

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591272

研究課題名(和文) シヌクレインの選択的オートファジー分解におけるBAG3/HSP70複合体の役割

研究課題名(英文) The role of BAG3/HSP70 complex in selective autophagic degradation of alpha-synuclein

研究代表者

渡邊 義久 (Watanabe, Yoshihisa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50363990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の発症機序および治療法の開発を目指して、 $\alpha$ -シヌクレイン凝集体の分解と凝集体形成の解明を目的とし研究を行った。培養細胞内に線維化 $\alpha$ -シヌクレインを導入、その分解過程を観察したところ、オートファジー分解に関与する蛋白質群が凝集体に局在していた。また、オートファジー関連蛋白質を阻害したところ、その分解が抑制された。

さらに、リソソーム蛋白質カテプシンBの機能の阻害により、線維化 $\alpha$ -シヌクレインを核とした内在 $\alpha$ -シヌクレインの凝集化が抑制されたことから、オートファジー等を通して切断された線維化 $\alpha$ -シヌクレインがシードとなって新たな $\alpha$ -シヌクレイン凝集体が形成されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the degradation and aggregate formation of  $\alpha$ -synuclein associated with Parkinson's disease.  $\alpha$ -Synuclein fibrils were introduced into cultured cells, and their degradation was examined immunocytochemically. Autophagy-associated proteins were colocalized to these aggregates. Their degradation was inhibited by knockdown of Atg-5. Moreover, the nucleation activity of  $\alpha$ -synuclein fibrils was reduced by inhibition of the lysosomal protein cathepsin B, resulting in a decrease in  $\alpha$ -synuclein aggregates. These results suggested that the cleavage of  $\alpha$ -synuclein fibrils into lysosomes via autophagy and endocytosis was involved in  $\alpha$ -synuclein-aggregate formation.

研究分野：神経内科学

キーワード： $\alpha$ -シヌクレイン オートファジー分解 凝集体形成 p62

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病やアルツハイマー病など多くの神経変性疾患は、異常タンパク質や異常オルガネラの蓄積により発症すると考えられている。通常、異常タンパク質はタンパク質分解機構(プロテアソームやオートファジー)により分解されている。しかし、様々なストレスや加齢などによる分解機構の破綻は、これら異常タンパク質の蓄積を引き起こし、最終的に疾患を発症する。

家族性パーキンソン病の遺伝子解析から、Lewy 小体の構成成分でもある  $\alpha$ -シヌクレインのアミノ酸変異や遺伝子重複が原因であることが報告された。このことから、 $\alpha$ -シヌクレインの構造異常や細胞内レベルの増加が疾患発症の原因の1つであると考えられている。これまでに、我々も含め複数の研究者が  $\alpha$ -シヌクレイン代謝に関する解析を行っており、細胞内ではプロテアソーム系やオートファジー系などが、そして細胞外ではセリンプロテアーゼ Neurosin がその分解に関与していることが明らかになった。Lewy 小体に含まれる  $\alpha$ -シヌクレインは Ub 化を受けているが、Ub の付加は線維形成期から封入体形成期と考えられている。さらに、 $\alpha$ -シヌクレインの Ub 非依存的分解も報告されていることから、 $\alpha$ -シヌクレインの代謝過程には Ub 依存・非依存的の2つの経路が存在すると考えられている。多くの分解基質は、ユビキチン(Ub)シグナルの付加によりプロテアソームや選択的オートファジー系で分解される。しかし、最近我々は Ub に依存しない選択的オートファジー分解経路も報告されており、 $\alpha$ -シヌクレインの分解機構を詳細に解析することは重要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、 $\alpha$ -シヌクレインの分解機構の解明および疾患発症との関連性を明らかにすることを目的とする。特に、疾患発症と関わりのある線維化またはオリゴマー $\alpha$ -シヌクレインの分解にどのような因子が関わっているのかを解明する。選択的オートファジーに関与する因子として p62 や BAG3/HSP70 複合体を中心にさらに、細胞内  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体形成における  $\alpha$ -シヌクレイン分解の関わりについても解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 線維化 $\alpha$ -シヌクレインの調製と培養細胞への導入

