

| | |
|----------|--|
| 氏名 | やぎ ひさし 八木 寿 梓 |
| 学位の種類 | 博士（再生医科学） |
| 学位記番号 | 甲第8号 |
| 学位授与年月日 | 平成18年 3月10日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題目 | Amyloid fibril formation of α -synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: Implications for the mechanism of transmissible conformational diseases (α シヌクレインのアミロイド線維形成はあらかじめ形成された他のタンパク質のアミロイドによって促進される：コンフォメーション病の伝播機構に対する関連性) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 押村 光 雄 (副査) 島 義 郎 河田康志 |

学位論文の内容の要旨

α シヌクレインは家族性パーキンソン病の原因タンパク質の一つで、レビー小体と呼ばれる神経細胞内封入体を形成する性質を有している。レビー小体には α シヌクレインだけでなく、他のタンパク質の凝集体も含まれている。この事実から、レビー小体内に存在する α シヌクレインのアミロイド線維は、他の異なるタンパク質との相互作用を經由して形成されるのではないかという疑問が生じる。この仮説を証明するために、我々はあらかじめ形成した様々なタンパク質の線維をあらかじめ添加した状態で α シヌクレインのアミロイド線維形成を *in vitro* で調べた。添加するアミロイド核として、アミロイド線維を形成することが明らかになっている大腸菌由来シャペロン GroES、ニワトリ由来リゾチームとウシ由来インシュリンの3種類のタンパク質を用いた。驚いたことに、 α シヌクレインのアミロイド線維形成は、あらかじめ形成した GroES、リゾチーム、インシュリンの線維を添加することによって明らかに促進された。生理条件下において、特定の構造を形成していないという特徴を有している α シヌクレインは様々なタンパク質分子種と結合することができ、その結果、 α シヌクレインのアミロイド線維形成（伸張反応）の引き金となることが示唆された。この知見はパーキンソン病の分子メカニズムを理解するうえで非常に重要な示唆を与えるとともに、コンフォメーション病全般の伝播機構についての興味深い関連性を提供する。

方 法

α シヌクレインのアミロイド線維形成における分子の変化は、大型放射光施設である SPring8 にて詳細な研究を行った。また、アミロイド線維経時変化はアミロイド線維に結合する蛍光色素チオフラビン T を用いて蛍光測定を行った。異種タンパク質間相互作用に関する研究は、アミロイド線維を形成する GroES、リゾチーム、インシュリンを用いて α シヌクレインのアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べた。核として用いるアミロイド線維は超音波破碎を行った後、 α シヌクレイン溶液に一定量加えて (seeding) インキュベートした。次に視覚的に α シヌクレインと他のアミロイド形成タンパク質との相互作用を調べるために、Cy5 修飾した α シヌクレインに対して FITC ラベルして形成させた GroES とリゾチームのアミロイド線維を seed して蛍光顕微鏡観察を行った。さらに 10 nm 金コロイド (α シヌクレイン用) と 40 nm 金コロイド (GroES 用) が付加している二次抗体を用いて透過型電子顕微鏡においても観察を行い、1 本のアミロイド線維上での異種間のタンパク質相互作用を確認した。

結 果

α シヌクレインの分子は塩や金属を添加することにより、その濃度に依存して構造がコンパクトになることが明らかになった。さらに α シヌクレインのアミロイド線維形成は、分子のコンパクトさに依存することも明らかになった。次に、 α シヌクレイン溶液に α シヌクレインのアミロイド線維を seed すると (同種効果)、約 400 時間要したアミロイド線維形成がただちに起こり、大幅にアミロイド線維形成が促進された。この促進効果は典型的な seed 効果を示し、添加する量に対して大きな変化は見られなかった。それに対し、異種のアミロイド線維 (GroES、リゾチーム、インシュリン) を seed すると添加した量に依存して α シヌクレインのアミロイド線維形成が起こる時間が短縮されることが明らかになった。蛍光顕微鏡観察においては FITC 修飾したアミロイド線維 (α シヌクレイン、GroES、リゾチーム) を起点に Cy5 ラベルした α シヌクレインが伸長していることが明らかになった。異なる大きさの金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡観察においても一本の線維からそれぞれ大きさの金コロイドが結合した二次抗体が標識された。これらのことから α シヌクレインのアミロイド線維形成は、異種のアミロイド線維を加えることによって、 α シヌクレインがそれらを起点にアミロイド線維形成を起こしていることが明らかになった。このことは、 α シヌクレインは他のアミロイド線維に対しても相互作用してアミロイド線維を伸長していく適応能力を持つ性質を示している。

考 察

アミロイド線維はアルツハイマー病、プリオン病、ポリグルタミン病や他のアミロイドーシスに見られる共通の異常タンパク質凝集体である。本研究から得られた α シヌクレインのアミロイド線維形成における初期の構造変化から分子間の会合、アミロイド線維形成に至るまでの一連の反応は、他のアミロイド線維形成タンパク質の分子機構の解明に応用することが可能であることが示唆された。また、 α シヌクレインが主要構成成分である Lewy 小体には様々な種のタンパク

質が α シヌクレインと共に凝集している。 α シヌクレインと他のタンパク質との相互作用は、*in vivo*の実験系で報告されているが直接的な証拠は見つかっていない。今回の結果より、 α シヌクレインが他のタンパク質と直接相互作用していることが示された。本研究で用いたサンプルはそれぞれ異なる種（ヒト、大腸菌、ウシ、ニワトリ）のタンパク質を用いて研究を行った。得られた結果は、プリオン病感染でも指摘されている種の壁という常識を考え直す必要があることを示しており、新たなタンパク質感染症のメカニズムの1つとして考える必要があると思われた。さらに現在、様々な神経変性疾患同士の伝播性が議論されており、それに対しても我々の結果は重要な意味を持つ。

結 論

α シヌクレインのアミロイド線維形成に至るまでの形成メカニズムを明らかにした。さらに α シヌクレインは異種のアミロイド線維形成タンパク質と相互作用してアミロイド線維伸張を起こしうる特異的な性質を有することも明らかになった。このことから、様々な神経変性疾患同士における伝播の可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、ヒト由来パーキンソン病原因タンパク質である α シヌクレインを用いて、 α シヌクレインのアミロイド線維形成機構と異種アミロイド形成タンパク質が α シヌクレインのアミロイド線維形成過程に及ぼす影響について検討したものである。その結果、NaClを添加することにより、 Na^+ が α シヌクレインのC末端領域の負電荷を緩和し、 α シヌクレインの構造をコンパクトにすることが明らかになった。 α シヌクレインの構造のコンパクトさはNaClの添加量に依存し、アミロイド線維形成時間にも影響を及ぼした。あらかじめ形成した異種のアミロイド線維を α シヌクレイン溶液に添加すると、添加するアミロイド線維量に対してアミロイド線維形成時間が短縮された。顕微鏡観察においても、添加したアミロイド線維を起点に α シヌクレインのアミロイド線維が開始されていることが明らかになった。本論文の内容は、 α シヌクレインが異種のアミロイド線維と特異的に相互作用する性質を明らかにするとともに、様々な原因が考えられる神経変性疾患の発症機構の解明に貢献し、学術の水準を高めたものと認める。