

## 論文の内容の要旨

論文題目  $\alpha$ -synuclein トランスジェニック線虫 (*C. elegans*) を用いた  
パーキンソン病モデル動物創出の試み

氏名 小山 彰比古

パーキンソン病 (PD) は臨床的に筋固縮、安静時振戦、無動などの運動障害を生じ、病的には中脳黒質のドパミン性ニューロンなどの細胞脱落とともに残存ニューロン内に Lewy 小体 (LB) と呼ばれる細胞質内封入体が出現することを特徴とする神経変性疾患である。家族性 PD の病因遺伝子産物である  $\alpha$ -synuclein 蛋白質が、孤発性 PD にも見られる LB の主要構成成分であること、Lewy 小体型痴呆症や多系統萎縮症などの関連疾患においても  $\alpha$ -synuclein の蓄積が認められることから (synucleinopathy)、 $\alpha$ -synuclein の神経細胞内蓄積は細胞障害、細胞死の原因となる可能性が考えられている。

現在までにヒト  $\alpha$ -synuclein を神経細胞に過剰発現するトランスジェニック (TG) マウス、TG ショウジョウバエが作製され、 $\alpha$ -synuclein の神経細胞内蓄積、運動障害が認められている。線虫 *C. elegans* は、マウスやハエに比べて遺伝学的解析が容易であること、基本的な神経系を備えていること、全神経細胞が同定され、神経細胞間の結合関係や行動との相関が明らかにされていること、線虫を用いたアルツハイマー病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症のモデル動物が作製されていることから、神経変性疾患の有力なモデル動物となる可能性がある。

本研究において、私は PD のモデル動物作出を目的として、神経系にヒト  $\alpha$ -synuclein を過剰発現する TG 線虫を作成し、 $\alpha$ -synuclein の蓄積や神経機能に対する影響について解析した。

まず、全神経細胞にヒト $\alpha$ -synuclein を過剰発現する TG 線虫を作製するために、神経系に高い発現の得られる *unc-51* プロモーターの下流に、野生型 (WT) 及び家族性 PD 変異型 (A53T、A30P) ヒト $\alpha$ -synuclein を組み込んだ発現ベクターを作製した。これを線虫野生株 (N2) にマイクロインジェクションし extrachromosome ラインを作製した。これらのラインを用いて紫外線照射法により導入遺伝子を染色体挿入した integrant ラインを取得し、過剰発現ラインを樹立した。各 $\alpha$ -synuclein 発現ラインをウェスタンブロット解析した結果、ヒト $\alpha$ -synuclein は約 15 kDa の全長蛋白質として発現していた。TG 線虫をパラフォルム固定後、パラフィン包埋・薄切し、抗ヒト $\alpha$ -synuclein 抗体により免疫染色したところ、全身の神経細胞体と突起に広く陽性像が認められ、特にシナプ스에富む神経突起束である nerve ring に強い染色が見られた (図 1A、B)。野生型と家族性 PD 変異型の間で $\alpha$ -synuclein の発現、局在に相違は見られず、uncoordinated movement (Unc)、mechanosensory defect (Mec) などの異常表現型は見られなかった。

疾患脳に蓄積した $\alpha$ -synuclein に特徴的な Ser129 リン酸化を特異的に認識する抗体 (anti-PSer129) による免疫染色では陽性反応が nerve ring に限局して観察され (図 1C)、アルカリホスファターゼを用いた脱リン酸化処理により染色が消失したことから (図 1D)、 $\alpha$ -synuclein ホモログを持たない線虫 *C. elegans* においてもヒト $\alpha$ -synuclein の Ser129 がリン酸化を受けることが明らかとなった。一方、体壁筋あるいは腸管細胞に特異的に $\alpha$ -synuclein を過剰発現する TG 線虫では、大量の $\alpha$ -synuclein 蛋白質の発現にもかかわらず、リン酸化は検出されなかったことから (図 2)、 $\alpha$ -synuclein のリン酸化が神経細胞特異的に生じる可能性が示唆された。

