

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430050

研究課題名(和文) レビー小体病における異常シヌクレインの早期認識機構：NUB1の役割

研究課題名(英文) Involvement of NUB1 in the early phase of Lewy body disease

研究代表者

丹治 邦和 (TANJI, Kunikazu)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：10271800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルファシヌクレイン(Syn)は家族性および孤発性パーキンソン病の原因遺伝子または危険因子である。レビー小体病などの病的状況下ではSynは不溶性となり、異常Synとして神経細胞の前シナプスなどに蓄積している。我々はこれまでに異常Synの結合タンパク質の一つとして新規ユビキチン様タンパク質NUB1を同定した。今回、生体での異常Synの機能を明らかにするために、SynとNUB1を発現するダブルトランスジェニックマウスを作製し、生化学的、病理学的に解析した。またヒト脳サンプルからNUB1を単離した結果、レビー小体病ではNUB1は異常にリン酸化を受けていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal  $\alpha$ -synuclein (Syn) is deposited in neuronal cytoplasmic inclusions and presynapses in Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB). Previously we have shown that NUB1 is accumulated in these specific regions together with abnormal Syn and that NUB1 is able to inhibit  $\alpha$ -synuclein aggregation in cultured cells. We therefore created transgenic (Tg) mice expressing both NUB1 and abnormal Syn to investigate the role of NUB1 on degradation of abnormal Syn in vivo. Immunohistochemical and biochemical studies confirmed that NUB1 was over-expressed in neurons of mice expressing NUB1 (NUB1 Tg), and both NUB1 and abnormal Syn (double Tg). Normal and abnormal Syn levels were unchanged between abnormal Syn Tg mice (Lewy body disease model mice) and double Tg mice. Pathological observations were almost similar between them. Biochemical analyses showed that level of insoluble Syn were lower in double Tg mice compared with abnormal Syn Tg mice.

研究分野：分子神経病理学

キーワード：脳神経疾患 レビー小体病 シャペロン分子

### 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$ シヌクレイン (Syn) は家族性および孤発性パーキンソン病の原因遺伝子かつ危険因子である。Syn は生理的状況下では、前シナプスに局在しており、タンパク質分解酵素で容易に可溶化される。一方、レビー小体病などの病的状況下では Syn は不溶性となり、神経伝達物質の貯蔵および放出の調節が損なわれる可能性がある。我々は不溶性 Syn の結合タンパク質の一つとして新規コピキチン様タンパク質 NUB1 を同定した。また、NUB1 は効率的なタンパク質分解機能を有することをこれまでに報告してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では以下 2 点を明らかにすることを目的とした。

1. 作製した NUB1 過剰発現マウスを用いて、生体における異常 Syn および、その結合分子 NUB1 の特徴を明らかにする。
2. 作製した NUB1 特異抗体を利用して NUB1 の性状を明らかにする。

### 3. 研究の方法

家族性の点突然変異 (A53T) を導入した Syn トランスジェニック (Tg) マウスならびに NUB1 Tg を用いて、ダブル Tg マウスを作製した。さらにレビー小体病 (パーキンソン病およびレビー小体型認知症) 剖検例を用いた。本研究における動物実験計画は、弘前大学動物実験委員会により承認され、弘前大学実験動物に関する指針に遵って行った。遺伝子組み換え動物使用に当たっての拡散防止処理を踏まえ、組み換え DNA 実験の弘前大学動物倫理委員会の承認を得ている。本研究に使用するヒト剖検脳は本研究室に保管、または新潟大学脳研究所から入手しており、いずれも書類による審査を経て、使用しており倫理上問題はない。

### 4. 研究成果

(1) NUB1/ Syn ダブル Tg マウスを作製し (図 1) 行動学的および病理学的に検討した。Syn Tg マウスおよび NUB1/Syn ダブル Tg マウスともに海馬および大脳皮質の前シナプスにおいて異常 Syn が蓄積していた。蓄積構造物の程度に差は認められなかったが、TritonX-100 に不溶性を示す Syn の量が NUB1/Syn ダブル Tg マウスでは有意に減少していた (図 2)。

(2) 初年度に作製した NUB1 抗体を用いてヒト凍結脳から NUB1 を免疫沈降した。その結果、レビー小体病では NUB1 の異常リン酸化が確認された。

(3) リン酸化 NUB1 による凝集体への影響を培養細胞を用いて検討した。2 種類の凝集体 (レビー小体様凝集物および異常ハンチンチンの凝集体) を指標にした。(1) N 末端側のリン酸化 NUB1 において凝集体形成が促進された。(2) 同じ N 末端側のリン酸化 NUB1 において細胞毒性が軽減された。なお、このリン酸化部位に対するリン酸化 NUB1 特異抗体を作製した。

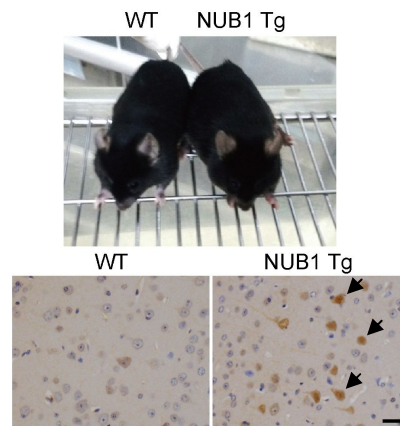


図 1 作製した NUB1 Tg マウスと病理組織像  
正常マウス (Wt) と NUB1 Tg マウスは見たためでは区別できない。NUB1 抗体を用いて脳内を免疫染色すると NUB1 Tg マウスでは Wt に比べて強い染色性が認められる (矢印)。Bar=20  $\mu$ m

