

## 審査の結果の要旨

氏名 岩田 淳

本研究は多系統萎縮症発症、パーキンソン病、レビー小体を伴う痴呆症において重要な役割を演じていると考えられる $\alpha$ -シヌクレインの疾患への関与を明らかにするために様々な実験を試みており下記の結果を得ている。

1.  $\alpha$ -シヌクレインに対する多クローン性抗体を作成するためにまず遺伝子組み換え $\alpha$ -シヌクレインを大腸菌より精製し、これをウサギに免疫して抗体を得た。さらに、ヒト $\alpha$ -シヌクレインのC末端の配列を利用して抗ペプチド抗体を作成した。それぞれの抗体について特異性を確認した後に多系統萎縮症剖検脳の免疫染色を行ったところ、 $\alpha$ -シヌクレインが乏突起神経膠細胞内封入体(GCI)に含まれる事が示された。
2. MSAにおけるGCIの役割について検討するため様々な抗体でMSA剖検脳の免疫染色を行い、HSP-56、HSP-60、HSP-90といったシャペロン、及び転写因子Elk-1に対する抗体がGCIを染色することを確認した。シャペロンの存在は蓄積した $\alpha$ -シヌクレインの構造が異常であり、凝集体を形成していることと関係があることを示唆し、また、Elk-1で染色されることについては、以前報告されたMAPキナーゼでのGCIの染色性とあわせ、MSAの乏突起神経膠細胞内でMAPキナーゼ経路の異常が生じている可能性が示唆された。
3. 正常脳とMSA患者脳より各種界面活性剤を使用して蛋白質を抽出したところ、MSA患者脳ではギ酸不溶性分画に $\alpha$ -シヌクレインが存在することが確認された。家族性パーキンソン病の一部では $\alpha$ -シヌクレインの突然変異が報告されており、パーキンソン病では不溶性 $\alpha$ -シヌクレインがレビー小体として神経細胞内に蓄積するという知見に基づいてMSA患者においても $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の配列検索をイントロン、エクソン境界を含めて行ったが、今回の解析では患者特異的な変異は発見できなかった。
4.  $\alpha$ -シヌクレインとElk-1との関係についてさらなる検討を加えるため、培養細胞系を使用して実験を行った。マウス神経膠細胞系のOS-3を使用して $\alpha$ -シヌクレインとElk-1とを高発現したところ、それぞれは免疫沈降により共沈すると共に、細胞質内に共存する構造物を形成したためこの構造物をcytoplasmic granule (CG)と命名した。Elk-1の欠失変異体による検討では、CG形成にはElk-1のETSドメイン及びB-boxが必要であり、これらのドメインを有する欠失変異体は $\alpha$ -シヌクレインと免疫沈降にて共沈した。融合蛋白による検討では $\alpha$ -シヌクレイン、及びElk-1との直接結合は観察されなかった。そこで、それぞれに結合する蛋白を検索したところ、MAPキナーゼであるERK-2が $\alpha$ -シヌクレイン及びElk-1双方と直接結合することを確認した。 $\alpha$ -シヌクレインとERK-2との結合部位をそれぞれの欠失変異体によって検討したが、 $\alpha$ -シヌクレ

インの N 末端繰り返し構造及び ERK-2 の 68-133 アミノ酸配列が必要であることが判明した。さらに、 $\alpha$ -シヌクレインの高発現が MAP キナーゼ系に与える影響について検討したが、培養細胞系では  $\alpha$ -シヌクレインの高発現が Elk-1 のリン酸化低下すなわち MAP キナーゼ系の活性低下につながることをホタルルシフェラーゼアッセイ法によって確認された。そして、その効果は  $\alpha$ -シヌクレインの N 末端繰り返し構造に特異的であることが示された。

5. さらに、 $\alpha$ -シヌクレインの高発現が培養細胞系に与える影響について検討するために、マウス neuro2a 細胞を用いて検討を加えた。通常の neuro2a 細胞では  $\alpha$ -シヌクレインの高発現によって細胞の生存能は低下した。これは  $\alpha$ -シヌクレインの N 末端の繰り返し構造による影響であり、C 末端では効果のないこと、そして  $\alpha$ -シヌクレインの相同蛋白質である  $\beta$ -シヌクレインではその効果のないことを確認した。その結果を基にエクダイン誘導系を使用して neuro2a の発現誘導細胞系を確立し、 $\alpha$  シヌクレイン発現による細胞の生存能の検討を行ったが、培養液中の血清を低下させたときに生存能の低下が有意に生じ、この生存能低下は TUNEL 法、及び DNA 断片化の検出によりアポトーシスによって生じていることが判明した。細胞生存能低下の原因については、 $\alpha$ -シヌクレインの発現につれて ERK-1/2、p38MAP キナーゼ、SAPK/JNK の MAP キナーゼ群のリン酸化が低下することより、MAP キナーゼの安定拮抗状態に影響を与えることが原因と考えた。さらに、外部よりの刺激に対する MAP キナーゼの反応についても検討したが、 $\alpha$ -シヌクレイン発現細胞では epidermal growth factor、anisomycin、紫外線による刺激に対する MAP キナーゼのリン酸化、そしてその下流の c-fos のメッセンジャーRNA の発現が欠如していたが、一方で MAP キナーゼキナーゼのリン酸化には影響がなかった。紫外線による刺激では野生型  $\alpha$ -シヌクレイン発現細胞では反応が見られたため、変異型  $\alpha$ -シヌクレインがより強度に MAP キナーゼ経路に影響することが考えられた。さらに、 $\alpha$ -シヌクレインと MAP キナーゼとの直接結合が免疫沈降法、GST プルダウン法によって確認され、また、MAP キナーゼキナーゼのリン酸化状態が  $\alpha$ -シヌクレインの発現によっても変化しないため、一連の影響は MAP キナーゼと  $\alpha$ -シヌクレインが直接結合するために生じることが示唆された。そして、 $\alpha$ -シヌクレインの高発現による細胞の生存能低下を回復させる目的で活性型 MAP キナーゼキナーゼの遺伝子導入を行ったところ、低下した MAP キナーゼのリン酸化が回復し、また細胞生存能も回復した。この現象は通常の neuro2a 細胞に一過性  $\alpha$  シヌクレインを発現させた場合に生じる生存能低下についても有効であった。

以上、本論文は多系統萎縮症における  $\alpha$  シヌクレイン蓄積の検討より出発し、培養細胞において  $\alpha$ -シヌクレインと MAP キナーゼ経路の構成蛋白の Elk-1、MAP キナーゼとの結合の存在、及び細胞の生存能に与える影響を明らかにした。本研究はこれまで未知であった  $\alpha$ -シヌクレインの役割について貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。