$\alpha$ -synuclein は本来可溶性の高い蛋白質であるが、synucleinopathy 患者脳に蓄積した $\alpha$ -synuclein は高い不溶性を獲得している。TG 線虫において、不溶性 $\alpha$ -synuclein が生じているか否かを検討するために、8 日齢まで加齢を経た TG 線虫を各種界面活性剤により段階的に可溶化し各画分をウェスタンブロット解析した。 $\alpha$ -synuclein は全長蛋白質として、主

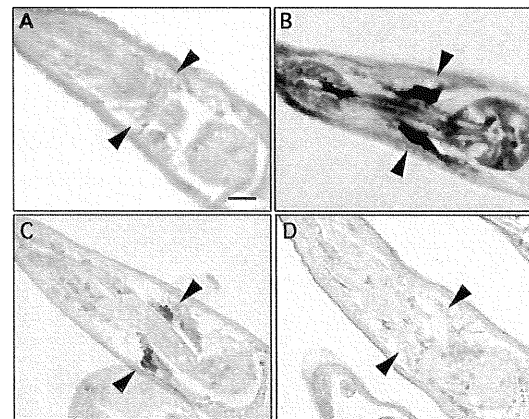


図1  $P_{unc-51}::synA53T$  の免疫染色像 (A) N2、(B)  $P_{unc-51}::synA53T$  の抗 $\alpha$ -synuclein 抗体による染色像。(C)  $P_{unc-51}::synA53T$  の抗リン酸化 $\alpha$ -synuclein 抗体による染色像。(D) アルカリホスファターゼ処理後の  $P_{unc-51}::synA53T$  の抗リン酸化 $\alpha$ -synuclein 抗体による染色像。nerve ring を矢印で示す (scale bar = 10  $\mu$ m)。

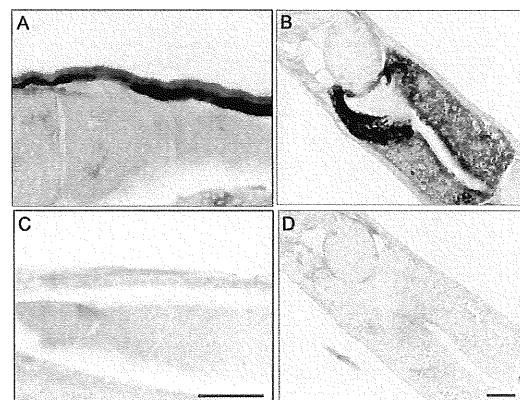


図2 体壁筋、腸管における $\alpha$ -synuclein の発現 (A)(C)  $P_{unc-54}::SynWT$ 、(B)(D)  $P_{ges-1}::SynWT$  の抗 $\alpha$ -synuclein 抗体(A)(B)、抗リン酸化 $\alpha$ -synuclein 抗体(C)(D)による免疫染色像 (scale bar = 10  $\mu$ m)。

に可溶性画分に回収され、不溶性の $\alpha$ -synuclein は検出されなかった (図 3)。よって TG 線虫では 8 日齢でも $\alpha$ -synuclein は高い可溶性を保持していることが明らかとなった。

哺乳類の神経系において、 $\alpha$ -synuclein は細胞体には存在せず、シナプス前末端に局在する。線虫においても、神経細胞に発現した $\alpha$ -synuclein が、シナプス末端に富む神経突起束である nerve ring に豊富に分布したことから、 $\alpha$ -synuclein が軸索輸送を受ける可能性が示唆された。そこで、シナプス小胞の軸索末端への輸送に関わるモーター蛋白質 UNC-104 の機能低下変異体との交配を行った。*unc-104* 変異の導入により、 $\alpha$ -synuclein は神経細胞体に強く蓄積するようになり、リン酸化 $\alpha$ -synuclein の局在は nerve ring から神経細胞体に移行した (図 4A)。また、ウェスタンブロット解析の結果、*unc-104* 変異の導入により、 $\alpha$ -synuclein のリン酸化が亢進していることが示された (図 4B)。このことから、線虫の神経細胞に発現させた $\alpha$ -synuclein は UNC-104 依存的に軸索輸送を受けていること、軸索輸送障害を受けた $\alpha$ -synuclein は神経細胞体に蓄積し、リン酸化が亢進することが示唆された。

