

審査の結果の要旨

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、病理学的には中脳黒質のドー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 α -synuclein 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 α -synuclein の蓄積が認められることから、 α -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 α -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、 α -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より原始的な動物であるが、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、申請者は PD のモデル動物作出を目的として、神経系にヒト α -synuclein を過剰発現する TG 線虫を作出し、 α -synuclein の蓄積や神経機能に対する影響について解析した。

1. 全神経細胞にヒト α -synuclein を過剰発現する TG 線虫株の樹立

全神経細胞にヒト α -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、野生型及び家族性 PD 変異型 (A30P、A53T) ヒト α -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後、紫外線照射により integrant line を取得、back cross を行い過剰発現ラインを樹立した。TG 線虫の各種界面活性剤可溶画分をウェスタンブロット解析すると、 α -synuclein は 15 kDa の全長蛋白質として、主に可溶性画分に回収された。線虫個体をパラフォルム固定後、パラフィン包埋・薄切し、抗ヒト α -synuclein 抗体により免疫染色したところ、神経細胞体と突起に広く陽性像が認められ、特に神経突起とシナプスに富む nerve ring に強い染色が見られた。野生型、家族性 PD 変異型間で、 α -synuclein の発現、局在に違いは見られず、uncordinated movement などの機能異常は見られなかった。

疾患脳に蓄積した α -synuclein に特徴的な Ser129 リン酸化を特異的に認識する抗体 (anti P-syn) による免疫染色を行うと、nerve ring に限局した陽性反応が観察され、アルカリホスファターゼによる脱リン酸化処理により染色は消失した。一方、体壁筋あるいは腸管細胞に特異的に α -synuclein を過剰発現する TG 線虫では、大量の α -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。

哺乳類の神経系において、 α -synuclein は細胞体に集積せず、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 α -synuclein が、リン酸化の有無に関わらず、シナプス末端に富む神経突起束である nerve ring に局在したことから、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 UNC-104 / KIF1A 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、 α -synuclein のリン酸化は全身で顕著に亢進し、その局在が nerve ring から神経細胞体に移行した。

2. α -synuclein 過剰発現が神経機能に与える影響の解析

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。 α -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 α -synuclein を発現する TG 線虫を作製した。免疫染色により、 α -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。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 α -synuclein を発現するラインに比べて、家族性 PD 変異型 α -synuclein を発現するラインでは touch response の低下が観察され、この傾向は特に A30P 変異で顕著であった。

本研究において、申請者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 α -synuclein を過剰発現する TG 線虫を作製した。全神経細胞に α -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 α -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 α -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。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/KIF1A の機能低下変異の導入により、 α -synuclein のリン酸化は亢進し、その局在が nerve ring から細胞体へ移動した。 α -synuclein の神経末端における局在に UNC-104/KIF1A が関与すること、その障害は過剰リン酸化の一要因となる可能性が示唆された。touch neuron 特異的に家族性 PD 変異型ヒト α -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 α -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 α -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、申請者が作出した α -synuclein TG 線虫モデルは、 α -synuclein のリン酸化、神経機能障害など、PD をはじめとするヒト α -synuclein 蓄積症における生化学的・機能的異常を再現するモデル動物と考えられ、パーキンソン病をはじめとする α -synuclein 蓄積に伴う神経変性疾患の分子機構解析と治療法の創出に資するところが大きく、博士 (薬学) の学位に値するものと判定した。