

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07386

研究課題名(和文) PLK2ノックアウトによるSer129リン酸化 シヌクレイン神経毒性の解明

研究課題名(英文) Effects of PLK2 knockout on alpha-synuclein neurotoxicity

研究代表者

佐藤 裕康 (Sato, Hiroyasu)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90436204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病を特徴づけるLewy小体には凝集したシヌクレイン( $\alpha$ -S)が蓄積している。主要な翻訳後修飾であるSer129のリン酸化が神経毒性に与える効果は不明である。本研究ではPolo-like 2(PLK2)によるリン酸化が神経毒性に与える効果を検討した。PLK2ノックアウト(KO)マウス中脳に組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV-A53T  $\alpha$ -S)を接種し、リン酸化がドパミン神経毒性に与える効果を解析した。その結果、PLK2-KOマウスでは  $\alpha$ -Sによる神経変性が抑制されている可能性があった。神経保護効果が有意なものか、またそのメカニズムについて、追加解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は病理学的に黒質線条体のドパミン神経細胞の脱落とシヌクレイン凝集体の形成によって特徴づけられる。リン酸化  $\alpha$ -Sは主要な翻訳後修飾として知られるが、その病的意義は不明である。現在、 $\alpha$ -Sによる神経毒性を緩和する治療薬は開発されていない。本研究によりSer129リン酸化の  $\alpha$ -S神経毒性への効果を明らかにすることにより、リン酸化レベルの調節が、神経保護効果を有する治療のターゲットとなりうるか明らかとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aggregated alpha-synuclein ( $\alpha$ -S) accumulates in the Lewy bodies in Parkinson's disease. The effect of phosphorylation of Ser129, a major post-transcriptional modification, on neurotoxicity remains to be elucidated. In this we analyzed the effect of Ser129 phosphorylation by polo-like 2 (PLK2) on  $\alpha$ -S neurotoxicity. We injected recombinant adeno-associated virus (AAV)-A53T  $\alpha$ -S into the midbrain of PLK2 knockout mice and analyzed the dopamine neurotoxicity. The data suggested that dopamine neurotoxicity in PLK2 knockout mice might be suppressed than that in wild-type mice. Additional analysis is underway to determine if the neuroprotective effect is significant and the mechanism by which it is achieved.

研究分野：神経内科

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン PLK2 モデル動物 アデノ随伴ウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) を特徴づける Lewy 小体には凝集した  $\alpha$ -Synuclein (S) が蓄積している。凝集した S の主要な翻訳後修飾は Ser129 残基のリン酸化である。S の凝集と Ser129 リン酸化が PD の病態メカニズムに関与していることが想定されるが、リン酸化 S がドパミン神経毒性に与える効果については結論が得られていない。S の Ser129 をリン酸化するキナーゼには、GRK2、GRK3、GRK5、GRK6、CK1、CK2、Polo-like kinase (PLK) 2、PLK3 が知られている。S の神経毒性に対するリン酸化の効果について、複数の動物モデルで検討されている。我々はアデノ随伴ウイルス (AAV) ラット PD モデルで、GRK6 を発現させて S を Ser129 でリン酸化させると、神経毒性が増強することを報告した (Sato et al. J Neurosci 2011)。しかし、PLK2 と S を AAV で共発現すると、神経細胞で S の発現が低下し、神経細胞の脱落が有意に抑制されること、PLK2 によるリン酸化は S のライソゾーム系での分解を促進して神経保護的に働くことを報告した (Oueslati et al. PNAS 2013)。この様に、Ser129 リン酸化が S の神経毒性に与える効果については相反する結果が報告されている。これら相反する結果は、キナーゼの違いに起因するのか、導入したキナーゼの発現レベルといった実験系の違いによって生じたのか不明である。Ser129 リン酸化 S は PD を病理学的に特徴づける極めて特徴的な所見であるにも関わらず、その病的意義については未だ不明である。PD の病態メカニズムを解明し、S のリン酸化やキナーゼのレベルを抑制すべきかどうか明らかにし、根本的治療薬開発のターゲットとなりうるか解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、「PLK2 による Ser129 リン酸化が S の神経毒性に与える効果を解明する」ことを目的とした。具体的には、PLK2 ノックアウトマウスの中脳黒質に、ウイルスを用いて S を強制発現させたモデルで解析する。