線虫は体表への接触刺激を認識し (touch sense)、回避行動を取る性質を持ち(touch response)、この行動は6個の touch neuron により支配されている。

$\alpha$ -synuclein 過剰発現が touch neuron の機能に与える影響を解析するために、touch neuron 特異的な発現の得られる *mec-7* プロモーターを用い、野生型及び家族性 PD 変異型 $\alpha$ -synuclein を発現する TG 線虫を作製した。免疫染色により、 $\alpha$ -synuclein 蛋白質が touch neuron の細胞体及び突起に強く発現していることを確認した (図 5A)。各発現遺伝子につき独立した 3 ラインについて、体表刺激による回避行動を観察したところ (touch assay)、野生型 $\alpha$ -synuclein を発現するラインでは control ( $P_{hsp-16}::EGFP$ ) と比較して有意差がなかったのに対し、家族性 PD 変異型 $\alpha$ -synuclein を発現するラインでは touch response の低下が有意に観察され、この傾向は特に A30P 変異で顕著であった。Touch neuron

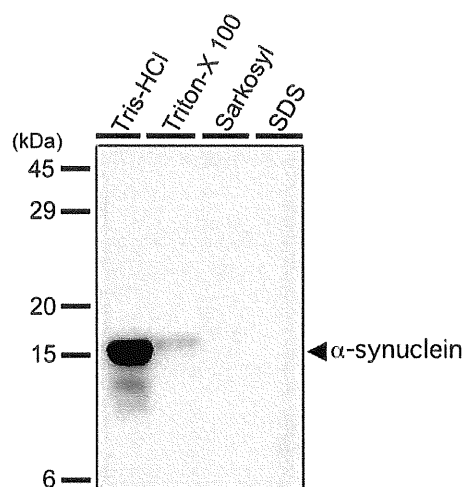


図3 各種界面活性剤による段階的分画  
 $P_{unc-51}::synWT$  ラインを 1% Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1% Sarkosyl, 1% SDS を用いて順次可溶化し、分画した。ヒト $\alpha$ -synuclein 特異抗体によりウェスタンブロットした。

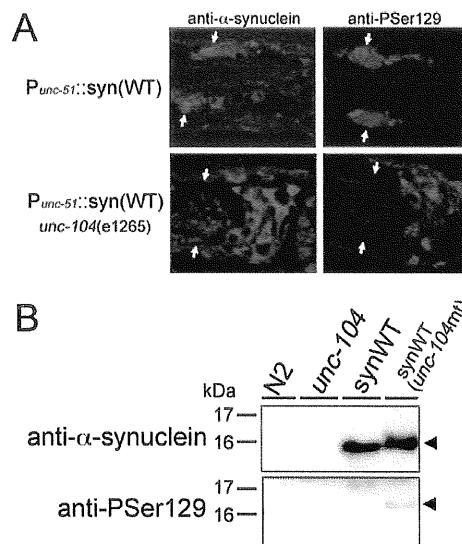


図4 *unc-104* 変異が $\alpha$ -synuclein に及ぼす影響  
(A) *unc-104* 変異を導入した  $P_{unc-51}::synWT$  の蛍光免疫染色像。*unc-104* 変異により $\alpha$ -synuclein が細胞体に蓄積した。(B) *unc-104* 変異を導入した  $P_{unc-51}::synWT$  のウェスタンブロット。*unc-104* 変異によりリン酸化 $\alpha$ -synuclein が増加した。

