

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650319

研究課題名(和文)プロテオグリカンの生体内機能を利用した神経変性疾患リハビリテーションの新規開発

研究課題名(英文) A new molecular-based rehabilitation for neurodegenerative disease by in situ application of proteoglycan

研究代表者

K A 井上(Inoue, Katarzyna)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90302877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患での機能障害は、神経細胞内外における種々のタンパク質凝集体の異常形成に起因する。本研究は、神経細胞中のヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)がトランスグルタミナーゼ2(TG2)の機能を調節し、脳神経変性疾患発症に関与する可能性を、*in vitro*実験系で調べた。C6グリア腫細胞のHSPGとTG2は、免疫染色、ショ糖密度勾配超遠心で同じ膜ドメインに存在し、OptiPrep密度勾配遠心、細胞分画法で輸送小胞分画に検出され、HSPGがTG2の細胞内外の輸送や酵素活性の調節に関与する事が示唆された。今後、両分子の相互作用の解明による神経変性疾患の治療法開発への展望が広がる。

研究成果の概要(英文)：Many neurodegenerative diseases are often caused due to abnormal formation of protein aggregates by transglutaminase 2 (TG2). Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) has been also suggested to play critical role in many neurodegenerative diseases. Putative interaction of TG2 with HSPG has been suggested. The purpose of this study was to determine the role of HSPG species expressed by glial cells in cell-surface trafficking and biological activity of TG2 related to pathogenesis of neurodegeneration using an *in vitro* approach. Subcellular fractionation and immunocytochemical analyses showed that TG2-specific compartments were also specific for HSPGs suggesting possible interaction between those molecules. Understanding the bases of molecular interaction between TG2 and HSPGs and the precise role of HSPGs in regulation of biological activity of TG2 will help to identify the pathogenic mechanism of neurodegenerative diseases and to develop targeted rational therapy.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学 プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化にともない外神経変性疾患の患者が急増し、特にアルツハイマー病、パーキンソン病、及びハンチントン病などの神経変性疾患を持つ患者では、記憶喪失や運動麻痺が確実に進行する。神経変性疾患に対する治療法は確立されておらず、効率的なりハビリテーションも確立されていない。外神経変性疾患で惹起される神経細胞死や神経細胞の機能障害は、神経細胞内外における種々のタンパク質凝集体の異常形成に起因すると考えられている。したがって上記プロセスの進行を防ぐことは、これら疾患に対する新たな治療法の開発に繋がる。生体内に広く発現するトランスグルタミナーゼ 2 (TG2) は、タンパク質側鎖のグルタミン酸とリジンの間に共有結合を形成する酵素である。この TG2 は、生体構造の構築や安定化に寄与し、セリアック病、糖尿病、肝疾患、癌など、様々な病態形成に深く関与している。特に神経細胞では、TG2 によってタンパク質間で共有結合が形成され、タンパク質凝集体の分解が阻害され、これが脳神経変性疾患の発症を左右すると考えられている。

(2) ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、細胞表面および細胞外マトリックスの主要な活性分子の一つであり、成長因子やサイトカインと相互作用し、これらの細胞に対する作用や細胞内輸送を調節している。最近、この HSPG がアルツハイマー病やパーキンソン病といった病脳神経変性疾患の病状や病因に重要なアミロイドで検出され、また HSPG の 1 種であるシンデカン 4 と TG2 の相互作用が発見された (Scrapellini et al., 2009)。これらの知見から、神経細胞に表現している HSPG が TG2 の機能を調節し、脳神経変性疾患の病状や病因に関与している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、HSPG が TG2 に作用することによって、TG2 の神経細胞の細胞内外の輸送 (分泌とエンドサイトーシス) を調節し、酵素活性を制御している可能性を *in vitro* の実験系を用いて検討した。そのために以下の項目を明らかにする。

(1) 神経系細胞が生合成する HSPG を同定し、TG2 との相互作用の有無を明らかにする。

(2) 神経系細胞における HSPG が、TG2 の細胞外への輸送 (分泌など) に関与しているかを解明し、その生物学的な活性を調節しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 生化学的な実験 [逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) およびイムノプロット法] を用いて神経系細胞に発現している HSPG

を同定し、これを TG2 に対する抗体を用いた共沈殿し、質量分析を行うことにより HSPG/TG2 複合体の存在を確認する。

(2) 共焦点顕微鏡観察により TG/HSPG 複合体の局在する神経細胞内コンパートメントを同定する。さらに、密度勾配超遠心法を用いて TG/HSPG 複合体の局在する神経細胞内コンパートメントのキャラクタリゼーションを行う。

(3) HSPG に対する siRNA を用いて、HSPG をノックダウンした時の TG2 の細胞局在や機能の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 生化学的および分子生物学的な解析により C6 グリア腫細胞におけるトランスグルタミナーゼ 2 (TG2) の発現および細胞内の局在の確認ができた。さらに、C6 グリア腫細胞のプロテオグリカンを部分精製し、HSPG の分子種の同定をおこなった。まずヘパラン硫酸鎖を特異的に認識する 3G10 抗体を用いたイムノプロット解析の結果から細胞には複数異なる分子量を持つ HSPG が存在することが示唆された。また代表的な HSPG の発現を RT-PCR により解析したところ、数種の HSPG の mRNA が検出された。以前、HSPG は神経組織でも多く発現しているという報告があったが、グリア細胞における HSPG のキャラクタリゼーションは本課題で網羅的に行い、新たな HSPG に関する基礎知識を得た。

