

令和元年6月12日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16134

研究課題名（和文）様々な脂質によるプリオノイド化 シヌクレイン株の生成とその形質多様性の解析

研究課題名（英文）Analyses of the effect of lipid interactions on alpha-synuclein toxic conversion

研究代表者

鈴木 マリ（SUZUKI, Mari）

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主任研究員

研究者番号：20455405

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、パーキンソン病やレビー小体型認知症の原因として考えられている シヌクレイン蛋白質が毒性を獲得する機序を解明することを目的とした。研究代表者らはライソソーム病の一種である異染性白質ジストロフィー原因遺伝子であるARSAが、シヌクレインを発現するパーキンソン病モデルショウジョウバエの運動機能障害に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、異染性白質ジストロフィー原因遺伝子産物であるARSAがパーキンソン病の発症に影響することをモデル生物を用いて明らかにしたものである。特定のARSA遺伝子変異が症状に影響を及ぼすことから、パーキンソン病の罹りやすさを予測し予防に貢献したり、発症を抑える機序を利用した治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）： -synuclein plays a central role for pathogenesis of Parkinson's disease and dementia with Lewy body. The aim of this study is to explore how -synuclein gains toxic function. We found that ARSA, a causative gene for metachromatic leukodystrophy, affects -synuclein-induced locomotor dysfunction in Drosophila model of Parkinson's disease.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：シヌクレイン パーキンソン病 ショウジョウバエ ライソソーム病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い患者数が増加している神経変性疾患の克服は、全世界における重要課題である。パーキンソン病 (PD) とレビー小体型認知症 (DLB) は臨床症状が異なるものの、レビー小体の蓄積という共通性が認められ、近年レビー小体病と分類されている。孤発性 PD や DLB では、通常は無害である野生型 シヌクレイン (Syn) が毒性および伝播性を獲得 (プリオノイド化) し、疾患の発症・進行の原因となると考えられるが、その要因や伝播の分子メカニズムは未解明である。

近年、異常 Syn が細胞間を移行して異常構造を伝播し PD 病変を拡大させる可能性が指摘され、プリオン仮説として注目されている。細胞モデルにおいて Syn の分泌・取り込みに関する知見が蓄積されつつある中、近年複数のグループが動物モデルにおける異常 Syn の伝播現象を証明した (Luk et al., J Exp Med 2012; Masuda-suzukake et al., Brain 2013)。このような状況から、動物モデルを用いた Syn 脳内伝播メカニズムの解明が、PD/DLB の根本的治療法開発のための重要課題となっている。PD/DLB 病態の進行における異常 Syn 伝播が関心を集める一方で、Syn 遺伝子変異の無い場合に「通常は無害である野生型 Syn がどのようなメカニズムで毒性および伝播性を獲得 (プリオノイド化) するか」という疾患発症の本質的メカニズムに関する問題も残されたままである。

代表者はショウジョウバエモデル及び *in vitro* アッセイ系を用いて GBA 遺伝子産物である glucosylceramidase (GCase) 機能喪失が Syn 毒性に及ぼす影響を解析し、GCase 活性低下により蓄積した基質グルコシルセラミドが Syn のプリオノイド化を促進して PD モデルショウジョウバエの病態を増悪させることを見出した (Suzuki et al., Hum Mol Genet 2015)。興味深いことに、特定の脂質が蓄積する他のライソソーム病の脳病理解析においても異常 Syn の蓄積が認められ (Suzuki et al., Acta Neuropathologica 2007) ムコ多糖症 型原因遺伝子 NAGLU の一塩基多型が PD と関連するとの報告もある (Winder-Rhodes et al., Mov Disorder 2011)。これらの事実は他のライソソーム病で蓄積する糖脂質や糖鎖が Syn プリオノイド化を促進する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、ライソソーム病で蓄積する脂質が Syn プリオノイド化に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、PD モデルショウジョウバエにおいてライソソーム病原因遺伝子ハエホモログをノックダウンした際の影響を解析する予定であった。本研究を開始してからまもなく、PD 患者の遺伝学的解析から関連遺伝子として同定された Arylsulfatase A (ARSA) に関して、韓国ソウル大学の Seoun-Jae Lee 教授らとの国際共同研究を行うこととなった。ARSA はライソソーム病の一つである異染性白質ジストロフィー (MLD) の原因遺伝子である。ARSA の L300S 変異により PD リスクが増加、N352S 変異により PD リスクが低下するとの予備データから、本研究では PD モデルショウジョウバエの症状に対する野生型、LS または NS 変異型 ARSA の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PhiC31 インテグラーゼによる部位特異的な遺伝子組換えシステムを用いて、野生型、LS または NS 変異型 ARSA 遺伝子を UAS 配列下流に繋いだ外来遺伝子をゲノム中の特定の位置に有するショウジョウバエを作製した。樹立した ARSA 発現ショウジョウバエを野生型 Syn 発現 PD モデルショウジョウバエ (*elav-GAL4 > Syn*) と交配し、ARSA と Syn を神経系に共発現するショウジョウバエを作製した。

