

論文の内容の要旨

論文題目：トランスジェニック線虫を用いた α -synuclein の神経障害性を
修飾する遺伝子群の網羅的解析

氏 名：桑原 知樹

【序論】

パーキンソン病 (PD) はドパミン性神経細胞の変性・脱落と残存ニューロンにおける細胞内封入体 Lewy 小体の出現を特徴とする神経変性疾患である。 α -synuclein は優性遺伝性家族性 PD の病因遺伝子であり、ミスセンス変異 (A53T、A30P、E46K) や遺伝子重複が報告されているが、孤発性 PD でも Lewy 小体の主要構成成分であることが知られている。これらの知見から、構造異常をきたした α -synuclein の細胞内蓄積が神経細胞死を招くことが示唆されるが、その詳細な分子機構は不明である。

α -synuclein による神経障害機構を個体レベルで解明するため、私は修士課程においてヒト α -synuclein をドパミン神経に過剰発現するトランスジェニック (Tg) 線虫を作出し、線虫ドパミン神経の担う食餌の認知機能に低下が生じることを明らかにした。機能低下は家族性変異型 α -synuclein を過剰発現する Tg 線虫で顕著であり、PD に類似した機序で細胞障害が生じている可能性が示唆された。本研究において、私は線虫のニューロンにおいて α -synuclein が引き起こす神経障害の分子機構を解明するため、神経系に α -synuclein を過剰発現する Tg 線虫に対して microarray 法や RNAi スクリーニングなどのゲノムワイドな手法を適用し、 α -synuclein による神経障害性を修飾する遺伝子を探索した。

【方法・結果】

1. ヒト α -synuclein Tg 線虫における遺伝子発現変動解析

unc-51 プロモーターを用いて pan-neuronal にヒト α -synuclein (野生型、A53T、A30P 家族性 PD 変異型) を過剰発現する Tg 線虫を作出し、免疫組織化学的・生化学的に α -synuclein が神経細胞に高発現することを確認した (図 1)。これらの Tg 線虫は運動障害や産卵異常などの明

らかな表現型を示さなかったが、ドパミン神経や touch 神経特異的に高発現させた場合に機能低下が生じることから、pan-neuronal に α -synuclein を発現する Tg 線虫を DNA microarray 法により解析し、 α -synuclein 発現依存的な遺伝子発現変動を調べた。

α -synuclein Tg 3 ライン (synWT, A53T, A30P)、N2 (野生型)、EGFP-Tg 各 1 ラインを解析した。3 日齢 young adult 個体から mRNA を抽出し、2 枚の DNA チップ (Affymetrix®) に分けて hybridize させ、2 枚対 2 枚の 4 通りの比較で有意差を認める遺伝子を選別した。その結果、 α -synuclein 発現ライン群で有意に mRNA 発現量が変動している遺伝子として 31 個を同定した。

次に、この 31 遺伝子の発現変動を real-time RT-PCR により確認した。3 回の独立した試行を行い、家族性変異型 (A53T, A30P) を発現する複数ラインで一定して発現上昇が認められる遺伝子として *egl-1* を同定した (図 2A)。*egl-1* はアポトーシス経路の最上流に位置する遺伝子であり、哺乳類の BH3-only 蛋白質 (Bad, Bid など) のホモログである。神経細胞における *egl-1* 転写活性の亢進の有無を確認するため、*egl-1* プロモーター下で核移行シグナル付き GFP を発現する線虫に対し、野生型あるいは A30P 変異型 α -synuclein を遺伝子導入すると、A30P 変異型 α -synuclein 発現線虫で特異的に (全個体の約 16%) 頭部神経細胞群における GFP の蛍光が観察された (図 2B)。

しかし *egl-1* 発現亢進によるアポトーシスは観察されなかった。また、touch neuron に A30P 変異型 α -synuclein を発現する線虫を *egl-1* 欠損変異ラインと交配した場合にも *egl-1* の有無にかかわらず touch sense に変化は認められなかった。従って、*egl-1* は α -synuclein の下流で動く遺伝子であるが α -synuclein による神経機能低下には関与しないことが示唆された。

