

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：15401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700450
 研究課題名（和文） 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の神経変性疾患への関与解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the involvement of chaperone-mediated autophagy to the pathogenesis of neurodegenerative diseases using a novel method to monitor its activity
 研究代表者 関 貴弘 (Takahiro Seki)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
 研究者番号：50335650

研究成果の概要（和文）：シャペロン介在性オートファジー（CMA）はタンパク質分解系の一つであるが、簡便な活性評価法が存在せず、他の分解系に比べ生理機能や疾患発症への関与解明が遅れている。本研究では、CMA を 1 細胞レベルで解析する新規活性評価法を確立し、神経変性疾患の一つである脊髄小脳失調症 14 型（SCA14）の原因である変異 γ PKC が培養神経細胞で CMA 活性を低下させることを解明した。また、別のタイプの SCA である SCA3 モデルマウスの脳で CMA 関連タンパク質の発現量が変化していることをも解明した。本研究は 2 つのタイプの SCA 発症に CMA が関与する可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Chaperone-mediated autophagy (CMA) is one of the proteolytic pathways. Since there is no simple method to monitor CMA activity, the roles of CMA in physiological functions and pathogenesis of diseases have remained unknown. In the present study, I have established a novel method to monitor CMA activity in a single cell level. To utilize this method, I revealed that mutant γ PKC which causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) impairs CMA activity in primary cultured neural cells. In addition, I elucidated that the amounts of proteins related to CMA are altered in the brain of SCA3, another type of SCA, model mice. These findings suggest that CMA might be related to the pathogenesis of two different types of SCAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学・神経薬理学

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：シャペロン介在性オートファジー、脊髄小脳失調症

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の一つである脊髄小脳失調症 14 型（SCA14）は PKC の神経特異的分子種である γ PKC のミスセンス変異が原因で引き起こされる。しかしこの変異 γ PKC が神経変性を引き起こすメカニズムは不明なままである。最近、変異 γ PKC が強く結合するタンパク質の一つとして heat shock cognate protein 70 (Hsc70) が同定された。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に関与するが、オートファジー・リ

ソソーム系タンパク質分解系の一つであるシャペロン介在性オートファジー（CMA）にも関与する（図 1）。CMA は長期間飢餓や酸化ストレス負荷などにより活性化され、ストレス環境下での細胞の生存に関与する。CMA は、① ターゲットとなるタンパク質が細胞質タンパク質の約 30% を占める、② 他の分解系と異なり、哺乳細胞でのみ存在する、という点から、哺乳細胞の機能維持に不可欠なタンパク質分解系であり、CMA の破綻が様々な疾患発症に繋がる可能性は高い。しか

し、CMA は簡便でかつ一細胞レベル・生細胞レベルで行える活性評価法が開発されておらず、そのため。その活性制御機構や生理的役割、疾患への関与はほとんど不明で治療への応用もなされていないのが現状である。

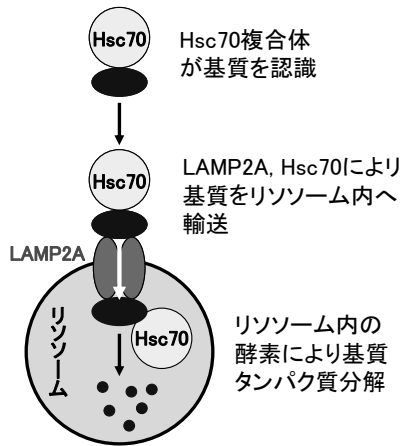


図1 シャペロン介在性オートファジーの模式図

2. 研究の目的

本研究では、最近開発された HaloTag 及び HaloTag リガンドを用いた生細胞でのタンパクの蛍光標識システムを利用し、簡便でかつ一細胞レベル・生細胞レベルで行える新規 CMA 活性評価系を確立すること、神経細胞レベルで SCA14 を引き起こす変異 γ PKC が細胞内 CMA 活性に及ぼす影響を明らかにし、治療への応用へと展開させること、さらには SCA14 以外の神経変性疾患における CMA の関与解明を検討す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3点について研究を行った。

(1) CMA 活性を一細胞レベル・生細胞レベルで簡便に評価可能な新規活性評価法の確立

(2) 新規活性評価系を用いた SCA14 の原因である変異 γ PKC が CMA 活性に及ぼす影響の解明

(3) 別のタイプの SCA である SCA3 のモデルマウスにおける CMA 関連タンパク質の発現量変化

4. 研究成果

(1) CMA 活性を一細胞レベル・生細胞レベルで簡便に評価可能な新規活性評価法の確立

HaloTag (HT) システムは細胞透過性の HT リガンドと HT が共有結合する性質を用いて、HT リガンドに蛍光色素を融合させることにより、細胞にタンパク質を発現させた後も蛍光標識が可能となるシステムである。この HT リガンドに細胞質に発現する CMA 基質 (GAPDH) を融合させ、培養細胞に発現させ