6xHis tag  $\alpha$ -シヌクレイン (His- $\alpha$ -シヌクレイン) を大腸菌で発現させ、Ni カラムで精製する。0.2 mg/ml の精製蛋白質を 500rpm で 2 週間攪拌することで線維化  $\alpha$ -シヌクレインを作製した。

培養細胞への導入のために、リポフェクトアミン LTX と線維化  $\alpha$ -シヌクレインを混ぜ、室温で 30 分間インキュベートした。その後、HEK293 細胞へ添加した。

### (2) 免疫細胞・組織化学

4%PFA で固定した細胞もしくは固定後ミクロトームで作製した切片は PBS で洗浄された。0.1%Triton X-100 処理を行った後、正常ヤギ血清でブロッキング、1次抗体を 25°C、12 時間反応させた。PBS で洗浄後、蛍光 2 次抗体を反応させ (25°C、4 時間)、洗浄・封入した。LSM 510 META レーザー共焦点顕微鏡で観察した。

### (3) マウス脳内への線維化 $\alpha$ -シヌクレインのインジェクション

マウス線条体へ線維化  $\alpha$ -シヌクレイン (5mg/ml) を麻酔下でインジェクション (0.5 $\mu$ l/min) を行った。6 ヶ月後、作製したマウスは免疫組織化学解析に使用した。なお、これら動物実験を実施するに当たって、京都府立医科大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号: M25-216)。

## 4. 研究成果

### (1) オートファジーによる線維化 $\alpha$ -シヌクレインの分解機構の解析

*in vitro* で線維化した  $\alpha$ -シヌクレインをトランスフェクション試薬で HEK293 細胞内へ導入した。そして、その細胞におけるユビキチン (Ub)、p62、LC3 の局在性を免疫細胞化学的に解析した。導入された線維化  $\alpha$ -シヌクレインはリン酸化を受け、細胞内で大きな凝集体を形成する (図 1, P- $\alpha$ Syn)。これらの凝集体に Ub、p62 や LC3 は共局在を示した (図 1)。

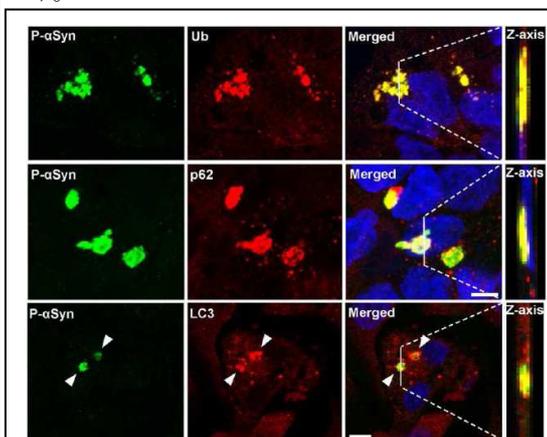
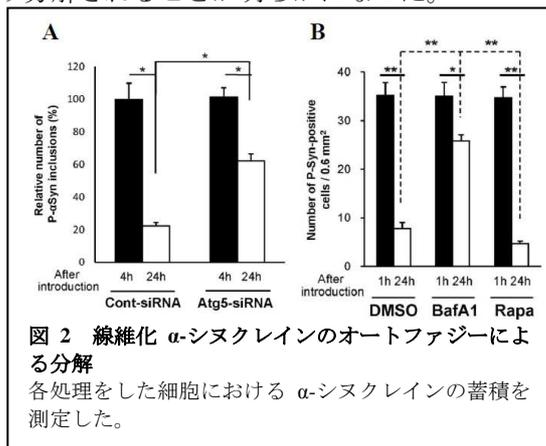


図 1  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体(P- $\alpha$ Syn)とユビキチン(Ub)、p62、LC3 の共局在

