

平成21年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590979
 研究課題名(和文) パーキンソン病治療標的としてのリン酸化 シヌクレインの生物学的解析
 研究課題名(英文) Biological analysis of phosphorylated α -synuclein as a therapeutic target for Parkinson's disease
 研究代表者
 荒若 繁樹 (ARAWAKA SHIGEKI)
 山形大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：00344789

研究成果の概要：

パーキンソン病 (PD) のレビー小体を構成する シヌクレイン (S) の 129 番目セリン残基のリン酸化が、S の毒性を促進させる可能性がある。本研究課題は S リン酸化反応を検討し、1) SH-SY5Y 細胞で GRK3、GRK5、GRK6、CK2 がリン酸化に関与、2) S の細胞内局在により寄与するキナーゼが異なる、3) AAV ウイルスで S とキナーゼをラット中脳黒質に共接種しドパミン神経細胞死を生ずる系の作製に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2800,000	840,000	3640,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3300,000	990,000	4290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：神経生化学、神経病態科学、神経変性疾患、パーキンソン病、シヌクレイン、リン酸化、キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) の治療法の開発には、本態である中脳ドパミン神経細胞の変性機構を解明し、治療標的候補を探さなくてはならない。私たちは、PD の疾患感受性遺伝子として G タンパク質共役型キナーゼ 5 (GRK5) を見出し、GRK5 は PD を特徴づける異常構造物レビー小体を構成する シヌクレイン (S) の 129 番目セリン残基をリン酸化することを報告した。この知見から、セリン 129 のリン酸化が S の異常重合・凝

集化を促進し、神経細胞毒性をもたらすという「リン酸化 S 仮説」を考えている。この仮説を検討するためには、このリン酸化反応を司るキナーゼの内因性レベルでの同定およびその制御機構の存在を調べる必要がある。また、リン酸化された S を過剰に発現するげっ歯類モデルの開発が必要である。これらの点は、未だ明らかではない。

2. 研究の目的

孤発性パーキンソン病の病因に シヌクレイン(α S)の異常凝集過程が関与していると考えられている。本研究課題は α Sのセリン129をリン酸化するキナーゼの解析を行う。 α Sのリン酸化制御機構及びリン酸化 α Sの生物学的役割の検討、さらにげっ歯類モデルを用いてリン酸化 α Sの神経毒性について検討する。具体的な研究目標は以下の3点である。

- (1) α Sのセリン129をリン酸化するキナーゼの同定。
- (2) Gタンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK)ファミリーによる α Sセリン129リン酸化の制御機構の解明。
- (3) リン酸化 α S セリン 129 のモデルマウスの作成

3. 研究の方法

(1) 非神経系培養細胞である HEK293 細胞、ヒトドパミン神経細胞の形質をもつ神経系培養細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、RNA 干渉により標的キナーゼをノックダウンして、 α S のリン酸化反応に及ぼす効果を観察した。

(2) 各標的キナーゼをノックダウンした SH-SY5Y 細胞を材料として、生化学的に細胞分画を行い解析した。

(3) ラット中脳にステレオタキシクにアデノ関連ウイルス (AAV) に組み込んだ S とキナーゼを共接種した。

4. 研究成果

(1) 非神経系細胞である HEK293 細胞では、GRK3 と GRK6 が、内因性レベルで S Ser129 のリン酸化に寄与している (図 1、2) ヒト神経系 SH-SY5Y 細胞では GRK3、GRK5、GRK6 に加え、サブユニットから成るカゼインキナーゼ (CK) 2 が内因性レベルで S Ser129 のリン酸化に寄与していることを認めた。

(2) SH-SY5Y 細胞において、細胞膜と関連して存在する シヌクレインのリン酸化には、GRK3、GRK5、GRK6 に加え、サブユニットから成るカゼインキナーゼ (CK) 2 が寄与し、細胞質にある シヌクレインのリン酸化には CK2 が寄与していることを見出した。

