

ヒト α -synuclein (A30P+A53T) Tg マウスの進行性運動機能障害に対する
化学シャペロンである sodium 4-phenylbutyrate の治療効果の検討

小野 和彦

福岡大学薬学部 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

**A chemical chaperone, sodium 4-phenylbutyrate attenuates the pathogenic potency in human
 α -synuclein A30P+A53T transgenic mice**

Kazuhiko Ono

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku,
Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Aggregation and cytotoxicity of misfolded α -synuclein are postulated to be crucial in the disease processes of Parkinson's disease (PD) and other synucleinopathies. Mutations in the α -synuclein gene in some pedigrees of familial PD have been reported. The mutant α -synuclein has been reported to form fibrillar aggregates resulting in biochemical abnormalities that are responsible for the onset of familial PD. Thus, any agent which effectively prevents the development of misfolded and aggregated α -synuclein would be a disease-modifying therapeutic candidate. We examined the efficacy of sodium 4-phenylbutyrate (PBA), one of the chemical chaperons, in transgenic (Tg) mice overexpressing human α -synuclein containing a double mutation (A30P+A53T). To evaluate the therapeutic efficacy, bradykinesia and motor coordination were assessed using a pole test and a rotarod treadmill task, respectively. After PBA treatment, these motor deteriorations gradually improved. In immunohistochemical examinations, both a loss of tyrosine hydroxylase-positive neurons and an increase of phosphorylated α -synuclein in the substantia nigra were inhibited, resulting in no depletion of the striatal dopamine content. These data suggested that PBA might be one of the therapeutic reagents for neurodegenerative disorders.

Key Words: parkinson's disease, α -synuclein, chemical chaperone, 4-phenylbutyric acid

緒言

パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患であり、臨床的には、安静時振戦、筋強剛、寡動・無動、姿勢反射障害を主徴とする。病理学的には中脳黒質や青斑核におけるメラニン含有細胞の脱落がみられ、残存神経細胞内に細胞質内封入体である Lewy 小体が出現する。PD の原因は不明であるが、中脳黒質のドパミン神経細胞が緩徐進行性に変性・脱落することにより黒質線条体系が障害され、線条体におけるドパミンが減少し、錐体外路系の運動障害を生じると考えられている。現在のところ PD 治療は対症療法であり、病態を根本的に改善させる治療法の確立が望まれている。

PD の多くは孤発性に発症するが、一部に家族性に遺伝する。家族性 PD (FPD) において、現在までに 13 の遺伝子座または原因遺伝子が同定されている¹⁾。その中で、最初に同定されたのが α -synuclein 遺伝子であり、現在までに A53T、A30P、E46K の 3 つの変異が報告されている^{2,4)}。 α -synuclein タンパク (α -Syn) は主に脳シナプス前終末に豊富に存在し、140 のアミノ酸残基からなる分子量 16kDa の可溶性の高いタンパク質で、生理学的条件においては、伸張した状態で特別の構造をとらないが、Lewy 小体においては β シート構造の繰り返しからなる線維化した構造をとることが知られている⁵⁾。 α -Syn の生化学的特性の解析において、A53T または E46K 変異は、正常野生型に比べ線維化を促進する、A30P 変異は、数分子の α -Syn が凝集したオリゴマーの形成を促進することが示された⁴⁾。何らかの原因で α -Syn は線維化を起こし、 β シート重合体である protofibril を形成し、次いでアミロイド様沈着物を形成し、最終的に Lewy 小体が形成されると考えられている。FPD だけでなく孤発性 PD においても、 α -Syn は Lewy 小体の主要構成成分であることが明らかにされたこと、PD 以外のシヌクレイノパチー (α -Syn 蓄積症) 疾患群においても、 α -Syn が蓄積していることから、 α -Syn はこれら疾患群の共通カスケードの一端を担っている可能性がある⁶⁾。現在、 α -Syn が凝集し、蓄積して Lewy 小体を形成する過程が PD の発症プロセスであるとの考えが支持されていることから、 α -Syn のミスフォールディングや凝集を防ぎ、また α -Syn の凝集の分解代謝を促進させることが PD およびその他シヌクレイノパチーの治療につながると考えられる。そこで、われわれはその候補物質として、化学シャペロンである sodium 4-phenylbutyrate (PBA) に着目した。PBA は経口投与が可能な短鎖脂肪酸で、尿素サイクル異常症、地中海貧血症、各種がんなどにおいて臨床応用されている^{7,9)}。また、PBA はいくつかの疾患モデルマウスにおいて神経細胞保護作用があること^{10,11)}、さらに PBA は、様々な疾患におけるタンパク質の mislocalization や凝集を防ぐこと、小胞体ストレスを抑制することが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。今回、ヒト Thy-1 プロモーターによってコントロールされ、PD と類似した病態を示すことが報告されている、変異ヒト α -synuclein (A30P+A53T) トランスジェニック (Tg) マウス¹⁵⁾を用いて、PBA の治療効果について検討した。

