

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500303

研究課題名 (和文) α シヌクレインの機能に関する分子神経生物学的研究研究課題名 (英文) Molecular neurobiological studies on the functions of α -Synuclein

研究代表者

上田 健治 (UEDA KENJI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：90261180

研究成果の概要 (和文)：

アルツハイマー病脳の不溶性成分の分析から我々が見出した α シヌクレインは、その遺伝子変異が家族性パーキンソン病の原因遺伝子として再同定された。そして、約90年間不明であったレビー小体という脳病理 (異常構造物) の主成分である事が判明した。しかし、 α シヌクレインの生理的機能は不明のままである。我々は、 α シヌクレインが脳神経細胞のミトコンドリア (細胞内エネルギー産生構造物) に存在する事を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

After the biochemical examination of SDS-insoluble materials of the brains with Alzheimer's disease, we identified human α -Synuclein by cDNA cloning. Later, some missense mutations of the gene of α -Synuclein were found in the cases with familial Parkinson's disease. α -Synuclein turned out to be the major component of Lewy bodies. In the present studies, we identified that α -Synuclein is localized in the inner membrane of neuronal mitochondria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シヌクレイン、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

我々がアルツハイマー病 (AD) 脳の SDS 不溶性成分の分析から未知分子として見出した α -Synuclein は、そのミスセンス変異が優性遺伝型パーキンソン病 (PD) の疾患責任遺伝子として同定された。生理的には α -Synuclein はシナプス前に多く局在しており、 α -Synuclein の機能異常や代謝異常がシナプスの機能異常から神経変性を来し、その

ことが parkinsonism や認知症という症状に繋がる可能性がある。

しかしこれまで多くの病的側面の研究が成されているが、 α -Synuclein の生理機能の詳細は依然不明のままであった。

2. 研究の目的

以上の背景から、これら α -Synuclein が関与する神経変性疾患の分子病理を真に理解

する為には、 α -Synuclein の生理機能を知ることが重要である。生理的狀態を熟知してこそ病理的狀態を良く知り得る。従って研究の主目的としては、 α -Synuclein の生理機能の基礎的解明に重点を置く。

3. 研究の方法

(1) α -Synuclein に対する特異抗体を作成し、神経細胞内の局在を免疫細胞組織科学的に検出し、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察する。

(2) 動物脳組織を用いて、細胞内器官を分離精製し、Western blot 法を用いて α -Synuclein を同定する。

(3) 動物脳を解剖し脳領域別に分離調製を行い、それぞれの脳領域別に α -Synuclein の発現の多寡を Western blot 法を用いて検討する。

(4) 上の(3)の検討の際、それぞれの脳領域からミトコンドリアのみを分離調製し、 α -Synuclein を検討する。

(5) 分離調製したミトコンドリアを用いて、 α -Synuclein の生化学的検討をする。

(6) 培養神経細胞に α -Synuclein を導入発現させ、細胞の病態生理を詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) 独自に開発した単クローン抗体を用いて、 α -Synuclein の脳神経細胞内の局在を、免疫電顕法を用いて詳細に検討したところ新たな知見が得られた。即ち、 α -Synuclein はシナプス前部、細胞核のみならず、ミトコンドリアに局在が確認された。ミトコンドリア外膜、内膜、その間隙、マトリックスそれぞれに局在する免疫電顕像が得られた。さらに、ラット脳を用いて脳領域別にミトコンドリアを単離精製して Western blot 解析したところ、神経変性し易い脳領域、即ち海馬、嗅球、線状体のミトコンドリアに α -Synuclein が多くみられた。精製したミトコンドリアに α -Synuclein を添加すると、 α -Synuclein の量に依存して複合体 I の活性が抑制された。これらから、 α -Synuclein の機能の一つとしてミトコンドリアでの機能の存在が確認され、複合体 I を抑制する事から、 α -Synuclein の異常、特に量的な増大が、ミトコンドリアの機能異常に直接関連する可能性が示唆された。

ミトコンドリアの異常は PD や AD 等の変性疾患で重要視されている病理である。上の成果から、ミトコンドリアにおける α -Synuclein の生理的な本来の発現量の多寡が、変性疾患脳においてミトコンドリア機能に悪影響を与える一因となって、ある一群のニューロンが特に変性し易くなっている可能性が示唆され、そのインパクトは大きい。

(2) PD の病理形成において、過剰リン酸化し

た α -Synuclein が関与していると考えられている。しかし、リン酸化した α -Synuclein の生理機能に関しては未だ確立していない。ドーパミン神経細胞株 MN9D に野生型 α -Synuclein と擬リン酸化 α -Synuclein を導入発現させ、ドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) を検討したところ、TH 自身の発現には影響は観られなかった。しかし、野生型 α -Synuclein を発現させた場合は明らかに TH の Ser40 のリン酸化とドーパミン生合成が抑制された。一方、S129D 擬リン酸化 α -Synuclein を発現させた場合は TH のリン酸化が促進され、ドーパミン生合成も促進された。さらに、野生型 α -Synuclein の過剰発現は MN9D への細胞毒性として現れたが、擬リン酸化 α -Synuclein を発現させた場合には細胞毒性は観られなかった。これらから、Ser129 がリン酸化された α -Synuclein の機能の一つとして、TH の活性制御に関わる可能性と細胞毒性を抑制する可能性が示唆された。 α -Synuclein のリン酸化の生理機能に関しては確定した証明が少なく、この成果のインパクトは大きい。