特異的に $\alpha$ -synuclein を発現するラインにおいて観察された touch sense の低下が、touch neuron の細胞死の結果生じたものであるか否かを検討するために、*mec-7* プロモーターの下流に EGFP を組み込んだ発現ベクターを、各 $\alpha$ -synuclein 発現ラインにマイクロインジェクションし、touch neuron を蛍光により可視化した。その結果、touch sense の低下の観察されるラインにおいて、touch neuron が消失していないことが明らかとなった。よって、 $\alpha$ -synuclein の過剰発現による touch sense の低下が、神経細胞死の結果生じたものではなく、神経機能低下によるものであると考えられた。

本研究において、私は代表的な神経変性疾患である PD の病態モデル樹立を目的として、神経細胞にヒト $\alpha$ -synuclein を過剰発現する TG 線虫を作製した。全神経細胞に $\alpha$ -synuclein を過剰発現するラインでは、神経細胞体及び突起、特に神経突起とシナプスに富む nerve ring に強い $\alpha$ -synuclein の発現が見られ、これは哺乳類脳における分布に類似していた。また、PD 脳に蓄積した $\alpha$ -synuclein に特徴的な Ser129 のリン酸化は、nerve ring のみに限局して観察された。一方、体壁筋、腸管では $\alpha$ -synuclein のリン酸化は起こらず、 $\alpha$ -synuclein のリン酸化は神経細胞に特異的な現象であることが示唆された。さらにシナプス小胞の軸索輸送に関与するモーター蛋白質 UNC-104 の機能低下変異の導入により、 $\alpha$ -synuclein が細胞体に蓄積し、リン酸化が亢進したことから、 $\alpha$ -synuclein の神経末端における局在に UNC-104 蛋白質が関与し、その障害は蓄積と過剰リン酸化の一要因となる可能性が示唆された。

また、touch neuron 特異的に家族性 PD 変異型ヒト $\alpha$ -synuclein を過剰発現することにより touch response の低下が引き起こされた。家族性 PD 変異は $\alpha$ -synuclein 蛋白質の凝集性を促進することが *in vitro* の実験において示されており、構造異常を生じた $\alpha$ -synuclein の細胞内蓄積が機能障害を誘発した可能性が示唆された。以上のごとく、私が作出した $\alpha$ -synuclein TG 線虫モデルは、 $\alpha$ -synuclein のリン酸化、神経機能障害など、PD をはじめとするヒト synucleinopathy における生化学的・機能的異常を再現するモデル動物と考えられる。今後このモデルを用いて、 $\alpha$ -synuclein 蓄積に伴う神経細胞障害や過剰リン酸化の分子機構を解析し、治療法の創出につなげたい。

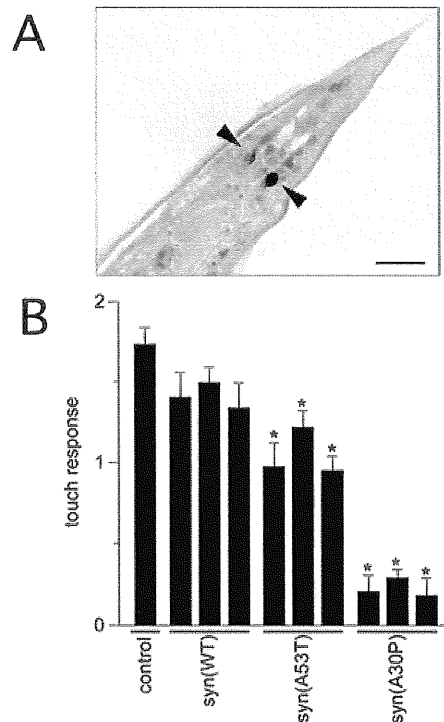


図5  $P_{mec-7}$ ラインの touch assay  
(A)  $P_{mec-7}::synA30P$  のヒト $\alpha$ -synuclein 特異抗体による免疫染色像 (scale bar = 10  $\mu$ m)。touch neuron を矢印で示す。(B) 各種 $\alpha$ -synuclein 発現ライン 20 匹ずつに対し touch assay を行い、正常反応を 2、反応低下を 1、反応の消失を 0 とし数値化した。5 回の試行 (100 匹) の平均値と標準偏差を示す (\* は  $p < 0.01$ )。