

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」

平成 19 年度採択研究代表者

高橋 良輔

京都大学大学院医学研究科・教授

パーキンソン病遺伝子ネットワーク解明と新規治療戦略

1. 研究実施の概要

パーキンソン病の複合病態を解明し、新規治療手段を開発するためには多面的なアプローチが必要である。特に、神経保護治療法の鍵となる小胞体ストレス応答機構は機能的に重複する複数の経路があり、その解明には迅速かつ高効率の遺伝学的解析系が必要である。この目的のために、武田グループが開発したメダカを用いた多重遺伝子破壊システムとリソースをチーム内で共有する共同研究体制を構築することを初年度の最重点課題とした。これにより、森グループは小胞体ストレス応答を制御する3つの経路(IRE1、PERK、ATF6)の責任分子のうち、ATF6とPERKを欠損するメダカ系統の樹立に成功した。高橋グループは、家族性パーキンソン病の病因遺伝子である Parkin と PINK1 の欠損メダカ系統を樹立し、形態学および行動解析を進めている。一方、生化学やマウス遺伝学を用いたオーソドックスなアプローチにより、他の病因遺伝子産物 PINK1、ATP13A2、 α -シヌクレインやこれらの関連分子群についても重要な知見が得られつつある(高橋・服部・木下グループ)。小胞体ストレス制御化合物の探索を担当する小川グループは既に4つの候補を得た。この内2つはマウスのパーキンソン病モデル(MPTP 及び 6-OHDA)において神経保護作用を有する。並行して α -synuclein 発現用アデノウイルスベクターや α -synuclein 過剰発現細胞株の作製など、新たな疾患モデル構築の準備も進めている。今後はこれらのリソースや情報を積極的に交換してチームの研究を加速し、目標達成を目指す。

2. 研究実施内容

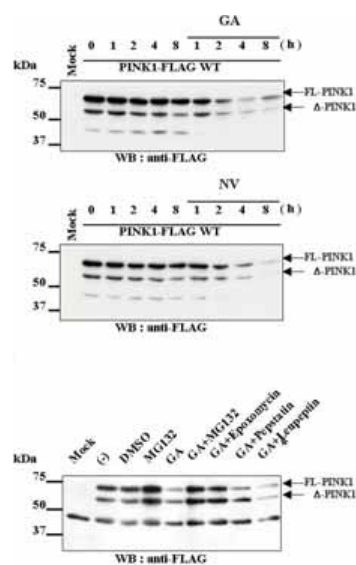
(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

A. 高橋グループ

研究目的: 常染色体劣性遺伝性の家族性パーキンソン病病因遺伝子の Parkin と PINK1 はショウジョウバエでは同じシグナル経路で下流と上流の関係にあることが知られている。それぞれの生理機能および機能的連関をマウス、メダカ、細胞のモデルを用いて明らかにする。

研究方法: 武田グループと共同研究で、常染色体劣性家族性パーキンソン病の病因遺伝子である Parkin と PINK1 の機能喪失変異メダカを ENU ミュータジェネシスにより作製した。これらを掛け合わせる二重変異メダカも作出した。これらのメダカに関して、TH 染色による中枢ドーパミン神経の細胞数測定、HPLC によるドーパミンとその代謝産物の測定、さらに遊泳のビデオ撮影による行動解析を行った。一方、ミトコンドリアの蛋白質キナーゼである PINK1 の機能を解明するため、免疫沈降物の質量分析により、その結合蛋白質の同定を行った。

結果: メダカに関しては、哺乳類の黒質に相当する部位のドーパミン細胞数は Parkin または PINK1 欠損メダカと野生型で差は認められなかった。ドーパミン量は PINK1 欠損メダカでは上昇傾向にあった。行動学的には変異型と野生型で差は認められなかった。一方、PINK1 の免疫沈降物の解析から PINK1 結合蛋白質として Hsp70、さらに Hsp90 とそのコシャペロンである Cdc37 を見出した。Hsp90 阻害剤で Hsp90 および Cdc37 と PINK1 の結合を乖離させると、PINK1 の半減期は著しく短縮した(図)。また、パーキンソン病関連変異である L347P 変異は Hsp90、Cdc37 との結合が減弱しているが、この変異体の半減期も顕著に短縮することを見出した。以上より、Hsp90 と Cdc37 は結合することによって PINK1 を安定化していると考えた(右図; 論文1)。



B. 武田グループ

1. 「メダカでパーキンソン病モデルを樹立する」

これまでに家族性パーキンソン病の原因遺伝子、Parkin, Pink1, ATF6, Perk をそれぞれ破壊したメダカを作った。一方、HtrA2/omi と ATG10 遺伝子を完全破壊したメダカはできなかった。遺伝子破壊メダカは、高橋教授と森教授の研究室で交配と表現型解析がなされている。

