

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700393

研究課題名 (和文) 線虫 *C. elegans* を用いたパーキンソン病発症機構の解明と治療薬開発研究課題名 (英文) Analysis of the mechanism of Parkinson disease and drug development using the nematode *C. elegans*

研究代表者

桑原 知樹 (KUWAHARA TOMOKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号：10533903

研究成果の概要 (和文) :  $\alpha$ -Synuclein は家族性パーキンソン病の病因遺伝子であり、その遺伝子産物は疾患脳内神経細胞において Ser129 位のリン酸化を受けて蓄積する。線虫 *C. elegans* は神経変性疾患の分子機構を解析するツールとして有用であることが示唆されている。我々はヒト  $\alpha$ -synuclein を発現する線虫を用いて、 $\alpha$ -synuclein のリン酸化がその神経毒性に与える影響について解析した。その結果、Ser129 リン酸化は  $\alpha$ -synuclein の膜結合性を低下させることにより、神経毒性および下流のストレス応答を軽減する役割を持つことを明らかにした。また、本研究で用いた線虫モデルは更なる遺伝子/薬剤スクリーニングにも有用であることを見出した。

研究成果の概要 (英文) :  $\alpha$ -Synuclein is a causative gene for familial Parkinson's disease and its protein product accumulates in the neurons of affected brains with phosphorylation at Ser129. Nematode *C. elegans* is suggested as a useful tool for the analysis of the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases. We have studied the role of phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein in its neurotoxicity using nematodes expressing human  $\alpha$ -synuclein. Our results suggest that the phosphorylation at Ser129 functions against  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity and downstream stress response by lowering its membrane-binding property. We also found that the present nematode model is useful in further screening for modifier genes or therapeutic drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験神経病理学

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：パーキンソン病、 $\alpha$ -synuclein、リン酸化、線虫

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は老年期に発症する代表的な神経変性疾患であり、中脳黒質ドパミン作動性ニューロンを主体とする神経細胞の変性・脱落と、細胞内封入体 Lewy 小体の蓄積を特徴とする。また、類縁疾患であるレビー小体型認知症 (dementia with Lewy bodies; DLB) では大脳皮質神経細胞の変性・脱落とともに Lewy 小体が大脳皮質に広汎に出現する。いずれも発症の原因はほぼ不明であり、高齢化社会を迎えた今日において病因究明と根本的治療法の確立が急務である。

PD の一部に存在する優性遺伝性家族性 PD 家系の連鎖解析から、 $\alpha$ -synuclein 遺伝子のミスセンス変異 (A53T, A30P, E46K) および遺伝子重複 (二重化・三重化) が同定された。一方、PD/DLB 脳に蓄積した Lewy 小体の免疫化学的解析から Lewy 小体の主要構成成分として  $\alpha$ -synuclein が同定された。 $\alpha$ -Synuclein は脳に豊富に存在する可溶性の蛋白質であるが、その機能については不明な点が多く、ノックアウトマウスは神経終末におけるドパミンの放出と取り込みに若干の異常が認められる程度である。一方、 $\alpha$ -synuclein の家族性変異は *in vitro*, *in vivo* においてその凝集過程を亢進させ、また細胞障害性を発揮する場合があることが報告された。以上より、 $\alpha$ -synuclein の遺伝子変異／重複による異常機能獲得が  $\alpha$ -synuclein の細胞内凝集・蓄積過程の亢進を伴って最終的に疾患発症をもたらすと考えられるに至っている。

$\alpha$ -Synuclein の凝集・蓄積を伴う神経障害の分子機構を明らかにするため、 $\alpha$ -synuclein を過剰発現する各種培養細胞および動物が作出されている。 $\alpha$ -Synuclein をマウスやハエの神経細胞に発現させると細胞変性・脱落や Lewy 小体様の凝集体形成が認められることが報告された。一方、 $\alpha$ -synuclein を単に培養細胞に発現させるだけでは凝集や細胞障害性を認めないものの、小胞輸送を阻害したり、各種ストレス応答を惹起する可能性が示唆されている。また、我々のグループでは疾患脳に蓄積した  $\alpha$ -synuclein の生化学的解析から、 $\alpha$ -synuclein が Ser129 位において疾患脳特異的かつ高度にリン酸化を受けていることを見出しており (Fujiwara et al, *Nat Cell Biol*, 2002)、リン酸化が疾患発症に何らかの役割を果たす可能性も考えられている。

