

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590335

研究課題名 (和文) 神経変性疾患における封入体の役割と結合異常タンパク質の同定

研究課題名 (英文) Identification of NUB1-interacting proteins in alpha-synucleinopathy

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

研究成果の概要 (和文)：

α シヌクレイン (α S) はシナプス末端に局在し、神経伝達物質の貯蔵および放出の調節に関与することが示唆されている。 α S はタンパク質分解酵素で容易に可溶化されるが、 α シヌクレイノパチーでは、不溶性となり、本来の生理的機能が損なわれることが病因の一つとされている。本研究において、新規ユビキチン様タンパク質 NUB1 の結合タンパク質の一つとして、不溶性 α S を同定した。さらにシヌクレイノパチー患者でのみ認められる異常 α S の簡易な検出法を確立した。この検出法と病理学的手法を用い、①レビー小体病剖検例では、NUB1 および不溶性 α S が早期から病態に関与していること、②海馬および大脳皮質の前シナプスなどにおいて共局在していることを示した。以上の結果から NUB1 は不溶性 α S を認識している可能性を示している。今後、作製した NUB1 遺伝子改変動物を用い、生体内における不溶性 α S の意義を明らかにするとともに治療への道を模索する。

研究成果の概要 (英文)：

α -Synuclein is a major component of Lewy bodies in Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB), as well as of glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. NUB1 also accumulates specifically in these α -synucleinopathy lesions. In this study, we established a method to detect abnormal α -synuclein found in patients with α -synucleinopathy. This system allowed us to identify abnormal α -synuclein is one of NUB1-interacting proteins. Further examination revealed that abnormal α -synuclein with proteinase K (PK) resistance exists in presynapses and involved in early stage of patients with PD and DLB. Surprisingly, endogenous NUB1 was also accumulated together with PK-resistant α -synuclein in the presynapses in transgenic mice expressing human α -synuclein with an A53T mutation. These findings suggest that NUB1 together with abnormal α -synuclein are involved in pathobiology of Lewy body disease.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

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：脳神経疾患、蛋白質、プロテオーム、封入体

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患に認められる細胞内封入体の主要構成成分の発見を発端として、神経難病の病態解明に向けた研究が展開されている。我々は2006年に、細胞内封入体の構成タンパク質のひとつ「NUB1」を見出した。本研究では、タンパク質の結合異常が α シヌクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症）の病態に関与しているとの仮説のもとに、この新規ユビキチン様結合タンパク質「NUB1」と結合している未知のタンパク質を同定することを第一目標として研究を進めた。

2. 研究の目的

α シヌクレイン (α S)は正常脳ではシナプス末端に局在し、タンパク質分解酵素で容易に可溶化される。一方、 α シヌクレイノパチーでは、 α Sは不溶性となり、細胞体、軸索および樹状突起内に細胞内封入体として存在する。本研究では以下4点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 不溶性 α Sの存在と分布
- (2) レビー小体病脳の前シナプスに蓄積している不溶性 α SとNUB1の役割
- (3) 前シナプスの超微形態、
- (4) レビー小体病（凍結脳組織）におけるシナプス画分の不溶性 α SとNUB1との関連

3. 研究の方法

家族性の点突然変異 (A53T) を導入した α S Tg マウスならびにレビー小体病（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。解析方法は免疫組織染色および免疫電顕に加え生化学的手法（ショ糖密度勾配遠心、スロットブロット法、ウェスタンブロット法）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う。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新潟大学脳研究所から書類による審査を経て、譲渡されており、倫理上問題はない。

4. 研究成果

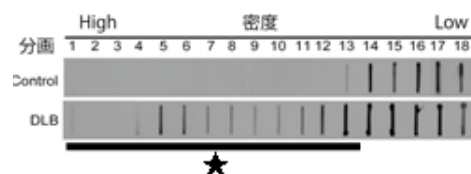
- (1) レビー小体の凝集性に着目し、密度の違いを利用して分画後、スロットブロット法を用いることにより正常対照例にはみられない高密度な異常 α シヌクレイン（[図1](#)★印）を検出できる手法を確立し

た。ここにはレビー小体、レビー小体様突起、オリゴマー、その中間産物さらには未知の分子を含んでいる可能性が高い。興味深いことに高密度 α シヌクレインは、全 α シヌクレイン量の62%を占め予想よりもはるかに広範囲で存在していることが明らかとなった（NIH Imageによる濃度定量化）。

- (2) Tg マウスおよびレビー小体病の脳組織からパラフィン切片を作成し、NUB1 に対する抗体を用い免疫染色を行った。その結果、不溶性 α SとNUB1は海馬および大脳皮質の前シナプスにおいて共局在していた。
- (3) Tg マウスの海馬 CA4 の電顕所見からNUB1の蓄積は α Sの繊維性凝集が始まる前からおこっていた（[図2](#)）。
- (4) レビー小体病（Braak PD stage VI）の凍結脳組織（側頭葉皮質）を用い、前述したショ糖密度勾配法による分画を行った結果、不溶性 α Sと同様の分布様式を示した。

