

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山後 淳也
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1078 号
学位授与の日付 令和4年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 USP10 inhibits the dopamine-induced reactive oxygen species-dependent apoptosis of neuronal cells by stimulating the antioxidant Nrf2 activity.
(USP10 はドーパミンが誘導する活性酸素依存性の神経細胞死を Nrf2 活性化によって抑制する)
論文審査委員 主査 教授 五十嵐 道弘
副査 教授 小野寺 理
副査 准教授 福田 智行

博士論文の要旨

背景と目的

活性酸素の過剰な産生は、パーキンソン病 (PD) を始めとする、様々な疾患の発症に関与している。PD は、脳の黒質におけるドーパミン神経細胞の進行性の脱落を特徴とする神経変性疾患である。ドーパミンは神経細胞間の情報伝達を担うが、神経細胞において活性酸素の産生を上昇させ、細胞死を引き起こすことから、PD におけるドーパミン神経細胞に特異的な細胞死に関与することが示唆されている。申請者の所属研究室では、USP10 蛋白質が、亜ヒ酸で処理した HeLa 細胞において、活性酸素依存性のアポトーシスを抑制することを報告した。今回、申請者らは、ドーパミンが誘導する神経細胞の細胞死に対する、USP10 の役割を解析した。

方法

SH-SY5Y 細胞は、ドーパミン神経細胞に似た性質を持つ、神経芽細胞腫由来の細胞株である。目的とする蛋白質の機能を解析するために、目的とする蛋白質に対応する siRNA を SH-SY5Y 細胞に遺伝子導入し、siRNA の標的蛋白質の発現量を低下させた (ノックダウン, KD)。siRNA を導入した SH-SY5Y 細胞をドーパミンで処理し、細胞毒性および細胞死関連蛋白質の発現量をウェスタン法で調べた。ドーパミンによる細胞死は、細胞内の脱水素酵素活性から生存細胞数を評価する CCK-8 法と、アポトーシスの指標である切断型 Caspase3 の発現量を定量化する免疫染色法で評価した。Nrf2 および Nrf2 の標的遺伝子 (NQO1, GSTM1, p62) の RNA 量は real-time PCR 法によって定量した。野生型の p62 およびその変異体のプラスミドを SH-SY5Y 細胞に遺伝子導入し、その機能を解析した。

結果

USP10 を発現している野生型の (USP10-WT) SH-SY5Y 細胞をドーパミンで、4-12 時間処理すると、活性酸素の産生が昂進し、細胞死が誘導され、この細胞死は USP10 の発現を低下 (USP10-KD) させることによって、さらに増強された。この細胞死は、細胞を抗酸化剤である N-Acetyl cysteine で処理することにより抑制さ

れた。以上の結果から、USP10 はドーパミンによる SH-SY5Y の活性酸素依存性細胞死を抑制することが示された。

Nrf2 は抗酸化遺伝子群の転写活性化因子である。Nrf2 は抗酸化蛋白質の転写を促進することで、活性酸素依存性細胞死を抑制する。Nrf2 の機能は Keap1 により抑制され、リン酸化された p62 (S349) により促進される。USP10-WT 細胞をドーパミンで処理すると、Nrf2 に加えて、Nrf2 の標的遺伝子である p62 および HO-1 蛋白質の発現量が増加したが、これらの発現増加は、USP10-KD によって低下した。Nrf2-KD と p62-KD は、ともにドーパミンによる SH-SY5Y の細胞死を促進した。その過程で、Nrf2-KD は p62 の発現量を減少させ、p62-KD は Nrf2 および Nrf2 の標的遺伝子である HO-1 の発現量を減少させた。Keap1 は Nrf2 活性を抑制することが報告されている。Keap1-KD は、USP10-KD による Nrf2 および HO-1 量の低下と細胞死の促進をともに低下させた。これらの結果から、USP10 による神経細胞の細胞死の抑制には、Nrf2/Keap1/p62 経路が関与していることが示唆された。