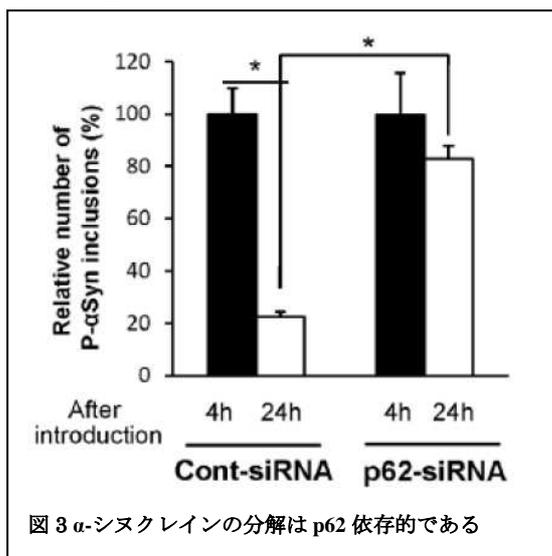
HEK293 細胞へ線維化  $\alpha$ -シヌクレインは導入され、抗リン酸化  $\alpha$ Syn 抗体、Ub 抗体、p62 抗体、LC3 抗体で染色された。

この結果から、 $\alpha$ -シヌクレイン凝集体はオートファジーにより分解される可能性が示唆された。そこで、この凝集体の蓄積がオートファジーの抑制や促進の影響を受けるか検討した。オートファジー関連蛋白質 Atg-5 のノックダウンによりオートファジーを抑制すると、24 時間後の凝集体蓄積が増加した (図 2A)。また、Rapamycin でオートファジーを促進すると、凝集体蓄積が減少した (図 2B)。以上の結果から、細胞内へ導入した線

線維化  $\alpha$ -シヌクレインはオートファジーにより分解されることが明らかになった。



オートファジーアダプターp62は基質の選択的分解に関与している。そこで、p62が線維化  $\alpha$ -シヌクレインの分解に必要なかを確認した。p62をノックダウンすると、オートファゴソームマーカーLC3に取り囲まれた  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体は減少し、凝集体の蓄積は増加する(図3)。このことから、p62が線維化  $\alpha$ -シヌクレインのオートファジーによる選択的分解に関与していることが分かった。



## (2) $\alpha$ -シヌクレイン凝集体と BAG3/HSP70 複合体の共局在性の解析

*in vitro* で作製した線維化  $\alpha$ -シヌクレインをマウス線条体へマイクロインジェクション (5 $\mu$ g) することでパーキンソン病モデルマウスを作製した。このマウスの線条体における  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体と Ub、p62、HSP70 そして BAG3 との共局在性を免疫組織化学的に解析した。その結果、これらすべてのタンパク質が  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体に存在していた(図4)。また、培養細胞モデルでも、導入した線維化  $\alpha$ -シヌクレインを粗精製すると、その不溶性画分に BAG3 や p62 が含まれていた(図5)。

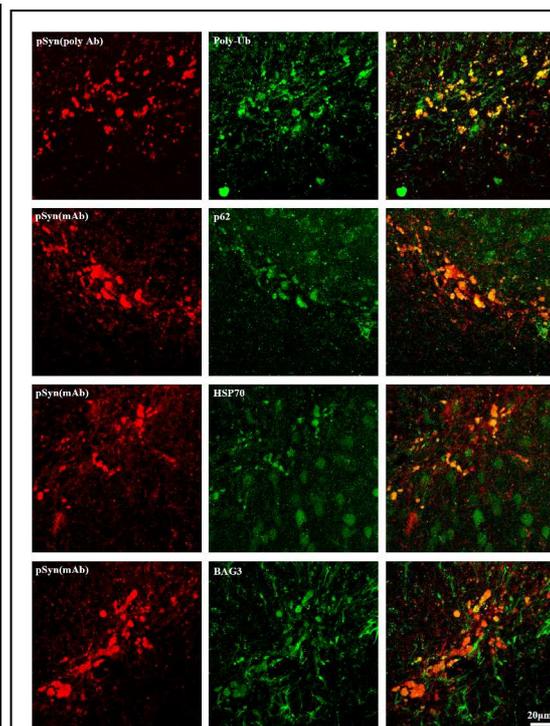
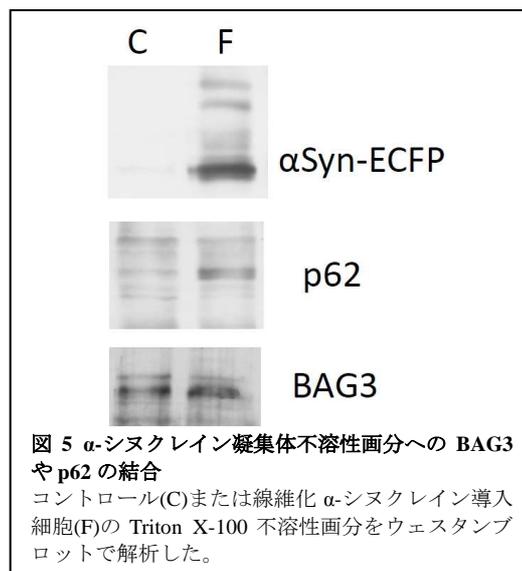


