

57. シヌクレイン変異によるパーキンソン病の分子機構解明

広常 真治

大阪市立大学 医学部 細胞機能制御学

Key words : パーキンソン病, アルファシヌクレイン, 細胞内物質輸送

緒言

アルファシヌクレインは家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定されたが¹⁾、生理的な機能は不明な点が多い。我々はアルファシヌクレインタンパク質が微小管の制御因子として機能し、従来の細胞骨格としての微小管とは異なった構造を持つ非定型微小管と結合することを突き止めた。本研究ではアルファシヌクレインが結合する非定型微小管の役割を明らかにし、パーキンソン病発症の分子機構を解明することを目的とする。

方法

1. アルファシヌクレインの結合した微小管の微細構造解析

アルファシヌクレインの結合した微小管の構造的な特徴を明らかにするためにアルファシヌクレインの結合した微小管をクライオ電子顕微鏡でプロトフィラメントの構造を解析した²⁾。次に、プロトフィラメント 14 の微小管が存在するかどうかを明らかにするためにラットの坐骨神経をタンニン酸、グルタルアルデヒドで固定し超薄切片を作製して電子顕微鏡で解析した。さらにプロトフィラメント 14 の微小管が可動性微小管であることを証明するためにラット坐骨神経を結紮し、結紮部位において同様の解析を行った。

2. アルファシヌクレインの結合した微小管の細胞内における動態の解析

これまでシヌクレインファミリーの細胞内での動態は解析されていなかった。そこで我々は蛍光標識したシヌクレインファミリータンパク質を後根神経節細胞に発現させその動態を神経突起内で解析した。次に、神経細胞におけるアルファシヌクレインの動態を解析するために蛍光標識したアルファシヌクレイン、細胞質ダイニン、チューブリンを後根神経節細胞に発現させ移動時の共局在をライブセルイメージングで解析した。さらに詳細なアルファシヌクレインの結合した非定型微小管の解析のために、超解像顕微鏡 (PALM) を適用した。

結果

1. アルファシヌクレインの結合した微小管の微細構造解析

アルファシヌクレインは家族性パーキンソン病の原因として同定されシャペロンとしての機能や細胞膜のリン脂質との結合が示されているものの生理的な機能は不明であった。我々はアルファシヌクレインがチューブリンと結合し微小管の安定性の制御で重要な役割を果たしていることを発見した。アルファシヌクレインの組換えタンパク質を作製し、ブタ脳から精製したチューブリンの重合能に与える影響を解析した結果、チューブリンの重合を促進し、安定な微小管を形成することを発見した (図 1)。さらに金コロイドを用いた結合様式の同定をした結果、微小管周囲にネックレスのように結合することを発見した。

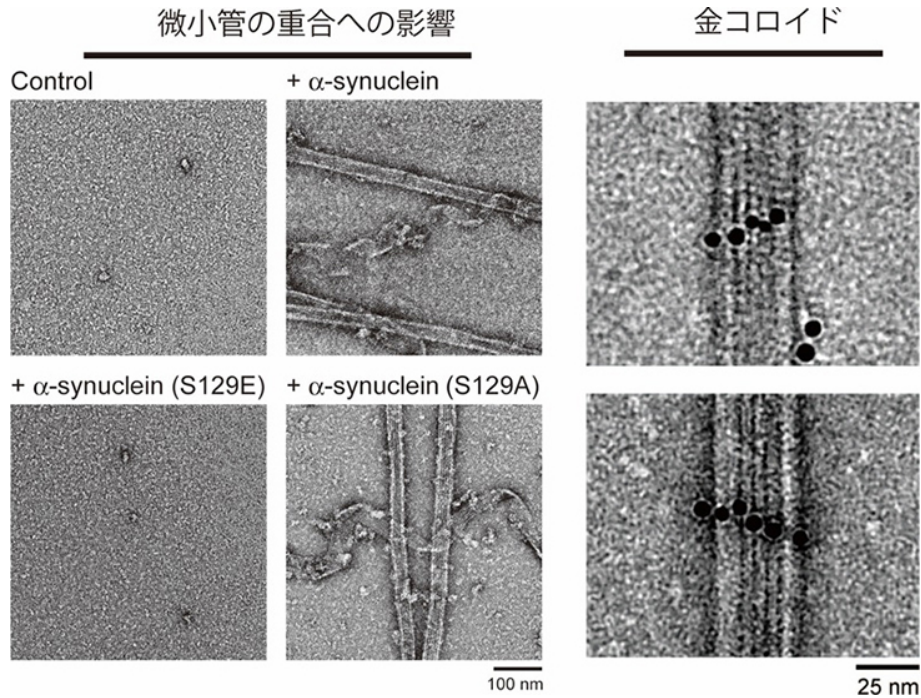


図1. アルファシヌクレインの微小管への結合様式の解析

アルファシヌクレインの組換えタンパク質存在下で微小管を重合させた結果、アルファシヌクレインは紡微小管重合を促進した。また免疫電子顕微鏡の解析からアルファシヌクレインは微小管にネックレス様に結合することが明らかとなった。

一方、アルファシヌクレインはS129がリン酸化され、特にLewy小体に集積しているアルファシヌクレインは高度にS129がリン酸化されていることが分かっている。また、家族性パーキンソン病ではアルファシヌクレインのE46KやA30Pの変異が報告されている。これらの変異を導入したアルファシヌクレインではチューブリンとの結合能は全くなくなることが分かった。さらにクライオ電子顕微鏡による解析で、アルファシヌクレインはプロトフィラメント14の微小管に選択的に結合することが分かった(図2, 3)。哺乳類の微小管はプロトフィラメント13であることが知られているが、これまでプロトフィラメント14が存在することは報告されていない。ラットの坐骨神経の電子顕微鏡による解析からプロトフィラメント14の微小管が存在すること、さらに坐骨神経を結紮し、結紮部位においてプロトフィラメント14が濃縮されていることを証明した。

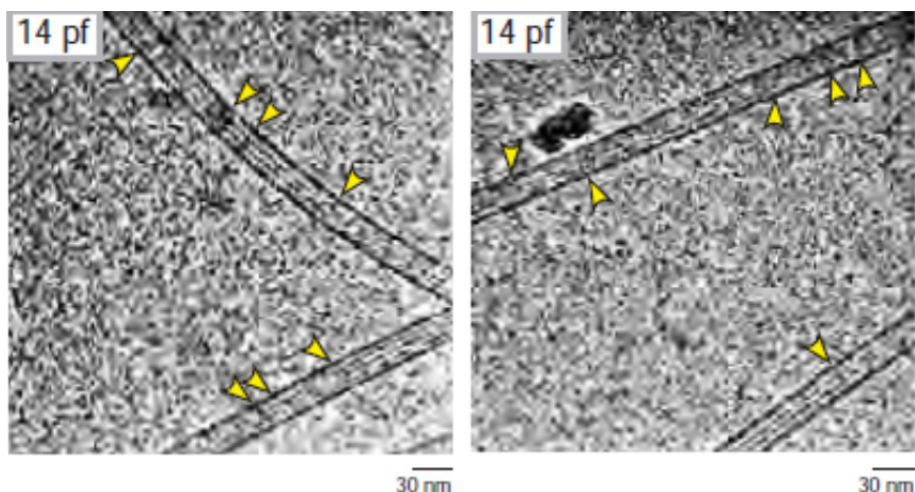


図2. アルファシヌクレインの結合した微小管のクライオ電子顕微鏡による解析
 アルファシヌクレインの結合した微小管をクライオ電子顕微鏡で解析した。Halo タグを結合させ、アルファシヌクレインの電子密度を高めた組換えタンパク質の解析結果から、免疫電子顕微鏡と同様にアルファシヌクレインは微小管の周囲を取り囲むように結合していることが分かった。

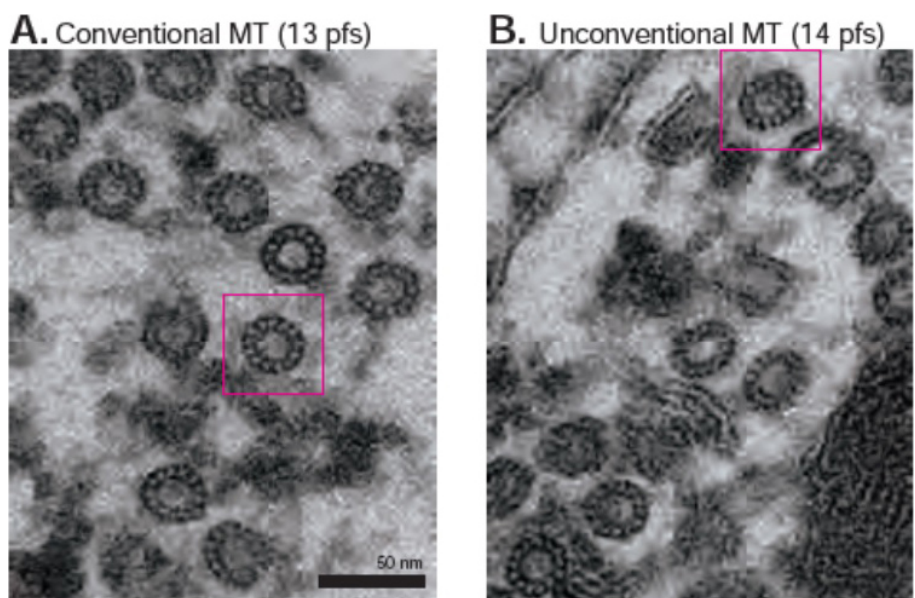


図3. 微小管のプロトフィラメントの解析
 ラット坐骨神経の微小管をタンニン酸、グルタルアルデヒドで固定し超薄切片を作製して電子顕微鏡で解析した。その結果、大多数の微小管は従来のプロトフィラメント13のものであるが、プロトフィラメント14の微小管も存在し、坐骨神経の結紮部位においてプロトフィラメント14が濃縮されていることが分かりプロトフィラメント14の微小管は可動性であることが証明された。

2. アルファシヌクレインの結合した微小管の細胞内における動態の解析

神経突起内では微小管はプラス端を細胞体側にマイナス端を末梢側に向けて並んでおり細胞体から離れる輸送はキネシン依存的、細胞体に向かう輸送は細胞質ダイニン依存的である³⁾。アルファシヌクレインタンパク質は後根神経節細胞内では顆粒状に存在しており、かつ神経突起内をダイナミックに移動していることが分かった。さらにリン酸化変異体 (phosphor-S129) や家族性パーキンソン病に見られる E46K の変異体では細胞核周辺に大きな凝集塊を形成し、ほとんど動いていないことが分かった (図4)。これらのデータはシヌクレインファミリータンパク質が従来の微小管結合タンパク質 (MAPS) と異なり極めて可動性の高い微小管と結合しており、かつ安定的に運搬されていることを示している。蛍光標識したアルファシヌクレイン、細胞質ダイニン、チューブリンを後根神経節細胞に発現させたライブセルイメージングの結果からこれらのタンパク質は軸索内で複合体を形成して移動していることがわかった。