1. 無細胞転写翻訳系を用いた PBA の凝集抑制効果の検討

まず、当研究室において確立している無細胞転写翻訳系を用いた *in vitro* の MxA タンパク凝集系にて、PBA の凝集抑制効果について検討した。MxA タンパクは、インターフェロンによって産生誘導される GTP加水分解酵素で、抗ウイルス作用を持ち、分子構造上の特徴から強発現下では、分子内、分子間結合により多量体を形成しやすく、細胞質内封入体として不溶性凝集タンパクとなりやすい^{16,17)}。この MxA タンパク凝集系においてタンパクの高次構造形成に影響を与える因子を種々検索したところ、PBA が効率よく MxA タンパクの凝集を抑制することがわかった。無細胞転写翻訳系において MxA タンパクを発現させると、大部分は多量体を形成し、ショ糖密度勾配遠心法で重い分画 (数字が小さいほど重い分画を示す) 1 から 4 に回収されたが、PBA を添加すると MxA タンパクは、ほとんど単量体の分画 7 に回収されるようになった (Fig. 1)。また、他の化学シャペロンである TMAO に比べ PBA は低濃度で凝集抑制効果を示した (Fig. 1)。この MxA での結果や、これまでの PBA に関する様々な報告から PBA の化学シャペロンとしての基質特異性が低いことが考えられ¹⁰⁻¹⁴⁾、 α -Syn においても凝集抑制効果を示す可能性が示唆された。また、PBA は種々の疾患治療薬として応用されており安全性が高いことから、PBA を今回の治療薬物として用いることとした。