図 4 パーキンソン病モデルマウス脳における  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体と BAG/HSP70 複合体の共局在 Ub、p62、HSP70 として BAG3 と  $\alpha$ -シヌクレインの局在をパーキンソン病モデルマウスで解析した。



さらに、 $\alpha$ -シヌクレイン凝集体が認められる領域でのオートファジー動態を観察するために、オートファゴソームマーカーLC3の免疫染色を行った。その結果、線条体へ線維化  $\alpha$ -シヌクレインをインジェクションしたマウス脳内では、広範囲に伝播し、リン酸化  $\alpha$ -シヌクレイン陽性の新たな凝集体が認められる。そして、その領域では LC3 蛋白質の発現増加や凝集体への共局在が観察された(図6)。

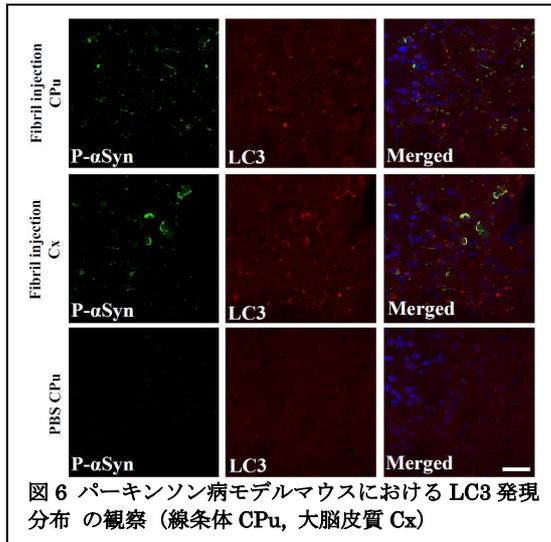


図6 パーキンソン病モデルマウスにおける LC3 発現分布の観察 (線条体 CPu, 大脳皮質 Cx)

### (3) 線維化 $\alpha$ -シヌクレインのカテプシン B による切断と $\alpha$ -シヌクレイン凝集化活性

ECFP- $\alpha$ -シヌクレインを発現する HEK293 細胞へ線維化  $\alpha$ -シヌクレインを導入すると、それを核として細胞内の ECFP- $\alpha$ -シヌクレインは凝集化する。これにより線維化  $\alpha$ -シヌクレインのシード活性を定量的に測定する方法を確立した。そこで、 $\alpha$ -シヌクレインのリソソームにおける分解とシード活性との関係を調べるために、塩化アンモニウムや Bafilomycin A1 処理でリソソーム機能を抑制した時のシード活性を測定した。その結果、20mM 塩化アンモニウムや 10nM Bafilomycin A1 処理下では、線維化  $\alpha$ -シヌクレインの導入にも関わらず ECFP- $\alpha$ -シヌクレインの凝集化はほとんど起きなかった (図 7A)。さらに、システインプロテアーゼ阻害剤 E-64d やカテプシン B 阻害剤 CA-074Me 処理、siRNA によるカテプシン B 発現の抑制によって、そのシード活性は抑制された (図 7B)。このことから、導入した線維化  $\alpha$ -シヌクレインのカテプシン B 切断産物が核となって新たな ECFP- $\alpha$ -シヌクレインの凝集化を促すと考えられる。

