

## 自己評価報告書

平成23年4月27日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20300123

研究課題名 (和文) シヌクレイノパチーに特異的な蛋白分解異常：ナブオパチーの提唱と分子病態解明

研究課題名 (英文) Role of NUB1 in inclusion body formation in synucleinopathies

## 研究代表者

若林 孝一 (WAKABAYASHI KOICHI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50240768

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患、パーキンソン病、レビー小体型認知症

## 1. 研究計画の概要

レビー小体病 (パーキンソン病およびレビー小体型認知症) の病態にはタンパク質の異常修飾が重要な役割を果たしている。しかしながら、 $\alpha$ シヌクレインの凝集メカニズムには不明の点が多い。申請者らは、NUB1 はシヌクレイノパチー脳に認められる封入体の構成成分であり、プロテアソームにおける Synphilin-1 の分解を促進することにより細胞内封入体の形成を抑制していることを明らかにした。さらに、NUB1 はシヌクレイノパチーに認められる封入体に特異的に発現しており、他の変性疾患には認められないことも報告してきた。

そこで本研究では、①レビー小体病の前シナプスに蓄積している不溶性 $\alpha$ シヌクレインと NUB1 の関係、②レビー小体病の前シナプスにおける超微形態 (シナプスの大きさ、シナプス小胞の形態・密度)、③レビー小体病のシナプスにおける不溶性 $\alpha$ シヌクレインの定量ならびに NUB1 の生化学的性状 (凝集、修飾および断片化) を明らかにすることを目的とする。得られる成果は、レビー小体病を含むシヌクレイノパチーのみならず、他の神経変性疾患 (タウオパチーや TDP43 proteinopathy) にも応用可能であり、神経変性疾患の病態の理解と治療法開発に与える影響は大きい。

## 2. 研究の進捗状況

(1) シヌクレイノパチー脳を用いた NUB1 の病態生化学的検討：

シヌクレイノパチーの病変部位ならびに正常対照の凍結脳組織 (側頭葉皮質) 5 mL/g (volume/weight) を、低張溶液、界面活性剤溶液、SDS 溶液、尿素溶液を用いて順次溶解

し、抽出した各サンプルを Western blot により解析した。その結果、レビー小体型認知症では尿素画分において NUB1 の量が増加していることが明らかとなった。しかし、正常対照と比べ分子量に差が認められないことから、不溶性 NUB1 がユビキチン化またはリン酸化を受けている可能性は低いと考えられた。

(2)  $\alpha$ シヌクレイントランスジェニックマウスを用いた病理学的検討：

$\alpha$ シヌクレイントランスジェニックマウスを用い、病理学的検討を行ったところ、proteinase K (PK) 耐性 $\alpha$ シヌクレインがニューロピルに広範に認められた。シナプトフィジン免疫染色との比較から、それらは前シナプスに局在していることが確認された。前シナプスに局在している PK 耐性 $\alpha$ シヌクレインはリン酸化されていなかった。さらに、 $\alpha$ シヌクレイントランスジェニックマウスでは $\alpha$ シヌクレイン陽性封入体が認められた。それらはリン酸化されていたが、PK 耐性ではなかった。

(3) レビー小体病を用いた病理学的検討：

パーキンソン病およびレビー小体型認知症では多数のレビー小体や Lewy neurites が認められた。それらは、リン酸化されており、PK 耐性であった。一方、海馬、側頭葉皮質、黒質、脳幹被蓋の前シナプスにも PK 耐性 $\alpha$ シヌクレインの蓄積が認められたが、それらはリン酸化されていなかった。

レビー小体病では PK 耐性 (不溶性)  $\alpha$ シヌクレインが前シナプスに広範に蓄積していることから、 $\alpha$ シヌクレインの生理的機能が阻害し、症状の出現に寄与している可能性が示唆される。

(4) シヌクレイノパチー脳を用いた NUB1 の免疫組織化学的検討：

NUB1 は免疫組織化学的に、レビー小体病で

はPK耐性（不溶性）の $\alpha$ シヌクレインが蓄積している前シナプスに共存していた。同様の所見は $\alpha$ シヌクレイントランスジェニックマウスでも確認された。 $\alpha$ シヌクレイントランスジェニックマウス海馬の免疫電顕では、NUB1はシナプス小胞に局在していたが、これらのシナプスには異常な線維構造は認められなかった。レビー小体型認知症の凍結脳組織（側頭葉皮質）を用いた生化学的検討では、NUB1と不溶性 $\alpha$ シヌクレインが共存していることが示された。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

これまでに、①PK耐性（不溶性） $\alpha$ シヌクレインが前シナプスに広範に蓄積していること、②それらは NUB1 と共局在していること、③レビー小体型認知症では尿素画分において NUB1 の量が増加していることを明らかにしており、研究計画は順調に進展している。

### 4. 今後の研究の推進方策

今後、フィルタートラップ法で NUB1 の異常凝集を解析する。また、免疫沈降およびウェスタンブロット法により NUB1 の修飾および断片化について検討を行う。

### 5. 代表的な研究成果

(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 15 件)

- ① Tanji K, Mori F, Mimura J, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Proteinase K-resistant  $\alpha$ -synuclein is deposited in presynapses in human Lewy body disease and A53T  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *Acta Neuropathol* 120: 145-154, 2010、査読あり
- ② Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol* 120: 1-12, 2010、査読あり
- ③ Tanji K, Kamitani T, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 38: 210-218, 2010、査読あり
- ④ Miki Y, Tomiyama M, Ueno T, Haga R, Nishijima H, Suzuki C, Mori F, Kaimori M, Baba M, Wakabayashi K. Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 469:

357-359, 2010、査読あり

- ⑤ Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease linked to SNCA duplication. *Acta Neuropathol* 116: 575-577, 2008、査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Existence of proteinase K-resistant  $\alpha$ -synuclein is human Lewy body disease and A53T  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. 第17回国際神経病理学会. 2010年9月11日. Salzburg, Austria.
- ② Miki Y, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Immunocytochemical localization of histone deacetylase 6 in neurodegenerative disorders. 第17回国際神経病理学会. 2010年9月11日. Salzburg, Austria.
- ③ 丹治邦和、森文秋、張海心、木藤克己、神谷哲、若林孝一. シヌクレイノパチーモデルマウスにおける synphilin-1 結合タンパク質 (NUB1) の局在. 第50回日本神経病理学会. 2009年6月6日. 高松市.
- ④ 丹治邦和、森文秋、譚春鳳、柿田明美、張海心、木藤克己、神谷哲、高橋均、若林孝一. シヌクレイノパチー剖検脳における synphilin-1 結合タンパク質 (NUB1) の定量的解析. 第49回日本神経病理学会. 2008年5月20日. 東京都.

[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]