

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591262

研究課題名(和文)ドーパミン神経特異的な シヌクレイン修飾と新規パーキンソン病治療ターゲット

研究課題名(英文) Dopamin neuron specific modification of alpha-synuclein and novel therapeutic target against Parkinson's disease

研究代表者

中曾 一裕 (Nakaso, Kazuhiro)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：30379648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病はドーパミン(DA)神経死を来す神経変性疾患である。しかし、なぜDA神経に病態が生じるのかよく分かっていない。我々はDAとシヌクレイン(asyn)の相互作用と細胞毒性について検討した。TetOFFシステムを用い、PC12細胞でasyn発現細胞(変異体を含む)を確立した。asynの発現は細胞脆弱性をもたらしたが、チロシン水酸化酵素阻害をすると脆弱性が抑制されたことから、asyn毒性はDA代謝と関係があると考えられた。さらにasynにはDA存在下にてMet酸化修飾があること、その主要ターゲットとして127番Metが重要と考えられ、周辺アミノ酸配列はこの修飾を促進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the selective loss of dopamine (DA) neurons. However, it is not well understood why PD-related pathogenesis occurs in DA neurons. We investigated the interaction between DA and  $\alpha$ -synuclein (asyn) with regard to cytotoxicity. We generated PC12 cells expressing human asyn, as well as several asyn mutants using a Tet-OFF system. Overexpression of wildtype asyn decreased cell viability in long-term cultures, while an inhibitor of tyrosine hydroxylase blocked this vulnerability, suggesting that asyn-related cytotoxicity is associated with DA metabolism. The vulnerabilities of all mutant cell lines were lower than that of wildtype asyn-expressing cells. Moreover, asyn containing DA-mediated oxidized methionine (Met(O)) was detected in our cell lines. Met(O) was lower in methionine mutant cells, especially in the M127A mutant cells. Moreover, Y125 and S129 may act as enhancers of this DA-related modification of asyn.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 -synuclein ドーパミン カテコールアミン メチオニン

## 1. 研究開始当初の背景

PDの病態の最大の特徴として、(i) DA神経の選択的細胞死、(ii) DA神経中Lewy小体形成の2点が挙げられる。申請者はこれらの特徴を解析し、これまでにDA神経特異的な分子病態として、DA存在下におけるsyn発現細胞の潜在的脆弱性(Ito, Neurosci Res 2010)、タンパク質の易凝集性(Yoshimoto, FEBS Lett 2005, Nakaso, Brain Res 2004)などの報告をしてきた。この一連の継続的な研究の中で、後述するPC12-syn-TetOFF細胞を確立した。この細胞はsyn発現量とDAをはじめとするカテコールアミン代謝を同時にコントロール出来るモデル細胞であり、PD病態を研究するにあたって極めて有用なツールである。

synはLewy小体の主要構成成分であり、家族性PDの原因遺伝子(PARK1, PARK4)でもある。synはDA神経では毒性に、非DA細胞では保護的に働くという報告があり、さらにsynはC末端近くのリン酸化やニトロ化により可溶性オリゴマー形成が促進され、細胞毒性に働くことが知られている。実際、申請者が確立したPC12-syn-TetOFF細胞でもDA依存的な細胞毒性を示しており、synがPDの病態の中で「DA神経に特異的な細胞脆弱性」の特徴付けに重要な役割を果たしていることはもはや疑いのない事実である。

しかし、リン酸化など一般的なsynの翻訳後修飾はよく研究されているにも関わらず、DA神経特異的な翻訳後修飾についての研究はほとんど行われていない。申請者はこれまでに、DA存在下においてその酸化産物であるキノン体が、synの特定のメチオニン残基を酸化(スルホキシド化)し、DA神経の脆弱性と極めて密接に関係していることを明らかにした。さらに最近の初期検討で、この病的修飾がsynだけでなく種々のタンパク質の易凝集性とも関与していることが明らかとなりつつある。

synの研究において、翻訳後修飾についてはこれまで、リン酸化、ニトロ化、糖鎖修飾などが注目されてきた。しかし、これらはDA神経特異的な現象とは限らない。本研究ではPD病態の最も重要な「DA神経の選択的細胞死、DA神経におけるLewy小体形成」という点に改めて注目し、DA神経の持つ潜在的特殊性とsynとの接点(特にDA酸化産物キノン体によるsynのMet(O)修飾)を明らかにするものである。

