

論文の内容の要旨

論文題目 α -シヌクレインの細胞内動態の研究
多系統萎縮症における乏突起神経膠細胞内封入体との関連について
指導教官 金澤一郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 岩田 淳

多系統萎縮症(multiple system atrophy, (MSA))の乏突起神経膠細胞内の glial cytoplasmic inclusion (GCI)を構成する主たる物質として近年 α -シヌクレインが同定された。 α -シヌクレインは 140 アミノ酸より構成される分子量約 14 万の蛋白質で、生理的に三次元構造をとらずその機能は不明である。 α -シヌクレインは N 末端側に KTKEGV の配列を中心とする繰返し配列を、C 末端側は酸性アミノ酸を多く有するが、機能が既知の蛋白質とは相同性が存在しない。類似蛋白として繰返し配列に非常に高い相同性を有しつつ C 末端側のアミノ酸配列が異なる β 、 γ -シヌクレイン、シノレチンが存在するが、それらについても機能は不明である。生理学的にはシナプス末端に多く存在し、シナプス小胞の放出の抑制作用を有していると考えられている。疾患との関連上では 2 種類の点突然変異が家族性パーキンソン病の原因となっていることが知られている上、パーキンソン病やレビー小体を伴う痴呆症(Dementia with Lewy body)の神

神経細胞内封入体であるレビー小体の主要構成成分であることが知られている。しかし、私の行った遺伝子解析を含め、多系統萎縮症や孤発性パーキンソン病、Dementia with Lewy bodies の患者では遺伝子変異は認められず、疾患における α -シヌクレインの蓄積現象の意義については現在のところ不明な点が多い。

私は、まず多系統萎縮症疾患脳での α -シヌクレインの細胞内信号伝達系への影響を検討するために、多数の信号伝達系の分子に対する抗体で剖検脳の免疫染色を行い、転写因子である Elk-1 に対する抗体によって患者脳の GCI が染色されることを初めて見いだした。Elk-1 は MEK や、ERK によって構成される古典的な MAP キナーゼ経路の活性化によってリン酸化され、その転写活性を発現する転写因子である。次に、この現象の病理学的意義を検討するために、不死化マウス神経膠細胞培養細胞において α -シヌクレインと Elk-1 との関係を検討した。マウス神経膠細胞由来の培養細胞 OS-3 に、 α -シヌクレインと Elk-1 をクローニングした発現ベクターを遺伝子導入したところ、 α -シヌクレインと Elk-1 は細胞内の細胞質において小顆粒状構造物 (cytoplasmic granule と命名) として複合体を形成することを蛍光二重染色法の共焦点レーザー顕微鏡によって確認した。免疫沈降では抗 α -シヌクレイン抗体で Elk-1 が、抗 Elk-1 抗体で α -シヌクレインが共沈し、複合体形成が裏付けられた。これらの複合体形成については Elk-1 の N 末端側に存在する ETS 領域と B-box 構造が重要であり、これらの構造を欠いた変異 Elk-1 を導入した場合には α -シヌクレインと Elk-1 とは免疫沈降で共沈しない上 cytoplasmic granule も形成しなかった。

次に、直接結合の可能性を遺伝子組み換え蛋白質によって検討したが、非リン酸化型 Elk-1、また試験管内でリン酸化した遺伝子組み換え Elk-1 蛋白質ともに α -シヌクレインとの結合の証拠は得られなかった。一方、Elk-1 と結合し、リン酸化することが知られている MAP キナーゼの ERK-2 については、 α -シヌクレインおよび Elk-1 の

双方と結合することが免疫沈降法及び GST プルダウン法によって確認されたため、複合体形成はこの三者によるものの可能性が考えられた。

さらに機能面への影響を検討した。 α -シヌクレインを発現した培養細胞は epidermal growth factor (EGF) やアニソマイシン、紫外線による外部からの刺激に対する MAP キナーゼのリン酸化、そして Elk-1 のリン酸化が α -シヌクレイン非導入細胞に比べて抑制される事をルシフェラーゼアッセイ法、及びリン酸化特異的抗体による免疫プロットによって確認した。そして、この効果には α -シヌクレインの N 末側の繰り返し配列が重要であることも確認した。

さらに、エクダイソン発現誘導システムを使用してマウス neuro2a 細胞の α -シヌクレインの発現誘導培養細胞系を確立して解析を進めたところ、培養細胞での α -シヌクレインの高発現は細胞の生存能を低下させ、それは MAP キナーゼ経路の活性化が低下するためであることを発見した。すなわち、 α -シヌクレインの高発現によって、ERK-1/2、p38MAP キナーゼ、SAPK/JNK といった一群の MAP キナーゼのリン酸化が低下し、その下流に位置する Elk-1 のリン酸化、c-fos 遺伝子の発現、c-FOS 蛋白の発現にまで負の調節作用が生じた。一方、MAP キナーゼキナーゼのリン酸化状態には変化は見られなかった上に加えて α -シヌクレインと MAP キナーゼとの結合が示されたため、この阻害作用は α -シヌクレインの MAP キナーゼへの直接の作用である可能性が示された。

一方、 α -シヌクレイン発現によって低下した細胞の生存能については、活性型 MEK-1 の遺伝子導入により MAP キナーゼのリン酸化が回復すると共に改善することを発見した。

我々の系では、導入され高発現した α -シヌクレインは凝集体を形成することはなかったが、上記の結果より、MAP キナーゼ経路の抑制を様々な形で生じ、結果として細胞の生存能低下につながったと考えた。そして、これらの現象が MSA、そしてパー

キンソン病での神経細胞死と関係している可能性があると考えた。その点において、MAPキナーゼのリン酸化回復は治療の可能性を示していると考ええる。