

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461277

研究課題名(和文)パーキンソン病の関連タンパク質に対する酸化修飾のパーキンソン病発症における役割

研究課題名(英文) Research about S-nitrosylation of proteins related to pathogenesis of Parkinson's disease

研究代表者

小澤 健太郎 (Ozawa, Kentaro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80507393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：私は家族性パーキンソン病の原因タンパク質、parkinが一酸化窒素(NO)により主食されることで、その活性が制御されていることを見いだした。今回は内在性のparkinにおけるNO修飾が神経細胞の変性への役割を検討するため、parkinの被修飾アミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異細胞を作成したところ、NOによる内在性parkinの修飾は強発現したparkinのとは異なりミトコンドリア分解には関与せず、ミトコンドリア刺激に対する細胞死に関与していることを明らかにした。このことはparkinのNOによる修飾が孤発性パーキンソン病の発症機構に関与している可能性を示唆していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I have revealed parkin, a protein related to pathogenesis of Parkinson's disease, is S-nitrosylated and its activity is regulated by S-nitrosylation. To investigate a role of S-nitrosylation of endogenous parkin in degeneration in Parkinson's disease, we generated cell lines which cysteine targeted by S-nitrosylation was converted to another amino acid. Using them, I revealed S-nitrosylation of endogenous parkin is not involved in degradation of mitochondria through autophagy but in cell death by mitochondrial stress. These findings indicated S-nitrosylation of parkin might play an important role in cell death by mitochondrial dysfunction and, at least in part, pathogenesis of Parkinson's disease.

研究分野：神経薬理

キーワード：nitric oxide s-nitrosylation Parkinson's disease

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は神経変性疾患の中ではアルツハイマー病に次ぐ疾患である。家族性パーキンソン病の原因遺伝子は多く報告されているが、孤発性パーキンソン病の発症機構は十分解明されていない。一酸化窒素 (NO) はパーキンソン病の発症に関係しているという報告は多いが、その作用機序は不明なままであった。NO は炎症などの環境因子により産生されるガス状物質で、今まで多くの疾患に関係すると考えられてきたが、その分子的作用機序が明らかでないため、これまで治療に結びついてこなかった。申請者は世界で初めて NO によって修飾される Parkin の基質探し Parkin のシステイン残基を同定した。そしてこの parkin の NO 修飾は parkin の E3 ligase 活性を制御していることを明らかにした。もしこの制御が損なわれると parkin の活性化が十分におこらず、パーキンソン病発症に繋がる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

家族性パーキンソン病の原因タンパク質 parkin の NO による修飾が、孤発性パーキンソン病の発症機構に関係するかどうかを検討する。申請者は parkin の強制発現系を用いて、parkin の NO 修飾がおこらないと、parkin による不良ミトコンドリアの分解がおこらないことを示した。ただこの不良ミトコンドリアの分解は強制発現した parkin が存在する細胞でのみ確認されており、内在性 parkin のミトコンドリアの品質管理における役割は十分解明されていない。我々は内在性 parkin における NO 修飾がミトコンドリアの品質管理に関わっているかどうかを検討し、最終的には孤発性パーキンソン病の発症機構に迫りたいと考えた。

3. 研究の方法

内在性の parkin を、ゲノム編集技術を用いて、被修職システインを別のアミノ酸に置換したノックイン細胞を作成し、野生型と比較することで、内在性の NO 修飾が細胞死や神経変性に関与しているかや、関与しているとすればそのメカニズムを検討する。

3.1 内在性の NO 修飾の影響を評価するため、ゲノム改変技術を用いて、NO が修飾するシステインをセリンに置換した細胞株を作成した。この細胞株の作成は、PCR 法、サザンブロット法及びサンガー方式のシーケンスで確認した。

3.2 障害ミトコンドリアの分解は、ミトコンドリアに局在するタンパク質をウェスタンブロット法にて定量する方法と、同じくミトコンドリアに局在するタンパク質を免疫化学染色し、その形状を観察することで行な

