

京都大学	博士 (薬学)	氏名	本郷 春幸
論文題目	パーキンソン病関連蛋白質による微小管の安定化状態の制御と glycogen synthase kinase-3 $\beta$ の役割に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>パーキンソン病は、運動機能障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患である。病理学的には中脳黒質でのドパミン神経細胞死およびレビー小体と呼ばれる細胞質封入体が観察される。レビー小体の主要構成成分である<math>\alpha</math>-synucleinをコードする遺伝子は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである。そのため<math>\alpha</math>-synucleinは、パーキンソン病の病態生理に関わる重要な分子として注目されている。一方、タウ蛋白質は微小管結合蛋白質の一つであり、微小管の安定化に寄与する。近年、パーキンソン病患者剖検脳の検討から、同一細胞内においてレビー小体とリン酸化タウ蛋白質が高頻度に共在することが報告された。さらに、タウ蛋白質をリン酸化する酵素の一つであるglycogen synthase kinase-3<math>\beta</math> (GSK3<math>\beta</math>) の活性化も示唆されている。したがって、<math>\alpha</math>-synucleinとタウ蛋白質には、その重合・蓄積過程で何らかの相互作用があると推測されている。また、培養細胞を用いた検討から、選択的なドパミン神経細胞死に微小管の不安定化が寄与していることが示唆されており、微小管の安定化状態の制御を明らかにすることは、パーキンソン病の病態解明および治療薬の開発に有用であると考えられる。そこで、本研究において著者は、ロテノン誘発微小管不安定化による<math>\alpha</math>-synuclein毒性に対する作用および微小管の安定化状態の制御におけるGSK3<math>\beta</math>の役割について研究を行った結果、以下の新知見を得た。</p> <p>第一章 ロテノン誘発微小管不安定化による<math>\alpha</math>-synuclein誘発毒性に対する作用</p> <p><math>\alpha</math>-Synucleinはmonomer、oligomer、protofibril、線維化した凝集体など複数の構造をとる。線維化した凝集体よりもoligomer、protofibrilの方が高い細胞毒性を持つことが報告されている。これまでの研究から<math>\alpha</math>-synucleinが微小管に結合すること、ミトコンドリア複合体 I を阻害するロテノンや1-methyl-4-phenylpyridiniumは微小管を不安定化することが明らかとなっており、微小管不安定化と<math>\alpha</math>-synuclein凝集とが関連していることが示唆される。そこで、ロテノン処置時の<math>\alpha</math>-synuclein凝集および細胞死に与える影響をヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて検討した。ロテノンは濃度依存的に細胞死を引き起こし、その細胞死はGSK3<math>\beta</math>阻害薬 (SB216763) により抑制された。ロテノン処置により活性型であるリン酸化GSK3<math>\beta</math> (Tyr216) が増加し、この増加はアスコルビン酸により抑制された。ロテノン処置により細胞質の<math>\alpha</math>-synuclein dimerおよびoligomerが増加し、微小管画分の<math>\alpha</math>-synucleinは減少した。この時、チューブリンの細胞質画分での増加および微小管画分での減少が観察されたことから、ロテノンによる微小管の不安定化が示唆された。これらの変化はGSK3<math>\beta</math>阻害薬、微小管安定化薬 (タキソール) により抑制された。一方、活性型GSK3<math>\beta</math> (S9A) の過剰発現により、細胞質での<math>\alpha</math>-synuclein monomerが増加し、微小管画分の<math>\alpha</math>-synucleinは減少した。この結</p>			

果より、ロテノンによる $\alpha$ -synucleinの凝集にはGSK3 $\beta$ 活性上昇および微小管不安定化が関与するが、GSK3 $\beta$ 活性の上昇のみでは毒性のあるoligomer増加は明らかではなく、ロテノンの有する別の作用がさらに寄与していることが推察された。次に、細胞内に増加した $\alpha$ -synucleinが細胞死に与える影響を検討した。 $\alpha$ -synuclein過剰発現細胞、および細胞外からの $\alpha$ -synuclein適用で細胞内 $\alpha$ -synuclein monomer、oligomerの増加した細胞では、ロテノンによる細胞死が増強した。以上の結果から、ロテノンはGSK3 $\beta$ 活性化を介して、微小管から細胞質への $\alpha$ -synucleinの遊離および凝集によるoligomer化を促進することが示された。凝集することにより毒性を増した $\alpha$ -synucleinは細胞死に促進的に働くことが考えられた。