(2) TG2 に対する抗体を用いた共沈殿実験をおこない、TG2/HSPG 複合体の同定をおこなったが、HSPG を検出する事ができず、TG2/HSPG 複合体を同定することはできなかった。そこで別のアプローチとして、TG2 および HSPG に対する抗体を用いてラット C6 グリア腫細胞の免疫染色を行ったところ、同細胞において両方の分子が共局在している事を確認した。これらの知見から、グリア腫細胞に表現している HSPG は、TG2 と相互作用している可能性が示された。

(3) ショ糖密度勾配超遠心を用いてラット C6 グリア腫細胞から膜ドメイン分画を調製したところ、TG2 および HSPG は同じ比重を持つ分画に回収された。従って、TG2 及び HSPG が同じ膜ドメインに存在することが示唆された。さらに、OptiPrep 密度勾配遠心を用いた細胞分画法で、TG2 および HSPG が存在する分画の同定を行った。その結果、TG2 および HSPG は、輸送小胞の含まれる分画に検出された。よって、C6 グリア細胞に発現している HSPG は、TG2 の細胞内外の輸送、及び TG2 の酵素活性の調節に関与している事が示唆された。現在、分子生物学的方法を用いて HSPG が、TG2 の機能の制

御に果たしている役割を明らかにする実験を進めている。この関与を解明することで脳神経変性疾患の病態発症のメカニズム見出すことができると考えられる。

(4) 多くの研究から、TG2 の調節不全がアルツハイマー病、パーキンソン病やハンチントン病といった多くの神経変性疾患の発症に関与している事が示唆されている。今後の発展に当たっては、TG2 の酵素活性の調節機構を解明し、より神経変性疾患の発症に特異的に関与する因子を見出し、神経変性疾患特異的に作用する薬物標的を同定することは非常に重要である。さらに、TG2/HSPG の分子の間相互作用の基礎的なメカニズムを解析し、TG2 の生物学的活性の調節にかかわる HSPG の役割を明らかにすることが、神経変性疾患の治療の開発に新たな展望をもたらす。

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 1 件)

Miki Hara-Yokoyama, Mutsuko Kukimoto-Niino, Kazue Terasawa, Satoru Harumiya, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Nobumasa Hino, Kensaku Sakamoto, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yoko Hiruta, Nana Kawasaki, Chiemi Mishima-Tsumagari, Yoko Kaitsu, Tomoko Matsumoto, Motoaki Wakiyama, Mikako Shirouzu, Takeshi Kasama, Hiroshi Takayanagi, Naoko Utsunomiya-Tate, Kiyoshi Takatsu, Toshiaki Katada, Yoshio Hirabayashi, Shigeyuki Yokoyama, and Masaki Yanagishita, Tetrameric interaction of the ectoenzyme CD38 on the cell surface enables its catalytic and raft association activities, Structure, 査読有, Vol.20, No.9, 2012, pp.1585-1595
DOI: 10.1016/j.str.2012.06.017

[学会発表](計 4 件)

Katarzyna A. Inoue Role of heparan sulfate proteoglycan in etiology of neurodegenerative disease, 第 21 回プロテオグライカンフォーラム, 2014 年 1 月 12 日、東京都、東京医科歯科大学
Katarzyna A. Inoue, Miki Yokoyama, and Masaki Yanagishita, Cell surface heparan sulfate proteoglycans expressed by glioma cells: biochemical characterization, The 8th International Conference on Proteoglycans, 2013 年 8 月 25-29 日、Frankfurt am Main, Germany

Katarzyna A. Inoue, Miki Yokoyama, and Masaki Yanagishita, Association of heparan sulfate proteoglycans with trypsin-accessible membrane domains, The Gordon Research Conference on Proteoglycans, 2012 年 7 月 8-13 日、Proctor Academy, Andover, USA
Katarzyna A. Inoue, Miki Yokoyama, and Masaki Yanagishita, Characterization of membrane rafts enriched in cell surface heparan sulfate proteoglycans isolated from a rat parathyroid cell line, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日、京都市、国立京都国際会館

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

K A 井上 (INOUE, Katarzyna Anna)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：90302877

(2) 研究分担者

横山 三紀 (YOKOYAMA, Miki)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号：70191533

ゼレド ジョージ (ZEREDO, Jorge)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師
研究者番号：10363459

桑井 康宏 (KUMEI, Yasuhiro)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・講師
研究者番号：30161714

(3)連携研究者

柳下 正樹 (YANAGISHITA, Masaki)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・教授
研究者番号：70132793

長谷川 克也 (HASEGAWA, Katsuya)
独立行政法人 宇宙航空研究開発機構・宇
宙科学研究所・開発員
研究者番号：30425780