

論文の内容の要旨

論文題目 α -synuclein の凝集・蓄積に関する生化学的解析

氏 名 藤原 英雄

パーキンソン病 (PD) は筋固縮、振戦、無動などの運動障害を示す進行性神経変性疾患であり、病理学的には黒質のドパミン性神経細胞の脱落と残存神経細胞内に Lewy 小体 (LB) が出現することが特徴である。我々の研究グループでは LB の単離精製法を確立し、その主成分として α -synuclein 蛋白を同定した。近年、PD のみならず Lewy 小体型痴呆症 (DLB) や多系統萎縮症 (MSA) などの神経変性疾患においても細胞内に α -synuclein 蛋白が蓄積することが明らかとなり、これらの疾患は synucleinopathy と総称されるに至った。 α -synuclein 蓄積部位に一致して神経細胞脱落が生じること、 α -synuclein 遺伝子変異に起因する家族性 PD が見出されたことから、 α -synuclein の蓄積は神経細胞死と密接な関係を有する現象であることが予想される。しかし、生体内で α -synuclein が凝集・蓄積する場合、 α -synuclein 蛋白のもつ凝集性のみを駆動力として凝集に至るのか、それとも特殊な翻訳後修飾が α -synuclein の線維化を促進しているのかについてはほとんど不明であった。そこで私は DLB 患者脳内に蓄積した α -synuclein を蛋白質生化学的に解析することにより、蓄積 α -synuclein 特異的な翻訳後修飾を明らかにし、 α -synuclein が脳内で不溶化、蓄積する機序を解明することを目的として本研究に着手した。

1. Ser129 リン酸化が α -synuclein 線維化に及ぼす影響

synucleinopathy 患者の脳内において不溶性を獲得した α -synuclein 蛋白について検討を加えるため、界面活性剤に対する可溶性の違いにより他の蛋白と分離することを試みた。正常老人ならびに DLB 患者の脳皮質を、Tris、1% Triton X-100、1% Sarkosyl、8 M urea を含む各種緩衝液で順に可溶化した。抗ヒト α -synuclein 抗体を用いてウェスタンブロット解析すると、Tris 可溶画分および Triton X 可溶画分に陽性バンドが確認された。これらの画分では正常老人脳、DLB 患者脳間で α -synuclein 陽性バンドの量やパターンに違いが見られなかったことから、これらのバンドは正常 α -synuclein に対応するものと考えた。一方、urea 可溶画分においては DLB 患者脳特異的に陽性バンドがみられ、これらのバンドは DLB 患者脳内に蓄積した α -synuclein を反映していると考えられた。この画分に回収される α -synuclein

の大部分は電気泳動上、全長 α -synuclein と同じく 15 kDa 付近に泳動されるが、一部プロセシングを受けたと考えられる約 13 kDa の分子種、そして 22、29 kDa 付近にも陽性バンドがみられた (Fig.1a)。私は修士過程において urea 可溶画分に回収される、約 15 kDa の α -synuclein を蛋白質生化学的に解析することにより、蓄積した α -synuclein は Ser129 において高度にリン酸化を受けていることを明らかにした。Ser129 リン酸化 α -synuclein を特異的に認識するポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロット解析すると、Tris および Triton X 可溶画分に回収される正常 α -synuclein は認識されず、urea 可溶画分の蓄積 α -synuclein のみが特異的に認識された (Fig.1B)。

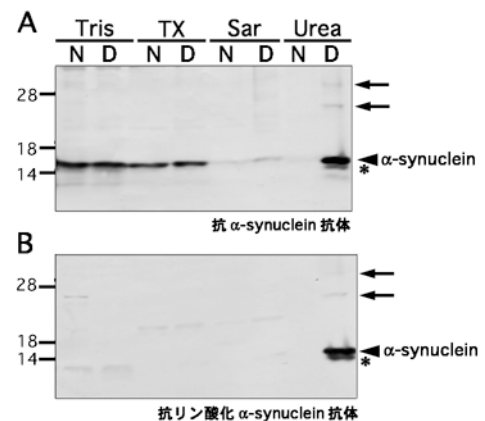


Fig.1 正常老人脳 (N) および DLB 患者脳 (D) の段階的蛋白質抽出
正常老人脳ならびに DLB 患者脳を Tris、1% Triton X-100 (TX)、
1% Sarkosyl (Sar)、8M urea を含む緩衝液で順次可溶化後、ウェ
スタンブロット解析した。
* プロセシングを受けたと考えられる約 13 kDa のバンド、矢印は
22、29kDa のバンドを示す。