(3) PD の病理形成に関与する α -Synuclein はミトコンドリアに蓄積し、その機能に障害を与える事が知られている。我々は Adeno Associated Virus 発現系を用いてラット脳の黒質に α -Synuclein を発現させたところ、24 週間後にはチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性ニューロンはほぼ半減した。さらに、ミトコンドリアの形態にも異常を来し、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta \Psi_m$) は減極していた。免疫沈降実験と共焦点顕微鏡観察から、 α -Synuclein は adenylate translocator (ANT) と結合している事が示された。ANT の阻害剤である bongkrekic acid (BKA) が $\Delta \Psi_m$ の減極を部分的に無効にする事からも、 α -Synuclein が ANT と結合する事によって $\Delta \Psi_m$ の減極を促進する事が示唆された。これらの現象に加えて、ミトコンドリアマトリックスの apoptosis-inducing factor (AIF) の減少が観られた事から、AIF が細胞質に放出された可能性が示唆された。

これらの結果から、黒質のドーパミン作動性ニューロンにおいて α -Synuclein の過剰発現は、ミトコンドリア内の ANT と結合する事によりミトコンドリアの障害をもたらし、ミトコンドリア依存性の細胞死の経路を引き起こす可能性が示唆された。このミトコンドリアの機能異常が、PD におけるドーパミン作動性ニューロンの損傷と死に繋がっている可能性を示唆したインパクトは絶大である。

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6件)

- ① Uéda K, (9人中7番目) (2011) α -Synuclein overexpression impairs mitochondrial function by associating with adenylate translocator. *International J. Biochemistry and Cell Biology*, 査読有、Vol. 43, pp. 732-741
 - ② Uéda K, (8人中7番目) (2011) Phosphorylation of α -synuclein upregulates tyrosine hydroxylase activity in MN9D cells. *Acta Histochemica*, 査読有、Vol. 113, pp. 32-35.
 - ③ Uéda K, (10人中8番目) (2009) α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neuroscience Letters*, 査読有、Vol. 454, pp. 187-192.
 - ④ Uéda K, (8人中6番目) (2008) Semi-quantitative analysis of α -synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Research*, 査読有、Vol. 1244, pp. 40-52.
 - ⑤ Uéda K, (17人中11番目) (2008) Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human α -synuclein A30P+A53T transgenic mice with α -synuclein pathology. *Brain Research*, 査読有、Vol. 1250, pp. 232-241.
 - ⑥ Uéda K, (7人中6番目) (2008) Characterization of fibrillation process of α -synuclein at the initial stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、Vol. 369, pp. 910-914.
- [学会発表] (計13件)
- ① Shiroyama Y, Uéda K, et al. Shimotakahara S (2010) Analysis of contribution of dopamine of oligomeric intermediate in initial stage of α -Synuclein amyloidogenesis and the structural feature. BMB2010 The 33rd Mol. Biol. Soc. Jpn. and The 83rd Jpn. Biochem. Soc. Kobe [2010/12/08].
 - ② Goto A, Uéda K, et al. (2010) Novel microtubule regulatory molecules. BMB2010 The 33rd Mol. Biol. Soc. Jpn. and The 83rd Jpn. Biochem. Soc. Kobe [2010/12/07].

- ③ Sae-ung K, Govitrapong P, Uéda K, Phansuwan-Pujito P. (2010) Melatonin decreases α -synuclein in mesolimbic pathway of amphetamine-treated postnatal rats. The 10th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, APSN 2010, Phuket, Thailand [2010/10/20]
- ④ Uéda K, Chan P, et al. (2009) Wild-type α -Synuclein but not its mutants promotes proliferation of dopaminergic neuronal cells *in vitro*. *Mol. Biol. Soc. Jpn.* Yokohama [2009/12/11].
- ⑤ Uéda K, Yu S, et al. (2009) Mitochondrial α -synuclein is highly expressed in the brain regions where degeneration occurs. *Soc. Neurosci. Abstr.* 39: 630.11, Chicago, USA [2009/10/20]
- ⑥ Yu S and Uéda K (2009) Role of α -synuclein in microtubule assembly and neurite outgrowth. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, ISN, Satellite Symposium "Synucleinopathies—Mechanisms, models and therapeutic strategies," Beijing, China [2009/08/29]
- ⑦ Sae-ung K, Govitrapong P, Uéda K, Phansuwan-Pujito P (2009) Immunohistochemical study on α -synuclein expression within nigrostriatal pathway in amphetamine-treated postnatal rats, The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, ISN/APSN Joint Meeting, Busan, Korea [2009/08/24]
- ⑧ Boontem P, Phansuwan-Pujito P, Uéda K, Govitrapong P (2009) Immunocytochemical study of methamphetamine induced α -synuclein in SK-N-SH cells, The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, ISN/APSN Joint Meeting, Busan, Korea [2009/08/24]
- ⑨ Uéda K, Yu S, et al. (2009) Mitochondrial α -synuclein: Implications in neurodegenerative diseases, The 12th International Conference on Alzheimer's Disease, ICAD2009, Vienna, Austria [2009/07/15]
- ⑩ Yu S, Uéda K, et al. (2009) Normal expression and biological functions of α -synuclein, XXXIII Congress of the Italian Society of Histochemistry, Rome, Italy [2009/06/09]
- ⑪ Uéda K, Chan P, et al. (2008) α -Synuclein

promotes the cell growth of dopaminergic neurons *in vitro*. Soc. Neurosci. Abstr. 38: 342.10, Washington, DC, USA [2008/11/17]

⑫Grinberg LT, Ueda K, et al. (2008) The most frequent cause of dementia in a Brazilian sample: A neuropathological study, The 11th International Conference on Alzheimer's Disease, ICAD 2008, Chicago, USA [2008/07/27]

⑬Ueda K (2008) The biology and pathology of α -synuclein, Symposium " α -Synuclein in Neurodegenerative Disease," The 8th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, APSN 2008, Shanghai [2008/06/26]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 健治 (UEDA KENJI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：90261180