## 2. 研究の目的

パーキンソン病(PD)の病態の中で、選択的細胞死やLewy小体形成がなぜドーパミン(DA)神経特異的に生じるのか、いまだに十分理解されてはいない。申請者は最近、DA存在下におけるシヌクレイン(syn)の細胞毒性・易凝集性誘発の機序として、syn内の特定のメチオニン残基が酸化修飾され、メチオニンスルホキシド(Met(O))となることが重要であることを示した。本研究ではMet(O)修飾syn抗体を作製し、それをを用いてDA神経特異的な病態を生化学的・病理学的に解析する。またMet(O)が可逆的である点に注目し、既存薬剤や競合ペプチド、ポリフェノール等によるMet(O)修飾抑制に関する研究を行い、DA神経に特異的な細胞死を回避するための知見を蓄積し、PD治療・予防の新規ターゲットを確立する。

## 3. 研究の方法

本研究の重要なテーマは「DA神経特異的なsyn修飾」の意義を明らかにすることであり、前半にDA存在下におけるsynの毒性機序の詳細検討、その知見に基づく細胞保護の検討を中心に行う。特に、(1)細胞レベルでのsynのMet(O)修飾詳細検討(細胞脆弱性・易凝集性との関連を含めて)、(2)競合ペプチドやキノン消去物質による治療法開発の細胞レベルでの基礎研究、(3)抗Met(O)syn抗体の作製、の3点に重点を置く。後半は(4)モデル動物を用いた個体レベルでの検討を行う。その際に、遺伝子改変とレセルピン投与による細胞内DA過剰状態の誘発を組み合わせることで、本課題の主要テーマ「DA神経特異的なsyn修飾」の意義を検討する。さらに(5)Met(O)syn抗体による生化学的・病理学的検討(剖検脳など)を行う。

## 4. 研究成果

(1)細胞レベルでのsynのMet(O)修飾詳細検討および細胞脆弱性・易凝集性との関連  
まずin vitroで、(a) synとDA(あるいはその酸化体DAキノン)がinteractionすること、(b) synとDAのinteractionにはsynのC末端付近125YEMPS129の配列が重要であることが明らかとなった。

次にカテコールアミン代謝を有するPC12細胞を用い、かつ薬剤(テトラサイクリン、ドキシサイクリン)によりsyn発現を調節できるPC12-syn-TetOFF細胞を確率した。野生型syn発現株ではDA代謝存在下にお

いて細胞脆弱性を示したが, Met 残基の変異体 M127A および M116A/M127A は脆弱性を示さなかった (図 1)。

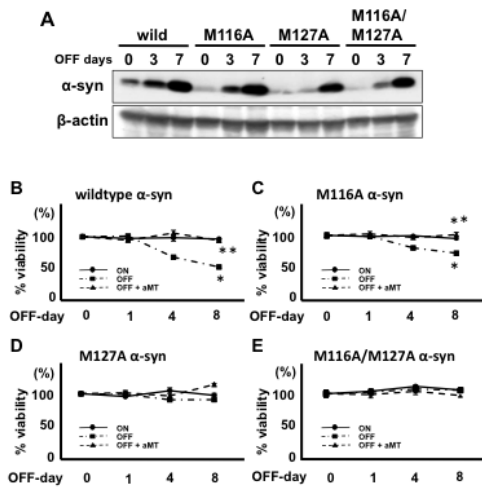


図 1 の説明

A: α-syn 野生型, M116A, M127A, M116A/M127A 各変異型発現株の確立. B-E: 野生型および M116A 変異型発現細胞は細胞生存率が低下するが, M127A, M116A/M127A 変異型発現株では生存率低下がみられない。

また, DA 代謝存在下では α-syn のメチオニンが酸化されている事を見出した. M127A 変異体では Met(O) が激減することから, 127 番 Met が酸化修飾の主要ターゲットであり, Y125D, S129A 変異体でも Met(O) が減少することから, 125 番チロシン, 129 番セリン残基は 127 番 Met の酸化を促進すると考えられた (図 2)。

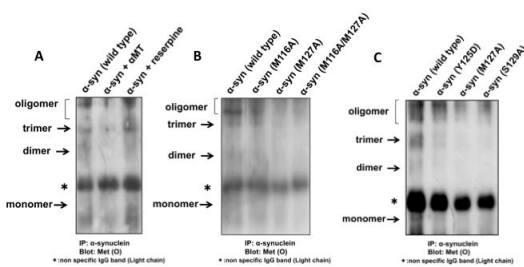


図 2 の説明

α-syn 抗体を用いた免疫沈降, 抗 Met(O) 抗体を用いた酸化 Met 含有タンパク質の検出. A: DA 存在下 α-syn は Met(O) を含有しているが, DA 代謝抑制下では検出されない. B および C: M127A, Y125D, S129A 各変異体では DA 存在下であっても Met(O) 含有量が低下する。

