

論文内容要旨

論文題目 GRK ファミリーによる α -シヌクレイン Ser129 のリン酸化反応に関する細胞生物学的解析

所属部門： 分子疫学 部門
所属講座： 生命情報内科学 講座
氏名： 坂本 雅弘

【内容要旨】

背景：パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質ドパミン神経細胞の選択的な変性を特徴とする神経変性疾患であるが、神経細胞死のメカニズムは解明されていない。 α -シヌクレイン (α S) は、孤発性 PD (sPD) を病的に特徴づけるレビー小体 (LB) の主要構成成分であり、LB に沈着した大部分の α S において、129 番目の Ser 残基がリン酸化されている。近年の研究より、リン酸化 α S は非リン酸化 α S より凝集し易いこと、 α S トランスジェニックショウジョウバエにおいて α S Ser129 のリン酸化がドパミン神経細胞死を促進させることが示されている。Ser129 のリン酸化が、 α S の重合及び細胞毒性の発揮に重要と考えられている。 α S Ser129 のリン酸化を担うキナーゼ候補として、これまでにカゼインキナーゼ (CK) 1、CK2 及び G タンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) 2、GRK5 がある。しかし、これら候補キナーゼが細胞内でどの程度 α S Ser129 のリン酸化反応に寄与しているのか不明である。

目的・方法：GRK ファミリーのうち、種々の細胞に発現が確認されている GRK2、GRK5、GRK6 に焦点をあて、内因性レベルで α S Ser129 のリン酸化反応に寄与する分子を同定するため、培養細胞においてドミナントネガティブ変異体及び RNA 干渉法を用いて検討した。

結果：HEK293 細胞及び SH-SY5Y 細胞における GRK ファミリーの発現は GRK2、GRK6、GRK5 の順に多かった。野生型 GRK2、GRK5 に加え、GRK6 の過剰発現によってもリン酸化 α S 量の増加を認めた。これらの結果を基礎に α S 安定発現 SH-SY5Y 細胞株に GRK ドミナントネガティブ変異体を過剰発現させたところ、GRK6 変異体が有意にリン酸化 α S の産生を抑制した。GRK2、GRK5 の変異体は抑制効果を示さなかった。野生型 GRK とドミナントネガティブ変異体を共発現させたところ、GRK6 の変異体は野生型 GRK6 だけでなく、野生型 GRK5 の活性も部分的に抑制した。GRK6 ドミナントネガティブ変異体の効果は GRK ファミリー間で特異的でない可能性が示唆されたので、次に α S 安定発現 HEK293 細胞株において、RNA 干渉法を用いて検討した。内因性 GRK2 及び GRK5 の発現を抑制させた場合、 α S Ser129 のリン酸化反応は抑制されなかったが、内因性 GRK6 の発現を抑制させた場合、 α S Ser129 のリン酸化反応は有意に抑制されていた。

考察：培養細胞において GRK ファミリーの中で、少なくとも GRK6 が α S Ser129 のリン酸化反応を担うキナーゼのひとつであることを示した。しかし、GRK6 と同じサブファミリーに属する GRK5 については、今回用いた培養細胞においてその発現が極めて少量であることから、 α S のリン酸化反応への寄与を過小評価している可能性は否定できない。今後、ヒト黒質ドパミン神経細胞において各キナーゼの寄与を明確にすることは、sPD の治療標的としての α S リン酸化阻害剤の開発に重要な知見を与えると考える。

平成 19 年 / 月 17 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： 坂本雅弘

論文題目： GRKファミリーによる α -シヌクレイン Ser129 の
リン酸化反応に関する細胞生物学的解析

審査委員：主審査委員 加藤 丈天 (印)

副審査委員 岡田 大 (印)

副審査委員 後藤 薫 (印)

審査終了日：平成 19 年 / 月 17 日

【 論文審査結果要旨 】

パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質ドパミン神経細胞の変性・脱落を特徴とする神経変性疾患であるが、神経細胞死のメカニズムは不明である。最近、 α -シヌクレイン (α S) 分子の 129 番目の Ser 残基のリン酸化が PD の病態に重要であることが報告された。 α S Ser129 のリン酸化を担うキナーゼ候補として、これまでにカゼインキナーゼ (CK) 1、CK2 及び G タンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) 2、GRK5 が知られているが、これら候補キナーゼが細胞内でどの程度 α S Ser129 のリン酸化反応に寄与しているのか不明である。

そこで坂本雅弘氏は、GRK ファミリーのうち、種々の細胞に発現が確認されている GRK2、GRK5、GRK6 に焦点をあて、内因性レベルで α S Ser129 のリン酸化反応に寄与する分子を同定するため、培養細胞においてドミナントネガティブ変異体及び RNA 干渉法を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 野生型 GRK2、GRK5 に加え、GRK6 の過剰発現によってもリン酸化 α S 量の増加を認めることを明らかにした。
2. α S 安定発現 SH-SY5Y 細胞株に GRK ドミナントネガティブ変異体を過剰発現させたところ、GRK6 変異体が有意にリン酸化 α S の産生を抑制した。しかし、GRK2、GRK5 の変異体は抑制効果を示さなかった。
3. 次に RNA 干渉法を用いて、 α S 安定発現 HEK293 細胞株について検討した。その結果、内因性 GRK2 及び GRK5 の発現を抑制させても α S Ser129 のリン酸化反応は抑制されなかったが、内因性 GRK6 の発現を抑制させたとき、 α S Ser129 のリン酸化反応は有意に抑制された。

以上の結果より坂本氏は、 α S Ser129 のリン酸化反応を担う主要なキナーゼは、SH-SY5Y 細胞株及び HEK293 細胞株においては GRK6 であることを明らかにした。今後、ヒト黒質ドパミン神経細胞での各キナーゼの寄与を明確にすることは、PD の治療標的としての α S リン酸化阻害剤の開発に重要である。

坂本雅弘氏の研究は、PD の新しい治療薬開発に必要なステップであり、新発見も含んでいる。また、種々の質問にも適切に回答した。したがって、審査委員会 (主査、副査) は本研究が学位 (博士) 授与に値するものと判断した。

(1, 200 字以内)