

## 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 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591085

研究課題名（和文）

Lewy 小体のコアを構築する Synphilin-1 の分解および凝集機構の解析

研究課題名（英文） Analyses on the mode of proteolysis and aggregation of synphilin-1 that constitutes the core of Lewy bodies

研究代表者

高橋 哲也（TAKAHASHI TETSUYA）

広島大学・病院・講師

研究者番号：00435942

研究成果の概要（和文）：

神経変性疾患では特定の蛋白質の分解の異常が封入体の形成と神経細胞死に関係していると考えられている。パーキンソン病においては Synphilin-1 が Lewy 小体（封入体）を構成する蛋白質の一つである。われわれは細胞内膜輸送の観点から封入体の形成を解析し、ESCRT 経路が Lewy 小体の形成に関与している可能性を明らかにした。この経路は他の神経変性疾患でも封入体形成への関与が示唆された。また培養細胞を用いて Synphilin-1 の Siah-1 によるユビキチン化が ESCRT 経路へ至るシグナルであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Impairments in the proteolytic process of disease-specific proteins have been assumed to be the cause of the formation of neuronal inclusions and subsequent neuronal cell death. In Parkinson's disease, Synphilin-1 is one of the constituents of Lewy bodies that characterize Parkinson's disease pathologically. We hypothesized that the perturbation of intracellular vesicle trafficking is the underlying cause which leads to the formation of neuronal inclusion, and elucidated that ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) pathway is implicated in the Lewy bodies formation. We also demonstrated that ubiquitination of Synphilin-1 by Siah-1 is a signal that recruit Synphilin-1 to ESCRT pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：①脳神経疾患 ②神経科学 ③蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$ -synuclein 結合蛋白質として同定された Synphilin-1 は、 $\alpha$ -synuclein とともにパーキンソン病を病理学的に特徴付ける Lewy 小体の構成蛋白である ( $\alpha$ -synuclein が Lewy 小体の周辺部=ハローに存在するのに対して、Synphilin-1 は Lewy 小体の中心部=コアに存在する)。 $\alpha$ -synuclein、Synphilin-1 両者の代謝 (分解) の異常が、両蛋白質の蓄積凝集すなわち Lewy 小体形成の原因と考えられている。本研究に先駆けて、我々はユビキチンリガーゼの Siah-1 が Synphilin-1 のユビキチン化ならびにそれに引き続く分解に関与していることを明らかにしていた。また Siah-1 と Synphilin-1 の共発現系細胞モデルを用いて Siah-1/Synphilin-1 が autophagic vacuole に類似の空胞を培養細胞内に形成することを見出していた。

## 2. 研究の目的

本研究では Siah-1 によりユビキチン化された Synphilin-1 が細胞内小胞輸送過程を経て分解されるという仮説に基づき、特に Lewy 小体について ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) 経路の関与を病理学的に検討し、細胞生物学的に検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. Lewy 小体の免疫組織学的検討

パーキンソン病患者剖検脳を対象に、ESCRT 経路に関与する各蛋白質複合体 (ESCRT 0~III) のサブユニット蛋白質の免疫染色を行い、Lewy 小体形成に ESCRT 経路が関与するのか検討した。疾患対象として同じく  $\alpha$ -synuclein が封入体を形成する神経変性疾患である多系統萎縮症の剖検脳でも同様に検討した。また  $\alpha$ -synuclein が封入体の基本的な構成要素とならないアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症についても検討した。

### 3-2. 細胞モデルを用いた Lewy 小体の分子生物学的検討

Siah-1/Synphilin-1 を HEK293T 細胞にトランスフェクトしたのちプロテアーゼインヒビターの MG-132 存在下で2日間培養すると、多房性の空胞が観察され、この空胞は Siah-1、Synphilin-1 両者が陽性である。Synphilin-1 を  $\alpha$ -synuclein に置き換えた場合でも同様の構造物が観察されることから in vivo での検討では Siah-1/Synphilin-1 強制発現系を用いた。4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した後、エンドソーム、ESCRT 経路、autophagy に関与する蛋白質を認識する抗体で免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. Lewy 小体の免疫組織学的検討

ESCRTIII 複合体のサブユニット蛋白質の CHMP (charged multivesicular body protein) 2B ならびに CHMP4B がパーキンソン病患者の中脳黒質ならびに青斑核の Lewy 小体 (ハロー) において、 $\alpha$ -synuclein と共存していた。また延髄迷走神経背側核には未知の CHMP2B 陽性の顆粒状構造物が観察された。本構造物は Lewy 小体の増加とともに減少する傾向があり、Lewy 小体の前駆体である可能性が示唆された。多系統萎縮症においても CHMP2B は  $\alpha$ -synuclein で構成される glial cytoplasmic inclusion にて陽性であった。

一方、その他の神経変性疾患であるアルツハイマー病では顆粒空胞変性が、筋萎縮性側索硬化症では skein like inclusion が免疫染色にて CHMP2B 陽性であった。

以上のことから Lewy 小体の形成過程に ESCRT 経路が関与していることが示唆された。またその他の神経変性疾患でも同様に一部の封入体に ESCRT 経路が関与している可能性があり、ダイナミックな細胞内膜輸送が普遍的に神経変性疾患に関与しているものと考えられた。