(2) 競合ペプチドやキノン消去物質による治療法開発の細胞レベルでの基礎研究  
DA 代謝存在下における α-syn 毒性を, クロロゲン酸, メラトニン, YEMPS ペプチドが

軽減することを見出した。

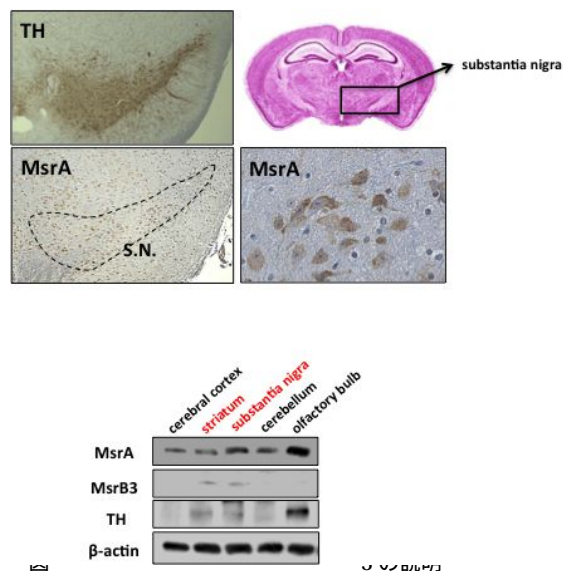
この細胞保護効果はクロロゲン酸については DA キノンの消去, メラトニンは DA キノン消去および受容体を介したシグナル伝達, YEMPS は DA キノンをデコイ的に消費させるためにもたらされると考えられた。

### (3) 抗 Met(O) α-syn 抗体の作製

ファージディスプレイ法を用い, YEM(O)PS 配列を積極的に認識する抗 Met(O) α-syn 抗体の作製を試みた. 2 つの候補抗体クローンが得られたが, その後の詳細な検討の結果, 今後の研究に使用できる条件を満たしていないことが判明し, 失敗に終わった。

### (4) 個体モデルを用いた検討

上記抗体が得られなかったため, 検討の方針を変更し, Met(O) の還元酵素 MsrA, MsrB の脳内分布と, DA/α-syn の関係を検討した. ウェスタンブロッティング, 免疫染色による検討により, マウス黒質, 線条体, 嗅球など DA 代謝が存在する領域における神経細胞に MsrA, MsrB が高発現していることを見出し, 潜在的に DA 代謝存在下ではタンパク質中の Met 残基が酸化されており, 防御的に MsrA や MsrB が高発現していることが予想された。



TH 活性が高い (カテコールアミン代謝が活発な) 脳部位において MsrA, MsrB が高発現している

また, 培養細胞 DA 存在下において, MsrA と α-syn が結合しており, 一方で DA 代謝抑制時にはその結合が極端に減少することを明らかにした. 今後, 患者脳における細胞内 α-syn/MsrA の共局在およびレビー小体の染色性の検討を行う予定である。

## 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 5 件)

1. Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, Okuno M, Kurosawa-Yamada M, Washizu C, Taniguchi H, Nakaso K, Yanagawa T, Warabi E, Shimogori T, Sakurai T, Hattori N, Nukina N. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. *Hum Mol Genet* 2015; 24:1092-1105. (査読あり)
2. Nakaso K, Tajima N, Horikoshi Y, Nakasone M, Hanaki T, Kamizaki K, Matura T. The estrogen receptor  $\alpha$ -PI3K/Akt pathway mediates the cytoprotective effects of tocotrienol in a cellular Parkinson's disease model. *Biochim Biophys Acta (Mol Basis Dis)* 2014; 1842: 1303-1312. (査読あり)
3. Harada H, Warabi E, Matsuki T, Yanagawa T, Okada K, Uwayama J, Ikeda A, Nakaso K, Kirii K, Noguchi N, Bukawa H, Siow R, Mann G, Shoda J, Ishii T, and Sakurai T. Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *J Neurosci* 2013; 33: 14767-14777. (査読あり)
4. Nakaso K, Tajima N, Ito S, Teraoka M, Yamashita A, Horikoshi Y, Kikuchi D, Mochida S, Nakashima K, Matura T. Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in  $\alpha$ -synuclein causes cytotoxicity and oligomerization of  $\alpha$ -synuclein. *PLoS One* 2013; 8: e55068. (査読あり)
5. Jiang H, Ren Y, Yuen EY, Zhong P1, Ghaedi M, Hu Z, Azabdaftari G, Nakaso K, Yan Y, Feng J. Parkin Controls Dopamine Utilization in Human Midbrain Dopaminergic Neurons, *Nat Commun* 2012; 3: 668 (doi: 10.1038/ncomms1669) (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