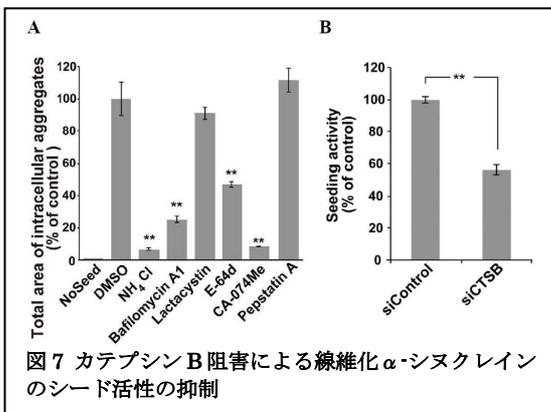


図7 カテプシン B 阻害による線維化  $\alpha$ -シヌクレインのシード活性の抑制

### (4) マウスニューロンにおける $\alpha$ -シヌクレイン発現分布の解析

マウス海馬由来初代培養神経細胞を用い、抑制性ニューロンおよび興奮性ニューロン

における  $\alpha$ -シヌクレイン発現を調べた。抑制性ニューロンは glutamic acid decarboxylase (GAD)、parvalbumin、somatostatin で、興奮性ニューロンは vesicular glutamate transporter-1 (vGluT-1)で検出した。その結果、抑制性ニューロンでは  $\alpha$ -シヌクレイン発現は非常に低く、興奮性ニューロンではシナプス前終末ボタンや細胞体に強く発現していた (図 8)。この観察はマウス海馬 CA1 領域における  $\alpha$ -シヌクレイン発現解析でも同様の結果を得た (図 9)。