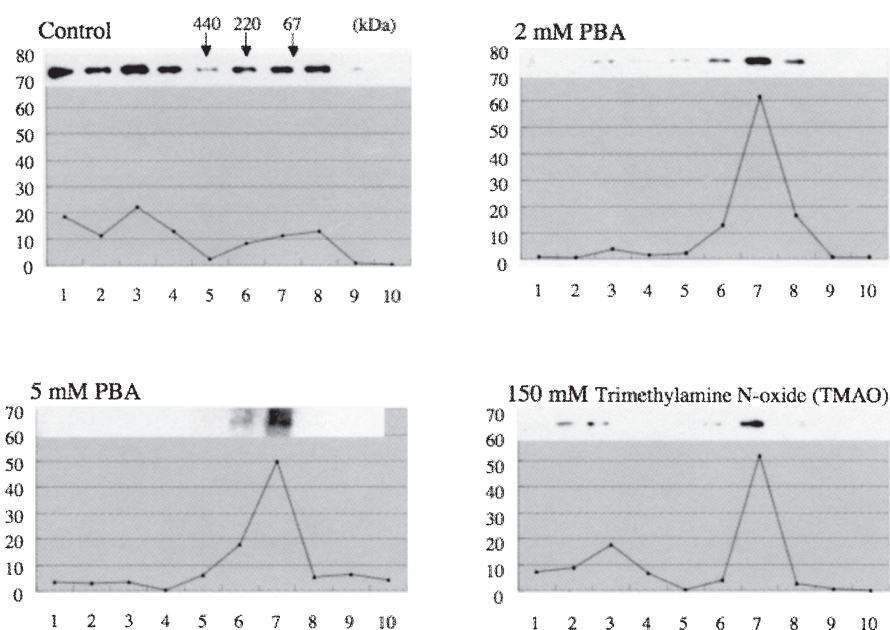


Fig.1. *in vitro* 無細胞転写翻訳系における PBA の MxA タンパク凝集抑制効果

2. BBB *in vitro* モデルを用いた PBA の BBB に対する透過性の検討

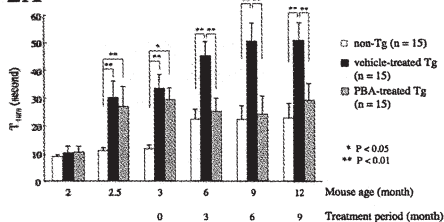
次に、PBA 治療実験を行う際に、PBA が Tg マウス脳実質内に移行するかを、*in vitro* 血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) モデル¹⁸⁾ を用い検討した。PBA の BBB 透過係数を算出したところ、PBA の透過係数は $162.91 \pm 21.02 \times 10^{-3}$ (cm/min) ($n = 4$ inserts) であり、sodium fluorescein (Na-F: コントロール) は $2.18 \pm 0.43 \times 10^{-3}$ (cm/min) ($n = 8$ inserts) であった。Na-F に比べて約 70 倍の透過性が示さ

れ、血中PBAはマウスの脳実質内に移行する可能性が示唆された。また、筋萎縮性側索硬化症やハンチントン病モデルマウスにおいて、PBA治療により神経細胞保護効果が示された^{10, 11)}ことから、PBAはマウス脳実質へ移行していることが考えられた。

3. PBA 治療効果の行動薬理的検討

PBA のタンパク凝集抑制効果が認められたこと、また、PBA がマウス脳実質へ移行する可能性が示唆されたことから、PBA による Tg マウスに対する治療実験を行った。マウスに対し、800 mg/kg の PBA を 7 日間連日、1 日 1 回経口投与し、3 週間休薬した。これを 1 クールとして、生後 3 ヶ月齢より開始し、生後 12 ヶ月齢まで続け、Tg の進行性運動機能障害に対する PBA の治療効果を行動薬理的に検討した。PBA の治療効果は 2 つの運動機能テスト (Pole test¹⁹⁾ (Fig. 2A) および Rotarod treadmill²⁰⁾ (Fig. 2B)) を用いて評価した。両テストにおいて、非治療 Tg 群は、PBA 治療開始時に認められた運動機能障害が月齢とともに増悪したが、PBA 治療 Tg 群では、その障害は著明な改善傾向を示した (Fig. 2A, B)。このことから PBA の間歇的経口投与にて、Tg マウスの進行性運動機能障害の著明な進行抑制と non Tg 群と同レベルへの回復が認められた。

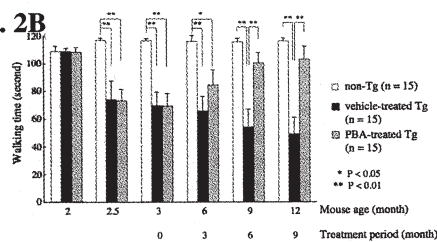
Fig. 2A



The means of data are presented with their standard errors.

Mouse age (month)	2	3	6	9	12
non-Tg	8.5 ± 0.5	11.6 ± 1.0	22.3 ± 2.4	22.2 ± 3.9	22.8 ± 5.2
vehicle-treated Tg	10.0 ± 2.1	33.2 ± 5.4	46.0 ± 5.2	50.3 ± 4.2	50.9 ± 4.1
PBA-treated Tg	10.4 ± 0.7	29.3 ± 5.0	25.0 ± 5.7	24.0 ± 5.4	27.9 ± 5.8
F value (2, 42)	0.43	7.26	7.76	11.86	8.59

Fig. 2B



The means of data are presented with their standard errors.

