論　文　内　容　要　旨

論文題目

パーキンソン病関連分子α-シヌクレインの Ser129 リン酸化反応の効果についての細胞生物学的解析

所属部門：　分子疫学　　部門
所属講座：　内科学第三　　講座
氏　　名：　佐々木　飛翔

【内容要旨】（1,200 字以内）

[**背景**] パーキンソン病(PD)は、神経病理学的に黒質ドパミン神経細胞の変性・脱落と異常細胞質内封入体レビー小体(LBs)の出現によって特徴付けられる。PD 脳では、LBs を構成するα-シヌクレイン（a-syn）の約 90%が Ser129 でリン酸化されている。一方、正常脳では、全体の 4%がリン酸化されているに過ぎない。この差は、a-syn の Ser129 リン酸化反応は病的状態で亢進することを示唆している。しかし、LBs にリン酸化された a-syn が高度に蓄積する機序は明らかではない。これまで、ミトコンドリア complex I 阻害薬の rotenone で細胞を処理すると Ser129 リン酸化が亢進すること、a-syn は Ca^{2+}と相互作用して神経毒性を発揮することが報告されている。しかし、これらの詳細については不明である。[**目的**] PD の病態を明らかにするため、a-syn リン酸化体の維持機構、リン酸化反応が亢進する条件、リン酸化反応の役割について細胞生物学的に解析した。[**方法**]細胞内においてリン酸化反応が亢進する条件について、Ca^{2+}イオノフォア A23187 とキレート剤を使用した。また、ミトコンドリアを障害する MPP^+と rotenone の処理により伴う変化を解析した。リン酸化の役割を分解系との関わりから調べるため、タンパク質合成阻害剤 cyclohexymide（CHX）による追跡実験においてプロテアソーム阻害剤 MG132 を使用して解析した。 [**結果**] cDNA の濃度を変えて a-syn を一過性発現させたところ、細胞内の Ser129 リン酸化体量と全体の a-syn 増加量は正の相関を示していた。大脳皮質初代培養神経細胞を A23187 で処理すると、リン酸化 a-syn 量が増加し、この反応は Ca^{2+}キレート剤で抑制された。MPP^+または rotenone で SH-SY5Y 細胞または大脳皮質初代培養神経細胞を処理すると、リン酸化 a-syn 量が増加し、この反応は Ca^{2+}キレート剤で抑制された。CHX の追跡実験において、rotenone によって惹起される Ser129 リン酸化は MG132 の併用処理によって減少が有意に抑制された。 [**考察**] 本実験から、a-syn の Ser129 リン酸化は全 a-syn に対して一定の割合になるよう細胞内で調節されていること、ミトコンドリア障害によるリン酸化体の増加は細胞外から流入する Ca^{2+}を介して生じること、ミトコンドリア障害によるリン酸化は a-syn をプロテアソーム分解系に向かわせることを示唆していた。したがって、リン酸化は、ストレス反応によって生じる a-syn の蓄積を防ぐ可能性が考えられる。本研究により、細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇によりリン酸化体が上昇したので、細胞内 Ca^{2+}濃度を調節することにより PD の治療につながる可能性が示唆された。

平成 28 年 1 月 15 日

山形大学大学院医学系研究科長　殿

学 位 論 文 審 査 結 果 報 告 書

申請者 氏名：　佐々木　飛翔

論 文 題 目：　パーキンソン病関連分子α-シヌクレインの Ser129 リン酸化反応の効果についての細胞生物学的解析

審 査 委 員：　主審査委員　加藤丈夫

副審査委員　後藤薫

副審査委員　中村孝夫

審査終了日：平成 28 年 1 月 13 日

【論 文 審 査 結 果 要 旨】

パーキンソン病(PD)は、神経病理学的に黒質ドパミン神経細胞の変性・脱落と異常細胞質内封入体レビー小体(LBs)の出現によって特徴付けられる。PD 脳では、LBs を構成するα-シヌクレイン（a-syn）の約 90%が Ser129 でリン酸化されている。一方、正常脳では、全 a-syn の 4%がリン酸化されているに過ぎない。この差は、a-syn の Ser129 リン酸化反応は病的状態で亢進している可能性を示唆している。さらに PD のモデル動物において、a-syn の Ser129 リン酸化は神経細胞死を亢進することが示されている。したがって、細胞内での a-syn Ser129 リン酸化反応の詳細を明らかにすることは、PD の病態の解明、さらには新たな治療ターゲット分子の発見に繋がる可能性がある。しかし、これまで細胞内の内因性（過剰発現でない）Ser129 リン酸化 a-syn を Western blot で検出することは困難であったため、この方面の研究は遅れていた。2015 年、申請者は細胞内の内因性 Ser129 リン酸化 a-syn および分泌型リン酸化 a-syn を Western blot で検出できる方法を確立した（Sasaki A et al, Sci Rep, 2015)。申請者は、その方法を用いて多くの実験を行い、「細胞外から細胞内に流入する Ca^{2+}により、a-syn の Ser129 リン酸化が亢進する」ことを明らかにした。本研究により、細胞内 Ca^{2+}濃度の調節（たとえば、Ca^{2+}ブロッカーにより細胞外から細胞内に流入する Ca^{2+}をブロック）が PD の新たな治療ターゲットになる可能性が示唆された。

以上の研究成果は新知見であり、さらに PD の新たな治療法開発に繋がる重要な基礎的知見である。したがって、審査委員会（主査、副査）は本研究が学位（博士）の授与に値すると判断した。