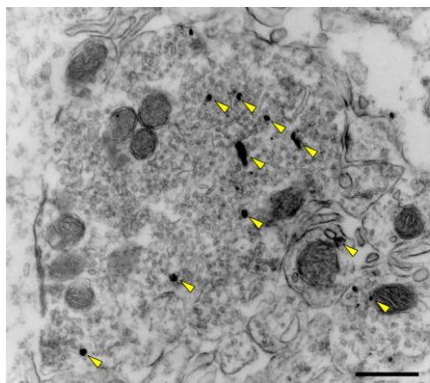
NUB1はユビキチン様タンパク質であり、シヌクレイノパチー脳の病態に関与していることを報告してきたが、詳細は不明であった。今回の一連の結果からNUB1の結合タンパク質の一つとして、異常 α Sが同定された。異常 α Sは、シヌクレイノパチー脳において広範囲に分布し、主にシナプス部位において早期から病態に関与していることを証明した。これまでの結果を踏まえ、今後、*in vivo*におけるNUB1の α Sへの影響をNUB1 Tg マウスを用いて、病理学的、生化学的に明らかにすると同時に、生体での異常 α Sの意義を行動学的に検討する予定である。これらの結果は孤発性 α シヌクレイノパチーの病態解明にむすびつくると同時に治療への標的ともなりえる。

図1
抗 α シヌクレイン抗体 (LB509) を用い α シヌクレインを検出



DLBの脳組織ではほぼ全てのfractionに α シヌクレインが検出される。一方、対照例(control)では低密度のfractionにだけ検出される。他の抗 α シヌクレイン抗体でも同様の結果を得た。

図2 海馬CA4の電顕所見



異常 α シヌクレインが出現する以前にNUB1の蓄積が前シナプスに認められる。(矢印) (Bar=500 nm)

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 12 件)

- ① Zhang HX, Tanji K, Yoshida H, Hayakari M, Shibata T, Mori F, Uchida K, Wakabayashi K. Alteration of biochemical and pathological properties of TDP-43 protein by a lipid mediator, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2). **Exp Neurol** 2010;222:296-303
- ② Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. **Acta Neuropathol** 2010;120:1-12
- ③ Tanji K, Mori F, Mimura J, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Proteinase K-resistant alpha-synuclein is deposited in presynapses in human Lewy body disease and A53T alpha-synuclein transgenic mice. **Acta Neuropathol** 2010;120:145-154
- ④ Tanji K, Kamitani T, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Neurobiol Dis** 2010;38:210-218
- ⑤ Mori F, Tanji K, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Relationship between Bunina bodies and TDP-43 inclusions in spinal anterior horn in amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2010;
- ⑥ Mori F, Miki Y, Tanji K, Kusumi T, Kijima H, Wakabayashi K. Widespread occurrence of eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions in an asymptomatic adult: A novel ubiquitin-negative filamentous inclusion. **Neuropathology** 2010;
- ⑦ Hosono T, Tanaka T, Tanji K, Nakatani T, Kamitani T. NUB1, an interferon-inducible protein, mediates anti-proliferative actions and apoptosis in renal cell carcinoma cells through cell-cycle regulation. **Br J Cancer** 2010;102:873-882
- ⑧ Mori F, Tanji K, Miki Y, Wakabayashi K. Decreased cystatin C immunoreactivity in spinal motor neurons and astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. **J Neuropathol Exp Neurol** 2009;68:1200-1206
- ⑨ Zhang HX, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K. Epitope mapping of 2E2-D3, a monoclonal antibody directed against human TDP-43. **Neurosci Lett** 2008;434:170-174
- ⑩ Zhang H, Tan CF, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. **Acta Neuropathol** 2008;115:115-122
- ⑪ Mori F, Tanji K, Zhang HX, Nishihira Y, Tan CF, Takahashi H, Wakabayashi K. Maturation process of TDP-43-positive neuronal cytoplasmic inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. **Acta Neuropathol** 2008;116:193-203
- ⑫ Mori F, Tanji K, Zhang H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. alpha-Synuclein pathology in the neostriatum in Parkinson's disease. **Acta Neuropathol** 2008;115:453-459

[学会発表] (計 5 件)

- ① Existence of presynaptic proteinase K-resistant alpha-synuclein in human Lewy body disease and A53T alpha-synuclein transgenic mice. 17th International Congress of Neuropathology, 2010 年 9 月 12 日、Salzburg, Austria
- ② パーキンソン病の前シナプスにおける proteinase K 耐性 α シヌクレインの蓄積. 第 33 回日本神経科学会、2010 年 9 月 3 日、神戸国際会議場・神戸市
- ③ レビー小体病の前シナプスにおける proteinase K 耐性 α シヌクレインの蓄積. 第 51 回日本神経病理学会、2010 年 4 月 23 日、砂防会館別館・東京都
- ④ シヌクレイノパチーモデルマウスにおける synphilin-1 結合タンパク質 (NUB1) の局在. 第 50 回日本神経病理学会、2009 年 6 月 6 日、サンポートホール高松・高松市
- ⑤ シヌクレイノパチー剖検脳における synphilin-1 結合タンパク質 (NUB1) の定量的解析. 第 49 回日本神経病理学会、2008 年 5 月 20 日、タワーホール船堀・東京都

[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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：