

平成30年6月7日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19502

研究課題名(和文) 脂質による シヌクレインのプリオノイド化と脳内伝播メカニズムのin vivo解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of prion-like conversion and transmission of alpha-Synuclein

研究代表者

鈴木 マリ (SUZUKI, Mari)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主任研究員

研究者番号：20455405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性のパーキンソン病(PD)やレビー小体型認知症(DLB)では、通常無害である野生型 シヌクレイン(Syn)が毒性および伝播性を獲得(プリオノイド化)し、疾患の発症・進行の原因となると考えられるが、その要因や伝播の分子メカニズムは未解明である。本研究では、Synのプリオノイド化を規定する要因として脂質に着目し、Synのプリオノイド化に影響する脂質要因の探索した。In vitroアッセイおよびショウジョウバエを用いたアッセイにより、複数の脂質が Syn毒性に影響することを見出した。また、Synの脳内伝播メカニズムを解明するための Syn脳内伝播モニターショウジョウバエを樹立した。

研究成果の概要(英文)：In sporadic PD and DLB, normally harmless Syn proteins without any mutations might gain toxic functions by unknown mechanisms. Thus, it is important to elucidate the factors promoting the toxic conversion of Syn. This study is aimed to explore the lipids that promote Syn prion-like toxic conversion by using in vitro biochemical assay and Drosophila model. We found that several lipids accelerate the conversion of Syn, and that one of the lipids found in vitro assay promote the toxicity of Syn in fly model of PD. In addition, we established novel Syn brain-transmission model fly that enables to monitor Syn transmission in vivo and could be used to explore the molecular mechanism of Syn prion-like transmission.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：パーキンソン病 レビー小体型認知症 シヌクレイン ショウジョウバエ 脂質 ライソソーム病

### 1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い患者数が増加している神経変性疾患の克服は、全世界における重要課題である。パーキンソン病 (PD) とレビー小体型認知症 (DLB) は臨床症状が異なるものの、レビー小体の蓄積という共通性が認められ、近年レビー小体病と分類されている。孤発性 PD や DLB では、通常は無害である野生型 シヌクレイン (Syn) が毒性および伝播性を獲得 (プリオノイド化) し、疾患の発症・進行の原因となると考えられるが、その要因や伝播の分子メカニズムは未解明である。

近年、異常 Syn が細胞間を移行して異常構造を伝播し PD 病変を拡大させる可能性が指摘され、プリオン仮説として注目されている。細胞モデルにおいて Syn の分泌・取り込みに関する知見が蓄積されつつある中、近年複数のグループが動物モデルにおける異常 Syn の伝播現象を証明した (Luk *et al.*, J Exp Med 2012; Luk *et al.*, Science 2012; Masuda-suzukake *et al.*, Brain 2013)。このような状況から、動物モデルを用いた Syn 脳内伝播メカニズムの解明が、PD/DLB の根本的治療法開発のための重要課題となっている。PD/DLB 病態の進行における異常 Syn 伝播が関心を集める一方で、Syn 遺伝子変異の無い場合に「通常は無害である野生型 Syn がどのようなメカニズムで毒性および伝播性を獲得 (プリオノイド化) するか」という疾患発症の本質的メカニズムに関する問題も残されたままである。

代表者はショウジョウバエモデル及び *in vitro* アッセイ系を用いて GBA 遺伝子産物である glucosylceramidase (GCCase) 機能喪失が Syn 毒性に及ぼす影響を解析し、GCCase 活性低下により蓄積した基質グルコシルセラミドが Syn のプリオノイド化を促進して PD モデルショウジョウバエの病態を増悪させることを見出した (Suzuki *et al.*, Hum Mol Genet 2015、研究開始当初は改訂中)。興味深いことに、特定の脂質が蓄積する他のライソソーム病の脳病理解析においても異常 Syn の蓄積が認められ (Suzuki *et al.*, Acta Neuropathologica 2007) ムコ多糖症 型原因遺伝子 NAGLU の一塩基多型が PD と関連するとの報告もある (Winder-Rhodes *et al.*, Mov Disorder 2011)。これらの事実は他のライソソーム病で蓄積する糖脂質や糖鎖が Syn プリオノイド化を促進する可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究ではグルコシルセラミド以外の脂質にも着目し、1) Syn のプリオノイド化に影響する脂質要因を明らかにする。また、プリオノイド化 Syn 伝播を解析する新規のショウジョウバエモデルを構築してスクリーニングを行い、2) プリオノイド化 Syn の脳内伝播メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 1) Syn のプリオノイド化に影響する脂質要因

*In vitro* アッセイ系で Syn の異常構造化に影響を及ぼす脂質をスクリーニングする。ヒットした脂質が Syn 毒性に影響を及ぼすかを野生型 Syn 発現ショウジョウバエモデルを用いて評価し、生体内において同定した脂質が Syn の毒性獲得要因となるか検証する。

