

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム  
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

研究開発課題名： (日本語)  $\alpha$ シヌクレインの新規分解制御機構の解明  
(英語) Novel mechanisms for degradation of  $\alpha$ -synuclein

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所  
疾病研究第四部 室長 株田 智弘

所属 役職 氏名： (英語)

実施期間： 平成28年5月20日 ～ 平成29年3月31日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

Alpha-synuclein 蛋白質はレビー小体の主要な構成成分である。Alpha-synuclein 蛋白質の神経細胞内への蓄積はレビー小体型認知症の原因と密接に関与しており、alpha-synuclein の細胞内分解システムの理解は $\alpha$ シヌクレイノパチーの治療法開発において重要である。我々は alpha-synuclein の細胞内分解を制御する蛋白質 X を新たに見いだしており、本研究では alpha-synuclein 分解の新たな制御機構解明を目的としている。

本年度はまず培養細胞を用いて、X の過剰発現により、alpha-synuclein の細胞内分解が促進されるかどうかを検討した。分解の検討には、ドキシサイクリン存在下で alpha-synuclein の発現がオフとなる tet-off システムを用いた。細胞としては neuro2a 細胞を用い、X の過剰発現が alpha-synuclein 蛋白質分解へ及ぼす影響を解析した。その結果、X の過剰発現により、alpha-synuclein の細胞内分解が顕著に促進されることを示した。Tet-off システム制御下の alpha-synuclein 量に関しても、X の過剰発現により顕著に低下した。

また、同様の実験系を用いて新たな分解機構のメカニズムを解析した。リソソームの protease inhibitor (pepstatin A + E64d) を添加した細胞では、X 依存的な alpha-

synuclein 分解促進が見られなかったことから、X による alpha-synuclein 分解はリソソームにおける分解であることが明らかとなった。また macroautophagy の阻害剤である 3-methyladenine 存在下では、X 依存的な alpha-synuclein 分解促進が見られたことから、X による alpha-synuclein 分解は macroautophagy とは別の経路であることが強く示唆された。

動物個体レベルにおける新規分解経路の解析を行うために、X のノックアウトマウスの作製を行い、その結果作出に成功した。次年度以降に、このマウスの脳において神経細胞内 alpha-synuclein の蓄積が見られるかなどの解析を行う予定である。

$\alpha$  シヌクレイノパチー剖検脳を用いた解析についても予備検討を行った。まず、X に対する特異的抗体を作製し、成功した。パーキンソン病および健常コントロールそれぞれの剖検脳（前頭葉）1 例ずつについて、ウエスタンブロット法により X 量の比較を行った。その結果、パーキンソン例において X の顕著な増加が見られた。

## 英文

$\alpha$ -Synuclein proteins are the major component of Lewy bodies. Accumulation of  $\alpha$ -synuclein proteins in neurons is closely involved in the pathogenesis of dementia with Lewy bodies. Therefore, understanding of intracellular system for degradation of  $\alpha$ -synuclein is important for the development of therapy of  $\alpha$ -synucleinopathy. We have found a novel protein X that regulates intracellular degradation of  $\alpha$ -synuclein. The aim of this study is to clarify novel mechanisms underlying degradation of  $\alpha$ -synuclein.

In this fiscal year, we investigated whether overexpression of X can promote intracellular degradation of  $\alpha$ -synuclein. To investigate the degradation, we employed a tet-off system, in which the expression of  $\alpha$ -synuclein is turned off in the presence of doxycycline. Using neuro2a cells, we examined the effects of overexpression of X on intracellular degradation of  $\alpha$ -synuclein. As a result, we showed that overexpression of X markedly promotes degradation of  $\alpha$ -synuclein. Overexpression of X also decreased the levels of  $\alpha$ -synuclein that is under control of tet-off system.

We also investigated the mechanisms of the novel degradation pathway, using tet-off system. In the presence of lysosomal protease inhibitors (pepstatin A + E64d), the promotion of  $\alpha$ -synuclein degradation induced by X was not observed, indicating that the  $\alpha$ -synuclein degradation induced by X is lysosomal degradation. In contrast, the promotion of  $\alpha$ -synuclein degradation induced by X was observed in the presence of the macroautophagy inhibitor 3-methyladenine, strongly suggesting that the  $\alpha$ -synuclein degradation induced by X is independent of macroautophagy.

To investigate the novel degradation pathway in vivo, we have generated X-deficient mice. We plan to analyze the mice next fiscal year.

We have generated a specific antibody against X, and conducted a preliminary examination using brain autopsies of  $\alpha$ -synucleinopathy. We analyzed protein levels

of X in the frontal cortex of a Parkinson's disease autopsy and a control brain autopsy.  
As a result, the protein level of X was increased in the Parkinson's disease brain.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願