

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21283

研究課題名(和文)細胞間伝播性alpha-Synuclein構造体の同定とその産生機構の解析

研究課題名(英文)Identification and characterization of cell-to-cell transmissible alpha-synuclein seed

研究代表者

田口 勝敏(Katsutoshi, Taguchi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60462701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病に特徴的なレビー小体の形成領域は病気の進行に伴って脳内を拡大する。現在、病変拡大の分子的背景としてプリオン様伝播仮説が注目されているが、細胞間を伝播する分子の性質については不明な点が多い。本研究では凝集形成能を有する線維様 α -シヌクレイン(α -Syn)画分を出発材料として生化学分画を行い、様々な分子形態を有する高分子化 α -Synの分離を行った。更に、病的神経が産生した高分子化 α -Synを分離した。病的神経が産生した高分子化 α -Synはある均一な分子量を持ち、レビー小体様凝集体の形成を誘導することができた。本研究結果は病的神経が産生する細胞間伝播性Seedの同定に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)： α -Synuclein (α -Syn) is one of major components of Lewy bodies and Lewy Neurites, the well-known pathological hallmarks of synucleinopathies including Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB). According to recent studies, cell-to-cell transmission of pathological α -Syn in the brain is critical event for neurodegeneration. However, biochemical properties of these pathological molecules remain to be elucidated. Here, we isolated some characteristic α -Syn-oligomers derived from preformed fibrils of α -Syn. Next, we further recovered extracellular α -Syn-oligomers having an uniform molecular mass in Native-PAGE from pathogenic conditioned culture medium. These oligomers successfully induced LB-pathology in cultured hippocampal neurons. Now, we are characterizing the pathogenic species of α -Syn. These molecules will be a better target to inhibit the disease propagation via cell-to-cell transmission in PD and DLB.

研究分野：神経解剖学

キーワード： α -Synuclein prion-like propagation seed Parkinson's disease

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病に特徴的な細胞内凝集体“レビー小体”の主要構成タンパク質の一つに α -Synuclein が挙げられる。 α -Synuclein 遺伝子の変異、あるいは重複が家族性パーキンソン病の発症をもたらすことから、その発症に関わる重要な責任分子の一つであると考えられている (Stefanis, Cold Spring Harb Perspect Med, 2012; Nishioka et al., Ann Neurol, 2006)。

レビー小体の形成領域はパーキンソン病の最初期には嗅球において観察されると共に、病気の進行に伴って下部脳幹から大脳皮質に向かって上向性に広がって行く。近年、神経細胞に障害を引き起こす過程において、高分子化した α -Synuclein が細胞間を伝播し、近傍の細胞内へ取り込まれることが重要であるとの報告が相次いだ (Emmanouilidou et al., J. Neurosci, 2010; Desplats et al., PNAS, 2009)。この細胞間伝播は“プリオン様伝播仮説”と呼ばれ、脳内で病変が伝播・拡大する分子メカニズムとして注目されている。高分子化 α -Synuclein が細胞内へ取り込まれるとこれが重合核となり、細胞内に存在する内在性 α -Synuclein (単量体) が更に重合を開始し、最終的にはレビー小体の形成に繋がると考えられている。このことからこの重合核は“Seed”と呼ばれている。精製した単量体 α -Synuclein を人工的に試験管内で重合させ、高分子化させた“線維様 α -Synuclein” (Fibril) を含む培地で神経細胞を培養するとレビー小体様の凝集体が形成されること (Volpicelli-Daley et al., Neuron, 2011) 更に、マウス黒質、あるいは線条体に Fibril を投与することにより、凝集体の形成が脳内各所、及び大脳皮質にまで伝播するという結果がこれまでに報告されている (Suzukake et al., Brain, 2013; Luk et al., Science, 2012)。しかしながら、Fibril は巨大な分子構造を有しているため、そのままの形で細胞内に取り込まれ、更に細胞間を次々に伝播することは難しいと考えられる。 α -Synuclein は重合する過程において様々な形態を取り得ることは既に知られているが、実際に細胞間伝播を担う Seed の分子構造がどのようなものか、そしてその分子はどのようにして産生されるのか等、現

在も不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、Fibril から派生する様々な分子形態を有する高分子化 α -Synuclein に着目し、その生化学的特性を明らかにすると共に、どのような構造の分子が細胞間伝播を担う Seed として機能しているのか、明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Fibril 画分を出発材料として生化学分画を行い、様々な形態の分子種を対象に、Seed 能を有する高分子化 α -Synuclein の分子形態とその性状について解析する。