しかし依然として  $\alpha$ -synuclein が *in vivo* において引き起こす神経障害機構の詳細については明らかではない。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、ヒト  $\alpha$ -synuclein を神経系に過剰発現するトランスジェニック (Tg) 線虫がパーキンソン病における病態を一部再現すること、またこの線虫を用いて  $\alpha$ -synuclein の神経障害性を修飾する遺伝子のスクリーニングが可能であることを示してきた (Kuwahra et al, *J. Biol. Chem.* 2006, *Hum. Mol. Genet.* 2008)。また、線虫神経系に発現させた  $\alpha$ -synuclein は PD/DLB 脳内変性部位と同様に Ser129 位においてリン酸化を受けることを見出していた。そこで本研究ではさらにこれらの研究を発展させるため、以下の2つのことを目標とした。

(1) 線虫神経系において認められる  $\alpha$ -synuclein の Ser129 リン酸化が神経障害性に与える影響およびその分子メカニズムについて、線虫の遺伝学を用いて解析する。  
(2)  $\alpha$ -Synuclein Tg 線虫の表現型の変化を指標とした遺伝子または薬剤スクリーニング法を確立し、遂行することにより、 $\alpha$ -synuclein 神経毒性を調節する遺伝子または化合物の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

(1)  $\alpha$ -Synuclein の 129 番セリン残基 (Ser129) をアラニンに置換した S129A 型  $\alpha$ -synuclein (非リン酸化型)、および Ser129 をアスパラギン酸に置換した S129D 型  $\alpha$ -synuclein (リン酸化模倣型) を発現する Tg 線虫を作出し、各種神経系の表現型の有無について調べる。

(2) 遺伝子スクリーニングは、以下の2つの手法を用いる。①作出した各  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫の DNA マイクロアレイ解析を行い、特異的に変動している遺伝子・パスウェイを同定する。②  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫に対して変異原である EMS (Ethyl methanesulfonate) を処理し、F2 世代において表現型が変化する線虫を単離した後、遺伝子マッピングにより変異箇所の同定を試みる。薬物スクリーニングについては、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で作製・配布されている clinical compound library を購入し、

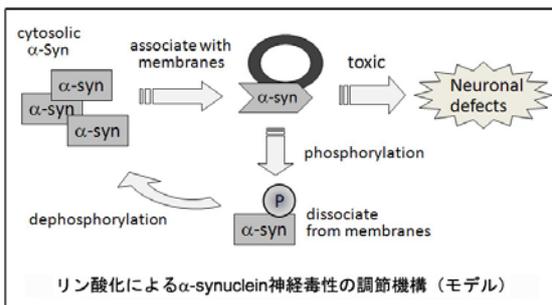
$\alpha$ -synuclein Tg線虫に系統的に投与して表現型を変化させる化合物の同定を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) $\alpha$ -SynucleinのSer129位リン酸化がその神経障害性に与える影響についての解析

我々はまず、リン酸化部位である Ser129 をアラニンに置換した S129A 型（非リン酸化型） $\alpha$ -synuclein を神経系に発現する Tg 線虫、および Ser129 をアスパラギン酸に置換した S129D 型（リン酸化模倣型） $\alpha$ -synuclein Tg 線虫を作成した。その結果、独立した複数の S129A 型 Tg 線虫が重度の運動機能障害や成長遅延を示すこと、一方 S129D 型 Tg 線虫は特に異常を示さないことが分かった。組織学的検討から S129A 型 Tg 線虫では明らかな神経細胞脱落は認められなかったが、生化学的検討の結果、興味深いことに膜結合型  $\alpha$ -synuclein の量が野生型  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫や S129D 型 Tg 線虫に比して顕著に増加していることを見出した。

