

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500408

研究課題名(和文) シヌクレインの神経細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Neuro-cell biological studies of alpha-synuclein

研究代表者

上田 健治 (UEDA, Kenji)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・病院・副院長室・研究生

研究者番号：90261180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が、アルツハイマー病脳のSDS不溶性成分の分析から未知分子として見出した シヌクレインは、その遺伝子の変異体が優性遺伝型パーキンソン病の疾患責任遺伝子として同定された。しかし、シヌクレインの生理的機能の詳細は不明のままである。我々は、シヌクレインが脳神経細胞のミトコンドリア内膜に存在する事を見出した。さらに、シヌクレインがadenylate translocatorに結合し、ATP産生の制御に関与する可能性を示した。培養細胞系を用いて、シヌクレインが細胞増殖促進、神経細胞突起伸長を促進する事を見出し、その作用が微小管形成を介する事を示した。

研究成果の概要(英文)：After the biochemical examination of SDS-insoluble materials of the brains with Alzheimer's disease, we identified human alpha-Synuclein by cDNA cloning. Some missense mutations of the gene for alpha-Synuclein were found as causal genes for the patients with familial Parkinson's disease and with familial dementia with Lewy bodies. However, physiological functions of alpha-Synuclein remain elusive.

In the present studies, we have shown that alpha-Synuclein is localized in the inner membrane of neuronal mitochondria, and that alpha-Synuclein binds adenylate translocator. It suggests that alpha-Synuclein may regulate the production of ATP through mitochondrial permeability transition pore. Using in vitro cell culture systems, we showed that alpha-Synuclein promotes cell proliferation and affects early neurite outgrowth. It was shown that these effects are through microtubule formation via tubulin assembly by alpha-Synuclein.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：シヌクレイン ミトコンドリア ATP産生 チュープリン 神経突起伸長 細胞増殖 ドーパミン カルパイン

1. 研究開始当初の背景

我々がアルツハイマー病脳の SDS 不溶性成分の分析から未知分子として見出した α シヌクレインは、その遺伝的変異体が優性遺伝型パーキンソン病の疾患責任遺伝子として同定された。生理的には α シヌクレインはシナプス前に多く局在しており、 α シヌクレインの機能異常や代謝異常がシナプスの機能異常から神経変性を来し、そのことがパーキンソン症候群や認知症という症状に繋がる可能性がある。

これまで多くの病理的側面の研究が成されているが、 α シヌクレインの生理機能の詳細は依然不明のままであった。

2. 研究の目的

α シヌクレインが関与する神経変性疾患の分子病理を真に理解する為には、 α シヌクレインの生理機能を知ることが重要である。生理的状态を熟知してこそ病理的状态を良く知り得る。従って研究の主目的としては、 α シヌクレインの生理機能の基礎的解明に重点を置く。これまでの我々の研究から判明してきた事は、その生理機能は複数ある事が示唆された。

3. 研究の方法

(1) ラット脳から調製したミトコンドリアを用いて、 α シヌクレインと作用するタンパク質の同定を試みる。

(2) 培養神経細胞を用いて α シヌクレインを導入発現させ、ミトコンドリアに与える影響を詳細に検討する。

(3) 分離精製したミトコンドリアを用いて、ミトコンドリアの生理活性に及ぼす α シヌクレインの影響を分子レベルで検討する。

(4) 培養細胞系(株細胞と初代神経細胞両方)を用いて α シヌクレインを導入させ、その影響を多面的に検討する。

4. 研究成果

(1) α シヌクレインは、ミトコンドリア内膜の mitochondrial permeability transition pore (mPTP) を構成するタンパク質、adenylate translocator に結合する事が確認され、 α シヌクレインが過剰に存在する状態ではミトコンドリアの機能障害に繋がる事が示唆された。

(2) α シヌクレインはドーパミン系培養株細胞 MES23.5 に導入されると、細胞増殖活性を有する事が見出され、その活性部位は NAC 領域以下の C 末端領域にある事が証明された。その作用機構は、微小管形成促進にある事が示唆された。

(3) 我々は、 α シヌクレインが脳神経細胞核内に存在する事を、哺乳類脳神経で証明したが、その核内機能は明確ではなかった。培養ドーパミン系細胞を用いて、ドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の遺伝子の発現を、 α シヌクレインが抑制する効果がある事を見出した。

(4) α シヌクレインはドーパミン系神経細胞に悪影響を及ぼすが、 α シヌクレイン 1 分子に 3 分子のドーパミンが直接結合する事を証明し、 α シヌクレインの凝集化に影響する事が示された。

(5) 我々は、ドーパミン系培養株細胞 MES23.5 に H_2O_2 を添加すると、 α シヌクレインが切断され核内に移動する事を見出した。カルパイン阻害剤によりこの現象は阻止され、細胞死も抑制された。C 末領域 α シヌクレイン (a.a.58-140) を導入すると、 H_2O_2 添加による細胞死が上昇した。従って、酸化ストレスに応じて α シヌクレインはカルパインにより切断され、C 末領域 α シヌクレインが核内に移行して細胞死に繋がるという新規機構が示唆された。