F1 個体頭部を用いて qRT-PCR およびウェスタンブロッティングを行い、ARSA および Syn の発現を確認した。運動機能の評価にはクライミングアッセイ法を用いた (Suzuki M et al., Hum Mol Genet 2015)。

4. 研究成果

ARSA 発現ショウジョウバエ頭部サンプルにおける ARSA 発現量を確認した結果、WT および NS 変異型 ARSA は同程度の蛋白質発現が確認されたが、LS

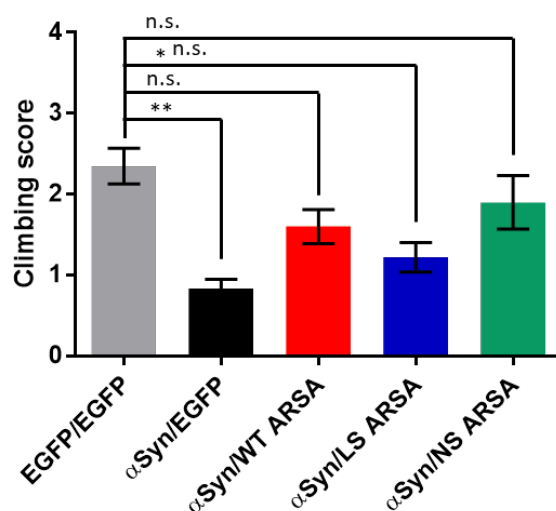


図1 ライソソーム酵素ARSAによる、パーキンソン病モデルショウジョウバエの運動機能改善効果。野生型αシヌクレイン (αSyn) を発現するパーキンソン病モデルショウジョウバエに野生型 (WT) または変異型 (LS または NS) ARSA を共発現させ、運動機能をクライミングアッセイにより解析した。EGFP はコントロール。7週齢において、野生型 (赤) および NS 変異 (緑) ARSA は、αSyn による運動機能障害 (黒) を改善した。

変異型 ARSA 蛋白質は発現は確認できたものの著しく少ないことが判明した。一方、各遺伝子の RNA 発現量には変化が認められなかったことから、LS 変異型 ARSA は翻訳後に何らかの原因で分解を受けていることが示唆された。ライソソーム病原因遺伝子産物は小胞体関連分解を受けることで発現量が低下し機能不全の原因となることが知られていることから、LS 変異型 ARSA も同様に小胞体関連分解を受けていることが予想された。そこでプロテアソーム阻害剤 proteasome I (PSI) 投与により LS 変異型 ARSA 量が増加するか検討したが、蛋白質量の変化は認められなかった。よって、小胞体関連分解以外の何らかの原因に蛋白質分解を受けている、または翻訳効率低下が起きている可能性が考えられた。続いて野生型 Syn 発現ショウジョウバエの運動機能に及ぼす影響を検討した。その結果、野生型および NS 変異 ARSA の発現により Syn による運動機能障害が改善することが明らかとなった(図 1)。一方、LS 変異 ARSA では有意な改善効果は認められなかった(図 1)。これらの結果は、PD 発症リスクに対する ARSA の影響と一致するものであった。LS 変異型蛋白質による小胞体ストレス惹起の可能性を考え検討したが、Hsc70-3 (ハエ Bip ホモログ) の発現増加および XBP1 スプライシングの増加は認められなかった。また変異型蛋白質の不溶化も認められなかった。

