

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500425

研究課題名(和文) シヌクレイノパチー脳における異常 シヌクレインの意義と結合タンパク質の役割

研究課題名(英文) The role of abnormal alpha-synuclein and its partners in synucleinopathy

研究代表者

丹治 邦和 (Tanji, kunikazu)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10271800

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)：シヌクレイン分子(Syn)の異常凝集を特徴とするシヌクレイノパチーでは、異常凝集を抑制することができれば、病態改善だけでなく、根本的な治療につながる可能性がある。我々はタンパク質分解関連分子NUB1がシヌクレイノパチーに深く関与することを報告してきた。本研究では、NUB1の異常凝集に対する効果を明らかにするために遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。作製したNUB1 トランスジェニック(Tg)マウスおよびNUB1/synダブルTgマウスは行動学および病的解析には差異は認められなかった。今回の結果を踏まえ、異常凝集を抑制するための新たなアプローチを模索し現在準備を進めている。

研究成果の概要(英文)：Abnormal synuclein is deposited in the presynapses and cytoplasmic inclusions found in synucleinopathy such as Parkinsons disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB) and multiple system atrophy. Likewise, NUB1 is also accumulated in these specific regions together with abnormal synuclein. Although NUB1 can degrade synuclein expressed in cultured cells, it is not clear that NUB1 possesses this ability in vivo. We created transgenic mice expressing NUB1 and synuclein to investigate the role of NUB1 on abnormal synuclein deposition. Immunohistochemical and biochemical studies confirmed that NUB1 was expressed in the neurons. Unexpectedly, however, there were no alterations of abnormal synuclein deposition between mice expressing synuclein and synuclein/NUB1. These results suggest that NUB1 unlikely degrades synuclein in vivo.

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：タンパク質分解 異常蓄積 神経変性

## 1. 研究開始当初の背景

家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定された シヌクレイン ( $\alpha$ -syn) は、本来シナプス末端に局在するタンパク質であり、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。一方、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) では、 $\alpha$ -syn の異常蓄積が神経細胞の胞体および神経突起に認められ、さらにタンパク質分解酵素に耐性を示す異常  $\alpha$ -syn が軸索末端に多量に蓄積している。これらの知見から異常  $\alpha$ -syn の蓄積が神経細胞の機能不全を誘発し、シヌクレイノパチーの病因の一つであると考えられている。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では以下2点を明らかにすることを目的とした。

1. 異常  $\alpha$ -syn および、その結合分子 NUB1 の特徴を明らかにする。
2. 生体内における NUB1 の異常  $\alpha$ -syn に対する効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

家族性の点突然変異 (A53T) を導入した  $\alpha$ -syn トランスジェニック (Tg) マウスならびに NUB1 Tg を用いて、ダブル Tg マウスを作製した。さらにレビー小体型病 (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。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った。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本研究室に保管、または新潟大学脳研究所から入手しており、いずれも書類による審査を経て、使用しており倫理上問題はない。

## 4. 研究成果

(1) 異常  $\alpha$ -syn は SDS 変性状態では検出が困難であるため、スロットプロット解析による非変性状態において検出した。さらに異常  $\alpha$ -syn の結合分子である NUB1 を指標として用いて解析を進めた。初年度に作製した NUB1 抗体を用いて免疫沈降後、NUB1 との結合分子を検討したところ、p62/sequestosome1 (p62) が同定された。

(2) p62 は種々の神経変性疾患の細胞内封入体に蓄積しており、ユビキチンと同様の染色像を示す。特に FTLD-TDP では p62 は TDP-43 との結合量が減少していた。

(3) p62 は酸化ストレスにより発現が亢進することが報告されている。実際に、アルツハ

イマー病脳内では p62 量が正常対照例と比較して有意に増加していることを見出した。一方、レビー小体型認知症では統計学的有意差は認められなかった。

(4) NUB1/  $\alpha$ -syn ダブル Tg マウスを作製し、行動学的および病理学的に検討した。  $\alpha$ -syn Tg マウスおよび NUB1/  $\alpha$ -syn ダブル Tg マウスともに海馬および大脳皮質の前シナプスにおいて異常  $\alpha$ -syn が蓄積していた (図1)。行動学的に特に両群で違いは見出せなかった。