(6) 初代培養神経細胞を用いて α シヌクレインの活性を調べたところ、神経突起伸長性が確認された。その活性は野生型のみであ

り、変異体 A30P、A53T には活性は無く、活性部位は NAC 領域以下の C 末端部位にある事が判明した。従って、 α シヌクレインの活性は、*in vitro*系、*in vivo*系（株細胞系、初代培養系）双方において常に全く矛盾無く、微小管形成促進する MAP 活性として説明可能であった。

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9件)

Liu G, Wang P, Li X, Li Y, Xu S, Uéda K, Chan P, Yu S. (2013) α -Synuclein promotes early neurite outgrowth in primary cultured neurons. **J Neural Transm.** **120**: 1331-43. 査読有、
doi: 10.1007/s00702-013-0999-8

Zhou M, Xu S, Mi J, Uéda K, Chan P. (2013) Nuclear translocation of α -synuclein increases susceptibility of MES23.5 cells to oxidative stress. **Brain Res.** **1500**:19-27. 査読有、
doi: 10.1016/j.brainres.2013.01.024

Shimotakahara S, Shiroyama Y, Fujimoto T, Akai M, Onoue T, Seki H, Kado S, Machinami T, Shibusawa Y, Uéda K, Tashiro M (2012) Demonstration of three dopamine molecules bound to α -synuclein: Implication of oligomerization at the initial stage. **J. Biophys. Chem.** **3**: 149-155. 査読有、
doi: 10.4236/jbpc.2012.32017

Sae-Ung K, Uéda K, Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P (2012) Melatonin reduces the expression of α -synuclein in the dopamine containing neuronal regions of amphetamine-treated postnatal rats. **J. Pineal Res.** **52**: 128-137. 査読有、
doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00927.x

Cheng F, Li X, Li Y, Wang C, Wang T, Liu G, Baskys A, Uéda K, Chan P, Yu S (2011) α -Synuclein promotes clathrin-mediated NMDA receptor endocytosis and attenuates NMDA-induced dopaminergic cell death. **J. Neurochem.** **119**: 815-825. 査読有、
doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07460.x

Li YH, Gao N, Ye YW, Li X, Yu S, Yang H, Uéda K, Chan P (2011) α -Synuclein functions as a negative regulator for expression of tyrosine hydroxylase. **Acta Neurol. Belg.** **111**: 130-135. 査読有、

<http://www.actaneurologica.be/acta/article.asp?lang=en&navid=137&id=15088&mod=acta>

Xuan Q, Xu SL, Lu DH, Yu S, Zhou M, Uéda K, Cui YQ, Zhang BY, Chan P (2011) Increased expression of α -synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation. **J. Neural Transm.** **118**: 1575-1583. 査読有、
doi: 10.1007/s00702-011-0636-3

Yin J, Han J, Zhang C, Ma QL, Li X, Cheng F, Liu G, Li Y, Uéda K, Chan P, Yu S (2011) C-terminal part of α -synuclein mediates its activity in promoting proliferation of dopaminergic cells. **J. Neural Transm.** **118**: 1155-1164. 査読有、
doi: 10.1007/s00702-011-0592-y

Zhu Y, Duan C, Lü L, Gao H, Zhao C, Yu S, Uéda K, Chan P, Yang H (2011) α -Synuclein overexpression impairs mitochondrial function by associating with adenylate translocator. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** **43**: 732-741. 査読有、
doi: 10.1016/j.biocel.2011.01.014

〔学会発表〕(計3件)

Leeboonngam T, Sae-Ung K, Uéda K, Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P (2012)

Protective effect of melatonin on the expression of α -synuclein in hippocampus of amphetamine-treated postnatal rat. **The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, APSN 2012**, Kobe, Japan [10/01/12] **J. Neurochem.** **123** [Suppl 1]: 78.

Yin J, Wang T, Han J, Zhang C, Ma Q, Li X, Cheng F, Liu G, Li Y, Uéda K, Chan P, Yu S (2011) C-Terminal part of α -synuclein mediates its activity in promoting proliferation of dopaminergic cells. **2011 International Conference on Molecular Neurodegeneration**, Shanghai, China [09/22/11] **Molecular Neurodegeneration** 2012, **7** [Suppl 1]: S21.

Sae-Ung K, Govitrapong P, Uéda K, Phansuwan-Pujito P (2011) Protective effect of melatonin on the dopamine pathway from amphetamine-induced neurotoxicity in postnatal rats. **The 23rd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, ISN**, Athens, Greece [08/31/11]

〔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：

<http://www.ncnp.go.jp/hospital/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 健治 (UEDA, Kenji)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センタ

ー・病院・副院長室・研究生

研究者番号：90261180

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：