

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700363

研究課題名(和文)p62とNrf2がシヌクレイン封入体の形成に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文)Effects of p62 and Nrf2 for alpha-synuclein aggregation

研究代表者

小田桐 紗織(Odagiri, Saori)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・流動研究員

研究者番号：80374817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：p62はレビー小体等の細胞内封入体の構成成分であり、封入体形成の早期から関与することが知られている。しかし本研究でシヌクレインTgマウス(A53変異)とp62K0マウスを交配し作製したTg/K0マウスにおいてもリン酸化シヌクレイン陽性封入体が形成された。そこでp62以外に封入体形成に関与していると思われるNBR1、Keap1の発現量を調べるためwestern blot法を行ったところ、Tg/K0マウスにおいてこれら2つの分子の発現量が増加しており、特にp62と機能的・構造的に類似したNBR1が有意に増加していたことから、NBR1はp62の欠損を補うため上方制御され得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：p62 is highly involved with intracellular proteolysis, and it is a component of the ubiquitin-positive inclusions that are observed in various neurodegenerative disorders. In LBD such as dementia with LBs and Parkinson's disease, p62 is localised in LB; furthermore, several lines of evidence show that disrupted proteolysis occurs in this disorder. We used a mouse model of LBD that lacks p62. Immunohistochemical analyses showed that LB-like inclusions were observed in transgenic mice that overexpressed alpha-synuclein (Tg mice) with or without the p62 protein. However, a p62 deficiency enhanced alpha-synuclein pathology with regards to the number of inclusions and staining intensity compared with Tg mice that expressed p62. Furthermore we determined that NBR1 is significantly increased in Tg mice without p62. These findings suggest that p62 and NBR1 effect the pathogenesis of neurodegenerative diseases through the cooperative modulation of alpha-synuclein aggregation.

研究分野：総合領域

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 p62 シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の多くは蛋白凝集病とみなすことが可能であり、パーキンソン病やアルツハイマー病はその代表である。そして、神経変性疾患に認められる細胞内封入体は神経細胞死と関連した構造物であると考えられてきた。しかし、封入体が細胞変性を反映する構造物であるとしても、それは必ずしも封入体そのものが細胞死を導くことを意味するものではない。最近、パーキンソン病では細胞障害性に作用しているのはシヌクレインの中間生成物(プロトフィブリル、オリゴマー)であり、レビー小体などの線維性構造物は細胞障害性に作用する物質を無毒化するために形成されるとの仮説が提唱されている(PLoS ONE 2010)。さらに、パーキンソン病の黒質ではレビー小体含有ニューロンにおいてドパミン産生の低下が生じていることが報告されている(J Neuropathol Exp Neurol 2006)。ドパミン低下がシヌクレインの中間生成物の形成を抑制することを併せ考えると、これらの知見はレビー小体の形成が細胞保護に働いている可能性を示唆する。

我々は蛋白分解能の低下が異常蛋白の蓄積、凝集を促進し、神経変性を招くとの立場からユビキチンおよびユビキチン様蛋白の機能解析を行ってきた。その一つにユビキチン結合蛋白である p62 (sequestosome 1) がある。p62 はレビー小体や神経原線維変化を含む細胞内封入体の構成成分であり、封入体形成の早期から参画していることが知られている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト α シヌクレイン遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウス(A53T SNCA-TG: 生後8ヶ月から運動失調を呈し細胞内封入体が出現)と p62 ノックアウトマウス(p62-KO)を交配して作成した4系統のマウス(WT; 野生型、KO; p62KO、Tg; α -synuclein^{+/+}/p62^{+/+}、Tg/KO; α -synuclein^{+/+}/p62^{-/-}、background; C57BL/6J)を用いて、ユビキチン結合蛋白である p62 が封入体の形成または分解に及ぼす影響を、神経変性疾患であるシヌクレインopathyの標的分子(α シヌクレイン)に焦点を当て解析することを目的とした。

3. 研究の方法

4系統のマウス(WT, KO, Tg, Tg/KO)の脳内病変部位における封入体数の比較のため、(1)病理組織学的解析として4%パラホルムアルデヒドで経心的に灌流固定したのち、4 μ m厚のパラフィン切片を作成し、リン酸化 α シヌクレインに対する抗体を用いて免疫染色を行った。また、(2)生化学的解析としてp62およびその関連分子の発現量を比較するためウェスタンブロット法を行いNIH Image Jにより定量化比較を行った。さらに、Tg, Tg/KOマウスの海馬のシナプス終末にはプロテインキナーゼ処理に耐性のある α シヌクレインが凝集することから(3)学習行動試験として水迷路試験を、また得られた結果から強制水泳試験を行った。

4. 研究成果

(1)ヒト α シヌクレイントランスジェニックマウスにおいて p62 の欠損はリン酸化 α シヌクレイン陽性封入体の形成を増強する

p62 のリン酸化 α シヌクレイン陽性封入体の形成または分解に及ぼす影響を調べるため、リン酸化 α シヌクレインに対する抗体を用い、4系統のマウス(WT, KO, Tg, Tg/KO)から作成したパラフィン切片に免疫染色を行った。

