

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手B  
研究期間：2008-2010  
課題番号：20700327  
研究課題名（和文） 多系統萎縮症の神経細胞内 $\alpha$ -Synuclein タンパク質複合体動態解析  
研究課題名（英文）  
Analysis of  $\alpha$ -synuclein insoluble protein complex in multiple system atrophy (MSA)  
研究代表者  
中山 貴美子 (KIMIKO NAKAYAMA)  
国立長寿医療センター（研究所）研究資源有効利用室 外来研究員  
研究者番号：50416187

研究成果の概要（和文）：多系統萎縮症（MSA）は非遺伝性の神経変性疾患の1つで、発病から約10年以内に長期臥床状態になり、死にいたる神経難病である。病理学的特徴としては、神経細胞の脱落とグリア細胞における異常封入体（GCI）の形成が見られる。GCI構成成分として、 $\alpha$ -synuclein（以下、 $\alpha$ -syn）というタンパク質が含まれ、神経変性に関与することが指摘された。今日、MSA発病機序は不明で、機序の解明、診断・治療法確立が望まれている。MSAモデルマウスは、国立長寿医療センター矢澤らによって開発されたCNPasaのプロモーター制御下でヒト $\alpha$ -syn（SNCA）がオリゴドンドロサイト特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスで、神経細胞内でマウス $\alpha$ -syn（Snca）の不溶化が起こる。申請者はこれまでにSncaの作用ターゲット分子として $\beta$  III-tubulin（Tubb3）を同定した。本研究では、MSA発症時におけるSncaのTubb3との結合部位を同定し、結合阻害による $\alpha$ -synの蓄積制御からMSA治療法開発を目指す。2008年度までにTubb3の構成する微小管機能阻害の効果をモデルマウスの初代培養細胞系で検討し、微小管阻害剤Nocodazole投与したところ、Sncaの神経細胞内での不溶化の抑制を明らかにし、Tubb3との結合が不溶化に関与することを間接的に示した。2009年度はモデルマウスへの微小管機能阻害剤の経口投与を行い、特徴的な症状の緩和が起こることを示し、また、Tubb3の部分欠失変異体を作成、COS7発現系や大腸菌タンパク質発現系を用い、免疫沈降でTubb3のSnca結合部位の特定を進め、結合部位配列の絞込みにつながる成果を得た。

研究成果の概要（英文）：MSA is a non-hereditary neurodegenerative disease. Glial cytoplasmic and neuronal inclusions are characteristic markers in MSA pathology.  $\alpha$ -Syn, which predominantly exist at presynaptic terminals in the CNS has a tendency to aggregate into amyloid fibril. We generated the transgenic (Tg) mouse model, in which human wild type  $\alpha$ -syn was overexpressed in oligodendrocytes and prepared primary cultures of neurons and glial cells from the mice. Our previous studies revealed that the oligodendrocytic inclusions of  $\alpha$ -syn induced neuronal accumulation of  $\alpha$ -syn and progressive neuronal degeneration in a mouse model. Immunoblotting analysis of the sequential extracts showed that insoluble mouse  $\alpha$ -syn and  $\beta$ -III tubulin was detected in the insoluble fraction of cultured cell of Tg mice. Immunoprecipitation analysis showed that  $\beta$ -III tubulin was co-immunoprecipitated with  $\alpha$ -syn in the mouse neurons. We coexpressed the Snca and Tubb3 genes in COS7 cells and verified that mouse  $\alpha$ -syn directly bound to  $\beta$ -III tubulin to form insoluble complex formation. Moreover, the insoluble  $\alpha$ -syn accumulation was modulated by treatment with a microtubule-depolymerizing agent. Thus, we thought that it is important to prevent  $\alpha$ -syn from binding to  $\beta$ -III tubulin. To determine the  $\alpha$ -syn binding region on  $\beta$ -III tubulin, we constructed various truncated forms of  $\beta$ -III tubulin and revealed the  $\alpha$ -syn binding region by immunoprecipitation analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：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，多系統萎縮症， $\alpha$ -synuclein， $\beta$  III-tubulin