#### 2) プリオノイド化 Syn の脳内伝播メカニズム

本研究では小型動物モデルの中でも特に遺伝学的解析に優れたショウジョウバエモデルを用いて、Syn 伝播と表現型を評価する新たなモデルを構築する。構築したモデルを用いて、Syn 伝播に影響する遺伝子および薬剤を候補スクリーニングにより同定する (図 1)。

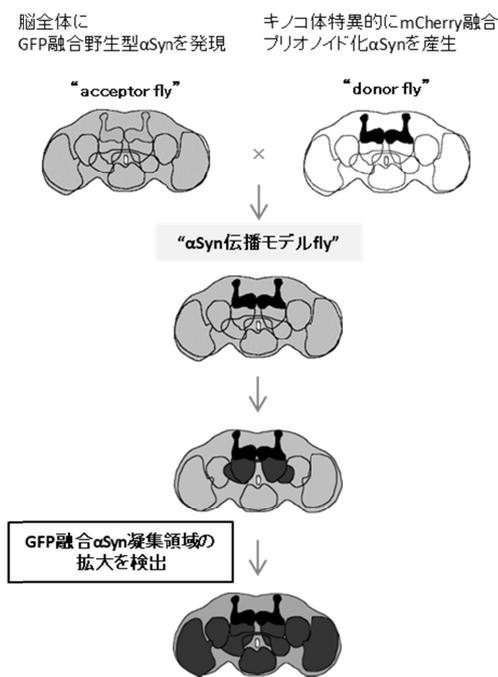


図 1 Syn 脳内伝播モニターショウジョウバエ

### 4. 研究成果

#### 1) Syn のプリオノイド化に影響する脂質要因

*In vitro* アッセイとして、様々な脂質を含むリポソームと精製 Syn を混合し、Syn の凝集、proteinase K (PK) 耐性への影響を評価した。その結果、Syn の異常構造化に影響を及ぼす可能性のある脂質として GM1 ガングリオシドを含む複数の脂質を同定した。また、ショウジョウバエモデルにおけるプリオノイド化 Syn の毒性評価として、野生型 Syn を神経系に発現するショウジョウバエと、GM1 ガングリオシド分解酵素遺伝子の shRNA を発現する RNAi ノックダウンショウジョウバエを交配し、次世代のバエの運動機能

障害および神経変性への影響を評価した。その結果、GM1 ガングリオシド分解酵素遺伝子のノックダウンにより Syn 発現ショウジョウバエの運動機能障害が増悪すること、また、Syn 蛋白質の PK 耐性も促進されていることが明らかとなった。

上記に加えて、ライソソーム病原因遺伝子 X の過剰発現ショウジョウバエを樹立し、野生型および疾患関連変異型 X の過剰発現が Syn 発現ショウジョウバエの運動機能に及ぼす影響を検討した。その結果、X の過剰発現により Syn ハエの運動機能が改善することを見出した。

## 2) プリオノイド化 Syn の脳内伝播メカニズム

Syn の脳内伝播をモニターするトランスジェニックショウジョウバエを樹立し、ドナー、アクセプター共に Syn 発現を確認し、適当な発現レベルを示す系統を選択した。今後は局所的にドナー Syn を発現させた際にドナー側の Syn の構造変化や凝集が認められるか検討していく。本モデルは Syn の *in vivo* 伝播メカニズムを解析する有用なツールとなる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1~6) は査読あり、7~8) は査読無し

- 1) Suzuki M\*, Sango K, Wada K, Nagai Y\*. Pathological role of lipid interaction with  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Neurochemistry International* (in press)  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.12.014>
- 2) Yoshida S, Hasegawa T\*, Suzuki M, Sugeno N, Kobayashi J, Ueyama M, Fukuda M, Ido-Fujibayashi A, Sekiguchi K, Ezura M, Kikuchi A, Baba T, Takeda A, Mochizuki H, Nagai Y, Aoki M. Parkinson's disease-linked DNAJC13 mutation  $\alpha$ -synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics* 27(5):823-836 (2018)  
DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy003>
- 3) Hervás R, Li L, Majumdar A, Fernández-Ramírez MC, Unruh J, Slaughter B, Galera-Prat A, Santana E, Suzuki M, Nagai Y, Bruix M, Casas-Tintó S, Menéndez M, Laurents DV, Si K\*, Carrión-Vázquez M\*. Molecular Basis of Orb2 Amyloidogenesis and Blockade of Memory Consolidation. *PLoS Biology* 14(1) e1002361 (2016)  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal>