た。HT とリガンドとの結合は酸性領域下では起こらないため、この結合はリソソーム内では起こらず、細胞質にある GAPDH-HT のみを標識することが可能である (図 2A)。しかし一度結合してしまえば、酸性条件下でも結合は保たれるため、標識された GAPDH-HT のリソソームへの移行を観察することにより、CMA 活性を測定できるのではないかと考えた (図 2B)。

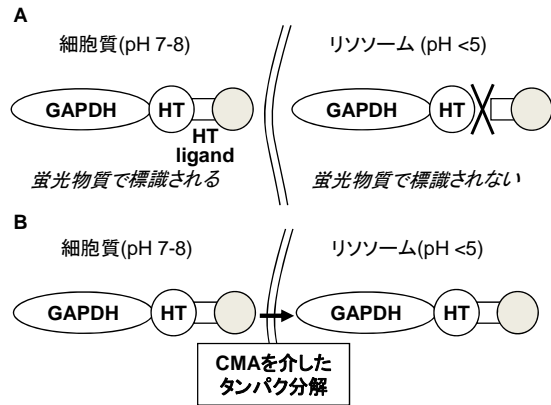


図2 HaloTag システムを用いた CMA 活性モニタリングの原理

実際に、GAPDH-HT を発現し、蛍光 HT リガンドで標識した直後では、GAPDH-HT は細胞質に均一に局在したが、さらに培養すると細胞質で点状に集積した (図 3)。この集積はリソソームのマーカーである LAMP1 や LAMP2A と共局在したこと、CMA の活性化薬及び阻害薬でその集積がそれぞれ促進および抑制されたこと、siRNA による LAMP2A のノックダウンによりその集積が抑制されたこと (図 4) から、GAPDH-HT の点状の集積は CMA 活性依存的に GAPDH が細胞質からリソソームへ移行したことが示唆された。このように HT システムを利用することにより、細胞内 CMA 活性を蛍光観察で簡便に評価可能な新規 CMA 活性評価法の開発に成功した。

また、同様のリソソームへの以降は GAPDH-HT を発現させた初代培養小脳プルキンエ細胞でも観察された (図 5)。このことより、この新規活性評価法は神経細胞で一細胞レベルでの CMA 活性観察にも応用可能であることが示された。

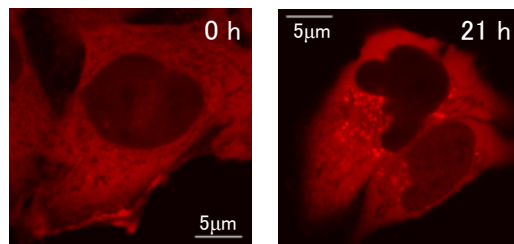


図3 HeLa 細胞における GAPDH-HT 集積

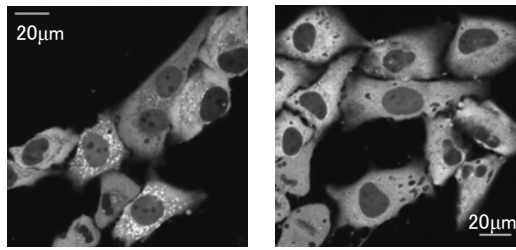


図4 Control-siRNA (左)及び LAMP2A-siRNA (右)導入 HeLa 細胞における GAPDH-HT のリソソーム集積

(2)新規活性評価系を用いた SCA14 の原因である変異 γ PKC が CMA 活性に及ぼす影響の解明

SCA14 の原因である変異 γ PKC は野生型に比べ Hsc70 と強く結合するため、変異 γ PKC が CMA に及ぼす影響を確立した新規活性評価法を用いて検討した。初代培養神経細胞 (小脳プルキンエ細胞) において、変異 γ PKC は GAPDH-HT のリソソーム移行を有意に抑制した (図5)。この抑制は変異 γ PKC の凝集体の観察されない細胞でも観察され、SCA14 の原因である変異 γ PKC は凝集体の形成に関係なく、CMA 活性を低下させることが明らかとなった。CMA はストレス時に活性化され、変性タンパク質の分解に関与するため、変異 γ PKC による CMA 障害が神経細胞のストレスへの脆弱性を増大させ、神経変性に繋がるのかもしれない。