その結果、Tg および Tg/KO マウスにおいてリン酸化 α シヌクレイン陽性封入体の形成が認められ(図1A)、視床においてはTg/KOマウスではTgマウスと比較して有意に封入体対数が増加していることが確認された(図1B)。また、海馬においてはTg, Tg/KOマウスのシナプス終末にはプロテインキナーゼ処理に耐性のある α シヌクレインが凝集していた。

これらの結果から、ヒト α シヌクレイントランスジェニックマウスにおいてはp62の有無にかかわらず封入体が形成され、またp62欠損により、封入体の形成が増強されることが推測された。

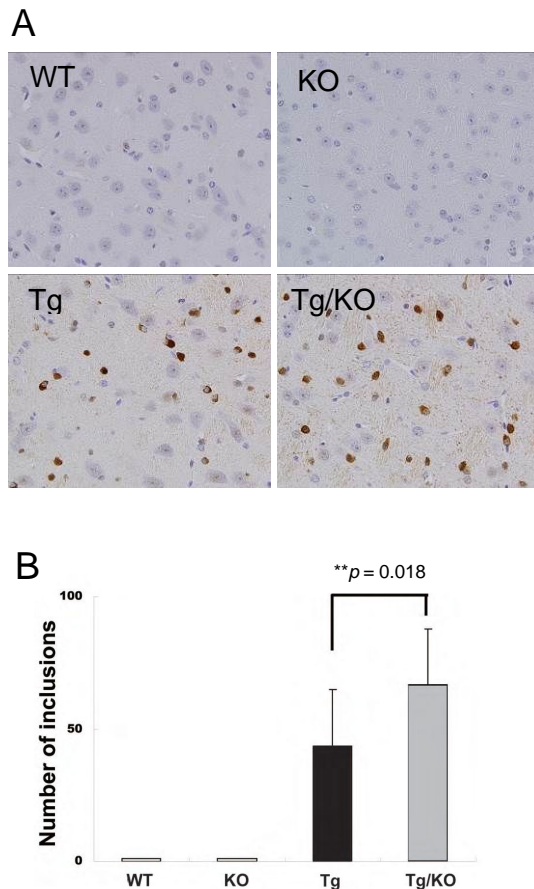


図1 Tgおよび Tg/KO マウスにおいてリン酸化 α シヌクレイン陽性封入体の形成が認められ(図1A)、Tg/KO マウスでは Tg マウスと比較して有意に封入対数が増加している(図1B)。

(2) p62KO、および Tg/KO マウスにおいて NBR1 発現量が増加する

免疫染色の結果より、ヒト α シヌクレイントランスジェニックマウスにおいて p62 の有無にかかわらず封入体が形成されたことから、p62 関連タンパクである Keap1 (p62 と相互作用するユビキチンリガーゼ複合体) ならびに NBR1 (p62 と相互作用するユビキチン化蛋白レセプター・アダプター) の発現量比較のため、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、Keap1、NBR1 共に脳内の発現量は p62 欠損マウス、特に Tg/KO において有意に増加しており(図2)。また p62 と機能的・構造的に類似した NBR1 においては、定量 PCR においても p62 を欠損した KO および Tg/KO マウスにおいて mRNA 発現量が有意に増加していた。このことにより、NBR1 は p62 の欠損を補うため上方制御され得ることが示唆された。

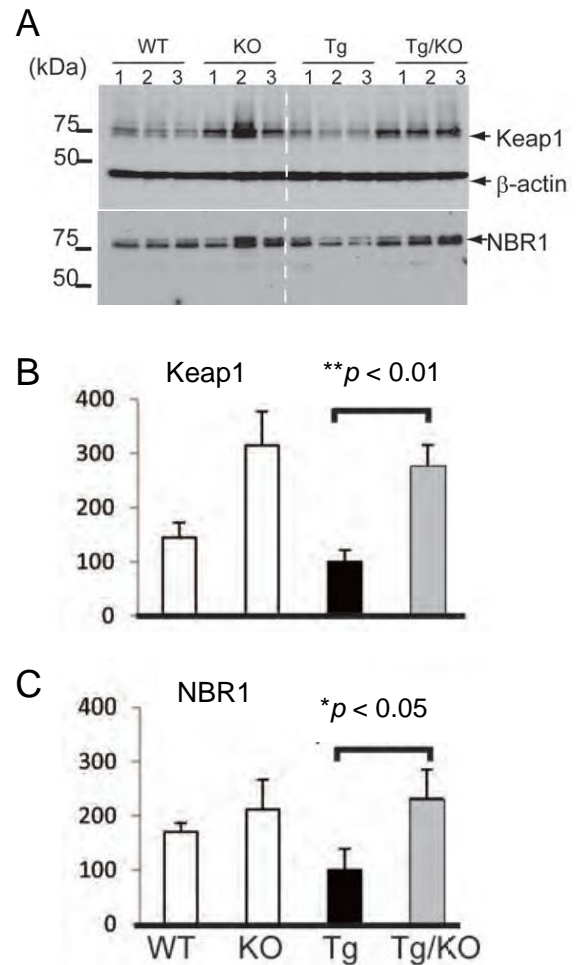


図2 4系統のマウス(WT, KO, Tg, Tg/KO)におけるウェスタンブロット解析(図2A) p62 関連分子である Keap1 (図2B) および NBR1 (図2C) の脳内発現量は p62 を欠損した Tg/KO マウスにおいて、Tg マウスより顕著に発現量が増加していた。

