

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640033

研究課題名(和文) シヌクレインテトラマーの立体構造を特異的に認識する抗体の作製

研究課題名(英文) Screening of molecules involved in the disease-associated conformational change of alpha-synuclein.

研究代表者

高松 芳樹 (TAKAMATSU, Yoshiki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主任研究員

研究者番号：50250204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレイン( $\alpha$ -S)が病態関連オリゴマーを形成するメカニズムを明らかにするために、安定なテトラマーを形成しにくいことが報告されているA53T変異型のヒト $\alpha$ -Sを過剰発現させたトランスジェニックフライでのトランスクリプトーム及びプロテオームの網羅的解析を行った。その結果、野生型の $\alpha$ -Sを発現させた個体に比べてA53T変異型の $\alpha$ -Sを発現させた個体では、ミトコンドリアに局在し、家族性パーキンソン病原因遺伝子の一つであるPINK1のリン酸化標的でもあるTRAP1が顕著に減少することを明らかにした。この結果から、TRAP1は変異型 $\alpha$ -Sによるパーキンソン病のミトコンドリア異常に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although dysregulation of the conformation of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -S) is supposed to underlie the pathogenesis of  $\alpha$ -synucleinopathies, the mechanism is elusive. Therefore, the objective of the present study was to identify the molecule which might be involved in the formation of pathogenic  $\alpha$ -S oligomer. Based on the idea that differential expression profiles of transgenic animals bearing the wild type or PD-causing mutation A53T of  $\alpha$ -S, which is known to decrease a formation of physiological tetramer, may provide a clue regarding the mechanism of toxic oligomer formation, we performed both transcriptome and proteome analyses using transgenic flies. Notably, we found that TRAP1, a mitochondrial chaperone, was significantly reduced in the A53T fly as compared to the fly expressing wild type  $\alpha$ -S. Further analyses were performed by quantitative PCR and western blot. Taken together, these results suggest that TRAP1 might be involved in the mitochondrial dysfunction in the A53T type of PD.

研究分野：分子生物学

キーワード：シヌクレイン パーキンソン病 テトラマー TRAP1 ミトコンドリア トランスジェニックフライ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生理的条件下での生体内因子の存在態様は、その因子の細胞内での局在や生理的機能を知る上で重要な手掛かりをもたらすものである。本研究で研究対象とした シヌクレインは140アミノ酸からなる蛋白で、シナプス前終末に豊富に存在することが報告されている。シヌクレインはパーキンソン病関連因子として多くの解析が進められてきたが、その疾患機序は依然として議論の対象であり、またそれ以前に生理的機能も明らかではない。この観点から、シヌクレインの細胞内での生理的条件下での存在態様は、パーキンソン病の疾患機序の解明を左右する重要な情報となる。

(2) シヌクレインは従来細胞内において多くは soluble なモノマーとして存在すると考えられてきた。またその構造解析から、N末側に脂質二重膜への介入領域が存在することが報告され、実際に一部は脂質ラフトに局在することも報告されている。さらに、シヌクレインのモノマー、オリゴマーとそれぞれ直接結合する因子も多数報告され、それらとの結合を介したミトコンドリア内膜やSNARE 複合体等への局在を通しての機能発現も行っていると考えられている。

(3) このような状況下、米国の Selkoe らのグループにより、シヌクレインは生理的条件下で安定なテトラマーを形成して存在するとの報告がなされた。

## 2. 研究の目的

生理的条件下で安定な存在態様とされる、シヌクレインのテトラマーに対する特異抗体を作製することを通して、シヌクレインが疾患に関与する病態関連オリゴマーを形成するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 研究代表者の所属する研究室では赤血球に $\alpha$ シヌクレインが豊富に存在することを以前に報告しているが(2007)、テトラマーシヌクレインを抗原として安定した態様で取得するノウハウについては保有しておらず、まずこの条件検討を行った。安定したテトラマーを構成させるために、Selkoe らの論文で報告された架橋剤 Disuccinimidyl glutarate (DSG)を赤血球サンプルに混合して調整し、ウエスタンブロットで検出する条件を検討した。赤血球サンプルの他、ドーパミン神経で野生型または変異型のヒト $\alpha$ または $\beta$ シヌクレインを発現させたトランスジェニックフライの頭部サンプルについても検討を行った。

(2) シヌクレインの検出にはヒト、マウスの各シヌクレインに反応するDB社の抗 $\alpha$ シヌクレイン抗体の他、Selkoe らの論文で使用された15G7抗体、抗リン酸化 $\alpha$ シヌクレイン抗体(#64)、重合したシヌクレインのみを検出する5G4抗体、ネガティブコントロールとして抗 $\beta$ シヌクレイン抗体(BD社)を使用した。

(3) 野生型または変異型のシヌクレインをドーパミン神経に特異的に発現させたトランスジェニックフライのマイクロアレイ解析についてはAffymetrix社のGeneChip Drosophila genome arrayを使用し、GeneSpringソフトウェアを用いて解析を行った。

(4) 上記トランスジェニックフライの質量分析による蛋白質発現の相対定量解析は、頭部蛋白質を抽出してiTRAQ試薬を用いて行った。解析にはAB sciex Protein Pilotソフトウェアを使用した。

## 4. 研究成果

(1) Selkoe らのグループはその後、分離ゲル上でテトラマー蛋白を識別することはできても、立体構造を維持しつつ抗原蛋白とし

て精製するのは困難であり、シヌクレインテトラマーは精製段階でモノマーとなることを報告した。本研究においても当初の計画を一部見直して、抗原蛋白の抽出をゲルの切り出しにより行うことを検討したが、テトラマーサイズのバンドは主要バンドではなく、スミアともなるため単一抗原にするには適当ではないと考えた。