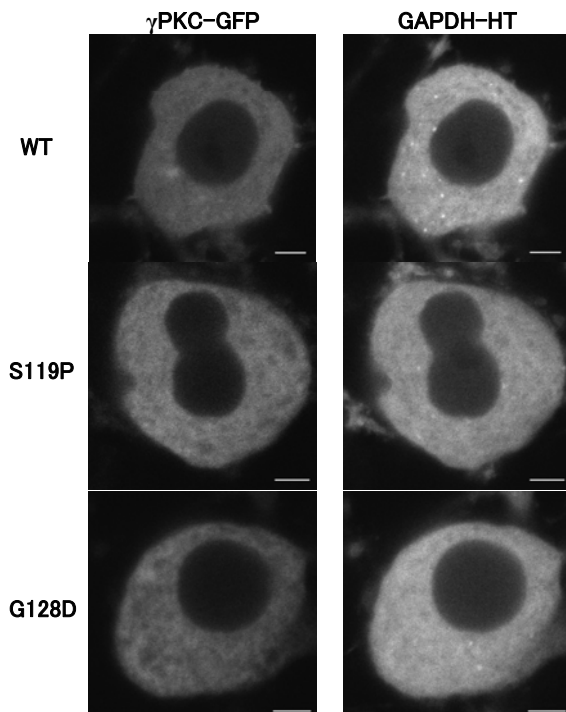


図5 γ PKC-GFP 発現初代培養小脳プルキンエ細胞細胞体における GAPDH-HT のリソソーム移行 (WT: 野生型、S119P、G128D:変異体, bar = 5 μ m)

(3)別のタイプの SCA である SCA3 のモデルマウスにおける CMA 関連タンパク質の発現量変化

SCA3 (脊髄小脳失調症 3 型、Machado-Joseph 病) は ataxin-3 をコードする遺伝子の変異が原因で発症する。Ataxin-3 遺伝子は CAG repeat を含み、健常人では 12~44 であるが、SCA3 患者ではこの repeat が 60~90 に異常伸長する。CAG repeat の異常伸長はハンチントン病、SCA1、SCA2 などでも共通に見られ、タンパク質として伸長ポリグルタミン鎖をコードするため、ポリグルタミン病と総称される。異常伸長した CAG repeat を有する ataxin-3 のトランスジェニックマウスは SCA3 モデルとして使われ、SCA3 様の運動失調を示し、生存期間も短縮する。そこで、Q84 (84 個の CAG repeat) を有するヒト ataxin-3 のトランスジェニックマウスの小脳において、CMA 関連タンパク質がどのように変化するかを検討した。SCA 様症状が見られる 40 週齢において Q84 トランスジェニックマウス (ヘテロ及びホモ) において、CMA 関連タンパク質である Hsc70 及び LAMP2A の発現量は非トランスジェニック (Non) 及び Q15-ataxin-3 (正常 ataxin-3) トランスジェニックマウスと比較して、僅かながらもいずれも有意に増大していた (図6)。これは SCA3 モデルマウス的小脳で CMA の活性化が見られることを示唆するものである。これは症状の見られない 24 週齢では観察されなかったため、症状の進行に伴い、CMA が活性化されることを示しており、CMA が SCA 様症状の発症に関与する可能性を示している。

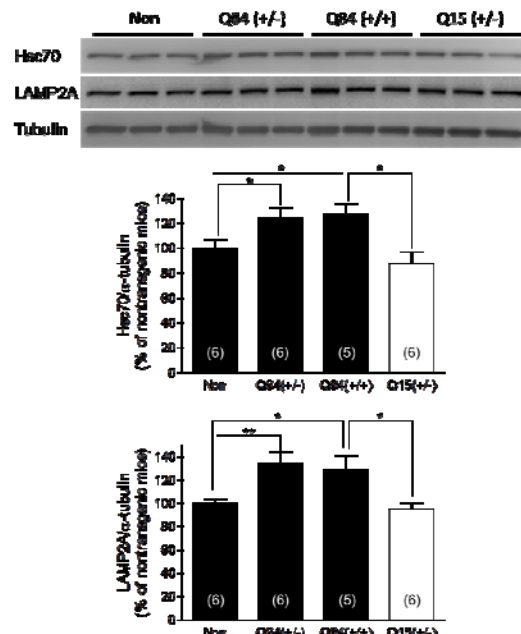


図6 Q84 及び Q15 ataxin-3 トランスジェニックマウス小脳 (40 週齢) における Hsc70 及び LAMP2A の発現
* p < 0.05, ** p < 0.01 (unpaired t-test)