1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症 (MSA) は非遺伝性の神経変性疾患の1つで、発病から約10年以内に長期臥床状態になり、死にいたる神経難病である。日本におけるMSA患者は10万人に8人で、欧米との比較で1.5倍高い。MSAの病理学的特徴としては、神経細胞の脱落とグリア細胞における異常封入体 (GCI) の形成が見られる。GCIの構成成分として、 $\alpha$ -synuclein (以下、 $\alpha$ -synと略す) というタンパク質が含まれ、神経変性に関与することが指摘された。今日、MSA発病のメカニズムは不明で、メカニズムの解明、診断・治療法の確立が望まれている。 $\alpha$ -synは神経終末に局在するタンパク質で、濃度依存的に凝集することが報告されている (Giasson BI, et al. *J. Biol. Chem.* 274: 7619-22.1999)。 $\alpha$ -synの異常凝集による疾患には、MSAだけでなくパーキンソン病、アルツハイマー病などが含まれ、サイヌクレノパシーとしてまとめられている。 $\alpha$ -synの神経細胞内での病的な役割については未だ解明されておらず、本研究で $\alpha$ -syn凝集の機序を明らかにすることにより、MSAのみならず、サイヌクレノパシーの診断・治療への応用が可能であり、臨床面からの期待も大きい。GCI

の病的な役割を明らかにするために、国立長寿医療センター矢澤らによってMSAの疾患モデルマウスが開発された。モデルマウスは、オリゴデンドロサイト特異的なタンパク質である CNPase のプロモーター制御下でヒト $\alpha$ -synを過剰発現するトランスジェニックマウスで、以下のことを明らかにした (Yazawa I, et al. *Neuron.* 45: 847-59. 2005)。MSA患者と同様のオリゴデンドロサイトにおけるGCI様の封入体形成、不溶性の $\alpha$ -synの蓄積が確認され、中枢神経系の神経細胞やオリゴデンドロサイトの細胞数の減少、さらに、年齢依存的な進行性の運動機能障害が見られた。さらに、興味深い結果として、神経軸索・神経終末において $\alpha$ -synの蓄積が見られた。以上の結果から、オリゴデンドロサイトにおいてヒト $\alpha$ -synを過剰発現することにより、神経細胞の内在性マウス $\alpha$ -synの発現誘導される可能性が示された。モデルマウスの結果を踏えて、MSAにおける $\alpha$ -synの病的な作用は次のような過程を経ると考えた。オリゴデンドロサイトから神経細胞への $\alpha$ -syn (ならびに関連分子) の発現誘導作用、神経細胞での $\alpha$ -synの発現による神経機能の変化、そして、神経変性に至る。このことから、MSA病態解明には①オ

オリゴデンドロサイト由来の  $\alpha$ -syn および関連分子の発現調節機構の証明, および実行因子の同定, ②神経細胞内で発現上昇した  $\alpha$ -syn と相互作用する分子 (作用ターゲット) の同定, ③神経細胞での  $\alpha$ -syn、および関連分子の発現が神経機能へ及ぼす影響の解析をする必要がある。

これまでにマウス大脳由来の神経細胞及びグリア細胞の初代培養細胞を用いて, 以下のことを明らかにした。初代培養日数に応じてオリゴデンドロサイト内でのヒト  $\alpha$ -syn の発現増加を確認し, 以降の神経細胞においてマウス内在性  $\alpha$ -syn の発現上昇を認めた。さらに, 界面活性剤に対する溶解性による分画を行い, 各分画のイムノブロットを行なったところ, モデルマウスでは不溶性分画においてマウス内在性  $\alpha$ -syn を検出した。これは, グリア細胞のみの培養系や, オリゴデンドロサイトの増殖を抑制した培養系では見られなかった。さらに, 分画で  $\alpha$ -syn と同様の挙動を示し, また, 免疫沈降で  $\alpha$ -syn と結合するタンパク質 (作用ターゲット分子) として,  $\beta$  III-tubulin を明らかにした。また,  $\beta$  III-tubulin が構成する微小管機能を阻害すると, 内在性のマウス  $\alpha$ -syn の不溶化が抑えられることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では, MSA 発症時における  $\alpha$ -syn の作用ターゲット  $\beta$  III-tubulin と, その結合部位を明らかにし,  $\alpha$ -syn を含むタンパク質複合体形成機構の解明する。作用ターゲットの機能阻害, ならびに結合阻害で  $\alpha$ -syn の蓄積を制御し, MSA 治療法開発へつなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)  $\alpha$ -syn 遺伝子と  $\beta$  III-tubulin 遺伝子クローニング, 及び, 変異体の作製  
マウス脳から RNA を抽出し,  $\alpha$ -syn (*Snca*)

と  $\beta$  III-tubulin (*Tubb3*) の配列情報をもとに PCR を用いてクローニングを行った。また, *Tubb3* の *Snca* 結合部位を特定するために, *Tubb3* について, 様々な長さ, 部位をもつ変異体を作製した。

