 複合体に取り込まれ、本来のセレン供給能から低下することも示唆された。SeP が Synuclein 凝集体に取り込まれることによる長期の影響は評価できておらず、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kaneko Takayuki, Mita Yuichiro, Nozawa-Kumada Kanako, Yazaki Masana, Arisawa Mieko, Niki Etsuo, Noguchi Noriko, Saito Yoshiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Antioxidant action of persulfides and polysulfides against free radical-mediated lipid peroxidation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 677 ~ 690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2023.2165918	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〕

-

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
研究協力者	斎藤 芳郎 (Saito Yoshiro) (70357060)	東北大学・薬学研究科・教授 (11301)	
研究協力者	外山 喬士 (Toyama Takashi) (50720918)		

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