次に USP10-KD による Nrf2 蛋白質の減少のメカニズムを調べた。Nrf2 はプロテアソームによって分解される。Nrf2 蛋白質はドーパミン処理によって増加し、この増加はプロテアソーム阻害剤処理によってさらに増加した。しかしながら、USP10-KD によって減少した Nrf2 蛋白質の量は、プロテアソーム阻害剤処理を加えても増加しなかった。この結果から、USP10 は、Nrf2 の蛋白質量を、プロテアソームによる蛋白分解とは異なるメカニズムで制御していることが示唆された。次に、ドーパミン刺激による Nrf2 mRNA 量の変動を解析した。ドーパミンは Nrf2 の mRNA 量を増大させた、しかし、USP10-KD は Nrf2 mRNA 量を低下させなかった。これらのことから、USP10-KD による Nrf2 蛋白質量の低下には、Nrf2 の蛋白質合成の低下が関与していることが示唆された。さらに、申請者らは新生蛋白質の生成量をピューロマイシン取り込み法により評価した。USP10-KD はドーパミン処理後の新生蛋白質の生成量を減少させた。これらの結果は、ドーパミン処理細胞において、USP10 が Nrf2 を含む蛋白質の翻訳を促進していることを示唆した。

p62 は、349 番目のセリン残基 (p62/S349) がリン酸化されると、Keap1 に強く結合し、Nrf2 を Keap1 から遊離させ、Nrf2 を活性化する。次に、USP10 が、p62/S349 のリン酸化 (pp62/S349) 量を制御するか調べた。USP10-KD は、ドーパミン処理をした場合としない場合の両方で、pp62/S349 の量を低下させた。USP10-WT 細胞において p62 は Keap1 及び USP10 と結合した。しかし、USP10-KD は p62 と Keap1 の結合を低下させた。USP10-KD 細胞にリン酸化 p62 模倣蛋白質 (p62/S349E) を発現させると、Nrf2 の量を増やすとともに、ドーパミン誘導性の細胞死を抑制した。これらのことから USP10 はリン酸化 p62 の量を増やすことで Nrf2 を活性化し、ドーパミン誘導性の細胞毒性を抑制していることが示唆された。

考察

申請者らは、神経細胞株 SH-SY5Y において、USP10 がドーパミンによる活性酸素の産生および活性酸素依存性のアポトーシスの両方を抑制することを発見した。PD では、過剰な活性酸素の発生がドーパミン神経細胞の細胞死を引き起こすことが示唆されている。また、ドーパミン自身も過剰な活性酸素の発生源の一つであると考えられている。したがって、USP10 には、PD における神経細胞死を抑制する機能があると考えられる。

ドーパミンで処理した SH-SY5Y 細胞において、USP10 が Nrf2 を活性化し、その活性化には、p62/S349 のリン酸化の昂進が関与することが示唆された。Nrf2 は細胞質から核内に移行することで活性化される。PD 患者の脳病変部では Nrf2 が核内に存在することから、PD では Nrf2 の抗酸化活性を超える活性酸素が細胞毒性を引き起こしていると考えられる。PD 病変部で USP10 を活性化させることができれば、リン酸化された p62 の量を増やすことができ、Nrf2 の核移行をさらに促進し、細胞死を抑えることができる可能性がある。

ドーパミンで処理した SH-SY5Y 細胞において、USP10 が Nrf2 蛋白質の翻訳を促進することが示された。PD を含む神経疾患では、翻訳の障害が疾病に関与していることが示唆されている。PD においても、Nrf2 の翻訳

が低下し、酸化ストレスに脆弱になっている可能性がある。従って、USP10 の活性化剤は、PD を含む神経変性疾患において、Nrf2 蛋白質の翻訳を促進し、細胞死を抑制する可能性がある。

Nrf2/Keap1/p62 による抗酸化活性の制御は、酸化ストレスからの神経細胞の保護に重要な役割を果たしている。本結果は、USP10 が神経細胞を酸化ストレスから守るために重要な役割を果たしていることを示唆した。

審査結果の要旨

神経変性疾患パーキンソン病では、中脳の黒質ドーパミン作動性神経細胞の細胞死がその原因となる。申請者は、脱ユビキチン化酵素活性を持つ USP10 蛋白質がこの過程を制御する可能性を検討した。ドーパミン神経細胞に似た形質を持つヒト由来の細胞株 SH-SY5Y で USP10 の発現を低下させると、ドーパミン処理後に、ドーパミンに依存する活性酸素の産生が増加し、それに基づく細胞死が誘導された。この系を用いて、申請者は USP10 が、多くの抗酸化蛋白質の転写活性化因子である Nrf2 を活性化することで、神経細胞死を抑制することを示した。その際、USP10 は2つの経路で Nrf2 を活性化した。USP10 はリン酸化された p62 蛋白質の量を増やし、リン酸化 p62 は Nrf2 を活性化した。また USP10 は、ドーパミンで処理した細胞の蛋白質合成が停止することを防いだほか、G3BP1 の挙動から、ストレス顆粒の産生抑制にも関与することを見出した。これらの結果は、USP10 が関与する、ドーパミンの神経毒性による細胞死の、抑制シグナル伝達経路の一部を見出したもので、この点に本論文の学位論文としての価値を認めた。