った。

3.3 細胞死評価

細胞死の評価は、培養細胞の上清中に漏出する LDH 活性を測定する方法と、細胞の数をカウントする方法で評価した。

3.4 活性酸素種の評価

活性酸素種を評価するため、TMRM、JC-1 および MitoSox にて染色した後、Flow cytometry にて蛍光量を測定した。

3.5 ミトコンドリア呼吸鎖、解糖系の評価

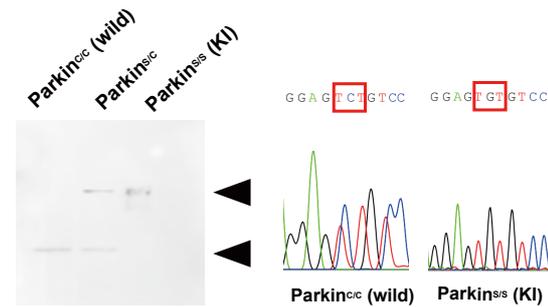
プライムテック社の培養細胞の代謝測定装置を用いて、培養細胞のミトコンドリア呼吸鎖の活性および解糖系の代謝を定量した

3.6 プロテオミクス解析

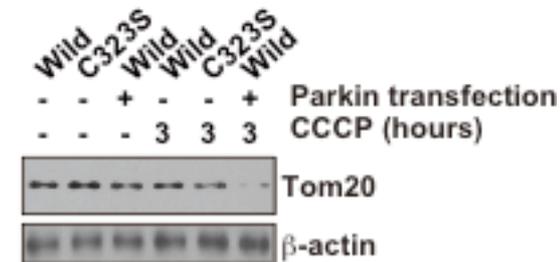
二次元電気泳動法にて2種類の細胞の発現タンパク質のプロファイリングを行なった

4. 研究成果

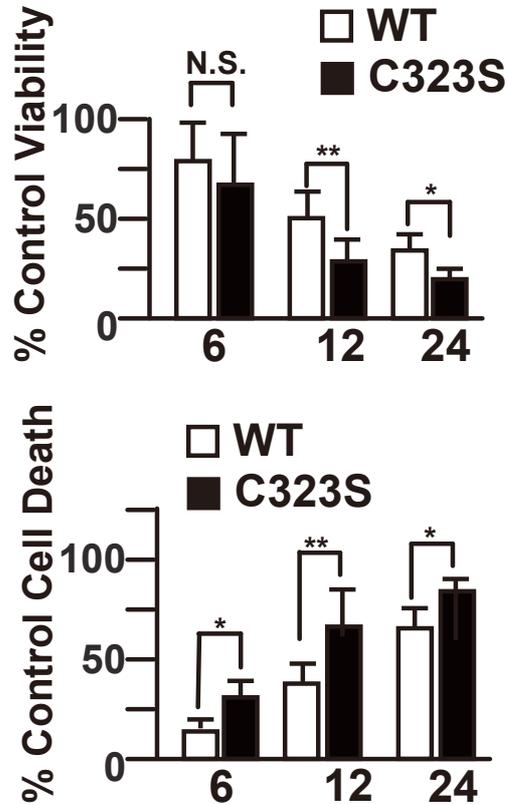
ゲノム編集技術を用いて、parkin の NO により修飾されるアミノ酸をセリンに置換した変異細胞を作成した。この細胞が正しい場所のみ変異が挿入されているかを、PCR 法、サザンブロット法で確認した。



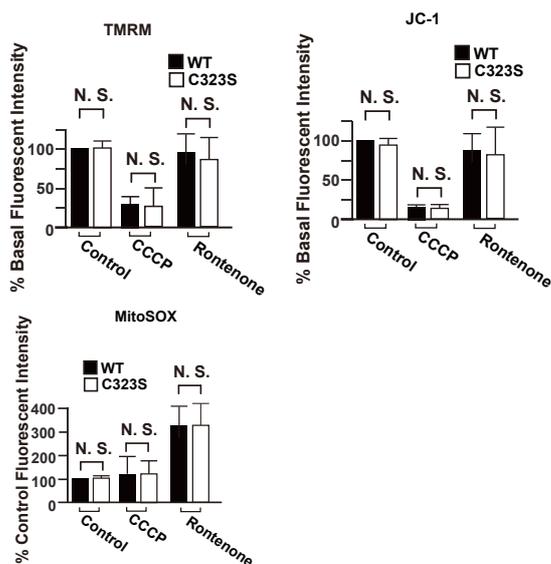
その後、変異細胞及び野生型でオートファジー機構によるミトコンドリアの分解を評価したが、既報の通り野生型、変異細胞共にミトコンドリアの現象は認められなかった。