- .pbio.1002361
- 4) Suzuki M, Fujikake N, Takeuchi T, Kohyama-Koganeya A, Nakajima K, Hirabayashi Y, Wada K, Nagai Y\*. Glucocerebrosidase deficiency accelerates the accumulation of proteinase K-resistant  $\alpha$ -synuclein and aggravates neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 24(23) 6675-6686 (2015)  
DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv372>
  - 5) Takahashi M, Suzuki M, Fukuoka M, Fujikake N, Watanabe S, Murata M, Wada K, Nagai Y, Hohjoh H\*. Normalization of Overexpressed  $\alpha$ -Synuclein Causing Parkinson's Disease By a Moderate Gene Silencing With RNA Interference. *Molecular therapy. Nucleic acids* 4 e241 (2015)  
DOI: <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.14>
  - 6) Takeuchi T, Suzuki M, Fujikake N, Popiel HA, Kikuchi H, Futaki S, Wada K, Nagai Y. Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(19) E2497-506 (2015)  
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1412651112>
  - 7) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 武内敏秀, 香山(古金谷)綾子, 中嶋和紀, 平林義雄, 和田圭司, 永井義隆. パーキンソン病リスク遺伝子 GBA の機能喪失は  $\alpha$ -シヌクレインの異常構造変化を促進して神経変性を悪化させる. 日本病態生理学雑誌 25(3) 36-44. (2016)
  - 8) 鈴木マリ, 永井義隆. ショウジョウバエを用いた神経変性疾患研究. 生体の科学 67 (6): 589-595. (2016)  
DOI: <https://doi.org/10.11477/mf.2425200559>

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 武内敏秀, 香山(古金谷)綾子, 中嶋和紀, 平林義雄, 和田圭司, 三五一憲, 永井義隆. GBA 機能喪失は  $\alpha$ -シヌクレインの異常構造変化を促進して神経変性を悪化させる. 第 36 回日本認知症学会学術集会 (2017)
- 2) 鈴木マリ, 永井義隆. パーキンソン病における シヌクレイン - 脂質相互作用の役割. 第 12 回臨床ストレス応答学会大会 (シンポジウム・招待講演) (2017)
- 3) Mari Suzuki, Anne-Marie Neumann, Yuji Saitoh, Nobuhiro Fujikake, Keiji Wada, Kazunori Sango, Yoshitaka Nagai.

- Improvement of misfolding protein-induced neurodegeneration by dietary restriction in *Drosophila*. XXIII World Congress of Neurology (2017)
- 4) Mari Suzuki, Anne-Marie Neumann, Yuji Saitoh, Nobuhiro Fujikake, Keiji Wada, Kazunori Sango, Yoshitaka Nagai. Dietary restriction improves neurodegeneration in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. EMBO/EMBL Symposium "Mechanisms of Neurodegeneration" (2017)
- 5) Mari Suzuki, Anne-Marie Neumann, Yuji Saitoh, Nobuhiro Fujikake, Keiji Wada, Kazunori Sango, Yoshitaka Nagai. Dietary restriction improves misfolding protein-related neurodegeneration in *Drosophila*. Keystone Symposia "Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease" (2017)
- 6) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 武内敏秀, 香山(古金谷)綾子, 中嶋和紀, 平林義雄, 和田圭司, 永井義隆. グルコセレブロシダーゼ機能欠失は シヌクレインの異常構造変化を促進して神経変性を増悪する. 第10回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. (2016)
- 7) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 武内敏秀, 香山(古金谷)綾子, 中嶋和紀, 平林義雄, 和田圭司, 永井義隆. パーキンソン病リスク遺伝子 GBA の機能喪失は -シヌクレインの異常構造変化を促進して神経変性を悪化させる. 第26回日本病態生理学会大会. (2016)

〔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〕

受賞

- 1) 第36回日本認知症学会学術集会 学会奨励賞(基礎研究部門)(2017年)
- 2) 第26回日本病態生理学会大会 奨励賞(2016年)
- 3) 第10回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 最優秀ポスター賞(2016年)

ホームページ等

- 1) <https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>
- 2) [https://www.ncnp.go.jp/press/press\\_release150916.html](https://www.ncnp.go.jp/press/press_release150916.html)
- 3) <http://www2.med.osaka-u.ac.jp/neurother/>
- 4) <http://www.igakuken.or.jp/diabetic/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 マリ (SUZUKI, Mari)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主任研究員  
大阪大学大学院医学系研究科・神経難病認知症探索治療学寄附講座・招へい研究員  
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所・疾病研究第四部・客員研究員  
研究者番号：20455405

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

永井 義隆 (NAGAI, Yoshitaka)  
大阪大学大学院医学系研究科・神経難病認知症探索治療学寄附講座・教授  
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所・疾病研究第四部・客員研究員

堺 竜介 (SAKAI, Ryusuke)  
大阪大学・大学院医学系研究科・神経内科/神経難病認知症探索治療学寄附講座・大学院生

大場 柁樹 (OBA, Masaki)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研修生