Mouse age (month)	2	3	6	9	12
non-Tg	108.4 ± 3.7	116.2 ± 3.8	115.6 ± 4.1	115.2 ± 2.5	115.9 ± 2.0
vehicle-treated Tg	108.5 ± 7.2	69.6 ± 10.5	65.4 ± 10.6	54.5 ± 12.7	48.8 ± 12.1
PBA-treated Tg	108.1 ± 3.2	69.2 ± 9.6	84.1 ± 11.1	100.4 ± 7.7	102.8 ± 9.3
F value (2, 42)	0.002	10.09	7.68	13.24	15.99

Fig. 2. Evaluation of the improvement of motor deterioration by PBA treatment. (A) The time required to make a complete downward turn (T_{turn}) was measured by the pole test. (B) Walking time (s) (retention time of walking on the treadmill) were measured by rotarod treadmill. Data are shown as mean \pm S.E.. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test.

4. ドパミン神経細胞に対する検討

次に、運動機能評価後の脳組織を用い、生化学的、組織化学的検索を行うことで PBA の治療効果の詳細を検討した。まず、ドパミン神経細胞に対する検討を行うために、黒質におけるドパミン生成の律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の検討 (抗 TH 抗体による免疫組織染色 (Fig. 3A) および Western blotting による黒質 TH 量の検討 (Fig. 3B, C)) を行い、続いて、線条体ドパミン量について検討 (HPLC 法による線条体ドパミン量の測定 (Fig. 3D)) を行った。抗 TH 抗体による免疫組織染色において、PBA 治療 Tg 群では非治療 Tg 群で認められた黒質領域の抗 TH 抗体による染色性の減弱は認められなかった (Fig. 3A)。12 ヶ月齢の PBA 治療 Tg 群 (n = 5) における TH 量は同月齢 non Tg 群 (n = 5) と同程度であったが、非治療 Tg 群 (n = 5) の TH 量は、non Tg 群に

比べ約30%減少した (Ratio (TH/ β -actin): non Tg = 1.02 ± 0.06 , vehicle-treated Tg = 0.67 ± 0.02 , PBA-treated Tg = 0.94 ± 0.03) (F (2, 12) = 18.89, vehicle-treated Tg mice vs non Tg mice and vehicle treated Tg mice vs PBA-treated Tg mice: $p < 0.01$ by Tukey-Kramer post-hoc test) (Fig. 2B, C)。また、12ヶ月齢のPBA治療Tg群 (n = 5) の線条体ドパミン量は、同月齢のnon Tg群 (n = 5) と同程度であったが、非治療Tg群 (n = 5) のドパミン量はnon Tg群に比べて約40%減少した (DA contents (pg/mg·brain tissue): non Tg = 2699.53 ± 151.69 , vehicle-treated Tg = 1641.60 ± 164.98 , PBA-treated Tg = 2626.35 ± 236.76) (F (2, 12) = 9.87, vehicle-treated Tg mice vs non Tg mice and vehicle treated Tg mice vs PBA-treated Tg mice: $p < 0.01$ by Tukey-Kramer post-hoc test) (Fig. 3D)。これらの結果より、PBAはTH陽性ドパミン神経細胞の減少を抑制し、線条体のドパミン量の減少に起因する運動機能障害を改善させたことが示唆された。

Fig. 3A

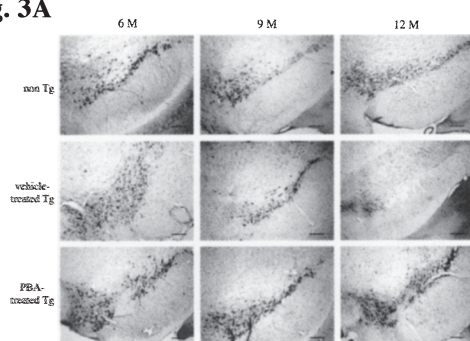


Fig. 3B

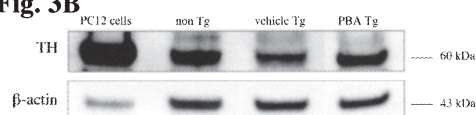


Fig. 3C

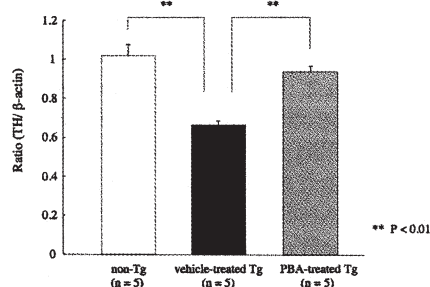


Fig. 3D

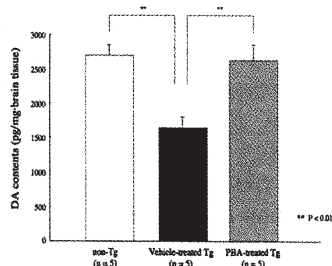


Fig. 3. (A) Immunohistochemical staining with anti-TH antibody. Non Tg mice are shown in the upper panels, vehicle-treated Tg mice are shown in the middle panels and PBA-treated Tg are shown in the lower panels. The 3 left panels show a 6 month-old, center 3 panels show a 9 month-old and the 3 right side panels show 12 month-old. (B) Quantitation of TH in 12 month-old mice brains by Western blotting analysis with anti-TH antibody. PC12 cells were used as a TH positive control. (C) The results of quantitative TH positive bands were detected using Western blotting. Data are shown as mean \pm S.E.. ** $p < 0.01$, by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test. Scale bar, 100 μ m. (D) The dopamine content in the striatum of 12 month-old mice brain by HPLC analysis. Data are shown as mean \pm S.E.. Statistical analysis between the non Tg, vehicle-treated Tg and PBA-treated Tg mice were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test (**: $p < 0.01$).

5. 脳内の変異 α -Syn の検討

次に、脳内変異 α -Syn を検討するために、抗ヒト α -Syn 抗体を用いた免疫組織染色を行った。PBA 治療 Tg 群と非治療 Tg 群との間に、抗 α -Syn 抗体による染色性に有意な差は認められなかった (positive staining area (pixels): non Tg = 29.7 ± 15.7 , vehicle-treated Tg = 2017.6 ± 405.7 , PBA-treated Tg = 2006.6 ± 552.8 , $F(2, 30) = 4.627$, No significant differences between PBA-treated and vehicle-treated Tg mice groups by Tukey-Kramer post-hoc test) (Fig. 4A, C)。この結果より、PBA 治療は変異 α -Syn の産生には影響しないことが示唆された。

最近シヌクレイノパチー病巣に選択的に広範囲に沈着している α -Syn がリン酸化していることが報告され^{21, 22}、 α -Syn のリン酸化と PD の病因との関連性が注目されている。そこで、PBA 治療が PD の発症に重要であると考えられる α -Syn のリン酸化に対してどのような影響を与えているかを検討した。抗リン酸化 α -Syn 抗体を用いた免疫組織染色を行い、抗リン酸化 α -Syn 抗体による染色強度を検討した結果、PBA 治療 Tg 群の染色性は非治療 Tg 群に比して著明に減弱していた (positive staining area (pixels): non Tg = 41.2 ± 12.9 , vehicle-treated Tg = 6022.4 ± 1391.0 , PBA-treated Tg = 411.2 ± 188.9) ($F(2, 16) = 19.79$, vehicle-treated Tg mice vs PBA-treated Tg mice: $p < 0.01$ by Tukey-Kramer post-hoc test) (Fig. 4B, D)。この結果より、PBA がリン酸化変異 α -Syn 量を著明に減少させたことが示唆された。共同研究者である池田博士らは、この Tg マウス脳内で、sarcosyl 不溶性の α -Syn がリン酸化していることを明らかにした¹⁵。この報告と今回の結果から、リン酸化した sarcosyl 不溶性、つまり凝集していると考えられる α -Syn を PBA は減少させたことが示唆された。また、PBA は化学シャペロンとして働き、分子シャペロンの誘導を引き起こすことなくミスフォールドタンパク質の蓄積を防ぐことで小胞体の機能を改善させているかもしれないとの報告¹³。変異 α -Syn は小胞体でのユビキチン-プロテオソーム系やシャペロン介在性オートファジー系の代謝を阻害するとの報告²³。さらに PBA はアンフォールドタンパク質の疎水性表面に結合することで、そのタンパク質の天然構造を安定化させるとの報告がある²⁴。これらの報告から今回の研究において PBA は、ミスフォールド α -Syn や凝集した α -Syn の蓄積を防いだ結果、小胞体のフォールディング能力を正常化させ、変異 α -Syn の運搬や代謝を促進させた可能性が考えられた。PBA が α -Syn の凝集や線維化を防ぐことができるかを詳細に検討するためには、今後さらなる研究が必要であるが、PBA は深刻な副作用がないことが知られていることから、経口投与による神経変性疾患に対して有効な治療薬として期待できる。

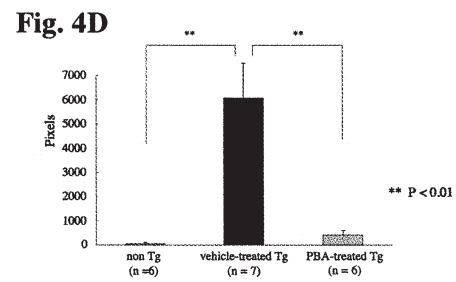
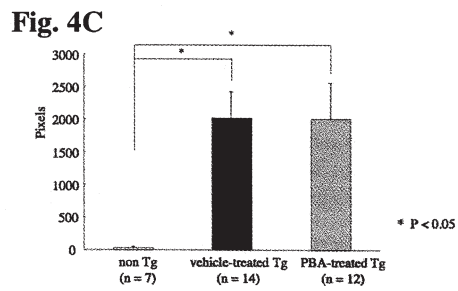
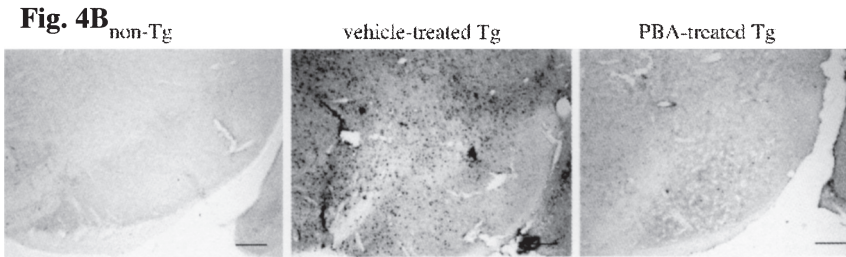
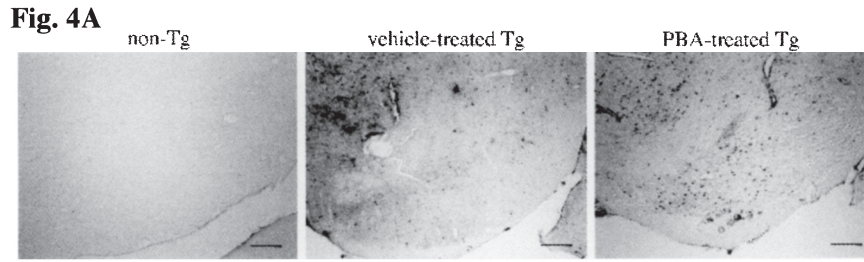


Fig. 4. Immunohistochemical staining in the brain tissue of 12 month-old mice with anti (A) α -syn and (B) phosphorylated α -syn antibody were evaluated. (C) and (D) indicate positive staining areas (pixels) of (A) or (B), respectively, which were measured by image analysis software (WinRoof). Data are shown as mean \pm S.E.. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test. Scale bar, 100 μ m.

結語

α -Synucleinタンパク (α -Syn) の凝集やミスフォールディングが引き起こす神経細胞障害性は、パーキンソン病 (PD) および他のシヌクレイノパチー発症において重要であると考えられている。 α -synuclein遺伝子変異は家族性PDの数家系で報告されており、変異 α -Synはミスフォールディングおよび凝集しやすい傾向がある。そのような状態の α -SynはPD発症の原因となると考えられており、 α -Synのミスフォールディングや凝集の進展を阻害するような薬物がPDに対する根本的な病態改善療法につながると考えられている。われわれは、その候補物質としてケミカルシャペロンであるsodium 4-phenylbutyrate (PBA) に着目し、PBAのヒト α -synuclein二重変異 (A30P+A53T) トランスジェニック (Tg) マウスに対する治療効果を検討した。治療効果を検討するために、bradykinesia (動作緩慢) およびmotor coordination (協調運動) をpole testおよびrotarod treadmill taskによりそれぞれ評価したところ、Tgマウスが呈する運動機能障害は、PBA治療にて著明に改善した。脳組織の検討にてPBA治療Tg群では、非治療Tg群で認められた黒質部位での抗TH抗体による染色性の低下、TH量の減少および線条体ドパミン量の減少が認められず、同月齢のnon Tg群と同レベルに維持された。また、PBA投与は α -Syn発現量に影響を与えず、リン酸化 α -Syn量の著明な減少を誘導したことが示唆された。PBAが異常構造タンパク質の疎水性表面に結合することで、異常構造タンパク質の凝集・蓄積を防ぐとの報告があることから、PBA治療により、 α -Synの凝集や蓄積が抑制されることで、神経細胞障害性が軽減され、線条体ドパミン量の減少に起因する運動機能障害が改善した可能性が考えられた。それらを明らかにするにはさらなるPBAの作用機序の詳細な検討が必要であるが、PBAの神経変性疾患治療薬としての有用性が示唆された。

参考文献

1. Mizuno Y, Hattori N, Kubo S, Sato S, Nishioka K, Hatano T, et al. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; 363(1500): 2215-27.
2. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-7.
3. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding a-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18(2): 106-8.
4. Greenbaum EA, Graves CL, Mishizen-Eberz AJ, Lupoli MA, Lynch DR, Englander SW, et al. The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J Biol Chem* 2005; 280(9): 7800-7.
5. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 57-87.
6. Iwatsubo T. Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2003; 250(Suppl 3): III11-4.

7. Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS. Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med* 1996; 335(12): 855-9.
8. Collins AF, Pearson HA, Giardina P, McDonagh KT, Brusilow SW, Dover GJ. Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. *Blood* 1995; 85(1): 43-9.
9. Carducci MA, Gilbert J, Bowling MK, Noe D, Eisenberger MA, Sinibaldi V, et al. A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule. *Clin Cancer Res* 2001; 7(10): 3047-55.
10. Gardian G, Browne SE, Choi DK, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, et al. Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem* 2005; 280(1): 556-63.
11. Ryu H, Smith K, Camelo SI, Carreras I, Lee J, Iglesias AH, et al. Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurochem* 2005; 93(5): 1087-98.
12. Burrows JA, Willis LK, Perlmutter DH. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(4): 1796-801.
13. Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, et al. Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 2006; 97(5): 1259-68.
14. Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagita T, Takata K, Kobayashi Y, et al. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J Neurochem* 2007; 101(6): 1491-1504.
15. Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Sasaki A, Matsubara E, Murakami T, et al. Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice with alpha-synuclein pathology. *Brain Res* 2009; 1250: 232-41.
16. Kochs G, Haener M, Aebi U, Haller O. Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem* 2002; 277(16): 14172-6.
17. Schumacher B, Staeheli P. Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273(43): 28365-70.
18. Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, et al. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β production. *Brain Res* 2005; 1038(2): 208-15.
19. Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, Ono T, Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985; 50(3): 435-41.

20. Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, et al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res* 2001; 118(1): 17-25.
21. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah EE, Goldberg MS, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002; 4(2): 160-4.
22. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, et al. Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem* 2002; 277(50): 49071-6.
23. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305(5688): 1292-5.
24. Papp E, Csermely P. Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use. *Hndb Exp Pharmacol* 2006; (172): 405-16.