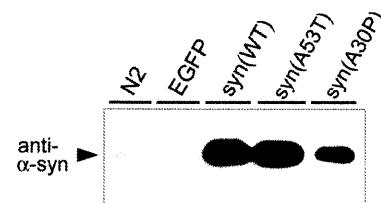


図 1. ヒト α -synuclein を全神経系に発現する Tg 線虫のウエスタンブロット解析

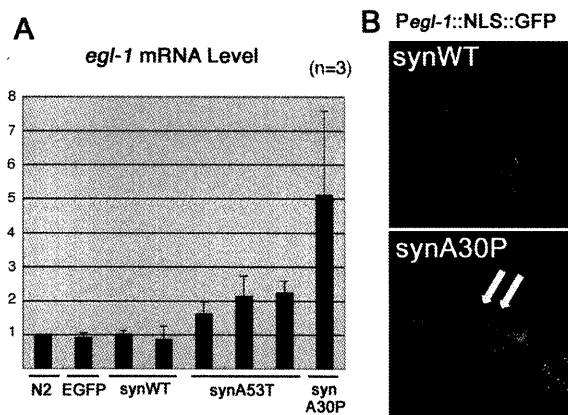


図 2 A. real-time RT-PCR による *egl-1* 発現量の定量。B. *Pegl-1::NLS::GFP* に対する α -syn 過剰発現。A30P α -syn 発現細胞で頭部神経細胞核に GFP の発光 (矢印) が観察された。

2. 網羅的 RNAi による α -synuclein 神経障害修飾因子の探索

1) RNAi スクリーニング

α -synuclein 過剰発現により生じる神経障害性に関わる新規遺伝子の探索にあたり、Tg 線虫の表現型を改善もしくは増悪させる遺伝子を同定することにした。まず α -synuclein Tg 線虫および対照群に対しゲノムワイドに RNAi を施し、表現型を変化させる遺伝子を探索した (図 3)。線虫の神経系に対しては、RNAi の効率が低いこと

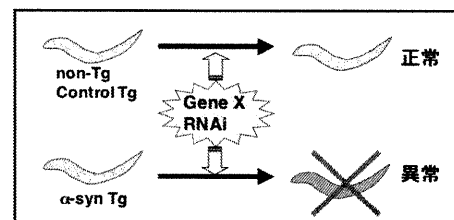


図 3 RNAi スクリーニング概略

が問題となる。そこで、神経系における RNAi 効果を増強する変異体 *eri-1* (enhanced RNAi) と各ラインを交配し、RNAi 効果の増強を確認した。

まず 1 次スクリーニングとして、*eri-1*、*synWT;eri-1*、*synA53T;eri-1* の 3 ラインを用い、神経系に発現する遺伝子を中心に feeding RNAi library から 1673 遺伝子を選択した。各ライン L4 幼虫を feeding RNAi plate に移して 3 日後、次世代の個体の表現型を観察し、Tg 線虫とコントロール間で運動機能障害、成長遅延などの表現型に相違を生じる遺伝子を選択した。その結果、約 17% にあたる 278 遺伝子で何らかの表現型が観察され、そのうち 66 遺伝子がライン間で異なる RNAi 表現型を与えた。

次に 2 次スクリーニングとして、*synA30P Tg* と *EGFP Tg* の 2 ラインを追加し、1 次スクリーニングで得られた 66 遺伝子について再度 RNAi を行い、 α -synuclein Tg 3 ライン (*synWT*、*A53T*、*A30P*) とコントロール 2 ライン (*non-Tg*、*EGFP*) の間で RNAi 表現型に差を生じる遺伝子を選択した。再現性を 3 回の試行で確認した。

その結果、RNAi により α -synuclein Tg 線虫の表現型を増悪させる 10 種の遺伝子、及び表現型を抑制する 1 種の遺伝子を同定した (Table 1)。興味深いことに表現型を増悪させる 10 種のうち 4 種がエンドサイトーシス関連遺伝子 (*apa-2*、*aps-2*、*eps-8*、*rab-7*) であり、中でも *apa-2* と *aps-2* は各種クラスリン被覆小胞の回収に関与するアダプター蛋白 AP-2 複合体のサブユニットであった (図 4)。