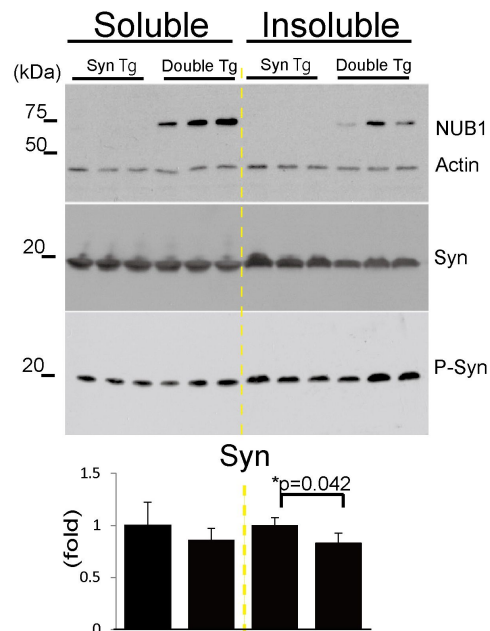


図 2 遺伝子改変マウス脳内における不溶性 Syn の比較  
Syn Tg マウスおよび NUB1/Syn ダブル

Tg(Double Tg)マウスの脳を用いて、TritonX-100の有無によりタンパク質を抽出した。Syn Tg マウスでは不溶性 Syn の量が Syn Tg マウスに比べて有意に減少していた。リン酸化 Syn (P-Syn) に関しては有意差はなかった。

(総括として) レビー小体病に認められる異常 Syn は病態に直結しているため、簡易に検出できれば、病態解明ばかりでなく、早期診断にも応用できる。しかし、これまで技術面で問題があり実現できていない。そこで本研究では異常 Syn の結合分子である NUB1 に着目し、大きく2つの結果を得た。(1) 遺伝子改変マウスを用いた解析から NUB1 は異常 Syn の溶解性を変化させること。(2) レビー小体病の脳内では NUB1 は異常リン酸化されていること。また、C 末端側のあるリン酸部位が凝集性を促進し、細胞障害を軽減すること。これらの結果はシヌクレイノパチーの病態解明にむすびつくと同時に異常 Syn の検出技術へ応用できる可能性がある。

#### 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10件)

#### 以下のすべての論文は査読有

Tanji K, Miki Y, Maruyama A, et al.: The role of NUB1 in alpha-synuclein degradation in Lewy body disease model mice. **Biochem Biophys Res Commun**, 470(3): 635-642, 2016

Miki Y, Tanji K, Mori F, et al.: AMBRA1, a novel alpha-synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy. **Brain Pathol**, (in press).

Yamazaki H, Tanji K, Wakabayashi K, et al.: Role of the Keap1/Nrf2 pathway in neurodegenerative diseases. **Pathol Int**, 2015; 65(5): 210-219.

Tanji K, Odagiri S, Miki Y, et al.: p62 Deficiency Enhances alpha-Synuclein Pathology in Mice. **Brain Pathol**, 2015; 25(5): 552-564.

Tanji K, Miki Y, Maruyama A, et

al.: Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease. **Biochem Biophys Res Commun**, 2015; 465(4): 746-752.

Miki Y, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K. Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, 2015; 74: 25-31.

Yoshida H, Meng P, Matsumiya T, et al.: Carnosic acid suppresses the production of amyloid-beta 1-42 and 1-43 by inducing an alpha-secretase TACE/ADAM17 in U373MG human astrocytoma cells. **Neurosci Res**, 2014; 79: 83-93.

Tanji K, Miki Y, Ozaki T, et al.: Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain. **Acta Neuropathol Commun**, 2014; 2: 50.

Mori F, Toyoshima Y, Tanji K, et al.: FUS colocalizes with polyglutamine, but not with TDP-43 in neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 2014; 40(3): 351-355.

Miki Y, Mori F, Kon T, et al.: Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. **Neuropathology**, 2014; 34(2): 148-158.

[学会発表](計5件)

Trehalose administration inhibits inflammatory responses in the brain of Lewy body disease model mice. 16th International Congress of Immunology: 2016年8月21-26日、Melbourne, Australia.

レビー小体病における synphilin-1 結合タンパク質 (NUB1) の役割. 第57回日本神経病理学会、2016年6月1-3日、ホテルニューキャスル(青森県・弘前市)

レビー小体病における p62 の役割.

第 56 回日本神経病理学会、2015 年 6 月 3-5 日、九州大学医学部百年講堂（福岡県・福岡市）

アルツハイマー病脳におけるリン酸化 p62 の検討。第 55 回日本神経病理学会、2014 年 5 月 5-7 日、学術総合センター（東京都）

The effect of disaccharide, trehalose, on the formation of alpha-synuclein-positive inclusions. 16th International Congress of Immunology: 2014 年 9 月 14-18 日、Rio de Janeiro, Brazil.

〔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

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

##### (2) 研究分担者

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