生きた病的神経が産生する細胞間伝播性高分子化 α -Synuclein を分離・回収し、その性状について解析を行う。

得られた結果を比較し、細胞間伝播性 Seed の分子構造とその性状について明らかにする。

4. 研究成果

() Fibril の調製

リコンビナント α -Synuclein (精製単量体) を出発材料に Fibril を調製し、原子間力顕微鏡によって Fibril 構造を確認した (図 1)。

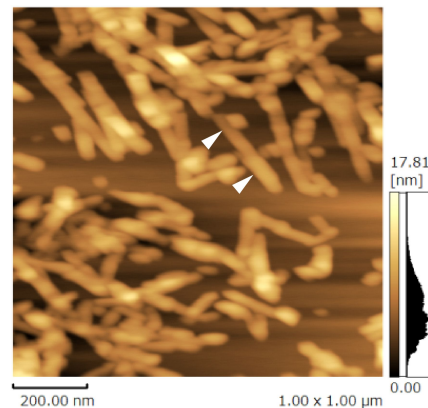


図 1: Fibril の分子形態 (原子間力顕微鏡観察)

調製した Fibril (図 1) を含む培地を用いて初代培養神経細胞を一定期間培養したところ、細胞内にレビー小体様凝集体の形成を確認することができた。

() Fibril 画分に由来する高分子化 α -Synuclein の分離

調製した Fibril (Fibril 画分) を出発材料と

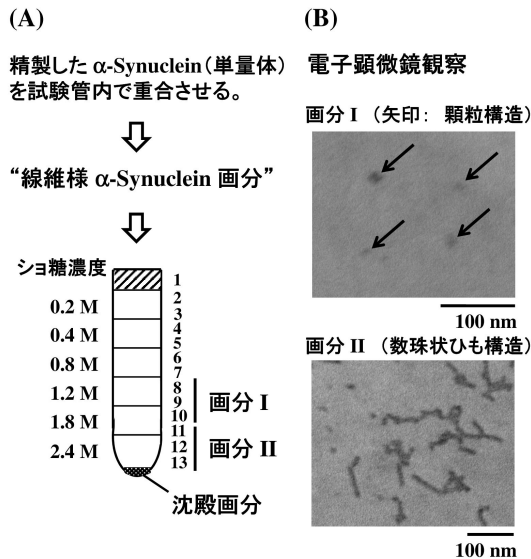


図 2: Fibril の生化学分画

(A) ショ糖密度勾配遠心スキーム

(B) 中～高比重画分に含まれる高分子化 α -Synuclein の分子形態 (電子顕微鏡観察)

して、ショ糖密度勾配遠心による生化学分画を行った (図 2A)。その結果、一部の中～高比重画分において、顆粒構造や数珠状ひも構造など、異なる分子形態の高分子化 α -Synuclein を分離・回収することができた (図 2B)。興味深いことに、顆粒構造の直径と数珠状ひも構造の短径の長さはほぼ一致していた。

() 分離した高分子化 α -Synuclein の凝集形成能の検定

Fibril 画分を出発材料としたショ糖密度勾配遠心により分離・回収した高分子化 α -Synuclein (顆粒構造と数珠状ひも構造) について、各々の凝集形成能を検定した。その結果、両者とも神経細胞内にレビー小体様凝集体の形成を誘導することができた。以上の結果を踏まえ、顆粒構造が細胞間伝播を担う最小の機能単位であるとの仮説を立て、以下では細胞自身が産生した高分子化 α -Synuclein を対象とした実験を行った。

() 病的神経細胞が産生する Seed 分子について

Fibril を用いて病的神経細胞を作製した後、これらの細胞を新鮮な培地でよく洗浄し、健康な神経細胞との共培養実験を行った (図 3)。

その結果、共培養された健康な神経細胞内にもレビー小体様凝集体の存在を検出することができた。本結果は培地中に病的神経細胞が産生した細胞間伝播性 Seed が存在することを示唆している。

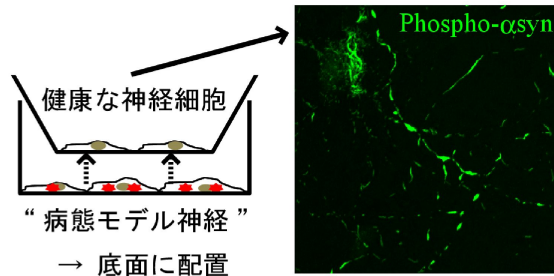


図 3: 病的神経細胞を用いた共培養実験

次に、病的神経細胞が産生した細胞間伝播性分子の分離・同定を行った。これまでの in vitro の実験によって得られた結果と生きた病的神経細胞が産生した高分子化 α -Synuclein の解析結果を比較することによって、より精度の高い細胞間伝播性 Seed の同定とその性質の解明を目指した。