一方、Lee 教授らは細胞・線虫モデルを用いて ARSA が Syn の異常構造変化を抑制するシャペロンとして機能することを明らかにした。シャペロン機能は NS 変異型が最も強く、次いで野生型、LS 変異型は最も弱く、ショウジョウバエモデルでの結果と一致するものとなった。以上から、ARSA は Syn のシャペロンとして機能し、その変異は PD リスクを変化させることが明らかとなった。本研究成果は Brain 誌に掲載予定である(発表論文 1) Lee JS et al., *Brain* in press。

<引用文献>

- 1) Luk, K.C., et al., Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med*, 2012. 209(5): p. 975-86.
- 2) Masuda-Suzukake, M., et al., Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain*, 2013. 136(Pt 4): p. 1128-38.
- 3) Suzuki, M., et al., Glucocerebrosidase deficiency accelerates the accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein and aggravates neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 2015. 24(23): p. 6675-86.
- 4) Suzuki, K., et al., Neuronal and glial accumulation of alpha- and beta-synucleins in human lipidoses. *Acta Neuropathol*, 2007. 114(5): p. 481-9.
- 5) Winder-Rhodes, S.E., et al., Genetic and pathological links between Parkinson's disease and the lysosomal disorder Sanfilippo syndrome. *Mov Disord*, 2012. 27(2): p. 312-5.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者に下線)

[雑誌論文](計 6 件)

(1 - 4 査読有、5 - 6 は査読無)

- 1) Lee JS, Kanai K, Suzuki M, Kim WS, Yoo HS, Fu YH, Kim DK, Jung BC, Choi M, Oh KW, Li Y, Nakatani M, Nakazato T, Sekimoto S, Funayama M, Yoshino H, Kubo S, Nishioka K, Sakai R, Ueyama M, Mochizuki H, Lee HJ, Sardi SP, Halliday GM, Nagai Y, Lee PH, Hattori N, Lee SJ*. Arylsulfatase A, a genetic modifier of Parkinson's disease, is an α -synuclein chaperone. *Brain* (in press)
- 2) Nakamura S[#], Oba M[#], Suzuki M, Takahashi A, Yamamuro T, Fujiwara M, Ikenaka K, Minami S, Tabata N, Yamamoto K, Kubo S, Tokumura A, Akamatsu K, Miyazaki Y, Kawabata T, Hamasaki M, Fukui K, Sango K, Watanabe Y, Takabatake Y, Kitajima TS, Okada Y, Mochizuki H, Isaka Y, Antebi A, Yoshimori T*. ([#] co-first author) Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nature Communications* 10(1):847 (2019) DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08729-6>

- 3) **Suzuki M***, Sango K, Wada K, Nagai Y*. Pathological role of lipid interaction with α -synuclein in Parkinson's disease. *Neurochemistry International* 119:97-106 (2018) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.12.014>
- 4) Yoshida S, Hasegawa T*, **Suzuki M**, Sugeno N, Kobayashi J, Ueyama M, Fukuda M, Ido-Fujibayashi A, Sekiguchi K, Ezura M, Kikuchi A, Baba T, Takeda A, Mochizuki H, Nagai Y, Aoki M. Parkinson's disease-linked DNAJC13 mutation aggravates α -synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics* 27(5):823-836 (2018) DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy003>
- 5) 大場 柗樹, 永井義隆, 福井浩二, 三五一憲, **鈴木マリ**. オートファジー抑制蛋白質 Rubicon の発現抑制はポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経症状を改善させる. *日本病態生理学会雑誌* 27 (3): 28-32 (2018)
- 6) 堺竜介, **鈴木マリ**, 永井義隆*. ショウジョウバエを用いたパーキンソン病の病態解明. *医学のあゆみ* 262 (6): 641-646 (2017)

[学会発表](計 14 件)