(2) ~ (3) の結果より、異なる2種類のSCAにおいて、CMA活性の異常が観察され、CMAはその他のSCAの発症メカニズムにも関与する可能性が示唆された。今後は本研究で開発した新規CMA活性評価法を用いて、様々なSCA及び他の神経変性疾患におけるCMAの関与を解明することが期待される。

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8件)

1. Fujiwara, M., Yamamoto, M., Miyagi, T., Seki, T., Tanaka, T., Hide, I. and Sakai, N. Effects of the chemical chaperone 4-phenylbutylate on the function of the serotonin transporter (SERT) expressed in COS-7 cells. *J. Pharmacol. Sci.*, (査読有) (2013) **in press**
2. Yamamoto, H., Tanaka, S., Tanaka, A., Hide, I., Seki, T. and Sakai, N. Long-term exposure of RN46A cells expressing serotonin transporter (SERT) to a cAMP analog up-regulates SERT activity and is accompanied by neural differentiation of the cells. *J. Pharmacol. Sci.* (査読有), **121**, 25-38 (2013)
3. Yan, H.D., Ishihara, K., Seki, T., Hanaya, R., Kurisu, K., Arita, K., Serikawa, T. and Sasa, M. Inhibitory effects of levetiracetam on the high-voltage-activated L-type Ca^{2+} channels in hippocampal CA3 neurons of spontaneously epileptic rat (SER). *Brain Res. Bull.* (査読有), **90**, 142-148 (2012)
4. Seki, T., Yoshino, K.I., Tanaka, S., Dohi, E., Onji, T., Yamamoto, K., Hide, I., Paulson, H.L., Saito, N. and Sakai, N. Establishment of a novel fluorescence-based method to evaluate chaperone-mediated autophagy in a single neuron. *PLoS One* (査読有), **7**, e31232 (2012)
5. Dohi, E., Tanaka, S., Seki, T., Miyagi, T., Hide, I., Takahashi, T., Matsumoto, M. and Sakai, N. Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival. *Neurochem. Int.* (査読有), **60**, 431-442 (2012)
6. Sakai, N., Saito, N. and Seki, T. Molecular pathophysiology of neurodegenerative disease caused by γ PKC mutations. *World J. Biol. Psychiatry.* (査読有) **12 Suppl 1**, 95-98 (2011)
7. Shuvaev, A.N., Horiuchi, H., Seki, T., Goenawan, H., Irie, T., Iizuka, A., Sakai, N. and Hirai, H. Mutant PKC γ in spinocerebellar ataxia type 14 disrupts synapse elimination and long-term

depression in Purkinje cells in vivo. *J. Neurosci.* (査読有), **31**, 14324-14334 (2011)

8. Seki, 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 C γ . *J. Pharmacol. Sci.* (査読有), **116**, 239-247 (2011)

[学会発表] (計29件)

1. 神垣真由美、関 貴弘、他 Toll様受容体4活性化により生存するミクログリアは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を自己生産する 第86回日本薬理学会年会 2013年3月23日(福岡市)
2. 田中 茂、関 貴弘、他 GPR3を介した突起伸長にGbetagammaを介する経路が部分的に関与する 第86回日本薬理学会年会 2013年3月22日(福岡市)
3. 秀 和泉、関 貴弘、他 ミクログリアの死細胞貪食におけるP2Y2受容体の関与 第122回日本薬理学会近畿部会 2012年11月16日(大阪市)
4. 田中 茂、関 貴弘、他 虚血脳におけるシヤペロン介在性オートファジーの役割 第24回日本脳循環代謝学会総会 2012年11月8日(広島市)
5. Tanaka, S., Seki, T., et al, Phosphatidylinositol 3-Kinase and mitogen-activated protein-kinase signaling pathway play a role in the GPR3-mediated neurite outgrowth. Neuroscience 2012, Oct 15, 2012 (New Orleans, USA)
6. Dohi, E., Seki, T., et al, Time dependent alternations of lysosomal-associated membrane protein type 2A in rodent brain following cerebral ischemia. Neuroscience 2012, Oct 14, 2012 (New Orleans, USA)
7. Yamamoto, H., Seki, T., et al, Long-term exposure of cAMP analogue up-regulates the function of serotonin transporter (SERT) in RN46A cells. Neuroscience 2012, Oct 14, 2012 (New Orleans, USA)
8. Hide, I., Seki, T., et al, Enhanced survival and phagocytic activity by Toll-like receptor 4 activation in rat microglia. 第55回神経化学学会 2012年10月1日(神戸市)
9. Tanaka, S., Seki, T., et al, GPR3 protects neurons from apoptosis under the hypoxic condition. 第55回神経化学大会 2012年9月30日(神戸市)
10. 田中 茂、関 貴弘、他 GPR3依存的な神経突起伸長にPI3キナーゼ、MAPキナーゼの活性化が寄与する 第35回日本神