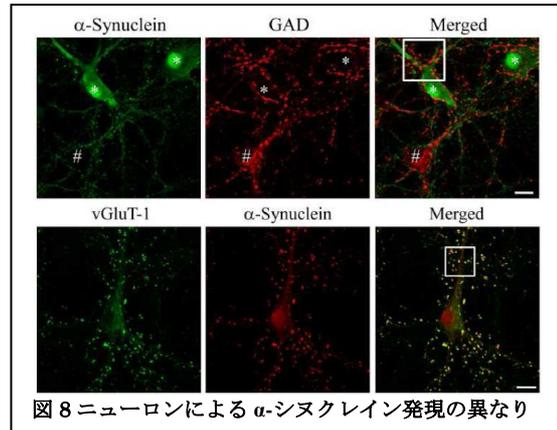


図8 ニューロンによる  $\alpha$ -シヌクレイン発現の異なり

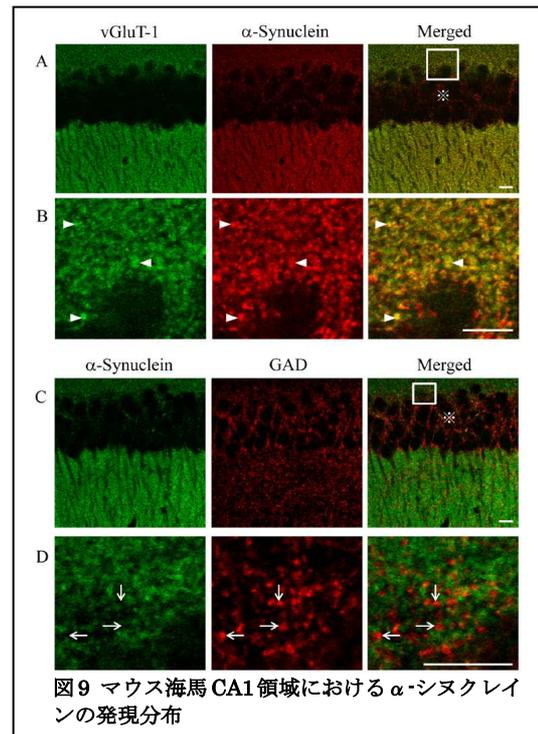


図9 マウス海馬 CA1 領域における  $\alpha$ -シヌクレインの発現分布

### (5) $\alpha$ -シヌクレイン凝集体への S349 リン酸化 p62 の蓄積

培養細胞およびマウス脳内で  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体を形成させ、S349 リン酸化 p62 の蓄積を免疫染色で解析した。

図 10、11 に示すように、培養細胞 (図 10) やマウス脳内 (図 11) のリン酸化  $\alpha$ -シヌクレイン陽性凝集体に S349 リン酸化 p62 が共局在している。そして、神経線維では局在性は低い、細胞体では非常に高いことが明らかとなった。

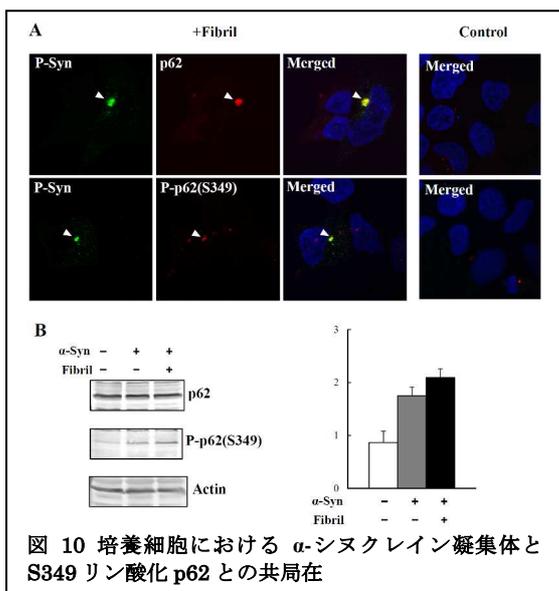


図 10 培養細胞における  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体と S349 リン酸化 p62 との共局在

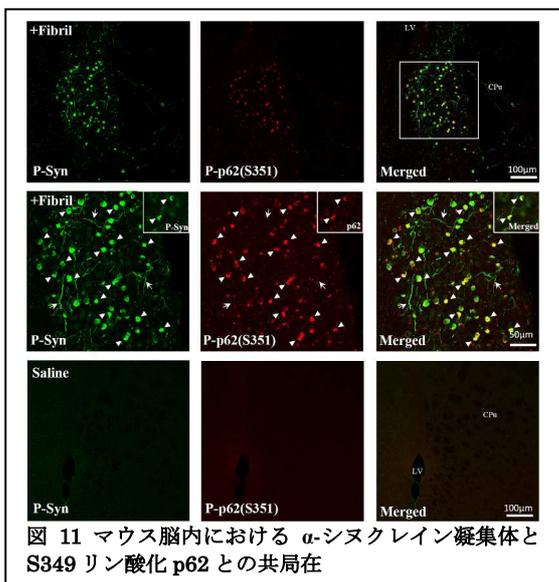


図 11 マウス脳内における  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体と S349 リン酸化 p62 との共局在

## 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 3 件)

- ① Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein inclusions. PLoS One (2012) 7: e52868. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0052868
- ② Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tatebe H, Miyata S, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. Differential expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons. PLoS ONE (2014) 9: e89327. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0089327
- ③ Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y, Tatebe H, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the

aggregate forming activity of exogenous  $\alpha$ -synuclein fibrils. Neurobiol Dis (2015) 73: 244-253. (査読有)

DOI: 10.1016/j.nbd.2014.10.011

[学会発表] (計 15 件)