- 1) 大場 柗樹, 永井義隆, 福井浩二, 三五一憲, **鈴木マリ**. オートファジー抑制蛋白質 Rubicon の発現抑制によるポリグルタミン病モデルの症状改善. **第 37 回日本認知症学会 学術集会** (2018)
- 2) 大場 柗樹, 永井義隆, 福井浩二, 三五一憲, **鈴木マリ**. オートファジー抑制蛋白質 Rubicon の発現抑制はポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経症状を改善させる. **第 28 回日本病態生理学会大会** (2018)
- 3) 大場 柗樹, 永井義隆, 福井浩二, 三五一憲, **鈴木マリ**. オートファジー抑制蛋白質 Rubicon の発現抑制はポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経症状を改善させる. **第 41 回日本神経科学学会大会** (2018)
- 4) **鈴木マリ**, 大場 柗樹, 三五一憲. ショウジョウバエを用いた神経変性疾患研究. **第 4 回日本ミエリン研究会大会** (2018)
- 5) **Suzuki M**, Oba M, Fukui K, Nagai Y, Sango K. Knockdown of Rubicon extends lifespan and attenuates polyglutamine toxicity in *Drosophila*. **第 59 回神経学会学術大会** (2018)
- 6) 堺竜介, **鈴木マリ**, 上山盛夫, 武内敏秀, 永井義隆, 望月秀樹. Establishment of α -synuclein transgenic *Drosophila* model by site-specific transgenesis. **第 59 回 日本神経学会学術大会** (2018)
- 7) 吉田隼, 長谷川隆文, **鈴木マリ**, 菅野直人, 小林潤平, 上山盛夫, 福田光則, 藤林明美, 関口清俊, 江面道典, 菊池昭夫, 馬場徹, 武田篤, 望月秀樹, 永井義隆, 青木正志. DNAJC13 mutation aggravates alpha-synuclein-induced toxicity through perturbation of trafficking. **第 59 回 日本神経学会学術大会** (2018)
- 8) **鈴木マリ**, 藤掛伸宏, 武内敏秀, 香山(古金谷)綾子, 中嶋和紀, 平林義雄, 和田圭司, 三五一憲, 永井義隆. GBA 機能喪失は α -シヌクレインの異常構造変化を促進して神経変性を悪化させる. **第 36 回日本認知症学会学術集会** (2017)
- 9) **鈴木マリ**, 永井義隆. パーキンソン病における α -シヌクレイン - 脂質相互作用の役割. **第 12 回臨床ストレス応答学会大会 (シンポジウム)** (2017)
- 10) **Suzuki M**, Neumann AM, Saitoh Y, Fujikake N, Wada K, Sango K, Nagai Y. Improvement of misfolding protein-induced neurodegeneration by dietary restriction in *Drosophila*. *The 23rd World Congress of Neurology (WCN 2017)* (2017)

- 11) **鈴木マリ**, Anne-Marie Neumann, 斉藤勇二, 藤掛伸宏, 和田圭司, 三五一憲, 永井義隆. 食餌制限は神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性を改善する. **第27回日本病態生理学会大会** (2017)
- 12) **Suzuki M**, Neumann AM, Saitoh Y, Fujikake N, Wada K, Sango K, Nagai Y. Dietary restriction improves neurodegeneration in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. **EMBO/EMBL Symposium "Mechanisms of Neurodegeneration"** (2017)
- 13) Hasegawa T, Yoshida S, **Suzuki M**, Kobayashi J, Sugeno N, Sekiguchi K, Ezura M, Kikuchi A, Takeda A, Nagai Y, Aoki M. Mutant DNAJC13 modulates accumulation and toxicity of α -synuclein through altered endosomal trafficking in cell and fly models of Parkinson's disease. **21st International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders** (2017)
- 14) **Suzuki M**, Neumann AM, Saitoh Y, Fujikake N, Wada K, Sango K, Nagai Y. Dietary restriction improves misfolding protein-related neurodegeneration in *Drosophila*. **Keystone Symposia "Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease"** (2017)

〔その他〕

糖尿病性神経障害プロジェクトホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/diabetic/>

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

永井 義隆 (NAGAI, yoshitaka)

大阪大学大学院医学系研究科・神経難病認知症探索治療学寄附講座

堺 竜介 (SAKAI, ryusuke)

大阪大学・大学院医学系研究科・神経内科/神経難病認知症探索治療学寄附講座

大場 柁樹 (OBA, masaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野