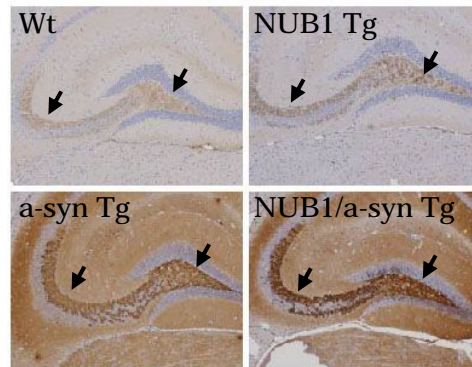


図1 海馬 CA3 および CA4 のシナプス終末における異常シヌクレイン沈着。タンパク質分解酵素で5分間処理した後、シヌクレイン抗体 (マウスモノクローナル 4D6) により免疫染色を行った。シヌクレイン陽性シグナル (矢印) が  $\alpha$ -syn Tg および NUB1/  $\alpha$ -syn ダブル Tg ではコントロール (Wt) と NUB1 Tg に比べて強い染色性が認められる。

計画予定どおり研究は進行した。予想に反して、NUB1 による異常  $\alpha$ -syn の分解効果は認められず、培養細胞での結果とは異なることが明らかとなった。ヒトでは NUB1 のアイソフォームとして NUB1L が存在し、他のほ乳類では NUB1L のみが発現している。NUB1L のアミノ酸配列および予備実験の結果から異常分子との結合能は NUB1 よりも強いと予想される。今後、NUB1L の  $\alpha$ -syn への影響を NUB1L 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  $\alpha$ -syn の意義を再検討する予定である。これらの結果は孤発性シヌクレイノパチーの病態解明にむすびつくと同時に治療への標的ともなりえる可能性を秘めている。

## 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10件)

1. Miki, Y., F. Mori, T. Kon, K. Tanji, Y. Toyoshima, M. Yoshida, H. Sasaki, et al., Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in

various neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, 34: **2014**. p.148-158.  
DOI: 10.1111/neup.12080.  
査読あり

2. Tanji, K., A. Maruyama, S. Odagiri, F. Mori, K. Itoh, A. Kakita, H. Takahashi, et al., Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72: **2013**. p.18-28.  
DOI: 10.1097/NEN.0b013e31827b5713.  
査読あり

3. Odagiri, S., K. Tanji, F. Mori, Y. Miki, A. Kakita, H. Takahashi, and K. Wakabayashi, Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia. *Biochem Biophys Res Commun*, 430: **2013**. p.394-399.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.034  
S0006-291X(12)02195-X [pii].  
査読あり

4. Tanji, K., H.X. Zhang, F. Mori, A. Kakita, H. Takahashi, and K. Wakabayashi, p62/sequestosome 1 binds to TDP-43 in brains with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *J Neurosci Res*, 90: **2012**. p.2034-2042.  
DOI: 10.1002/jnr.23081.  
査読あり

5. Tanji, K., S. Odagiri, A. Maruyama, F. Mori, A. Kakita, H. Takahashi, and K. Wakabayashi, Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis*, 49C: **2012**. p.190-198.  
DOI: S0969-9961(12)00304-X [pii]  
10.1016/j.nbd.2012.08.017.  
査読あり

6. Odagiri, S., K. Tanji, F. Mori, A. Kakita, H. Takahashi, and K. Wakabayashi, Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in alpha-synucleinopathy. *Acta Neuropathol*, 124: **2012**. p.173-186.  
DOI: 10.1007/s00401-012-0975-7.  
査読あり

〔学会発表〕(計6件)

1. 15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, August 22-27, 2013. Accumulation of autophagic adaptor protein, p62/sequestosome 1, in the brains

of Alzheimer's disease  
Kunikazu Tanji, Tomoh Matsumiya, Atsushi Maruyama, Saori Odagiri, Fumiaki Mori, Ken Itoh, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi and Koichi Wakabayashi

2. Nuero2013 第36回日本神経科学大会・京都市・2013年6月20-23日  
アルツハイマー病とシヌクレイノパチーにおけるストレス防御システム関連タンパク質の検討  
丹治 邦和, 丸山 敦史, 小田桐 紗織, 森文秋, 伊東 健, 柿田 明美, 高橋 均, 若林 孝一

3. 第54回日本神経病理学会(2013年4月24-26日、東京)  
神経変性疾患脳におけるユビキチンリガーゼ Keap1 の解析  
丹治 邦和, 丸山 敦史, 小田桐 紗織, 森文秋, 伊東 健, 柿田 明美, 高橋 均, 若林 孝一

〔図書〕(計1件)

1. Tanji K., F. Mori, and K. Wakabayashi  
Elsevier Inc. Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging Volume2, **2013**  
p.383-389

〔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