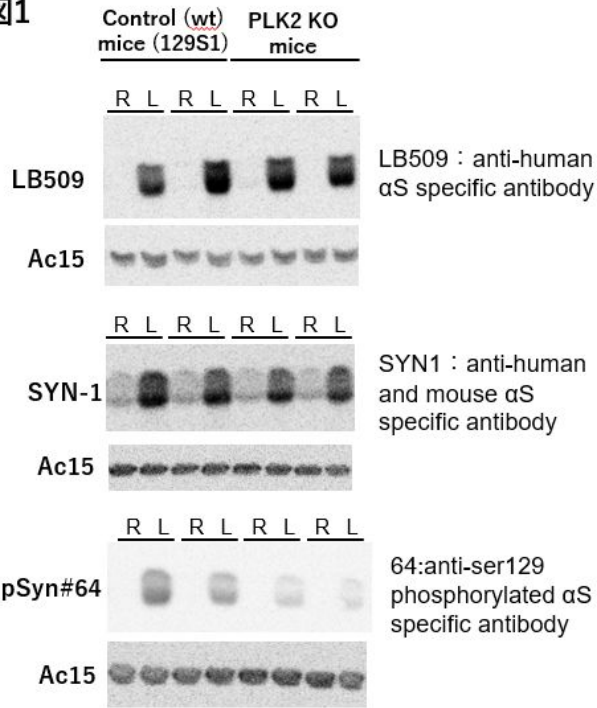
### 3. 研究の方法

PLK2 ノックアウトマウスの中脳黒質に組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) を接種し、A53T 変異型 S を過剰発現させたモデルを用いる。AAV 接種後の脳を採取し、免疫組織化学染色 (黒質、線条体ドパミン神経細胞の脱落の評価、S 凝集体形成評価、炎症細胞出現の評価) 生化学的方法で解析する。非ノックアウトマウスを対照として使用する。

### 4. 研究成果

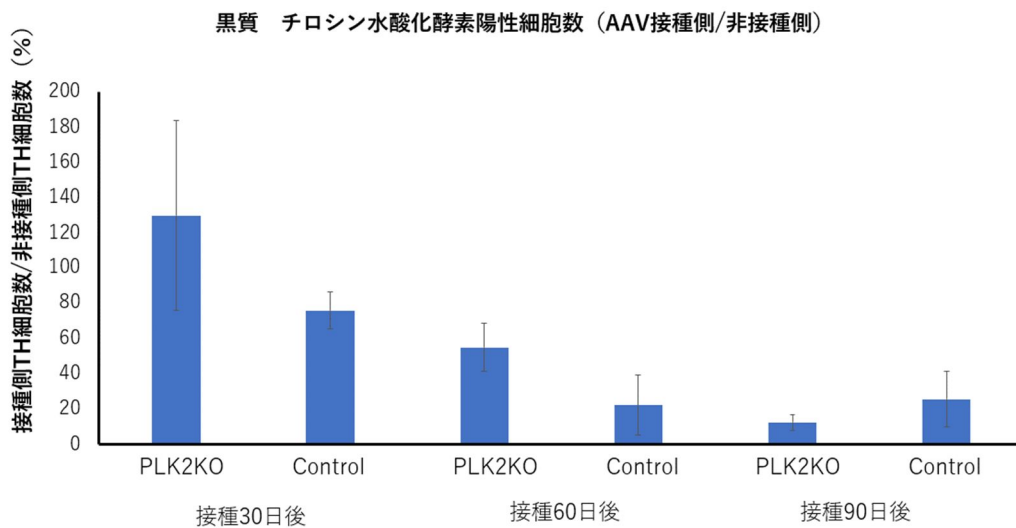
AAV-A53T S を PLK2 ノックアウトマウスおよびコントロールマウスの中脳に接種した。接種後、30、60、90 日後に脳を採取した。S 発現レベルは PLK2 ノックアウト、コントロールマウスで差は見られなかったが、PLK2 ノックアウトでは Ser129 リン酸化レベルは減少していた (図 1)。免疫組織化学染色を行い、ドパミン神経細胞数を定量した。その結果、ノックアウトマウスではドパミン神経細胞の脱落が一時的に (接種 30 日後、60 日後) 抑制されている可能性が示唆された (図 2)。実験手技により AAV 接種によるマウス個体間の S の発現状態が異なり、解析可能な個体数が限られていたため、解析の為の十分な個体数を追加する為、追加実験を行っており、現在解析中である。さらに、保護効果のメカニズムについて、リン酸化の S 凝集に与える効果を、免疫組織化学染色および生化学的に解析を追加する予定である。

図1



Midbrain homogenate  
TBS+ soluble fraction 20 $\mu$ g/lane  
30days after rAAV9-CAG-A53T  $\alpha$ S-WPRE  
injection into lt substantia nigra

図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroyasu Sato
2. 発表標題 The effect of serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein on neurotoxicity in PLK2 knockout mice
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------