## 第二章 GSK3 $\beta$ 活性調節による微小管安定化制御

第一章より、ロテノンはGSK3 $\beta$ 活性化を介して、微小管不安定化を惹起することが示唆された。そこで、GSK3 $\beta$ 活性化による微小管不安定化の機序を明らかにすることを目的として、GSK3 $\beta$ の基質であり微小管結合蛋白であるタウ蛋白質のロテノン誘発細胞死への関与を検討した。ロテノンは濃度依存的にSH-SY5Y細胞の細胞死およびタウ蛋白質リン酸化を引き起こした。細胞死およびタウ蛋白質のリン酸化は、GSK3 $\beta$ 阻害薬処置により抑制された。タウ蛋白質はリン酸化により微小管結合能が低下することが知られていることから、ロテノンがタウ蛋白質の微小管結合に与える影響を、細胞分画法を用いて検討した。ロテノンは濃度依存的に細胞質画分のタウ蛋白質を増加し、微小管画分のタウ蛋白質を減少した。この変化はGSK3 $\beta$ 阻害薬により抑制された。タウ蛋白質と微小管の結合低下は微小管の不安定化を招くことが知られていることから、遊離チューブリンおよび重合チューブリン（微小管）抽出法を用い、ロテノンが微小管の安定性に与える影響を検討した。ロテノン処置により遊離チューブリンは増加し、重合チューブリンは減少した。この変化はGSK3 $\beta$ 阻害薬により抑制された。さらに、ロテノンによる細胞死は微小管安定化薬であるタキソールにより抑制された。これらの結果より、ロテノンはGSK3 $\beta$ の活性化を介してリン酸化タウ蛋白質を増加し、それに続く微小管不安定化により細胞死を引き起こすことが示唆された。

以上、著者は、ロテノンによる細胞死の過程において、GSK3 $\beta$ 活性上昇によりタウ蛋白質のリン酸化を介した微小管不安定化が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、GSK3 $\beta$ 活性化とそれに引き続くタウ蛋白質リン酸化を介した微小管不安定化により、 $\alpha$ -synucleinの微小管からの細胞質への遊離、凝集が生じ、細胞障害が増強される機序を示した。本研究の成果は、パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死に微小管の異常が重要な役割を果たし、GSK3 $\beta$ の活性制御が微小管の正常化、神経保護に繋がることを示唆するものであり、これらを標的とする新たなパーキンソン病治療薬の創成に有用な基礎的知見を提供する。

(論文審査の結果の要旨)

パーキンソン病は、運動機能障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的には中脳黒質でのドパミン神経細胞死およびレビー小体と呼ばれる細胞質封入体が観察される。レビー小体の主要構成成分である $\alpha$ -synucleinをコードする遺伝子は、パーキンソン病の病態生理に関わる重要な分子として注目されている。さらに、微小管結合蛋白質の一つであるタウ蛋白質は、微小管の安定化に寄与し、同一細胞内においてレビー小体とリン酸化タウ蛋白質が高頻度に共在する。タウ蛋白質をリン酸化する酵素の一つであるglycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )の活性化も示唆されている。したがって、 $\alpha$ -synucleinとタウ蛋白質には、その重合・蓄積過程で何らかの相互作用があると推測され、微小管の安定化状態の制御を明らかにすることは、パーキンソン病の病態解明および治療薬の開発に有用な基礎的知見となると期待される。そこで、ロテノン誘発微小管不安定化による $\alpha$ -synuclein毒性に対する作用および微小管の安定化状態の制御におけるGSK3 $\beta$ の役割について研究を行った。

これまでの研究から $\alpha$ -synucleinが微小管に結合すること、ミトコンドリア複合体 I を阻害するロテノンや1-methyl-4-phenylpyridiniumは微小管を不安定化することが明らかとなっており、微小管不安定化と $\alpha$ -synuclein凝集とが関連していることが示唆される。そこで、ロテノン処置時の $\alpha$ -synuclein凝集および細胞死に与える影響をヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて検討した。ロテノンは濃度依存的に細胞死を引き起こし、その細胞死はGSK3 $\beta$ 阻害薬 (SB216763) により抑制された。ロテノン処置により活性型であるリン酸化GSK3 $\beta$  (Tyr216) が増加し、この増加はアスコルビン酸により抑制された。ロテノン処置により細胞質の $\alpha$ -synuclein dimerおよびoligomerが増加し、微小管画分の $\alpha$ -synucleinは減少した。この時、チューブリンの細胞質画分での増加および微小管画分での減少が観察されたことから、ロテノンによる微小管の不安定化が示唆された。これらの変化はGSK3 $\beta$ 阻害薬、微小管安定化薬 (タキソール) により抑制された。一方、活性型GSK3 $\beta$  (S9A) の過剰発現により、細胞質での $\alpha$ -synuclein monomerが増加し、微小管画分の $\alpha$ -synucleinは減少した。この結果より、ロテノンによる $\alpha$ -synucleinの凝集にはGSK3 $\beta$ 活性上昇および微小管不安定化が関与するが、GSK3 $\beta$ 活性の上昇のみでは毒性のあるoligomer増加は明らかではなく、ロテノンの有する別の作用がさらに寄与していることが推察された。次に、細胞内に増加した $\alpha$ -synucleinが細胞死に与える影響を検討した。 $\alpha$ -synuclein過剰発現細胞、および細胞外からの $\alpha$ -synuclein適用で細胞内 $\alpha$ -synuclein monomer、oligomerの増加した細胞では、ロテノンによる細胞死が増強した。以上の結果から、ロテノンはGSK3 $\beta$ 活性化を介して、微小管から細胞質への $\alpha$ -synucleinの遊離および凝集によるoligomer化を促進することが示された。凝集することにより毒性を増した $\alpha$ -synucleinは細胞死に促進的に働くと結論された。

次いで、GSK3 $\beta$ 活性化による微小管不安定化の機序を明らかにすることを目的として、GSK3 $\beta$ の基質であり微小管結合蛋白であるタウ蛋白質のロテノン誘発細胞死

への関与を検討した。ロテノンは濃度依存的にSH-SY5Y細胞の細胞死およびタウ蛋白質リン酸化を引き起こした。細胞死およびタウ蛋白質のリン酸化は、GSK3β阻害薬処置により抑制された。タウ蛋白質はリン酸化により微小管結合能が低下することが知られていることから、ロテノンがタウ蛋白質の微小管結合に与える影響を、細胞分画法を用いて検討した。ロテノンは濃度依存的に細胞質画分のタウ蛋白質を増加し、微小管画分のタウ蛋白質を減少した。この変化はGSK3β阻害薬により抑制された。タウ蛋白質と微小管の結合低下は微小管の不安定化を招くことが知られていることから、遊離チュブリンおよび重合チュブリン（微小管）抽出法を用い、ロテノンが微小管の安定性に与える影響を検討した。ロテノン処置により遊離チュブリンは増加し、重合チュブリンは減少した。この変化はGSK3β阻害薬により抑制された。さらに、ロテノンによる細胞死は微小管安定化薬であるタキソールにより抑制された。これらの結果より、ロテノンはGSK3βの活性化を介してリン酸化タウ蛋白質を増加し、それに続く微小管不安定化により細胞死を引き起こすことが示唆された。

以上、ロテノンによる細胞死の過程において、GSK3β活性上昇によりタウ蛋白質のリン酸化を介した微小管不安定化が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、GSK3β活性化とそれに引き続くタウ蛋白質リン酸化を介した微小管不安定化により、 $\alpha$ -synucleinの微小管からの細胞質への遊離、凝集が生じ、細胞障害が増強される機序を示した。本研究の成果は、パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死に微小管の異常が重要な役割を果たし、GSK3βの活性制御が微小管の正常化、神経保護に繋がることを示唆するものであり、これらを標的とする新たなパーキンソン病治療薬の創成に有用な基礎的知見を提供する。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降