

# 博士学位論文審査要旨

2021年2月2日

論文題目: Identification of Subcellular Compartments Containing Disseminated  $\alpha$ -Synuclein Seeds by Proteomic Analysis  
(プロテオミクス解析による伝播したアルファシヌクレインシードを有する細胞内構成物の同定)

学位申請者: 笠原 潤也

審査委員:

主査: 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査: 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

副査: 脳科学研究科 教授 元山 純

要 旨:

パーキンソン病は進行性の神経変性疾患の一種であり、振戦、無動、筋固縮などの運動障害が主症状としてあげられる。また、非運動障害として、鬱・不安・幻覚・妄想などの精神症状や物忘れなどの認知症症状を併発することがある。パーキンソン病の原因は、視床下核のドーパミン神経細胞の変性・脱落によるドーパミン神経回路の機能異常であるが、一方でパーキンソン病患者脳の病理所見として、脳の広範囲にわたる神経細胞内にレビー小体という円形の微細構造体が見られる。レビー小体は、アルファシヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) というタンパク質が形成する凝集体である。実際、 $\alpha$ -Syn の組換えタンパク質から試験管内で  $\alpha$ -Syn 凝集体を形成させ ( $\alpha$ -Syn 既形成原線維:  $\alpha$ -Syn-PFFs)、それをマウスの線条体に注入すると、脳の広範囲に  $\alpha$ -Syn の凝集体が伝播され、パーキンソン病様の症状を呈する。したがって、 $\alpha$ -Syn 凝集体の脳内伝播を抑制することができれば、パーキンソン病に伴う様々な神経障害の進行が緩和されることが期待できるが、 $\alpha$ -Syn 凝集体の脳内伝播のメカニズムは未だに不明である。

そこで、笠原氏は試験管内で形成させた  $\alpha$ -Syn-PFFs の脳内伝播機構を明らかにするために、 $\alpha$ -Syn-PFFs を高輝度の蛍光粒子 (Q-dot) で標識し、その脳内伝播の追跡を試みた。また、注入6時間後の脳組織の破碎物を蛍光活性化セルソーティング (FACS) に供し、Q-dot の蛍光を指標に  $\alpha$ -Syn-PFFs を含む細胞構造体を抽出した。この際、同側 (注入した側) と反対側 (注入してない側) の両側から抽出した構造体の組成を比較することにより、 $\alpha$ -Syn-PFFs の伝播に関わる因子の推定を行うこととした。得られた Q-dot 陽性構造体を、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法に供し、含まれるタンパク質を網羅的に同定した。得られた情報を基に、バイオインフォマティクスツールを用いたプロテオーム解析を行い、「注射側脳の  $\alpha$ -Syn-PFFs に豊富に存在するタンパク質」、「反対側脳の  $\alpha$ -Syn-PFFs に豊富に存在するタンパク質」、どちらにも属さない「共通タンパク質」の3群に分類し、各群にどのような構成物が多く含まれるかを解析した。その結果、注射側脳では小胞体 (ER) を構成するタンパク質が豊富に含まれていたのに対し、反対側ではシナプス小胞のエクソサイトosisに関わるシナプス構成タンパク質が豊富に含まれることが明らかとなった。これらのタンパク質から代表的なタンパク質について、免疫組織学的な解析を加えることにより、プロテオミクスのデータの信ぴょう性を評価した。

笠原氏は、本学位論文でパーキンソン病の一因となる  $\alpha$ -Syn 凝集体の脳内伝播に関与するタン

パク質群の全容を初めて明らかにしたと言える。今後、今回同定した個々のタンパク質の a-Syn 凝集体伝播における機能を詳細に明らかにすることで、a-Syn 凝集体の脳内伝播を安全かつ効率的に抑制し、パーキンソン病はじめレビー小体に起因する神経変性疾患の治療戦略に資する新たなターゲット分子の発見に繋がることが期待できる。本学位論文の骨子は、笠原氏を筆頭著者として *Neuroscience Research* 誌に発表された。

以上、本学位論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

## 総合試験結果の要旨

2021年2月2日

論文題目: Identification of Subcellular Compartments Containing Disseminated  $\alpha$ -Synuclein Seeds by Proteomic Analysis  
(プロテオミクス解析による伝播したアルファシヌクレインシードを有する細胞内構成物の同定)

学位申請者: 笠原 潤也

審査委員:

主査: 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査: 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

副査: 脳科学研究科 教授 元山 純

要 旨:

博士論文提出者は、2018年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に転入し、現在、在籍中である。病態脳科学分野・認知記憶加齢部門に属し、パーキンソン病の病態形成に関与するアルファシヌクレイン凝集体の脳内伝播機構を明らかにする研究を行った。本研究を通じ、パーキンソン病モデルマウスの創出、伝播した凝集タンパク質の精製と質量分析機による伝播経路に関わるタンパク質の同定、バイオインフォマティクスによるプロテオーム解析など、病態脳科学分野で用いられる近代的な研究手法とその原理を広く習得した。本博士論文の骨子となる研究内容は、2020年12月に日本神経科学学会誌 *Neuroscience Research* 誌に筆頭著者として刊行された。

2021年1月27日午後4時半より約1時間30分、提出論文に関する審査会を Zoom にて行い、提出者による英語でのプレゼンテーションと質疑応答を行った。プレゼンテーションでは、研究の背景、目的、方法、結果、結論、考察が過不足なく適切に説明され、国際的に活躍するための語学力(英語)を有していることが認められた。プレゼンテーション後の質疑応答においても的確に回答がなされたと評価できる。

更に、2021年2月1日午前11時から約1時間強、主査1名副査2名により論文内容並びに関連する脳科学分野の諸問題について非公開の口頭試問を実施した結果、本論文提出者は当該分野の研究者として十分な知識と、ディベート能力を有していることが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

# 博士学位論文要旨

論文題目： Identification of Subcellular Compartments Containing Disseminated  $\alpha$ -Synuclein Seeds by Proteomic Analysis

(プロテオミクス解析による伝播したアルファシヌクレインシードを有する細胞内構成物の同定)

氏名： 笠原 潤也

要旨：

パーキンソン病は進行性の神経変性疾患の一種であり、症状として振戦、無動、筋固縮がみられる。パーキンソン病患者の脳内では症状の進行に伴い、神経細胞に存在するアルファシヌクレイン ( $\alpha$ -シヌクレイン) タンパク質の異常構造化・自己凝集が促進し、 $\alpha$ -シヌクレイン凝集体 (レビー小体) がみられる。このことから、 $\alpha$ -シヌクレインはパーキンソン病の病因として考えられている。このような  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体形成や脳内動態を解析するため、*in vitro* で作成した  $\alpha$ -シヌクレイン既形成原線維 (Pre-formed Fibrils: PFFs) を線条体に注射したマウスや細胞を用いた手法が広く用いられている。

先行研究より、マウス脳線条体に注射したマウス  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs は神経回路を介して脳の広範囲を移動 (伝播) し、内在性  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体の形成やマウスの行動異常を引き起こすこと (Luk et al. 2012)、マウス由来初代神経細胞においてヒト  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs は順行性・逆行性両方向に移動し、細胞内で内在性  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体を引き起こすことが示されてきた (Volpicelli-Daley et al. 2011)。これらの報告から  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs は  $\alpha$ -シヌクレイン病態を促進する  $\alpha$  シヌクレインシードとして機能することが示されてきた。

当研究室では以前に  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs の脳内伝播を評価するため、マウス脳線条体にヒト  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs を注射し検討を行った (Okuzumi et al. 2018)。その結果、ヒト  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs は注射後一日以内に脳梁を介して注射側脳からその反対側脳へ伝播し、反対側脳において  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体形成を引き起こすことが明らかになった。このことからヒト  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs は *in vivo* において短期間のうちに脳梁を介して注射側脳からその反対側脳へ伝播することが示された。しかしながら、生体脳内を移動する微量な  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs を解析することは困難であり、そもそも  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs がどのような細胞内局在を経て脳内を伝播するのか未解明であった。そこで私は高い輝度と安定性をもつ量子ドット (QD) で蛍光標識したヒト  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs (QD-a-syn PFFs) を用いて、脳内を伝播する  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs の詳細な細胞内局在を検討した。特に注射側脳では細胞内に取り込まれた、もしくは取り込まれなかった  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs、反対側脳では伝播した  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs が豊富に存在すると予想し、各側の脳について検討を行った。

初めに QD-a-syn PFFs が細胞のどのような画分に存在するのかを細胞分画法により検討した。QD-a-syn PFFs をマウス脳線条体に注射し、6 時間後に脳を摘出した。注射側脳と反対側脳を別々に分け破碎し破碎液 (ホモジネート) を得たのち、ホモジネートを遠心することでプレシナプスとポストシナプスが結合したシナプトソームを含むペレット (P2 画分) とその上清 (S2 画分) を得た。各画分をスライドガラスにスポットし蛍光顕微鏡により確認した結果、QD-a-syn PFFs 数は両側において S2 画分よりも P2 画分に有意に多く存在した。なおウェスタンブロッティングによりシナプスマーカーのタンパク質量を確認したが、両側共に S2 画分よりも P2 画分に局在していた。

次にセルソーターにより P2 画分から QD 陽性粒子の分取を行った。その結果、QD の蛍光強度

をもつ粒子の分取に成功した。蛍光顕微鏡による分取前・分取後のホモジネートの観察においても、QD-a-syn PFFs が濃縮されたことを確認した。

続いて QD 陽性粒子がどのような細胞内構成物なのかを確かめるため、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS 法) によるタンパク質の同定、ならびにバイオインフォマテイクスツールによるプロテオーム解析を行った。各側の脳から同定されたタンパク質の存在量比をとり、「注射側脳に豊富に存在したタンパク質」、「反対側脳に豊富に存在したタンパク質」、またはそれらの群に属さない「共通タンパク質」の 3 群に分類し、各群にどのような細胞構成物が含まれるのか解析を行った。その結果、注射側脳では小胞体 (ER) を構成するタンパク質が豊富に含まれていたのに対し、反対側脳ではシナプスを構成するタンパク質が豊富に含まれていたことが判明した。続いてタンパク質の機能を解析した結果、反対側脳では神経伝達物質放出に関与するタンパク質や小胞輸送に関するタンパク質群が存在するのに対し、注射側脳では翻訳に関与するタンパク質が含まれていることが明らかとなった。

プロテオーム解析で得た結果を検証するため、免疫染色法により細胞小器官のマーカータンパク質と QD-a-syn PFFs の共局在を確認した。その結果、シナプスマーカータンパク質は同側よりも反対側脳で有意に QD-a-syn PFFs と共局在しており、対して ER マーカータンパク質は反対側よりも同側で有意に共局在していた。これらの結果はプロテオーム解析の結果と相関しており、さらに電子顕微鏡による観察からも P2 画分のホモジネート中に ER やシナプトソームが存在することを確認した。以上の結果から注射側脳で取り込まれた QD-a-syn PFFs は ER に主に局在し、反対側脳へ伝播した QD-a-syn PFFs はシナプスに局在することが示された。

本研究は初めて短期間に脳内を伝播した  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs の細胞内局在を明らかにし、さらに  $\alpha$ -シヌクレインの伝播に関与する候補タンパク質を示した。研究結果より、a-syn PFFs は細胞内へ取り込まれた後 ER を介して反対側へ伝播すること、そして伝播した  $\alpha$ -シヌクレインは神経細胞のシナプスを介して伝播することが示唆された。しかしながら、当研究では  $\alpha$ -シヌクレイン PFFs と候補タンパク質のタンパク質間相互作用について検討できていない。本研究で得た結果を踏まえ、個々の候補タンパク質についてさらなる検討を行うことで  $\alpha$ -シヌクレインシードの伝播を制御するタンパク質が同定できることが期待される。