そこで次に膜結合性の増加が表現型の増悪に関与している可能性を調べるため、膜結



合性を低下させることが知られている A30P 変異を S129A 変異に加えて導入した A30P-S129A 型  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫を作成した。その結果、この Tg 線虫は目立った異常表現型を示さず、同時にこの Tg 線虫において膜結合型  $\alpha$ -synuclein の量が大きく減少していることを確認した。以上より、膜結合型  $\alpha$ -synuclein が神経毒性を発揮すること、Ser129 のリン酸化は  $\alpha$ -synuclein を膜から引き離すことにより神経毒性を軽減させる効果を持つことが示唆された（下図参照、論文投稿中）。

##### (2) $\alpha$ -Synuclein-Tg線虫の運動機能異常を調節する遺伝子/化合物のスクリーニング

S129A 型  $\alpha$ -synuclein が引き起こす運動機能異常の背景にある分子機構を調べるため、我々は S129A-Tg 線虫の DNA マイクロアレイ解析を行い、野生型  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫と

の比較を試みた。その結果、寿命決定や酸化ストレス応答に重要な役割を果たす転写因子 Daf-16 の下流遺伝子群が S129A-Tg 線虫において大きく活性化していることを突き止めた。次に *daf-16* を欠損する線虫と S129A-Tg 線虫を交配させたところ、この線虫はほとんど成長できなかったことから、*daf-16* シグナル経路の活性化は S129A 型  $\alpha$ -synuclein の神経毒性を軽減する役割を持つと考えられた。

さらに、神経系に発現した S129A 変異型  $\alpha$ -synuclein が引き起こす運動機能異常に必要な遺伝子を探索するため、S129A  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫に対して変異原 EMS (Ethyl methanesulfonate) を処理し、F2 世代で運動機能が回復する個体を約 20 ほど単離することに成功した。ハワイアン株線虫 CB4856 との交配および snip-SNP 法による遺伝子マッピングの結果、S129A-Tg 線虫の運動機能異常に関わる 2 つの遺伝子座を同定した。いずれの遺伝子座についても現在原因遺伝子の特定を進めている。

また、作製した  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫の創薬への応用を図るため、96-well プレートを用いて  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫に化合物を網羅的に投与する方法を開発した。この時、 $\alpha$ -synuclein Tg 線虫の運動機能の回復を見やすくするため、アダプター蛋白質 AP-2 の RNAi を施した  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫 (Kawahara et al, *Hum. Mol. Genet.* 2008 にて報告済み) を使用した。実際にアメリカ国立衛生研究所 (NIH) から購入した clinical compound library を用いてスクリーニングを試みた結果、1 つの化合物が  $\alpha$ -synuclein Tg 線虫の表現型を劇的に改善することを見出した。しかし運動機能異常を示す他の変異体でも運動機能が回復したことから、 $\alpha$ -synuclein 特異的な効果ではないと考えられた。今回はライブラリに含まれる約 450 の化合物しか投与できなかったが、今後適切な化合物ライブラリーをより大規模に投与することにより、 $\alpha$ -synuclein 神経毒性を特異的に調節する化合物の単離が可能になることが期待される。

#### 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 1 件)

(1) 桑原知樹、利根川玲奈、三谷昌平、岩坪威：The analysis of the neurotoxicity of phosphorylation-mutant alpha-synuclein in *C. elegans*. 4th East Asia *C. elegans* Meeting, 2010年7月14日、東京

〔図書〕(計2件)

(1) 宮下惇嗣、桑原知樹、岩坪威：メディカルレビュー社 Brain Medical 2010年22(2) pp11-15

(2) 桑原知樹、岩坪威：メディカルレビュー社 Cognition and Dementia 2009年8(3), pp32-38

〔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

桑原 知樹 (KUWAHARA TOMOKI)

東京大学大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号：10533903

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし