

審査の結果の要旨

氏名 半野陽子

パーキンソン病 (PD) の変性神経細胞に特徴的に出現するレビー小体 (LB) の主要構成成分は α -synuclein 蛋白質である。家族性 PD (FPD) において α -synuclein 遺伝子変異が見出されたことから、 α -synuclein が PD における神経細胞変性に果たす役割が注目されている。 α -synuclein は脳に広く発現し、神経細胞のシナプス前末端に可溶性蛋白質として局在するが、LB などの病的構造物中では不溶線維化して蓄積する。 α -synuclein を過剰発現したトランスジェニック動物において α -synuclein の凝集やドパミン性神経細胞の障害が観察されていることから、 α -synuclein の構造変化とそれに起因する細胞内蓄積が PD における神経細胞変性に深く関わっていると考えられる。

細胞内における異常蛋白質蓄積には、蛋白質の産生、構造の変化とともに、分解・除去過程が関与する可能性がある。代表的な蛋白質分解系の1つであるマクロオートファジーは、蛋白質の品質管理や飢餓状態におけるエネルギー供給とともに、ポリグルタミン病などの神経変性疾患における凝集蛋白質の分解に関わることが示唆されている。そこで申請者は、PD をはじめとする α -synuclein 蓄積性神経変性疾患におけるマクロオートファジーの関与を解明したいと考え、主として培養細胞系を用いて検討を行った。

[方法と結果]

細胞質内 α -synuclein 凝集体のマクロオートファジーによる代謝

HEK293 細胞に α -synuclein と α -synuclein 結合蛋白質である synphilin-1 を共発現すると、発現 4 日後の時点で、約 4 % の細胞の細胞質に径 1-3 μ m の粗大顆粒状の α -synuclein/synphilin-1 陽性の凝集体が形成された。凝集体の分解を検討するために、tet-off 発現系を利用して発現 4 日目に α -synuclein の発現を遮断後、さらに 2 日間培養した。発現 6 日後において、 α -synuclein 凝集体陽性細胞の比率は 4 日目の約 20 % に減少していた。リソソーム分解阻害剤 NH_4Cl および液胞型 ATPase 阻害剤 bafilomycinA1 によって α -synuclein 凝集体の減少は抑制された。この結果から、HEK293 細胞に形成された α -synuclein 凝集体は最終的にリソソームによって分解されることが示唆された。

細胞質蛋白質をリソソームによる分解に導く経路としては、オートファゴソームを經由するマクロオートファジーが主要機構と考えられている。そこで、マクロオートファジー経路の必須遺伝子である ATG5 ノックアウト (KO) マウス由来の MEF 細胞に α -synuclein を発現し、 α -synuclein 凝集体の形成を検討した。 α -synuclein 凝集体を形成した細胞の比率は、ATG5 発現を誘導した場合 (ATG5 on) と比較して ATG5 KO 細胞 (ATG5 off) において増加した。また、in vitro で凝集性の亢進を確認した E46K および A53T 家族性 PD 変異型 α -synuclein を発現すると、野生型 α -synuclein を発現した場合と比較して凝集体数は増加した。これらの結果から、 α -synuclein 凝集体の代謝にマクロオートファジーが関与していることが示唆された。

α-synuclein 凝集体形成に対するプロテアソーム系の関与

α-synuclein 凝集体の形成と分解に対するプロテアソーム系の関与について検討した。まずα-synuclein 発現 MEF 細胞をプロテアソーム阻害剤である lactacystin で処理し、細胞内のα-synuclein の総量をウェスタンブロット解析すると、α-synuclein 量は約 5 倍に増加したが、野生型細胞と ATG5 KO 細胞間で差は見られなかった。この結果は、MEF 細胞において可溶性α-synuclein の代謝は主にプロテアソーム系が担うことを示唆するものと考えた。lactacystin 処理によりα-synuclein 凝集体陽性細胞比率は増加し、この傾向は ATG5 KO MEF 細胞においてより顕著であった。この結果は、プロテアソーム代謝の抑制を介した可溶性α-synuclein 濃度の増大による凝集促進と、ATG5 KO 細胞における凝集体分解の阻害によるものと解釈した。一方、³⁵S メチオニン代謝ラベリングを用いたパルスチェイス実験では、ATG5 KO 細胞におけるα-synuclein の半減期は野生型細胞に比して約 1.6 倍延長したことから、可溶性α-synuclein の一部はマクロオートファジーによる代謝を受けることが示唆された。

mTOR を介したマクロオートファジーの活性化が凝集体に与える影響

マクロオートファジーの制御に関わる代表的な上流因子である mTOR の凝集体分解への関与を検討した。rapamycin は mTOR を抑制的に制御し、その結果マクロオートファジーを活性化する。α-synuclein と synphilin-1 を一過性発現した HEK293 細胞において発現 4 日目に tet-off で発現を遮断し rapamycin 処理を施行すると、α-synuclein 凝集体陽性細胞比率は非処理細胞と比較して減少した。この結果から、mTOR を介したマクロオートファジーの活性化は、α-synuclein 凝集体の分解を促進することが示唆された。

さらにミトコンドリア complex I 阻害剤であり、ドパミン性神経細胞に毒性を持つ rotenone がマクロオートファジー活性を抑制すること、mTOR の活性の指標である S6K の Thr389 のリン酸化を増加させることを見出した。

α-synuclein 蓄積にマクロオートファジーが及ぼす影響の in vivo における検討

培養細胞を用いた検討から、α-synuclein 凝集体の代謝にマクロオートファジーが関与する可能性が示されたことから、遺伝子改変マウスを用いて in vivo の検討を行った。A53T 家族性 PD 変異型 α-synuclein トランスジェニック(TG)マウスと ATG5 KO マウスを交配し、ATG5 KO マウスの生存する出生直後に病理学的検討を行った。α-synuclein TG/ATG5 KO bigenic マウスとα-synuclein TG マウスは、ともに黒質神経細胞にα-synuclein が高発現したが、α-synuclein 陽性凝集体の形成は見られず、細胞数の減少も見られなかった。これらの結果には ATG5 KO マウスの短命が関与している可能性があり、conditional KO マウスを用いた検討を続行している。ATG5 KO マウスの神経細胞にはユビキチン陽性凝集体の形

成が観察されたが、これらは α -synuclein 陰性であった。

以上のごとく本研究において申請者は(1) 培養細胞に α -synuclein と結合蛋白 synphilin-1 を共発現することにより α -synuclein 陽性凝集体が形成されること (2) この凝集体の除去にマクロオートファジーが関与すること (3) mTOR 抑制によるマクロオートファジーの刺激により凝集体が減少することを示した。これらの成果はマクロオートファジーが α -synuclein 凝集体の除去を介した PD の新規治療ターゲットとなる可能性を示唆するものであり、PD ならびに神経変性疾患のメカニズムと治療法の確立に大きく貢献するものと考えられ、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。