(3) 行動試験において p62 欠損マウス(KO) は顕著な不動症状を示す

免疫染色の結果、Tg、Tg/KO マウスの海馬のシナプス終末においてプロテインキナーゼ処理に耐性のある α シヌクレインが凝集していたことから、記憶学習試験としてモリスの水迷路試験を行った。方法としてプラットホームのある状態で1回120秒のトレーニングを1日2回、5日連続で行い、5日目のトレーニングの2時間後にプラットホームを外し probe test を行った。その結果、WT、Tg マウスにおいては、トレーニング中徐々にプラットホームにたどり着くまでの時間が減

少していったが、KO、Tg/KO マウスでは時間の減少は認められなかった。また probe test において KO、Tg/KO マウスはプラットフォームを設置していた場所にたどり着くまでに長い時間を要し (図 3A)、さらに KO マウスではテスト中、うつ様症状によく似た不動を示した (図 3B)。そこで追加試験として強制水泳試験を行ったところ、Tg/KO マウスでは WT と比較して試験中の不動時間に差は認められなかったが、KO マウスでは顕著に不動時間の増加がみられた (図 3C)。これらのことから、p62 はストレス応答や逃避に対する意欲といった神経機能の維持に関わることが示唆された。

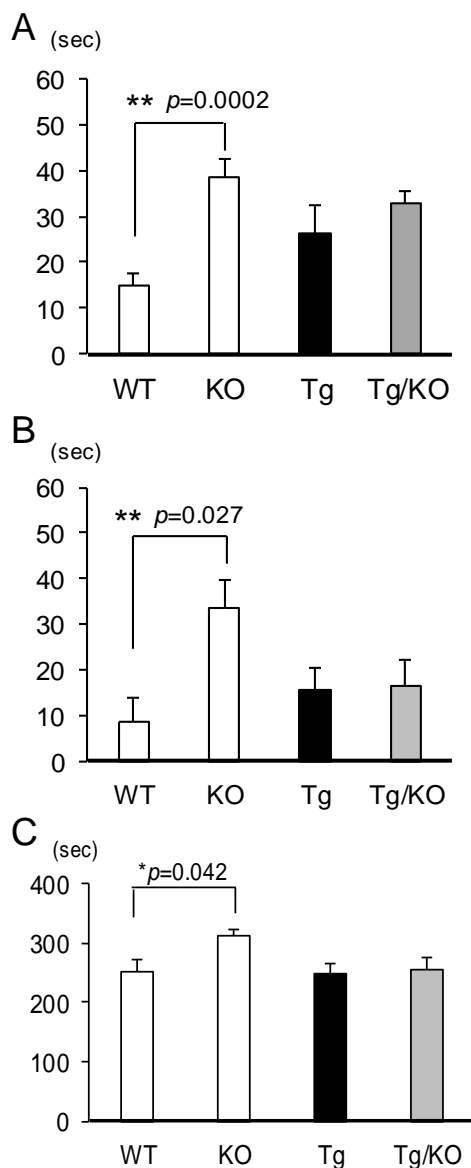


図 3 モーリスの水迷路試験では、p62 を欠損した KO、Tg/KO マウスはプラットフォームを設置していた場所にたどり着くまでに

かる時間が長く (図 3A)、KO マウスは顕著な不動を示した (図 3B)。強制水泳試験においても、KO マウスは顕著な不動時間の増加を示した (図 3C)。

以上より、ヒト α シヌクレインを過剰発現させたマウスにおいては、p62 欠損によりリン酸化 α シヌクレイン陽性封入体形成が増強されることから、封入体の形成には必ずしも必要でないこと、また、p62 の関連分子であり機能的・構造的に類似した NBR1 が p62 の欠損を補う代償的役割をし得ることが示唆された。本研究の内容に関しては現在論文投稿中である。また今後は、当初予定していたストレス防御タンパクである Nrf2 がシヌクレイン封入体の形成に及ぼす影響についても検討する。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

丹治邦和、丸山淳史、小田桐紗織、森文秋、伊藤健、柿田明美、高橋均、若林孝一「神経変性疾患脳におけるユビキチンリガーゼ Keap1 の解析」第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2013 年 4 月 25 日、東京都、タワーホール船堀)

小田桐紗織、丹治邦和、森文秋、柿田明美、高橋均、若林孝一「神経変性疾患における autophagic adapter protein (NBR1) の関与」第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2013 年 6 月 30 日、新潟県、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田桐 紗織 (ODAGIRI SAORI)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・流動研究員

研究者番号：80374817

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：