

磷酸化特异性抗 α -synuclein (突触核蛋白) 抗体所揭示的关于帕金森氏症及其相关疾病的新神经病理学

东京大学研究生院药理学系研究科临床药理学教研室

岩坪 威

在神经变性疾病中, 神经元按照一定的组合脱落, 同时在残留神经元的内外会形成特征性纤维高聚物。其形态及构成蛋白质虽然根据疾病的类型而定, 但是越来越多的报告表明, 特别是在遗传性疾病中, 病因基因的产物蛋白质会发生凝集、沉积的现象。例如CAG重复疾病的多聚谷氨酸酰胺链、家族性阿尔茨海默病的 β 淀粉状蛋白等。这种现象会导致变异及蛋白质构像异常, 从而会使沉积起来的蛋白质获得毒

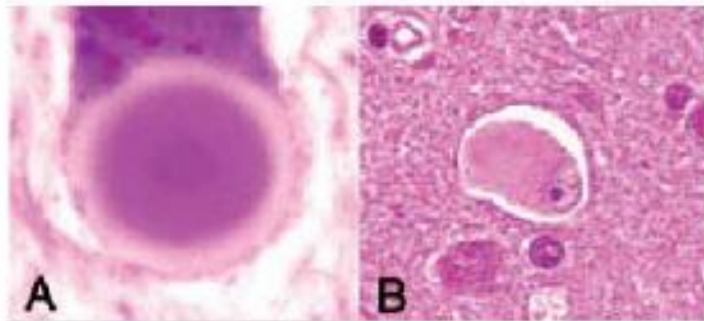


图1. 脑干型LB (A) 及皮质型LB (B) 的hematoxylin-eosin (HE) 染色成像

性或者在一些散发性病例中由于类似的变化而产生并沉积野生型蛋白质, 最终导致神经细胞的死亡。现在, 对于这种现象的关注与日俱增为了了解变性疾病的原因, 通常会采取一种 “body chemistry”

(人体化学) 的方法对 “封入体”

(即脑内不溶性高聚物) 进行提取及生化分析。在这一方面, 井原等人通过对阿尔茨海默病神经元纤维变化成分进行提取以及构成成份TAU蛋白的鉴定分析, 取得了迄今为止日本国内的最好结果¹⁾。

除了阿尔茨海默病 (AD) 之外, 以震颤、僵直、动作缓慢等运动障碍为症状的帕金森氏病 (PD) 也是一种成人神经变性疾病 (common disease)。另外, 路易体痴呆症 (Lewy body dementia, DLB)²⁾ 也是继AD之后的一种多发性变性痴呆症。这种疾病的主要症状包括视觉性幻觉及变化较大的痴呆、精神症状, 并且伴有PD及AD的病理学特征。在上述两种疾病中, 均可以在神经细胞中看到被称为 “Lewy小体” (LB) 的封入体。相关文献表明, 在PD患者中, LB主要多发于大脑的黑质、蓝斑核以及迷走神经背核等脑干神经细胞。

这种呈典型分布的脑干型LB经HE染色后, 在光学显微镜下呈现为红色的同心圆状核 (core) 以及周围明亮的晕圈 (halo)。即使是神经病理学的初学者, 也可以很容易地鉴别这种结构 (图1A)。在电子显微镜

下, 可以看到在周围存在直径小于10nm呈放射状排列的纤维结构、颗粒状物质以及膜状结构, 而中心部的致密程度远高于这些结构。在DLB患者的大脑皮质、带状回、海马回、岛回等边缘系皮质会出现形态各异的LB, 可称为皮质型LB。与脑干型LB不同的是, 皮质型LB不能形成core, 而halo也不明显 (见图1B)。虽然熟练的医生可以通过HE染色识别皮质型LB, 但皮质型LB比脑干型LB更不容易识别。在电子显微镜下, 皮质型LB的中心部较疏松, 而且纤维结构也不规则。在免疫组织化学方面, 脑干型与皮质型没有很大的差别, 其原因在于两者的构成成份极为相似。

相比于神经元纤维的变化数量, LB的数量极少, 因此很少有人会采用生化提取的方法对其进行研究, 其构成成份也主要根据免疫组织化学实验的结果而加以鉴定。最初, 有研究者认为神经微丝是LB的主要成份。但是由于皮质型LB的阳性率很低, 因此人们对于神经微丝是否是LB的主要成份产生了怀疑。随后, 1988年葛原等人以及前些年森、井原等人通过确定神经原质纤维变化, 发现在LB中存在高度染

色的泛素。自此以后, 泛素成为LB最有效

的生化标志并且得到了广泛应用。众所周知, 2004年诺贝尔化学奖就是与泛素有关。泛素是一种可以通过蛋白质降解体导致蛋白质发生降解的 “修饰蛋白质”。然而,

构成LB纤维结构的不溶性蛋白质的成份, 则一直是一个不解之谜。由于笔者对LB的构成成份具有浓厚的兴趣, 因此从DLB大脑皮质出发, 对直径10微米左右的球状LB中所包含的泛素等已知成份进行了免疫荧光染色, 并且确立了基于细胞分选器的离析、提取方法⁴⁾。考虑到成份的难溶性、多样性以及LB的致密结构, 我们认为对于LB直接进行蛋白化学分析是相当困难的。因此, 我们模仿神经元纤维变化的先例, 以提取的LB作为抗原, 制作了单克隆抗体, 然后采取了免疫化学方法

(immunochemical approach) 来鉴定可以在脑可溶区域中识别LB染色阳性抗体的抗原。每进行一组免疫实验, 需要进行上百次蔗糖密度梯度离心及细胞分类分离操作, 因此研究工作极为艰辛。然而, 马场美南等人并没有退却。经过努力, 终于得到了一个单克隆抗体系——LB509。该抗体可以识别脑可溶区域中的约15kDa蛋白质。在此研究的进行过程中, Polymeropoulos等人于1997年发现了可导致常染色体显性遗传的家族性PD家系中一个A53T氨基酸置换的 α -synuclein (突触

核蛋白) 变异⁵⁾, 因此我们断定LB509所识别

的LB中的抗原是 α -synuclein⁶⁾。在此之后, 陆续发现了其它家族性PD家系的A30P、E46K等氨基酸置换。而在最近, 还确认了无变异野生型基因的复制

我们认为神经细胞变性的机制在于： α -synuclein 蛋白质在 *invitro* 条件下可以沉积成纤维状结构，该过程由于家族性 PD 变异而被加速⁸⁾，该蛋白质在散发性 PD 及 DLB 由于某种原因导致发生构象异常，并且在神经细胞内逐渐沉积，最终导致细胞死亡。神经变性脑中沉积的病因蛋白质如果受到了特殊的翻译后修饰，则此类修饰可能是沉积的原因或者成为特异性标志。在确定了 LB 的主要成份是 α -synuclein 以后，长谷川成人先生开始指导我们实验室的 α -synuclein 研究活动。在他的指导下，我们改变了提取的基本方针，并且采用纯生化学方法对于脑中沉积的 α -synuclein 进行了分析。正常的 α -synuclein 可以被回收

到 Tris 缓冲液的可溶区域，而 DLB 脑中沉积的不溶性 α -synuclein 则被回收至 8M 尿素可溶区域。然而，不溶性 α -synuclein 的表观电泳度与正常 α -synuclein 没有任何区别，而且通过蛋白质印迹也不能判断是否存在翻译后修饰(图 2A)。针对这种现象，负责此项分析工作的藤原英雄先生使用溴化氰切断了从 DLB 脑中提取出来的不溶性 α -synuclein，然后对分离、提取的断片进行了质量分析。结果发现，由 C 末端 13 氨基酸构成的 α -synuclein 的断片的质量数比正常值高出 80 (相当于一个磷酸的质量数)

(图 2B)。通过串联质谱分析以及磷酸化部位特异性抗体分析，我们发现这种修饰

实际上是第 129 个丝氨酸残基的磷酸化⁹⁾。在正常玄鼠脑中也会发生 α -synuclein 的磷酸化，但是其程度只是几个百分点。但是在 PD、DLB 等 synucleinopathy 患者脑中的 α -synuclein 磷酸化则相当高。即使在患者死后，其脑中的 α -synuclein 磷酸化仍可达到 90% 以上。因此，可以认为在 α -synuclein 沉积时，由于某种原因导致了 Ser129 特异性的高度磷酸化。根据 *in vitro* 实验的结果，我们认为导致此部位发生磷酸化的激酶可能是酪蛋白激酶 1,2 或者 G 蛋白耦联受体激酶 (GRK)。在变性疾病的积累蛋白质过度磷酸化中，最广为人知同时也最受瞩目的是阿尔茨海默病 (AD) 以及 Tau 疾病

(Tauopathy) 中的 Tau 蛋白过度磷酸化。但是，导致 α -synuclein 磷酸化的却是与 GSK3 β 等牛磺酸氧化酶截然不同的激酶。两种酶导致产生不同的高聚物(见图 3F)，这一点具有进一步探讨的价值。由于磷酸化与高聚物的形成之间的关系还没有一个最终的结论，因此不能单纯地将 PD 或 AD 的症状归结为“过度磷酸化症状”。然而，由于磷酸化 α -synuclein 特异性抗体与正常 α -synuclein 不发生反应，但是可以极为敏感地识别沉积的 α -synuclein，因此，这种抗体可以为 α -synuclein 沉积的神经病理学研究带来新的进展。

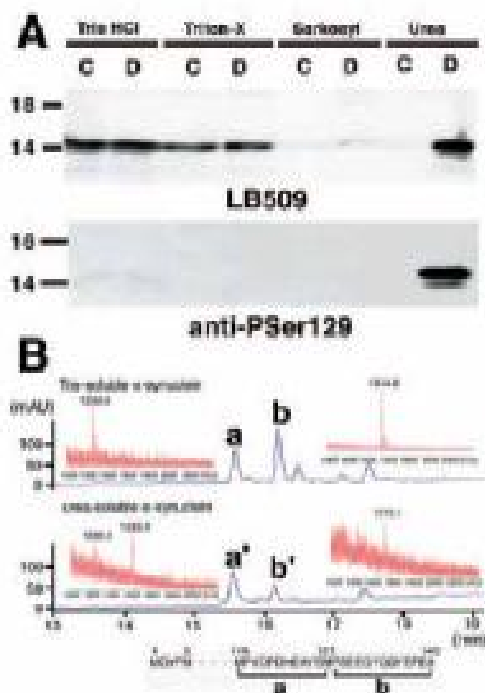


图2. 磷酸化 α -synuclein 的生化分析

- A. 对于从 DLB 脑 (D) 及对照组脑 (C) 中分阶段提取出来的 α -synuclein 所进行的蛋白质印迹分析。正常的 α -synuclein 分布在 Tris、Triton-X 的可溶区域，但是 DLB 脑中沉积的不溶性 α -synuclein 则被回收至尿素可溶区域 (上图。抗人类 α -synuclein 抗体 LB509)。磷酸化 Ser129 特异性抗体与正常 α -synuclein 不发生反应，但是可以与 DLB 脑中沉积的 α -synuclein 发生特异性反应 (下图)。
- B. 使用溴化氰切断正常 α -synuclein (上图) 与 DLB 脑中不溶性 α -synuclein (下图) 后，使用逆相高性能液相色谱法分离、提取 C 末端的两个肽链 (a 与 b)，然后使用 MALDI-TOF-MS 进行分析。可以看到由于 DLB 特异性峰值 a' 所导致的信号 (质量数 约为 80)。

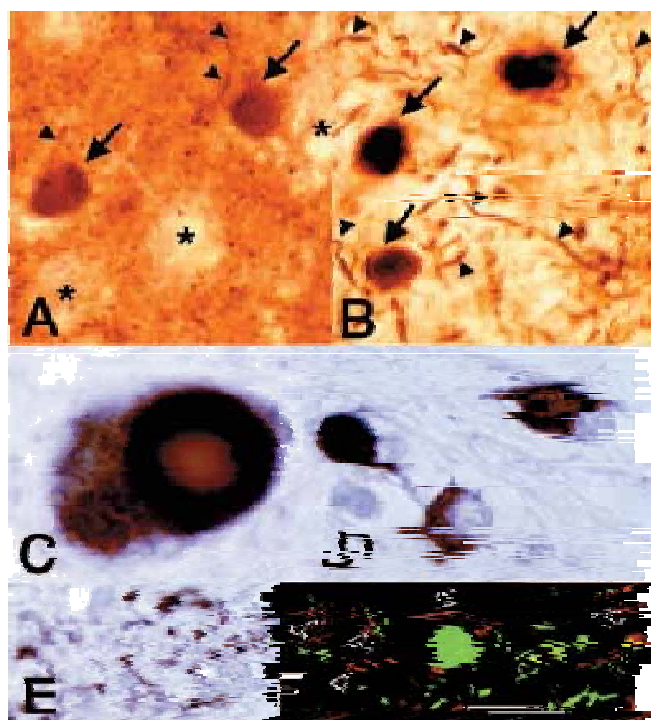


图 3. 磷酸化抗 α -synuclein 抗体在 synucleinopathy 患者脑部的免疫组织化学作用

- A. 磷酸化非依存性抗体 LB509 可以染色 LB (箭头标志)、Lewy neurite (箭头) 以及在神经纤维网上呈细颗粒状分布的正常 α -synuclein (*不能染色神经细胞体)。B. Ser129 磷酸化 α -synuclein 特异性抗体虽然可以高度染色 LB (箭头标志以及 Lewy neurite (箭头) 但是神经纤维网正常的 α -synuclein 却表现出阴性。脑干型 LB (C) 多系统萎缩症的 GCI (D) 以及 Hallervorden-Spatz 综合症的 dystrophic neurite (E) 也对于磷酸化 α -synuclein 表现出阳性。F: DLB 大脑皮质的抗 Ser129 磷酸化 α -synuclein 抗体 (绿色) 与抗磷酸化 Tau 抗体 (红色) 的双重荧光染色像。磷酸化 α -synuclein 以 LB (中央) 及 Lewy neurite 等形态大量沉积 (以绿色描出)。与此相对比的是, 可在 AD 脑中看到 neurofil threads (箭头, 以红

在确定了 α -synuclein 是 LB 的构成成份之后, 众多的研究报告均表明在各种神经变性疾病的脑病变中, α -synuclein 呈现出阳性反应。这些疾病被统称为

“synucleinopathy” (α -synuclein 沉积病)。虽然可以使用一般的 α -synuclein 抗体识别这些病变, 但是由于 α -synuclein 是一种在脑内大量存在的蛋白质, 因此使用一般的 α -synuclein 抗体时, 神经纤维网正常的 α -synuclein 会被高度染色, 从而会掩盖

特异性抗体进行染色时 (特别是对于 DLB 脑), 可以清楚地识别细胞内的 LB 以及神经纤维网上存在的 α -synuclein 阳性变性神经突起 (图 3B)。这些神经突起被称为

“Lewy neurite” 或 “Lewy thread/dot” 等。在以前, 通过使用泛素或磷酸化非依存型 α -synuclein 抗体, 我们已经知道在海马 CA2/3 区域存在此类突起。但是在使用磷酸化 α -synuclein 抗体后, 首次发现在大脑皮质也广泛存在此类突起。除

神经胶细胞质内的包含体 (GCI, glial cytoplasmic inclusion) (出现在少突神经胶质细胞, 为散发性脊髓小脑变性的代表性疾病——多系统萎缩症 (MSA, multiple system atrophy) 的典型特征 (图 3D) 以及 Hallervorden-Spatz 病 (症状为幼年期痴呆、锥体外系功能障碍等的变性神经突起图

3E) 等均表现出 α -synuclein 阳性反应, 因此可以认为抗磷酸化 α -synuclein 抗体是 synucleinopathy 病变的最有效标志这与磷酸化 Tau 特异性抗体 (例由长谷川等人确立、和光纯药开发并销售的 pSer422¹⁰⁾ 是神经纤维病理学 <neurofibrillary pathology> 最灵敏的“指针”) 的情况极为相似 (图

当初我们制作抗体时, 是以中央部拥有磷酸化 Ser129 的合成肽链作为免疫原, 然后使用重组 α -synuclein 蛋白质吸收磷酸化非依存型抗体成份, 最后从渗滤液 (flow through) 中提取抗体。使用这种方法的抗体生产量十分有限。后来, 川岛晶子、长谷川等人使用同种抗原, 得到了与 affinity 精制抗体具有同等选择性及敏感度的鼠单克隆抗体 pSer129#64¹¹⁾。这种抗体对于病理材料在 synucleinopathy 免疫化学及免疫组织化学方面的优点, 已经由齐藤、村山等人¹¹⁾加以证明 (参照第5页图)。

最近, 我们认为在 synucleinopathy 病患者的脑内沉积的 α -synuclein 不仅发生了磷酸化同时也有可能发生了单泛素化¹³⁾。明确神经变性中的此类翻译后修饰的机制

以及 α -synuclein 沉积的意义, 直接关系到对于 PD 等 synucleinopathy 疾病的早期诊断以及完全治疗, 而作为 α -synuclein 有效标志的磷酸化 α -synuclein 抗体一定会在相关研究中发挥重要的作用。

(参考文献)

- 1) Nukina, N., Ihara, Y.: "One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein".,

2) McKeith, I.G., Galasko, D., Kosaka, K., Perry, E.K., Dickson, D.W., Hansen, L.A., Salmon, D.P., Lowe, J., Mirra, S.S., Byrne, E.J., Lennox, G., Quinn, N.P., Edwardson, J.A., Ince, P.G., Bergeron, C., Burns, A., Miller, B.L., Lovestone, S., Collerton, D., Jansen, E.N., Ballard, C., de Vos, R.A., Wilcock, G.K., Jellinger, K.A., Perry, R.H.: "Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium or DLB international workshop", *Neurology*, 47, 1113-1124 (1996).

3) Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M., Ihara, Y.: "Lewy bodies are ubiquitinated: a light and electron microscopic immunocytochemical study", *Acta Neuropathol.*, 75, 345-353 (1988).

4) Iwatsubo, T., Yamaguchi, H., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Ihara, Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y.: "Purification of phosphorylated α -synuclein from Parkinson's disease brain", *Neurosci. Lett.*, 276, 2045-2047 (1997).

5) Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L.: "Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease", *Science*, 276, 2045-2047 (1997).

6) Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Iwatsubo, T.: "Aggregation of α -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies", *Am. J. Pathol.*, 152, 879-884 (1998).

7) Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muentert, M., Baptista, M., Goldberg, M.S., Lansbury, P.T. Jr.: "Is there a cause-and-effect relationship between α -synuclein fibrillization and Parkinson's disease?", *Nat. Cell Biol.*, 2, E115-119 (2000).

8) Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., Iwatsubo T.: " α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions.", *Nature Cell Biol.*, 4, 160-164 (2002).

9) Hasegawa, M., Fujiwara, H., Nonaka, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M.A., Iwatsubo, T.: "Phosphorylated α -synuclein is ubiquitinated in α -synucleinopathy lesions.", *J. Biol. Chem.*, 277, 49071-49076 (2002).

10) Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N.N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., Arai, T., Nagura, H.,

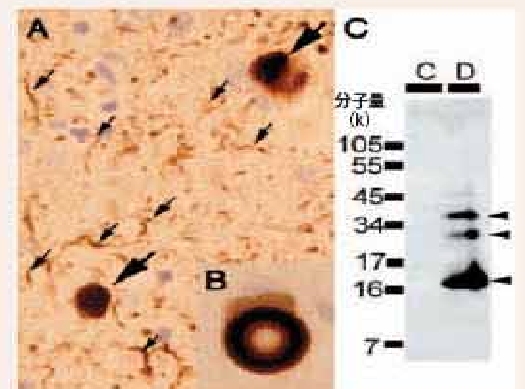
Products

抗磷酸化 α -突触核蛋白抗体对于帕金森氏病等疾病研究的意义

在帕金森氏病、Lewy小体痴呆症 (DLB) 等神经疾病中特异性出现的Lewy小体含有在丝氨酸129残基受到特异性磷酸化的 α -突触核蛋白。由于本品不会与正常的 α -突触核蛋白发生反应，但是可以识别沉积的磷酸化 α -突触核蛋白，因此可用于Lewy小体相关疾病的免疫组织化学及生物化学研究。

克隆No.: pSyn#64

亚类: 小鼠IgG₁ 特异性: 与丝氨酸129残基受到特异性磷酸化的 α -突触核蛋白发生特异性反应。与正常 α -突触核蛋白不发生反应。实用稀释倍率: 1:1,000~1:10,000 (蛋白质印迹、免疫组织染色)



(参考文献)

1) Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, S. M., Shen, J., Takio, K. and Iwatsubo, T. *Nature Cell Biol.* 4, 160 (2002).

2) Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N. N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., Arai, T., Nagura, H., Yamanouchi, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T. and Murayama, S. : *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62,

A: DLB 侧头叶皮质。除了皮质形 LB (大箭头) 之外, 无数的丝状异常纤维 (Lewy neurite, 小箭头) 也被染色。B: 帕金森氏病中脑黑质的脑干型 LB。C: DLB 大脑皮质 (D) 与正常脑 (C) 的尿素可溶组份的 pSyn#64 蛋白质印迹。pSyn#64 只可以识别 DLB 脑中的磷酸化 α -突触核蛋白 (箭头)

编号	品名	规格	容量
014-20281	Anti Phosphorylated α -Synuclein, Monoclonal Antibody	免疫化学用	50微升