() 病的神経が培地中に産生 (放出) した細胞間伝播性分子の分離

病的神経細胞を一定期間培養した培地 (conditioned medium) から高分子化 α -Synuclein の分離を行った。培地を濃縮後、ショ糖密度勾配遠心によって細分画を行い、Native-PAGE 及び SDS-PAGE によって培地中に存在する高分子化 α -Synuclein の分子量を算定すると共に、その凝集形成能についても検定を行った (図 4)。

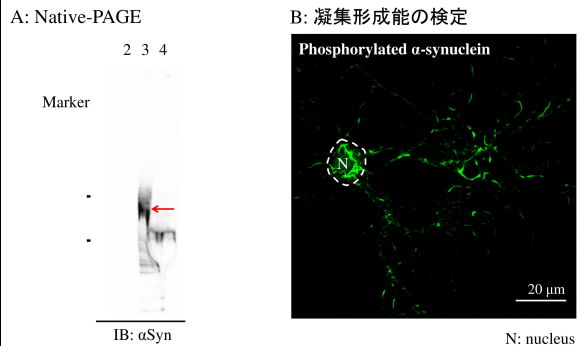


図 4: Conditioned medium 由来高分子化 α -Synuclein の解析

病的神経細胞を一定期間培養した培地に

由来する、ある特定の生化学画分では中分子量域において明瞭な高分子化 α -Synuclein のバンド(図中矢印)を検出することができたと共に(図4A) この画分を含む培地で健康な神経細胞を培養するとレビー小体様凝集体の形成を誘導することができた(図4B)。

現在、この細胞間伝播性分子の分子形態、及び生化学的性質について更に詳細に解析を進めている。本研究結果は病的神経細胞が自ら産生する細胞間伝播性 Seed 分子の同定に繋がるものと期待される。

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1件)

1) Watanabe Y, Tsujimura A, Taguchi K, Tanaka M. HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis. *Autophagy* 13: 133-148, 2017.

[学会発表](計9件)

1) **第39回日本神経科学大会(2016年7月20-22日 横浜)** ポスター発表

「Characterization of α -synuclein-enriched periglomerular cells in the mouse olfactory bulb」
筆頭発表者

2) **北米神経科学会 SfN2016(2016年11月12-16日 米田サンディエゴ)** ポスター発表

「Characterization of alpha-synuclein-enriched periglomerular cells in the olfactory bulb」
筆頭発表者

3) **第92回日本解剖学会学術集会・近畿支部会(2016年11月27日 大阪府狭山市 近畿大学東大阪キャンパス)** 口頭発表

「パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析」
筆頭発表者

4) **第39回日本分子生物学会年会(2016年11月30日-12月2日 横浜市)** ポスター発表

「細胞内 α シヌクレイン凝集体の形成/分解サイクルと細胞生存への影響について」
第3発表者

5) **第122回日本解剖学会総会・全国学術集会(2017年3月28日-30日 長崎市 長崎大学)** ポスター発表

「パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現するマウス嗅球傍系球体細胞の解析」
筆頭発表者

6) **第40回日本神経科学大会(2017年7月20-23日 千葉市 幕張メッセ)** ポスター発表

「Characterization of α -synuclein-enriched periglomerular cells in the mouse olfactory bulb」
筆頭発表者

7) **第93回 日本解剖学会学術集会・近畿支部会(2017年11月25日 滋賀県大津市 滋賀医科大学)** 口頭発表

「パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析」
筆頭発表者

8) **第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会(2018年3月28日-30日 東京都武蔵野市 日本医科大学 武蔵境校舎)** 口頭(シンポジウム)発表

「神経細胞間伝播性 α -シヌクレインの分離・同定とその解析」
筆頭発表者

9) **第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会(2018年3月28日-30日 東京都武蔵野市 日本医科大学 武蔵境校舎)**

日本解剖学会奨励賞受賞講演「神経解剖学を基盤としたパーキンソン病責任分子 α -シヌクレインの機能解析」

[その他]

ホームページ

京都府立医科大学

解剖学教室 生体構造科学部門

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anatomy1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 勝敏 (Katsutoshi Taguchi)

(京都府立医科大学 解剖学教室
生体構造科学部門 助教)

研究者番号: 60462701