1. Kazuhiro Nakaso, Naoko Tajima, Yosuke

Horikoshi, Satoru Ito, Tatsuya Matura, Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in  $\alpha$ -synuclein causes cytotoxicity and oligomerization of  $\alpha$ -synuclein. SfN 44<sup>th</sup> Annual Meeting Neuroscience 2014.

Nov 15-19. 2014. (Washington DC, USA)

2. 中曽一裕, 田島奈緒子, 堀越洋輔, 伊藤悟, 松浦達也

ドーパミン依存的なアルファシヌクレイン127番メチオニン残基の酸化修飾は神経毒性の原因となる

第37回日本神経科学大会 2014.9.11-13 (横浜)

3. 中曽一裕, 田島奈緒子, 堀越洋輔, 松浦達也

パーキンソン病分子病態におけるシヌクレイン酸化修飾と防御因子としてのメチオニンスルホキシド還元酵素

第67回酸化ストレス学会学術集会  
2014.9.4-5 (京都)

4. Kazuhiro Nakaso, Naoko Tajima, Yosuke Horikoshi, Tatsuya Matura

Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in  $\alpha$ -synuclein causes cytotoxicity and oligomerization of  $\alpha$ -synuclein  
SFRR12014 2014.3.23-26 (Kyoto)

5. 中曽一裕, 田島奈緒子, 紙崎孝基, 堀越洋輔, 小池泰介, 松浦達也

パーキンソン病モデルマウスに対するトコトリエノールの効果

第25回ビタミンE研究会 2014.1.24-25 (米子)

6. 中曽一裕, 田島奈緒子, 伊藤悟, 堀越洋輔, 松浦達也

$\alpha$ -synucleinのメチオニン127におけるドーパミン依存的な酸化修飾は細胞毒死と重合化を引き起こす

Neuro2013 2013.6.22 京都

7. 中曽一裕, 田島奈緒子, 堀越洋輔, 松浦達也

パーキンソン病関連分子シヌクレインのメチオニン酸化修飾と細胞毒性

第66回日本酸化ストレス学会学術集会  
2013.6.13-14 (名古屋)

8. 中曽一裕, 田島奈緒子, 堀越洋輔, 仲宗根正人, 小池泰介, 松浦達也  
トコトリエノールの抗パーキンソン病効果  
-モデル細胞, モデル動物を用いた検討-  
日本ビタミン学会第65回大会 2013 .5.17-18  
(東京)

9. 中曽一裕, 田島奈緒子, 菊池大介, 堀越洋輔, 山下敦, 小池泰介, 松浦達也  
トコトリエノールの抗パーキンソン病効果  
～細胞モデルから動物モデルへ～  
第9回トコトリエノール研究会 2012.11.12  
(東京)

10. 中曽一裕, 松浦達也  
抗酸化能とは独立したトコトリエノールの細胞保護効果 ～パーキンソン病モデル細胞を用いた検討～ 第15回Vitamin E Update Forum 2012. 8. 26 (東京)

11. 中曽一裕, 田島奈緒子, 寺岡麻梨, 関子哲平, 山下敦, 松浦達也. エストロゲン受容体ノカベオラ形成からのシグナル伝達を介したトコトリエノールの細胞保護効果 ～パーキンソン病モデル細胞における検討～ 第64回日本ビタミン学会 2012.6.22-23 (岐阜)

12. 中曽一裕, 田島奈緒子, 寺岡麻梨, 山下敦, 松浦達也. カテコールアミン酸化産物による シヌクレインのメチオニン酸化修飾とパーキンソン病の分子病態. 第65回日本酸化ストレス学会学術集会 2012. 6. 7-8 (徳島)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中曽 一裕 (NAKASO, Kazuhiro)  
鳥取大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30379648

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

松浦 達也 (MATSURA, Tatusya)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号: 00199746