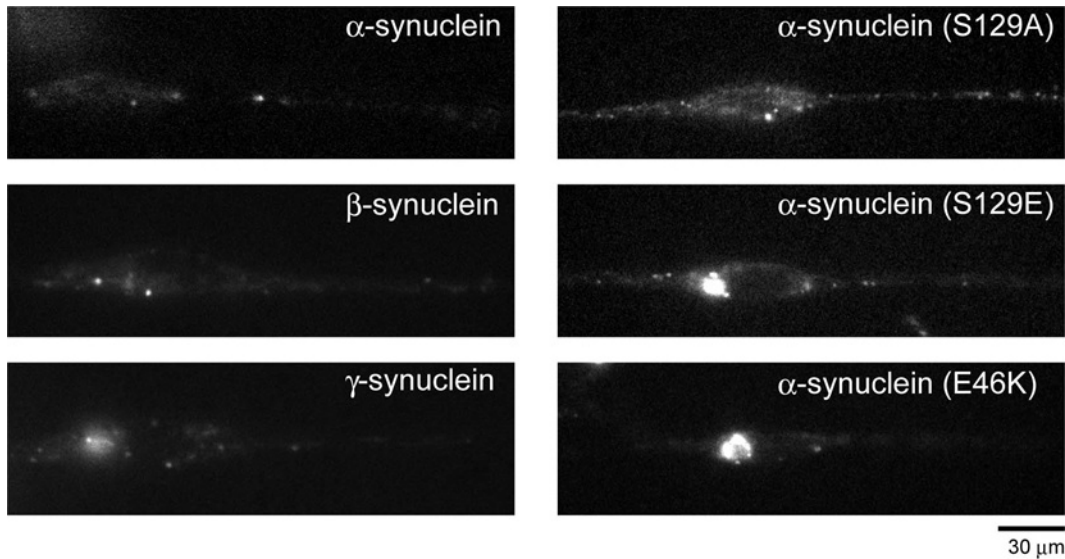


図4. アルファシヌクレインの後根神経節細胞におけるライブセルイメージング

シヌクレインタンパク質に蛍光標識し後根神経節細胞に導入・発現させ、ライブセルイメージングを行った。シヌクレインタンパク質は可動性が高いが、パーキンソン病変異型のアルファシヌクレインは可動性を失い、神経細胞核に凝集することが分かった。

さらに siRNA によってアルファシヌクレインをノックダウンし、その際の順行性の移動マーカーであるヘルペスウイルスの VP26、逆行性のマーカーであるライソソームの輸送障害を証明した。さらに細胞質ダイニンの順行性の運搬の障害を解析した。これら一連の解析からアルファシヌクレインの結合した非定型微小管の細胞内における機能を明らかにした。

大阪大学産業科学研究所の永井健治教授との共同で超解像顕微鏡 (PALM) を行った。PALM は光活性化→画像取得→重心位置計算→褪色の過程を 1 サイクルとして、視野中の蛍光分子がすべて褪色されるまで繰り返し、得られたすべての輝度重心輝点を重ね合わせることで最終画像を得るもので、50 nm の分解能をもつ⁴⁾。後根神経節細胞を固定後、チューブリン、細胞質ダイニン、アルファシヌクレインに対して超解像顕微鏡 (PALM) 解析を行い、細胞内における共局在とその微細構造を得た。特に、非定型微小管 (可動性微小管) の長さの分布を明らかにすることができ、非定型微小管は 0.5~2.3 マイクロメートルの短い断片であることが分かった。

考 察

1. 荷台として機能する特殊な非定型微小管の同定

微小管は代表的な細胞骨格であり、キネシンや細胞質ダイニンのようなモータータンパク質のレールとなっている。微小管はさらに中心小体や繊毛内の 9+2 構造の骨格としての役割以外についてはこれまで認知されていなかった。本研究の成果は微小管の細胞内における新たな非定型微小管の構造と機能を明らかにすることができた。

2. パーキンソン病発症の分子機構解明に対する貢献

アルファシヌクレインが1997年にNussbaumらのグループにより同定され¹⁾、研究の突破口が開かれた。しかしシヌクレインファミリーのタンパク質の生理的な機能はまだ未解明な部分が多く、アルファシヌクレインの変異がいかにして神経細胞の変性に至るかの分子機能は不明であった。今回の我々の研究でシヌクレインファミリーのタンパク質が微小管の制御、特に可動性微小管の形成にかかわることを明らかにした。この発見はアルファシヌクレインの変異が細胞内物質輸送の障害を引き起こし、ひいては神経細胞死に至る可能性を示唆していると考えられた。

共同研究者

本研究は大阪大学・産業科学研究所の永井健治教授のグループ、九州工業大学の安永卓夫教授のグループ、京都府立医科大学の伊東恭子教授のグループとの共同研究で行われた。

文 献

- 1) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. PMID: 9197268. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7.
- 2) Lis1 restricts the conformational changes in cytoplasmic dynein on microtubules. Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, Hirotsune S. *Microscopy (Oxf)*. 2015 Dec;64(6):419-27. DOI: 10.1093/jmicro/dfv055 PMID: 26371280.
- 3) LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. Yamada M, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Mimori-Kiyosue Y, Nakamura T, Itoh K, Fushiki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Torisawa T, Toyoshima YY, Hirotsune S. *EMBO J*. 2008 Oct 8;27(19):2471-83 DOI: 10.1038/emboj.2008.182 PMID: 18784752.
- 4) A guide to use photocontrollable fluorescent proteins and synthetic smart fluorophores for nanoscopy. Uno SN, Tiwari DK, Kamiya M, Arai Y, Nagai T, Urano Y. *Microscopy (Oxf)*. 2015 Aug;64(4):263-77. DOI: 10.1093/jmicro/dfv037 PMID: 26152215.