これらの結果から、 α -synuclein の過剰発現はエンドサイトーシス機能の抑制による神経系機能低下の表現型を増悪させることがわかった。従って α -synuclein の過剰発現が何らかの機序により、神経細胞におけるエンドサイトーシスを抑制的に制御している可能性を考えた。

2) α -synuclein とエンドサイトーシス機能との関係に関する検討

神経細胞のエンドサイトーシス機能の中でも、シナプス小胞の回収は特に重要である。そこで 7 種類のシナプス小胞エンドサイトーシス関連遺伝子を library より選別し、 α -synuclein Tg 線虫に対する RNAi 効果を再検討した。RNAi の効果をより高感度に検討するため、touch sense に軽度の異常を示す A53T 型変異 α -synuclein Tg 線虫に対して RNAi を行い touch sense の変化

	gene	annotation	RNAi phenotype	Human ortholog	Neuron 発現
1	<i>apa-2</i>	AP-2 α complex	<i>synTg</i> → <i>Unc</i> , ++	Yes	○
2	<i>aps-2</i>	AP-2 σ 2 complex	<i>synTg</i> → <i>Unc</i> , +	Yes	○
3	<i>eps-8</i>	EGF receptor kinase substrate	<i>synTg</i> → <i>Gro</i> , ++	Yes	○
4	<i>cdk-4</i>	Cyclin dependent kinase	<i>synTg</i> → <i>Unc</i> , ++	Yes	(○)
5	<i>ubc-9</i>	Ub conjugating enzyme (E2)	<i>synTg</i> → <i>Gro,Unc</i> , ++	Yes	?
6	<i>cdk-9</i>	Cyclin dependent kinase	<i>synTg</i> → <i>Gro</i> , ++	Yes	?
7	<i>Y106G6E.6</i>	Casein kinase	<i>synTg</i> → <i>Gro,Unc</i> , ++	Yes	?
8	<i>rab-7</i>	GTPase	<i>synTg</i> → <i>Unc</i> , +	Yes	?
9	<i>lit-1</i>	Nemo-like MAPK-related kinase	<i>synTg</i> → <i>Gro</i> , ++	Yes	×
10	<i>pat-10</i>	troponin C	<i>synTg</i> → <i>Gro</i> , ++	Yes	×
11	<i>cst-1</i>	Ste20-like kinase MST	<i>eri-1</i> → <i>Gro,Unc</i> , +++	Yes	○

Table 1 RNAi screening で表現型の変化を生じた遺伝子

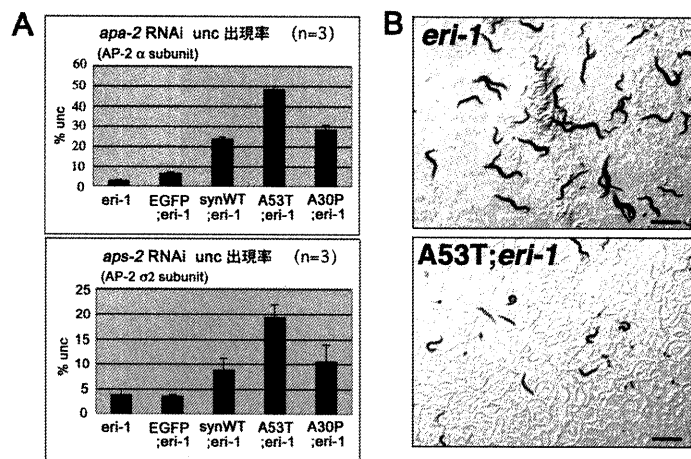


図 4 A. AP-2 subunit の RNAi による運動機能障害の出現率 B. *apa-2* RNAi による成長遅延 (bar = 500 μ m)