(3) AAV ウイルスによって S とキナーゼをラット中脳黒質に共接種し、ドパミン神経細胞死を引き起こす系を作製した。

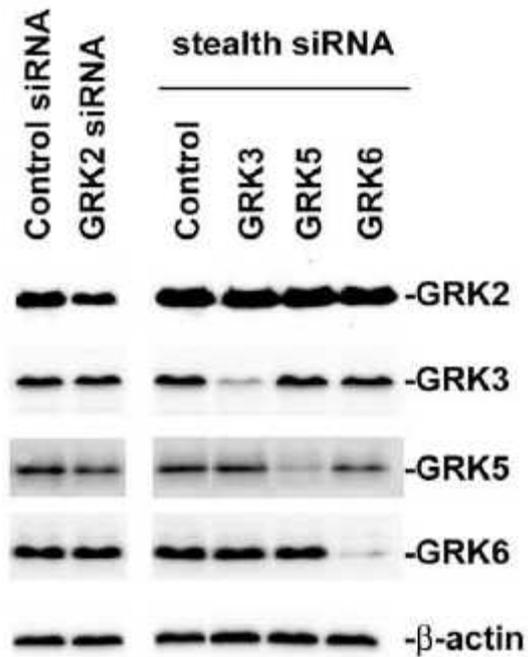


図 1 A

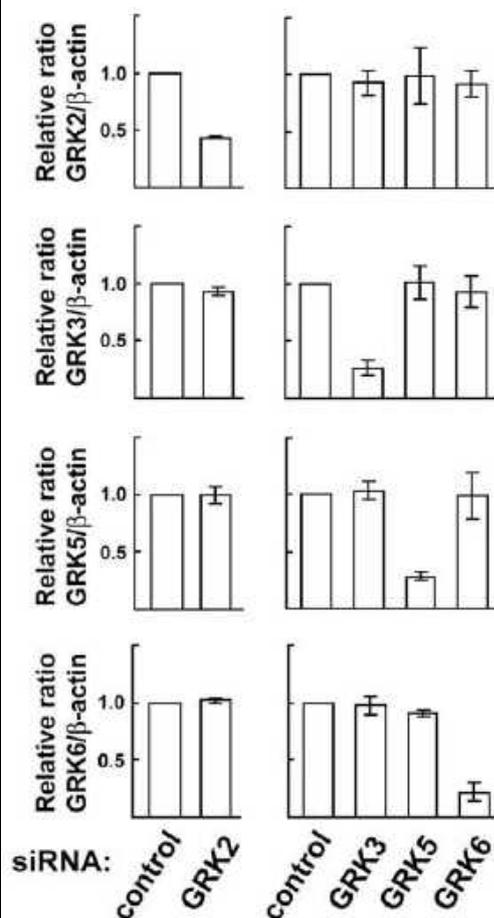


図 1 B

図1：HEK293細胞における siRNA によるノックダウン効果を示す。Aは、各標的キナーゼ (GRK) を siRNA でノックダウンしたときの、それぞれの発現をウエスタンブロットで解析したものである。Bは、バンド強度をグラフで示したものである。



図2 A

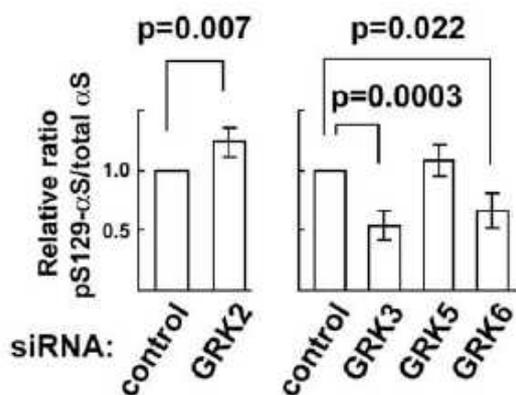


図2 B

図2：siRNA ノックダウンによるシヌクレインリン酸化反応を示す。HEK293細胞を用いた。Aは、各標的キナーゼ (GRK) を siRNA でノックダウンしたときの、リン酸化シヌクレインをウエスタンブロットで解析したものである。Bは、リン酸化シヌクレインのバンド強度をグラフで示したものである。

(4) AAV ウイルスによって S とキナーゼをラット中脳黒質に共接種し、ドパミン神経細胞死を引き起こす系を作製した。

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 2 件)

Sakamoto M, Arawaka S (corresponding author), Hara S, Sato H, Cui C, Machiya Y, Koyama S, Wada M, Kawanami T, Kurita K, Kato T. Contribution of endogenous G-coupled receptor kinases to Ser129 phosphorylation of α -synuclein in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 384, 378-382 (2009) 査読有り。

Karube H, Sakamoto M, Arawaka S (corresponding author), Hara S, Sato H, Ren CH, Goto S, Koyama S, Wada M, Kawanami T, Kurita K, Kato T. N-terminal region of alpha-synuclein is essential for the fatty acid-induced oligomerization of the molecules. *FEBS Lett* 582, 3693-3700 (2008) 査読有り

[学会発表](計 4 件)

原 進、荒若 繁樹、内因性 GRKs および CK1 の シヌクレイン Ser129 リン酸化反応への寄与、日本生化学学会・日本分子生物学会合同学会 BMB 2008、2008年12月9日～12日、神戸。

原 進、荒若 繁樹、内因性 GRKs の シヌクレイン Ser129 リン酸化反応への寄与、第49回日本神経学会、2008年5月15日～17日、横浜。

Hara S, Arawaka S、Biological contribution of G-protein-coupled receptor kinases to phosphorylation of alpha-synuclein at S129 in the pathogenesis of sporadic Parkinson s disease、Society of Neuroscience 2007、2007年11月4日、サンディエゴ、アメリカ合衆国。

Sato H, Arawaka S、Contribution of endogenous GRKs to phosphorylation of alpha-synuclein at S129 in cultured cells. International psychogeriatric association、2007年10月17日、大阪。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他] なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒若 繁樹 (ARAWAKA SHIGEKI)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00344789

(2)研究分担者

(3)連携研究者