- 経科学大会 2012年9月18日(名古屋市)
11. 酒井規雄、関 貴弘、他 神経細胞株 SH-SY5Y 細胞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 16 回活性アミンに関するワークショップ 2012年8月24日(札幌市)
 12. 土肥栄佑、関 貴弘、他 低酸素ストレスにより活性化されるシャペロン介在性オートファジーの細胞保護効果 第 121 回日本薬理学会近畿部会 2012年6月29日(徳島市)
 13. Hide, I., Seki, T., et al, Toll-like receptor 4 activation promotes survival and phagocytic clearance in Microglia: Possible involvement of purinergic receptors. Purine2012, June 1, 2012 (福岡市)
 14. 秀 和泉、関 貴弘、他 ミクログリアの Toll-like 受容体 4 活性化に対する異なる細胞反応とプリン受容体を介した調節 第 85 回薬理学会年会 2012年3月16日(京都市)
 15. 山本 光、関 貴弘、他 cAMP アナログの長期処置による RN46A 細胞におけるセロトニントランスポーター機能上昇の分子機序の解析 第 85 回薬理学会年会 2012年3月15日(京都市)
 16. 宮城達博、関 貴弘、他 齧歯類脳における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の発現と神経細胞内局在 第 85 回薬理学会年会 2012年3月15日(京都市)
 17. 田中 茂、関 貴弘、他 低酸素環境下における Gs 共役型受容体 GPR3 の神経細胞保護作用 第 85 回薬理学会年会 2012年3月14日(京都市)
 18. 土肥栄佑、関 貴弘、他 シャペロン介在性オートファジーは低酸素ストレスによる神経細胞死に対し保護的に働く 第 85 回薬理学会年会 2012年3月14日(京都市)
 19. Tanaka, S., Seki, T., et al, Involvement of GPR3 against apoptotic neuronal cell death during cerebellar development. Neuroscience 2011, Nov 14, 2011 (Washington DC, USA)
 20. Dohi, E., Seki, T., et al, Contribution of chaperone-mediated autophagy to the survival of cells under hypoxic condition. Neuroscience 2011, Nov 14, 2011 (Washington DC, USA)
 21. 酒井規雄、関 貴弘、他 ケミカルシャペロンのセロトニントランスポーター機能に対する影響 第 54 回日本神経化学大会 2011年9月27日(石川県加賀市)
 22. 山本 光、関 貴弘、他 cAMP アナログの長期投与は RN46A 細胞においてセロトニントランスポーターの機能を亢進させる 第 54 回日本神経化学大会 2011年9月27日(石川県加賀市)
 23. 田中 茂、関 貴弘、他 Involvement of GPR3 against apoptotic cell death during cerebellar development. 第 34 回日本神経科学大会 2011年9月17日(横浜市)
 24. 土肥栄佑、関 貴弘、他 低酸素環境下におけるシャペロン介在性オートファジーの役割 第 34 回日本神経科学大会 2011年9月17日(横浜市)
 25. 山本 光、関 貴弘、他 cAMP アナログ処置によるセロトニントランスポーター (SERT) の機能変化 第 15 回活性アミンに関するワークショップ 2011年8月11日(徳島市)
 26. 酒井規雄、関 貴弘、他 ケミカルシャペロンがセロトニントランスポーター機能に及ぼす影響第 15 回活性アミンに関するワークショップ 2011年8月11日(徳島市)
 27. 酒井規雄、関 貴弘、他 セロトニントランスポーター機能に対するケミカルシャペロン 4-phenylbutylate(4-PBA) の効果 第 119 回薬理学会近畿部会 2011年7月8日(名古屋市)
 28. 土肥栄佑、関 貴弘、他 低酸素ストレス環境下における LAMP-2A 陽性リソソームの関与と役割 第 52 回日本神経学会 2011年5月19日(名古屋市)
 29. 酒井規雄、関 貴弘、他 遺伝性脊髄小脳失調症 1 4 型(SCA14) の発症原因となる変異 γ PKC の分解にオートファジーが関与する 2011年5月19日(名古屋市)
- [その他]
ホームページ等
6. 研究組織
(1)研究代表者
関 貴弘 (Takahiro Seki)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・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：