を評価した。その結果、スクリーニングで同定した *apa-2* とともに、*unc-11* (AP180) の RNAi により touch sense の低下が増強された (図 5)。

unc-11 変異体などのエンドサイトーシス変異体は、神経筋接合部におけるアセチルコリンの放出が低下する結果、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬 aldicarb に耐性を獲得する。そこで α -synuclein Tg 線虫の aldicarb 感受性を検討すると、野生型及び家族性 PD 変異型 α -synuclein を発現する Tg ラインはいずれも Aldicarb 耐性を示し、特に RNAi で最も運動機能障害増悪の強かった A53T 変異型で顕著であった (図 6)。アセチルコリン受容体アゴニスト Levamisole への感受性は変わらなかったことから、アセチルコリンの放出量が実際に減少したことが考えられた。

以上より、 α -synuclein の過剰発現は線虫の各種神経細胞においてエンドサイトーシスの機能低下を増強させ、特にシナプス小胞のエンドサイトーシスを抑制的に制御することにより神経伝達物質の放出を阻害する可能性が示唆された。

【まとめ・考察】

本研究において私は、ヒト α -synuclein を全神経系に過剰発現する線虫を用い、ゲノムワイドな手法により α -synuclein 神経障害性を修飾する遺伝子を探索し、1) 家族性変異型 α -synuclein の過剰発現がアポトーシス上流因子 *egl-1* の発現亢進を引き起こすこと、2) 過剰発現した α -synuclein はエンドサイトーシス機能の低下を増悪させることを明らかにした。今回の結果は、長期間にわたって進展する PD における神経細胞変性に、細胞内に蓄積した異常な構造を持つ α -synuclein によるエンドサイトーシスの阻害が関与している可能性を示唆する (図 7)。今後、AP-2 複合体因子の過剰発現により α -synuclein Tg 線虫のシナプス伝達障害が回復する可能性や、 α -synuclein 過剰発現 Tg マウスなどのより高等な生物種において α -synuclein がシナプス機能に影響を与える可能性について検討したい。また PD 患者脳内におけるエンドサイトーシス障害の有無についても検討を加えたい。

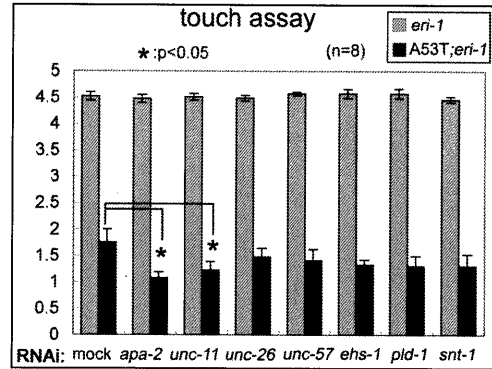


図 5 touch assay による神経機能の評価

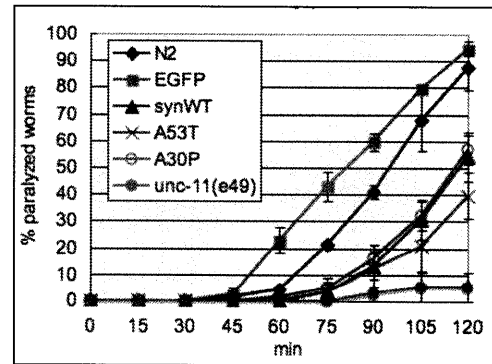


図 6 aldicarb assay による神経伝達物質放出量の評価

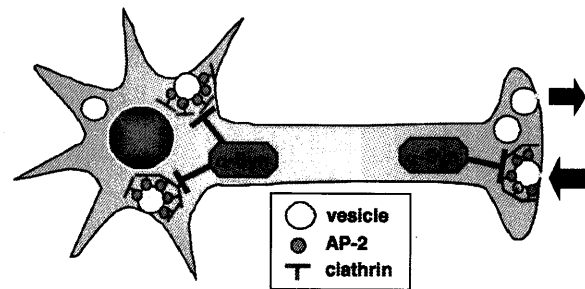


図 7 α -synuclein による神経障害機構のモデル