次にミトコンドリアの機能不全をおこすような薬剤を複数使い、その際に生じる細胞死を評価した。野生型細胞、変異細胞共に細胞死を生じたが、変異細胞は野生型細胞より細胞死が増強されていた。

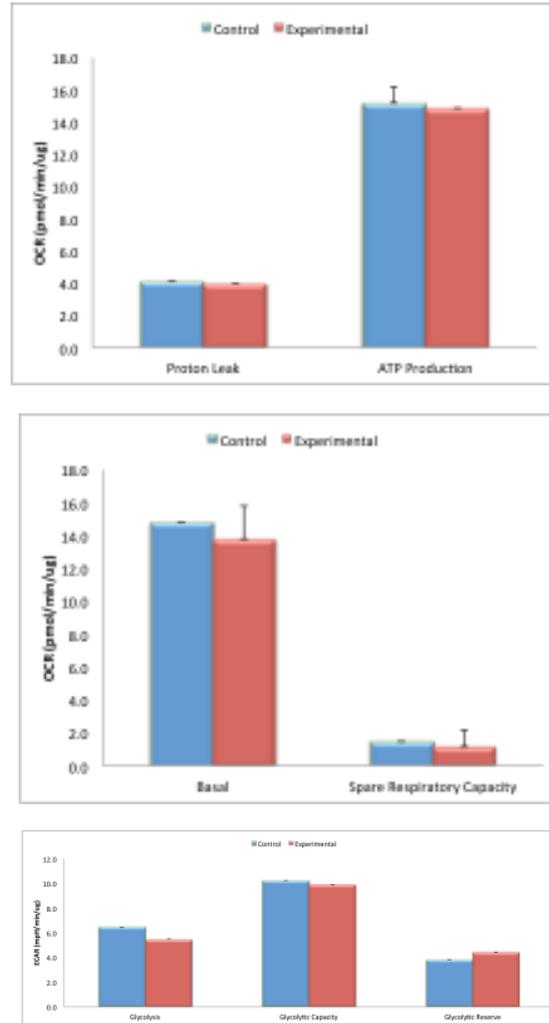


野生型細胞と変異細胞間で、活性酸素種の産生に差があるかどうかを、活性酸素種により蛍光強度に差を生じる試薬を用いて評価したが、野生型と変異細胞間で特に差を認めなかった。



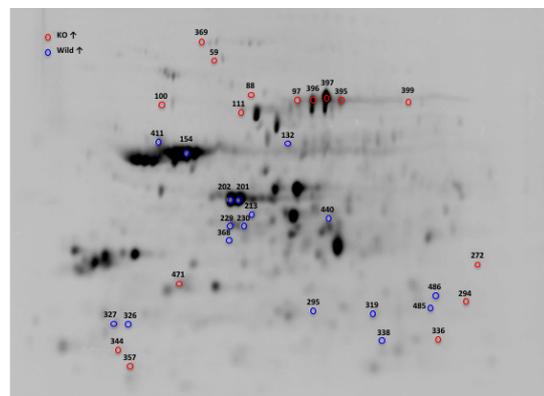
次に細胞代謝測定装置を用いて、野生型細胞と変異細胞間でミトコンドリア代謝、解糖系を比較した。その結果、変異細胞と野生型細胞間では、ミトコンドリア呼吸鎖の代謝、解

糖系の代謝では有意な差を認めなかった。



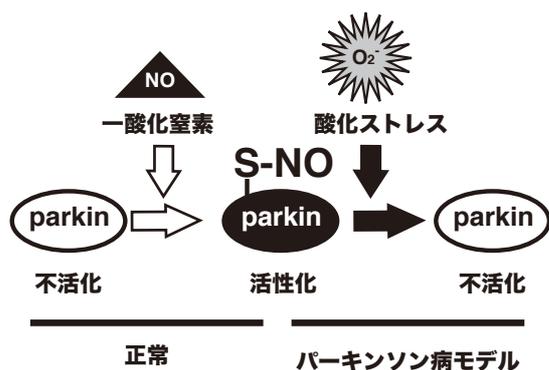
細胞死の分子的作用機序を解明するため、プロテオミクス解析を行ったところ、ミトコンドリア呼吸鎖のタンパク質が野生型、変異細胞間で発現量に差があることがわかった。