(2) 哺乳細胞によるタンパク質発現と共局在解析

① FLAG, 及び c-Myc 融合タンパク質の哺乳細胞における一過的発現系の作製

COS7 細胞に FLAG 融合 *Snca* (FLAG-*Snca*) 及び c-Myc 融合 *Tubb3* (c-Myc-*Tubb3*) の全長および変異体の一過的発現を行った。

② 蛋白質分画による解析

FLAG-*Snca* のみ発現, FLAG-*Snca* と c-Myc-*Tubb3* を共発現させた COS7 細胞を界面活性剤による溶解性で分画し, ウェスタンブロットで蛋白質の挙動を比較した。

③ 免疫染色による局在解析

COS7 細胞に FLAG-*Snca* 及び c-Myc-*Tubb3* の全長および変異体を発現させ, それぞれの抗体, またタグ抗体を用いて局在を解析した。

(3) 大腸菌による蛋白質発現系の作製

① *Snca*, *Tubb3* 全長および変異体蛋白質の精製

His タグ融合 *Snca*, 及び His タグ融合 *Tubb3* の全長および変異体を作製し, 大腸菌に発現させ, タグ結合カラムを用いて蛋白質の精製を行なった。

② 免疫沈降による結合部位決定

精製した *Snca* と *Tubb3* 全長, また *Tubb3* の変異体と混合し, *Snca* 抗体で免疫沈降し結合性を比較した。

(4) Tg マウスへの微小管阻害剤の経口投与, およびその効果

生後1ヶ月から24ヶ月まで Tg マウスに微小管阻害剤 Nocodazole の経口投与を行い, マウスの運動機能を解析した。また, 投与群, 非投与群の大脳のタンパク質分画を行い, ウ

エスタンプロットで解析した。

#### 4. 研究成果

(1) COS 7 細胞発現系を用いた Snca 蓄積と Tubb3 結合の関与の解析

FLAG-Snca のみ, FLAG-Snca と c-Myc-Tubb 3 とを共発現細胞させた COS 7 細胞を界面活性剤による溶解性で分画し, ウエスタンプロットで蛋白質の挙動を比較したところ, FLAG-Snca のみ発現した細胞では不溶性分画で  $\alpha$ -syn 抗体陽性のバンドは見られないが, FLAG-Snca と c-Myc-Tubb 3 と共発現細胞させた細胞では不溶性分画にバンドを確認した。また, FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行なった結果, Tubb 3 が共沈していることが確認できた。以上の異所性発現系の結果から, Snca が Tubb3 と結合して不溶性のタンパク質複合体を形成することを示した。Tubb3 変異体と Snca と共発現した細胞の免疫染色を行い, Tubb3 の C 末端側を含む変異体と共局在していることを明らかにした。

(2) 大腸菌発現系を用いた Tubb3 の Snca 結合部位解析

精製した Snca と Tubb3 全長, また Tubb3 の変異体と混合し, Snca 抗体を用いた免疫沈降で結合性を比較し, Snca と共沈する Tubb3 変異体から, Tubb3 の Snca 結合部位を 150 塩基まで絞り込んだ。

(3) Tg マウス経口投与による微小管阻害剤の効果

生後 1 ヶ月から 24 ヶ月まで Tg マウスに微小管阻害剤 Nocodazole の経口投与を行い, マウスの運動機能を解析した結果, 非投与群で見られる運動機能障害が, 投与群では改善した。また, 投与群, 非投与群の脳のタンパク質分画を行い, ウエスタンプロットで解析したところ, 投与群では非投与群で見られる不溶性の  $\alpha$ -syn のバンドが見られなかった。

#### 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 1 件)

Kimiko Nakayama, Yasuyo Suzuki, Ikuru Yazawa  
Microtubule Depolymerization Suppresses  $\alpha$ -Synuclein Accumulation in a Mouse Model of Multiple System Atrophy  
American Journal of Pathology, 174 巻, 2009, p1471-1480

[学会発表] (計 2 件)

中山貴美子, 鈴木康予, 矢澤生  
多系統萎縮症の  $\alpha$ -synuclein 蓄積の分子機構  
日本神経科学学会第 32 回大会, 2009 年 9 月 18 日 名古屋

中山貴美子, 鈴木康予, 矢澤生  
多系統萎縮症モデルマウスにおける  $\beta$ -III tubulin の  $\alpha$ -synuclein 蓄積への関与  
日本神経科学学会第 31 回大会, 2008 年 7 月 10 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山貴美子 (Kimiko Nakayama)  
国立長寿医療センター (研究所)・研究資源有効利用室・外来研究員  
研究者番号: 50416187