蓄積 α -synuclein に特異的な翻訳後修飾である Ser129 リン酸化が、 α -synuclein 蛋白蓄積の原因となりうるか否かについて検討するため、Ser129 リン酸化による α -synuclein 線維形成能の変化について検討した。Ser129 を特異的にリン酸化する casein kinase 2 により処理したリコンビナント α -synuclein を *in vitro* で線維化すると、直径 10 nm 程度の直線状線維を形成し、リン酸化処理の有無により、形成される線維の微細形態に違いは見られなかった (Fig.2A)。次に形成された線維量の比較を行った。遠心操作によりサンプルを上清 (s) と沈渣 (p) に分離し、線維を沈渣に回収して電気泳動を行った。非リン酸化 α -synuclein は大部分が上清に回収されたのに対し、リン酸化 α -synuclein は沈渣に多く回収され、その量はリン酸化により約 4 倍増加した (Fig.2B)。 β シート構造を認識して蛍光を発する thioflavin T により定量した場合にもリン酸化 α -synuclein の線維化の促進が観察された (Fig.2C)。アル

ツハイマー病患者脳においても高度にリン酸化された tau 蛋白が線維化して蓄積していることを考え合わせると、特定の蛋白質の過剰リン酸化が細胞内異常線維の形成を促進し、神経細胞死を導くという神経変性に共通なメカニズムが想定された。

2. α -synuclein のユビキチン化に関する検討

synucleinopathy 患者脳の不溶性画分には電気泳動上、22、29 kDa 付近に泳動される α -synuclein 分子が回収される。これらの分子は Ser129 リン酸化とともに何らかの修飾を受けた蛋白と予想され、その修飾を同定することにより α -synuclein 蓄積機構に新たな知見が得られるものと考えた。そこで大脳皮質に α -synuclein 蓄積病変が豊富に出現し、不溶性 α -synuclein を多量に回収できる Hallervorden-Spatz disease (HSD) 患者の剖検脳を用いて、それらの分子種に生じている翻訳後修飾の同定を試みた (Fig.3A)。

LB などの α -synuclein 蓄積病変がユビキチン陽性であることが以前から知られていたことや 22、29 kDa の α -synuclein 陽性ポリペプチドは全長型分子に比べて分子量が約 7 kDa ずつ増大していることから、これらの分子に生じている翻訳後修飾としてユビキチン化 (Ub 化) を予想した (ユビキチンは 76 アミノ酸からなるポリペプチドである)。そこで HSD 脳から抽出した各可溶画分を抗 Ub 抗体によりウェスタンブロット解析した結果、urea 可溶画分の 22、29 kDa のバンドは Ub 陽性を示し、蓄積 α -synuclein が Ub 化を受けていることが示唆された (Fig.3B)。

次に蛋白質生化学的手法を用いて、蓄積 α -synuclein の Ub 化部位の同定を試みた。HSD 患者脳から抽出した尿素可溶画分を陰イオン交換カラムで精製後、ゲル濾過カラムを用いて、15、22、29 kDa の α -synuclein 陽性ポリペプチドを分離することができた (Fig.4)。

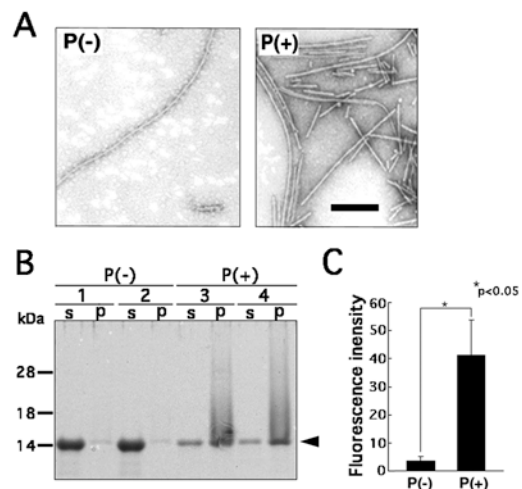


Fig.2 Ser129 リン酸化 α -synuclein の *in vitro* 線維化実験
(A) 非リン酸化 (P(-)) 及びリン酸化 (P(+)) α -synuclein 線維のネガティブ電顕像。Scale bar= 200 nm
(B) α -synuclein 線維化後、電気泳動ゲルを CBB 染色した。矢頭は α -synuclein を示す。
(C) thioflavin T による α -synuclein 線維の定量。
(励起波長：436 nm, 蛍光波長：492 nm)

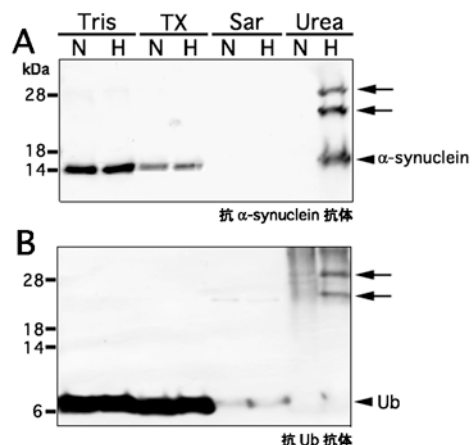


Fig.3 正常老人脳 (N) 及び HSD 患者脳 (H) の段階的蛋白質抽出
矢印は 22、29 kDa のバンドを示す。

リジルエンドペプチダーゼ (AP1) を用いて Ub 化蛋白質を消化すると、Ub 付加を受けた標的蛋白質の Lys 残基は切断されず、Ub 最 C 末端断片と標的蛋白質断片が結合した T 字型ペプチドが回収される。ゲル濾過後、逆相 HPLC で精製した 22 kDa モノ-