(2) そこで、本来の目的である疾患に関与するシヌクレインの病態関連オリゴマーの形成メカニズムの解明に迫るべく、テトラマーを形成しにくいことが報告された(Dettmerら、Nat. Commun. 2015) A53T変異型のヒトシヌクレインを過剰発現させたトランスジェニックフライとその野生型を過剰発現させたフライでのトランスクリプトーム及びプロテオームの網羅的解析を行った。

(3) その結果、野生型のシヌクレインを発現させた個体に比べて、A53T変異型のシヌクレインを発現させた個体では、ミトコンドリアに局在し、家族性パーキンソン病原因遺伝子の一つであるPINK1のリン酸化標的でもあるTRAP1 (TNF receptor associated protein 1) が顕著に減少することを明らかにした。

(4) 興味深いことに、A53T変異型シヌクレインをトランスジェニックフライで発現させたときにはTRAP1の顕著な減少が見られるのに対し、A30P変異型シヌクレインを過剰発現させたときにはTRAP1の減少は観察されなかった。シヌクレインの各変異により、ミトコンドリアの形態異常にも差が見られることが知られており、

シヌクレインの変異箇所によるTRAP1の発現差異と、ミトコンドリアの異常の違いとの関係は今後さらに検討する必要がある。TRAP1と同様にA53Tの過剰発現では減少するが、A30Pの過剰発現では減少しないミトコンドリア因子として、パーキ

ンソン病患者脳でもその発現が減少しているTOM40が他のグループから報告されており、TRAP1についても、これと同様の疾患メカニズムに関与する可能性が考えられ、今後さらに検討したい。

(5) TRAP1はHsp90ファミリーのシャペロンであることから、A53T変異型シヌクレイン発現個体では、シャペロン機能の欠損によるテトラマー形成不全がミトコンドリアのフラグメンテーションを始めとする形態異常及び機能不全、そして酸化ストレスの促進を引き起こす可能性が考えられ、継続して研究を進めている。

## 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7件)

1. Takamatsu Y, Ho G, Koike W, Sugama S, Takenouchi T, Waragai M, Wei J, Sekiyama K, Hashimoto M. Combined immunotherapy with “anti-insulin resistance” therapy as a novel therapeutic strategy against neurodegenerative diseases. *npj Parkinson's Disease* 2017, 3 Article number 4  
doi:10.1038/s41531-016-0001-1  
査読有り
2. Takamatsu Y, Koike W, Takenouchi T, Sugama S, Wei J, Waragai M, Sekiyama K, Hashimoto M. Protection against neurodegenerative disease on Earth and in space. *npj Microgravity* 2016, 2 Article number: 16013  
doi:10.1038/npjmgrav.2016.13  
査読有り
3. Sekiyama K, Takamatsu Y, Koike W, Waragai M, Takenouchi T, Sugama S, Hashimoto M. Insight into the Dissociation of Behavior from Histology in

Synucleinopathies and in Related Neurodegenerative Diseases. *J Alzheimers Dis.* 2016, 52:831-41.

doi: 10.3233/JAD-151015

査読有り

4. Waragai M, Adame A, Trinh I, Sekiyama K, Takamatsu Y, Une K, Masliah E, Hashimoto M. Possible Involvement of Adiponectin, the Anti-Diabetes Molecule, in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2016, 52:1453-9.

doi: 10.3233/JAD-151116

査読有り

5. Sugama S, Sekiyama K, Kodama T, Takamatsu Y, Takenouchi T, Hashimoto M, Bruno C, Kakinuma Y. Chronic restraint stress triggers dopaminergic and noradrenergic neurodegeneration: Possible role of chronic stress in the onset of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* 2016, 51:39-46.

doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.009

査読有り

6. Sekigawa A, Takamatsu Y, Sekiyama K, Hashimoto M. Role of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Synucleins in the Axonal Pathology of Parkinson's Disease and Related Synucleinopathies. *Biomolecules.* 2015, 5:1000-11.

doi: 10.3390/biom5021000.

査読有り

7. Sekiyama K, Takamatsu Y, Waragai M, Hashimoto M. Role of genomics in translational research for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 452: 226-35.

doi:10.1016/j.bbrc.2014.06.028

査読有り

〔学会発表〕(計3件)

1. 高松芳樹、小池和佳子、本多芳子、児玉

亨、井上聡、橋本款 及び シヌクレインを共発現させたトランスジェニックフライモデルでの網羅的トランスクリプトーム解析 第39回日本分子生物学会年会 2016.12.2 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2. 高松 芳樹、関山 一成、井上 聡、本多 芳子、児玉 亨、橋本 款 レビー小体型認知症で同定された2種類の変異型 シヌクレイン (P123H、V70M) は、ショウジョウバエ脳において異なるメカニズムで神経変性を引き起こす 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015.12.3 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
3. 高松 芳樹、関山 一成、本多 芳子、児玉 亨、橋本 款 レビー小体型認知症で見出された変異型 シヌクレインを発現するショウジョウバエは神経変性様表現型を示す 第37回日本神経科学大会 2014.9.11 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計2件)

1. 高松芳樹、小池和佳子、藁谷正明、杉野弘、橋本款 株式会社メディカルドゥ 「脳内環境辞典」 2017年 P20-21.
2. 高松芳樹、関山一成、橋本款 技術情報協会 「遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発」 2014年第7章 各疾患における遺伝子治療、遺伝子診断の現状と今後有望な開発ターゲットの考察 第14節 パーキンソン病
- 【2】

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/parkinson/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高松 芳樹 (TAKAMATSU, Yoshiki)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・  
認知症・高次脳機能研究分野・主任研究員  
研究者番号：50250204

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし