

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 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

研究成果の概要（和文）：

α シヌクレイントランスジェニックマウスならびにレビー小体病（パーキンソン病およびレビー小体型認知症）では不溶性 α シヌクレインおよびNUB1が病変部位の前シナプスに蓄積していた。 α 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を用いた生化学的検討では、NUB1と不溶性 α シヌクレインが共存していることが示された。以上から、前シナプスにおける異常 α シヌクレインとNUB1の蓄積はレビー小体病の病態に関与している可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

In human Lewy body disease (LBD), PK-resistant α -synuclein was deposited in Lewy bodies and Lewy neurites, as well as in the presynapses in distinct brain regions, including the hippocampus, temporal cortex and substantia nigra. Biochemical analysis revealed that PK-resistant α -synuclein was detected in the presynaptic fraction in Tg mice and human LBD. We further demonstrated that, in the brains of patients with LBD, NUB1 accumulates in the presynapses in the hippocampus, cerebral neocortex, and substantia nigra in which PK-resistant α -synuclein is deposited. Endogenous NUB1 also accumulated with PK-resistant α -synuclein in the presynapses of Tg mice that express human α -synuclein with an A53T mutation. Immunoelectron microscopy showed that NUB1 was localized to presynaptic nerve terminals where no abnormal filaments were seen. Biochemical analyses showed that NUB1 coexists with abnormal α -synuclein in the brains of LBD patients. These findings suggest that NUB1 along with abnormal α -synuclein is involved in the pathogenesis of LBD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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. 研究開始当初の背景

近年、ユビキチンと相同性を有するタンパク質（ユビキチン様タンパク質）が複数存在し、それらはユビキチンとは異なる機能をつかさどっていることが明らかとなってきた。その中でも、NEDD8 はユビキチンと最も高い相同性を示すユビキチン様タンパク質である。我々は、NEDD8 の機能を明らかにするため、NEDD8 の結合タンパク質である NUB1 (NEDD8 ultimate buster 1) を bait に Yeast two hybrid スクリーニングを行い、Synphilin-1 を同定した。Synphilin-1 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子である Synuclein の結合タンパク質であり、シヌクレイノパチー脳に認められる細胞内封入体の構成成分である。

我々は、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 (Am J Pathol 2006)。さらに、NEDD8 はユビキチンと同様の細胞内局在を示すことから (Neuropathol Appl Neurobiol 2005)、NEDD8 結合タンパク質である NUB1 はシヌクレイノパチーのみならず各種の神経変性疾患に関与していることが予想された。しかし、予想に反し、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かった (Acta Neuropathol 2007)。

そこで本研究では、NUB1 を標的分子とし、シヌクレイノパチーにおいて NUB1 が封入体の形成や細胞変性に果たす役割を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

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、 α シヌクレインの凝集メカニズムには不明の点が多い。

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 α 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（シナプス小胞の形態、蓄積物質の有無）、③レビー小体病のシナプスにおける不溶性 α シヌクレインの定量ならびに NUB1 の生化学的性状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。

3. 研究の方法

(1) シヌクレイノパチー脳を用いた α シヌクレインの病理学的検討：

α シヌクレイントランスジェニックマウスならびにヒト剖検脳（パーキンソン病およびレビー小体型認知症）を用い、proteinase K (PK) 処理後に α シヌクレイン免疫染色を行った。

(2) シヌクレイノパチー脳を用いた α シヌクレインの生化学的検討：

レビー小体型認知症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。

(3) 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：

α シヌクレイントランスジェニックマウスならびにヒト剖検脳（パーキンソン病およびレビー小体型認知症）を用い、NUB1 免疫染色を行った。

(4) シヌクレイノパチー脳を用いた NUB1 の生化学的検討：

レビー小体型認知症ならびに正常対照の凍結脳組織（側頭葉皮質）を用い、(2) と同様に NUB1 を定量した。

4. 研究成果

(1) シヌクレイノパチー脳を用いた α シヌクレインの病理学的検討：

α 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 α 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 α シヌクレインはリン酸化されていなかった。さらに、 α シヌクレイントランスジェニックマウスでは α 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。

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 α 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） α 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、 α シヌクレインの生理的機能を阻害し、症状の出現に寄与している可能性が示唆される。

(2) シヌクレイノパチー脳を用いた α シヌクレインの生化学的検討：

レビー小体型認知症脳ではほぼ全ての分画に可溶性の α シヌクレインが検出された。一方、正常対照では低密度の分画にだけ検出された。

(3) 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 α 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 α 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。 α 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。

(4) シヌクレイノパチー脳を用いた NUB1 の生化学的検討:

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 α シヌクレインが共存していることが示された。

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 30 件)

- ① Odagiri S, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in α -synucleinopathy. *Acta Neuropathol* (in press)
DOI:10.1007/s00401-012-0975-7
- ② Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Synphilin-1 binding protein NUB1 is colocalized with non-fibrillar, proteinase K-resistant α -synuclein to presynapses in Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 879-889, 2011
DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182303745
- ③ Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of autophagosomal protein (LC3, GABARAP and GATE-16) in Lewy body disease. *Neurobiol Dis* 43: 690-697, 2011
DOI: org/10.1016/j.nbd.2011.05.022
- ④ Miki Y, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of histone deacetylase 6, an aggresome-related protein, is specific to Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions. *Neuropathology* 31: 561-568, 2011
DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01200.x
- ⑤ Tanji K, Mori F, Mimura J, Itoh K, Kakita A,

Takahashi H, Wakabayashi K. Proteinase K-resistant α -synuclein is deposited in presynapses in human Lewy body disease and A53T α -synuclein transgenic mice. *Acta Neuropathol* 120: 145-154, 2010

DOI: 10.1007/s00401-010-0676-z

- ⑥ 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
DOI: 10.1007/s00401-010-0706-x
 - ⑦ 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
DOI: org/10.1016/j.nbd.2010.01.007
 - ⑧ 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
DOI: org/10.1016/j.neulet.2009.12.027
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Autophagosomal protein in alpha-synucleinopathy. 第2回国際アジア神経病理学会. 2011年11月5日. Beijing, China.
 - ② Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Existence of proteinase K-resistant α -synuclein in human Lewy body disease and A53T α -synuclein transgenic mice. 第17回国際神経病理学会. 2010年9月11日. Salzburg, Austria.
 - ③ 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.
 - ④ 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.
 - ⑤ 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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

丹治 邦和 (TANJI KUNIKAZU)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10271800
森 文秋 (MORI FUMIAKI)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60200383
小田桐 紗織 (ODAGIRI SAORI)
弘前大学・大学院医学研究科・助手
研究者番号：80374817

(3) 連携研究者

()

研究者番号：