Ub 化 α -synuclein を AP1 処理し、LC-MS を用いて解析した。その結果、 α -synuclein 由来の 4 個、Ub 由来の 2 個のペプチド断片が検出されるとともに、ピーク 6 から質量数 1252.4 のシグナルが検出された (Fig.5A,B)。次にこのイオンを MS/MS により解析した結果、 α -synuclein の Lys12 に Ub の最 C 末端ペプチドが付加したイソペプチドに由来することが明らかになった (Fig.5C,D)。

α -synuclein が線維を形成する際、30 番から 110 番付近がプロテアーゼ耐性のコア構造を作り、その N 末端側は線維の表層を形成する。このことを考え合わせると、 α -synuclein は線維を形成した後、表面に露出した Lys12 などで Ub 化を受けるが、何らかの理由によりモノユビキチン化状態にとどまり、分解を免れるものと考えられた。

本検討において私は疾患脳に蓄積した α -synuclein を蛋白化学的に解析した結果、蓄積 α -synuclein に特異的な翻訳後修飾を同定するとともに、その修飾が α -synuclein 蓄積の原因となる可能性を示した。この修飾は孤発性症例を含めた synucleinopathy 全般に生じる現象であり、脳内における α -synuclein 蓄積機序の解明にあたり新たな知見を加えるものと考えられる。しかし、現段階ではヒト脳内での α -synuclein リン酸化酵素やユビキチン化酵素の異常は明らかではなく、今後それらの酵素の同定あるいは動物モデルを用いた解析を行なうことにより、新たなパーキンソン病治療の開発につなげたい。

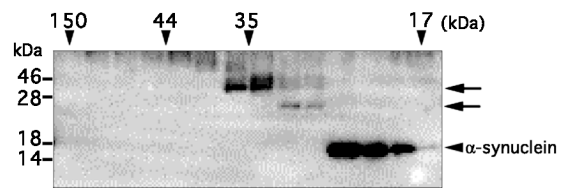


Fig.4 ゲル濾過カラムによる Ub 化 α -synuclein の分離
矢印は 22、29 kDa のバンドを示す。

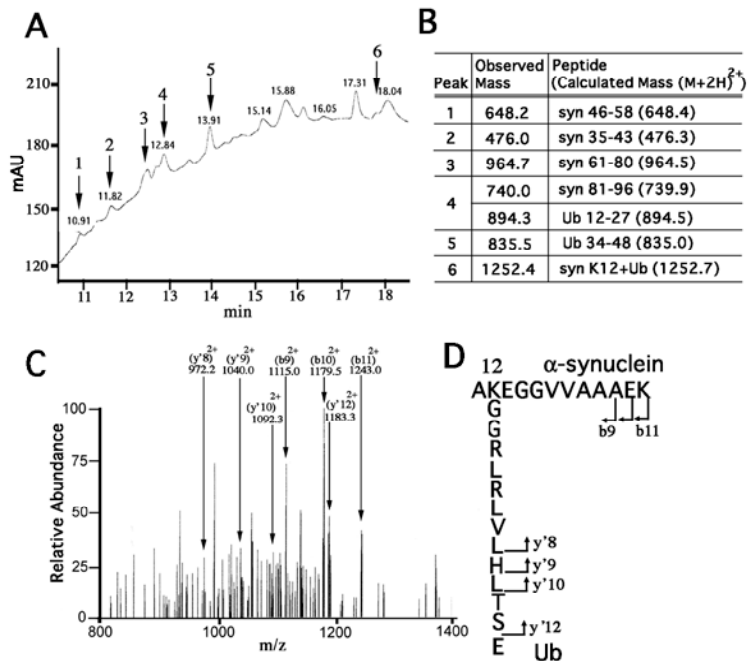


Fig.5 22kDa α -synuclein の解析

- (A) 22 kDa α -synuclein 陽性ポリペプチドの AP1 ペプチドマップ。
- (B) 各ピークに含まれるイオンの質量数と対応するペプチド。syn は α -synuclein を示す。
- (C) ピーク 6 に含まれる質量数 1252.4 のイオンから得られたタンデムマスペクトル。
- (D) Ub 化 α -synuclein ペプチドのうち矢印部分で分子開裂したフラグメントと一致するシグナルが得られた。