Spotの位置と増減



以上の結果から、内在性の parkin の N0 修飾が、ミトコンドリアの分解には関与していないが、ミトコンドリアの機能不全から生じる細胞死に関与していることを示した。これらの結果は N0 が parkin を通して、ミトコンドリアの機能維持に働いていることを

示すものであり、明らかな遺伝子変異で説明できない孤発性パーキンソン病の発症機序に迫る結果と考えている。



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)

1: Zhao J, Nishimura Y, Kimura A, Ozawa K, Kondo T, Tanaka T, Yoshizumi M. Chemokines protect vascular smooth muscle cells from cell death induced by cyclic mechanical stretch. *Sci Rep*. 2017 Nov 23;7(1):16128.

2: Yamaguchi J, Suzuki C, Nanao T, Kakuta S, Ozawa K, Tanida I, Saitoh T, Sunabori T, Komatsu M, Tanaka K, Aoki S, Sakimura K, Uchiyama Y. Atg9a deficiency causes axon-specific lesions including neuronal circuit dysgenesis. *Autophagy*. 2017 May 17:1-14.

3: Tsuji Y, Ozawa K, Komatsubara AT, Zhao J, Nishi M, Yoshizumi M. Detection of Nitric Oxide Induced by Angiotensin II Receptor Type 1 Using Soluble Guanylate Cyclase beta1 Subunit Fused to a Yellow Fluorescent Protein, Venus. *J Fluoresc*. 2017 Jan;27(1):399-405.

4: Nagayama K, Kyotani Y, Zhao J, Ito S, Ozawa K, Bolstad FA, Yoshizumi M. Exendin-4 Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Angiotensin II via the Inhibition of ERK1/2 and JNK Signaling Pathways. *PLoS One*. 2015 Sep 17;10(9):e0137960. doi: 10.1371/journal.pone.0137960. eCollection 2015.

5: Ito S, Ozawa K, Zhao J, Kyotani Y, Nagayama K, Yoshizumi M. Olmesartan inhibits cultured rat aortic smooth muscle cell death induced by cyclic

mechanical stretch through the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and p38 signaling pathways. *J Pharmacol Sci*. 2015 Jan;127(1):69-74.

6: Zhao J, Ozawa K, Kyotani Y, Nagayama K, Ito S, Komatsubara AT, Tsuji Y, Yoshizumi M. Azelnidipine inhibits cultured rat aortic smooth muscle cell death induced by cyclic mechanical stretch. *PLoS One*. 2014 Jul 17;9(7):e102813. doi: 10.1371/journal.pone.0102813. eCollection 2014.

[学会発表] (計 2 件)

1.
発表者名: 小澤健太郎、辻優一、趙晶、伊藤都裕、長山功佑、京谷陽司、吉栖正典
発表標題: 蛍光タンパク質を使った一酸化窒素アッセイ系の確立 / A high signal-to-noise NO probe composed of a Yellow Fluorescent Protein, Venus.
学会等名: 第 88 回日本薬理学会年会
発表年月日: 2015 年 03 月 18 日~2015 年 03 月 20 日
発表場所: 名古屋国際会議場

2.
発表者名: 小澤健太郎、趙晶、京谷陽司、伊藤都裕、長山功佑、辻優一、吉栖正典
発表標題: 一酸化窒素による脱分極ミトコンドリア分解の制御機構
学会等名: 第 37 回日本神経科学大会
発表年月日: 2014 年 09 月 11 日~2014 年 09 月 13 日
発表場所: パンフィコ横浜

[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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 健太郎 (OZAWA, kentaro)
大坂大学・医学部附属病院・医員

研究者番号： 80507393

(2) 研究分担者

吉栖 正典 (YOSHIKUMI, masanori)
奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号： 60294667

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()