### 4-2. 細胞モデルを用いた Lewy 小体の分子生物学的検討

今回 Lewy 小体の in vivo モデルとした Siah-1/Synphilin-1 強制発現系で観察される空胞の形成にも細胞内膜輸送の異常が関与していることが考えられたため、細胞免疫学的検討によりその本態を解析した。本空胞は p62、ユビキチン (k48、k63)、valosin-containing protein (VCP1)、early endosomal antigen 1 (EEA1) が陽性であり、LAMP3、CHMP2B、HDAC6、LC3 陰性は陰性であった。ドミナントネガティブ CHMP2B の CHMP2B  $\Delta$ 10 をトランスフェクトさせた場合でも空胞の数、大きさに変化は認められなかった。これらの結果は本モデルの空胞が実際には Lewy 小体と異なり初期エンドソームに関連した構造であることが示された。つまり今回の実験系では Lewy 小体の本態と考えられる late endosome にまでは至らなかったが、Synphilin-1 が ESCRT 経路へ recruit されるためのシグナルがユビキチン化であることが示された。

## 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 10 件)

1. Yamazaki Y, Matsubara T, Takahashi T, Kurashige T, Dohi E, Hiji M, Nagano

- Y, Yamawaki T, Matsumoto M. Granulovacuolar degenerations appear in relation to hippocampal phosphorylated tau accumulation in various neurodegenerative disorders. *PLoS One*. 6(11):e26996. 2011. (査読あり)
2. Takahashi I, Geyer SM, Nishi N, Ohshita T, Takahashi T, Akahoshi M, Fujiwara S, Kodama K, Matsumoto M. Lifetime risk of stroke and impact of hypertension: estimates from the adult health study in Hiroshima and Nagasaki. *Hypertens Res*. 34(5):649-54. 2011. (査読あり)
  3. Yuge L, Sasaki A, Kawahara Y, Wu SL, Matsumoto M, Manabe T, Kajiume T, Takeda M, Magaki T, Takahashi T, Kurisu K, Matsumoto M. Simulated Microgravity Maintains the Undifferentiated State and Enhances the Neural Repair Potential of Bone Marrow Stromal Cells. *Stem Cells Dev*. 20(5):893-900, 2011. (査読あり)
  4. Kondo K, Maruishi M, Ueno H, Sawada K, Hashimoto Y, Ohshita T, Takahashi T, Ohtsuki T, Matsumoto M. The pathophysiology of prospective memory failure after diffuse axonal injury--lesion-symptom analysis using diffusion tensor imaging. *BMC Neurosci*. 11:147, 2010. (査読あり)
  5. Yamazaki Y, Takahashi T, Hiji M, Kurashige T, Izumi Y, Yamawaki T, Matsumoto M. Immunopositivity for ESCRT-III subunit CHMP2B in granulovacuolar degeneration of neurons in the Alzheimer's disease hippocampus. *Neurosci Lett*. 477(2):86-90, 2010. (査読あり)
  6. Miura H, Hashida K, Sudo H, Awa Y, Takarada-Iemata M, Kokame K, Takahashi T, Matsumoto M, Kitao Y, Hori O. Deletion of Herp facilitates degradation of cytosolic proteins. *Genes Cells*. 15(8):843-53, 2010. (査読あり)
  7. Yamamoto K, Seki T, Adachi N, Takahashi T, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. Mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) is selectively degraded by autophagy. *Genes Cells*. 15(5):425-38. 2010 (査読あり)
  8. Shrestha I, Takahashi T, Nomura E, Ohtsuki T, Ohshita T, Ueno H, Kohriyama T, Matsumoto M. Association between central systolic blood pressure, white matter lesions in cerebral MRI and carotid atherosclerosis. *Hypertens Res*. 32:869-74, 2009. (査読あり)
  9. 末田 芳雅, 高橋 哲也, 越智 一秀, 大槻 俊輔, 滑川 道人, 郡山 達男, 瀧山 嘉久, 松本 昌泰 新規*GFAP*遺伝子変異 (S398F) を認めた成人型Alexander病の1例 臨床神経 49(6):358-63, 2009. (査読あり)
  10. Isha S, Ohtsuki T, Takahashi T, Nomura E, Kohriyama T, Matsumoto M Diagonal ear-lobe crease is correlated with atherosclerotic changes in carotid arteries. *Circulation J*. 73:1945-9, 2009. (査読あり)
- [学会発表] (計 5 件)
1. 高橋哲也、倉重 毅志、山崎 雄、日地 正典、山脇 健盛、松本 昌泰 「顆粒空胞変性は神経原線維変化の随伴所見か？」第 52 回日本神経学会総会 2011.5.18-20 東京
  2. Tomoyasu Matsubara, Tetsuya Takahashi, Takashi Kurashige, Yuu

Yamazaki, Masanori Hiji, Yuishin  
Izumi, Takemori Yamawaki,  
Masayasu Matsumoto  
“Granulovacuolar degenerations are  
associated with taupathology”  
International congress of  
neuropathology 2010.9.11 – 15  
Salzburg, Austria

3. 高橋哲也、砂川 融、越智一秀、山脇  
健盛、郡山達男、松本昌泰 「後骨間  
神経に「くびれ」を呈し、神経剥離術  
が有効であった1症例」第28回日本  
神経治療学会 2010.7.15 – 16 横浜
4. 高橋哲也 「パーキンソン病患者にお  
けるGERD(gastro-esophageal  
reflux disease)有病率について」第3  
回パーキンソン病・運動障害疾患コン  
GRESS、2009.10.8 – 10 東京
5. 高橋哲也、日地正典、郡山達男、松本  
昌泰 「運動ニューロン病におけるエン  
ドソーム関連蛋白の免疫染色性」  
第50回日本神経学会総会 2009.5.20  
– 22 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 哲也 (TAKAHASHI TETSUYA)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：00435942

(2) 研究分担者

松本 昌泰 (MATSUMOTO MASAYASU)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教  
授  
研究者番号：20192346

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：