- ① K. Taguchi, Y. Watanabe, A. Tsujimura, M. Tanaka; Differential expression of alpha-synuclein in vitro and in vivo. 北米神経科学会 2014 2014 年 11 月 15-19 Washington, DC.
- ② 渡邊義久. 異常タンパク質凝集体における p62 リン酸化. 第 8 回オートファジー研究会 2014 年 11 月 10-11 札幌市.
- ③ 辻村敦, 田口勝敏, 渡邊義久, 田中雅樹.  $\alpha$ シヌクレインの細胞内凝集はリソソームで形成される. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 横浜市.
- ④ 辻村敦, 田口勝敏, 渡邊義久, 田中雅樹. パーキンソン病に見られるレビー小体凝集体の細胞内形成過程の解析. 第 4 回 4 大学連携研究フォーラム 2014 年 12 月 2 京都市.
- ⑤ 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹. Differential expression of alpha-synuclein with a cell-type dependent manner in vivo. 第 120 回日本解剖学会総会 2015 年 3 月 21-23 神戸市.
- ⑥ 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹. レヴィ小体主要構成分子  $\alpha$ -Synuclein の脳内発現解析. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15-18 京都市.
- ⑦ 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹. パーキンソン病関連分子  $\alpha$ -Synuclein の多様な脳内発現プロファイルについて. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月 27-29 下野市.
- ⑧ 渡邊義久, 辻村敦, 田口勝敏, 田中雅樹. パーキンソン病治療薬開発を目的とした汽水域放線菌ライブラリーからのオートファジー誘導物質のスクリーニング. 4 大学連携研究フォーラム. 2013 年 12 月 9 日 京都市.
- ⑨ Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Differential expression of  $\alpha$ -synuclein depends on cell-types in cultured neurons. 第 36 回日本神経科学大会. 2013 年 6 月 20-23 日 京都市.
- ⑩ Tatebe H, Tokuda T, Ishi Ryotaro, Watanabe Y, Taguchi K, Kasai T,

Tsujimura A, Mizuta I, Mizuno T, Tanaka M, Nakagawa M.  $\alpha$ -Synuclein is present as a monomer in the biological fluid. 第36回日本神経科学大会. 2013年6月20-23日 京都市.

⑪ Watanabe A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T. Transendocytosis is impaired in CADASIL mutant NOTCH3. 第36回日本神経科学大会. 2013年6月20-23日 京都市.

⑫ 渡邊義久、田中雅樹. パーキンソン病関連蛋白質 $\alpha$ -Synucleinの凝集体蓄積とマクロオートファジー. 細胞内ロジスティクス・シンポジウム. 2013年9月17-18日 淡路市.

⑬ Taguchi K, Watanabe Y, Tatebe H, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. Autophagic clearance of Lewy body-like $\alpha$ -synuclein inclusions. 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease. Mar 6-10, 2013; Florence, Italy.

⑭ Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. Autophagic clearance of  $\alpha$ -synuclein inclusions and impaired mitochondria. 第35回日本神経科学大会. 2012年9月18-21日 名古屋市.

⑮ Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. p62/SQSTM1-dependent autophagic clearance of Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein inclusions. Neuroscience 2012. Oct 13-17, 2012; New Orleans, USA.

[図書] (計 2件)

① Watanabe Y, Tsujimura A, Taguchi K, Tanaka M.  $\alpha$ -Synuclein metabolism and aggregation in the pathogenesis of Parkinson's disease. In: Polizzi M and Kanowitz H editors. Alpha-Synuclein: Functional Mechanisms, Structure and Role in Parkinson's Disease. (Nova Science Publishers Inc, New York) (2013) 29-50.

② Watanabe Y, Tanaka M. Physiological functions and pathology of neurosin/kallikrein 6 in the central nervous system. In : Chiba I and Kamio T editors. Serine Proteases: Mechanism, Structure and Evolution. (Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, New York) (2012) 129-137.

[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：  
出願年月日：  
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

渡邊 義久 (WATANABE, Yoshihisa)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50363990

(2) 研究分担者

田中 雅樹 (TANAKA, Masaki)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：80264753

(3) 連携研究者

徳田 隆彦 (TOKUDA, Takahiko)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80242692