2. 小胞体ストレス応答機構の遺伝子を破壊した DT40 細胞の作製

Siah2 欠損および Siah1/Siah2 2重欠損細胞の作製: Siah 遺伝子は、E3 ユビキチンリガーゼで

あり、Parkin と機能的な重複がある可能性がある。我々は、既に Siah1 遺伝子破壊 DT40 細胞を作製した。2007 年度に、Siah2 欠損および Siah1/Siah2 2重欠損 DT40 細胞を作製した。今後、Parkin 遺伝子破壊細胞と Siah1/Siah2/Parkin 3重欠損細胞とを作製する予定である。

3. DT40 細胞において小胞体ストレスを誘導する実験系の樹立

DT40 細胞は、成熟 B 細胞であるが、さらに分化するとプラズマ細胞になり、大量に抗体を分泌するようになる。この抗体産生が、小胞体ストレスを惹起する。DT40 細胞は、Pax5 を遺伝子破壊すると、プラズマ細胞に分化する。培地にテトラサイクリン(抗生物質)を添加した時に Pax5 遺伝子を不活性化できる『仕掛け』を作る。さらにプラズマ細胞に分化させた時に起こるストレス応答(様々な遺伝子の発現誘導)を定量できるようにする。

C. 森グループ

研究経過: 武田研究室で、野生型の♂メダカを変異原で処理した後に野生型の♀と交配し、得られた 5,767 個の F1 の精子と DNA が凍結保存されている。この DNA 変異ライブラリーから目的とする遺伝子の ORF 内に、ストップコドンが生じているものがあるかどうか探索した。

小胞体ストレス応答発動タンパク質として、哺乳動物には、ATF6 α 、ATF6 β 、PERK、IRE1 α 、IRE1 β が存在するが、メダカにも全く同じように 3 種類計 5 個存在していた。

哺乳動物では小胞体シャペロンの主要な制御因子である ATF6 α について、適当なアンプリコンを設定し、5,767 個の DNA をシーケンシングしたところ、149 番目のリジンがストップコドンに変わっているのを見いだした。これに対応する精子を用いて人工授精し、ATF6 α 欠損メダカを得た。変異を純化するためにバッククロスを行っているところである。

同様に、PERK についても、79 番目のチロシンあるいは 97 番目のグルタミン酸がストップコドンに変わっている個体を見いだした。しかし、IRE1 α についてはシーケンシングしたアンプリコンの中に期待する変異は見つからなかった。小胞体ストレス応答発動タンパク質の制御因子として知られている小胞体シャペロン BiP については、ATP 結合部位の近くに位置する 38 番目のセリンがプロリンに変わっている個体を同定した。これら変異メダカについても、現在バッククロスを行っている。

D. 服部グループ

研究経過:

- 1) Park9 の原因遺伝子産物 ATP13A2 の機能解析を行った。Fraction して野生型と変異型の局在の変化を検討した。
- 2) ATP13A2 のノックアウトマウスの作成に着手。全ての遺伝子産物が共通カスケードを形成している可能性を考え、全ての遺伝性パーキンソン病の KO mice を作成中である。
- 3) Parkin KO と tau Tg との交配を行った。表現型を認めた。
- 4) Parkin の新奇基質の同定。そして KO での増加を確認した。
- 5) DJ-1, PINK1 の細胞内局在の検討と PINK1 と parkin の相互作用の検討を行い、parkin が PINK1

の安定性に関与することが判明した。

E. 木下グループ

研究目的: パーキンソン病における α -シヌクレインのリン酸化とレビー小体形成、アルツハイマー病におけるタウのリン酸化と神経原線維変化形成はいずれも家族性神経変性原因遺伝子産物を主成分とし、病態とよく相関することから、神経変性疾患の共通分子機構への手がかりを与えられられる。レビー小体形成に抑制的に作用するセプチンと(Ihara, Hattori, Kinoshita et al., Neuron 2007)、これら凝集体構成要素との相互作用に着目して、モデルマウスの作製・病態解析・バイオマーカー探索・治療実験を行う。

研究経過: Sept4 は PD のレビー小体の他、アルツハイマー病等で出現する神経原線維変化の副成分でもある (Kinoshita et al., Am J Pathol 1998)。そこで、上記と同様にヒト tau^{P301S}を発現する tauopathy モデルマウス(Yoshiyama et al., Neuron 2007)と Sept4 欠損マウスの交配を行い、生存曲線、神経症状、病理像、生化学等を検討する。初年度には tauopathy モデルマウスを吉山博士との共同研究として入手し、SPF 化後、交配を開始した。現在までに 100 個体余りの遺伝子型解析を行って表現型の差異を観察している。また、新規にヒト Sept4 抗体を作製し、ELISA 系の確立を試みている。

F. 小川グループ

研究経過: F9 Herp 欠損細胞及び他の細胞株を用いた小胞体ストレス制御物質の探索により、①フラボノイドの一種 tangeretin (1)、②レスベラトロール 4 量体 vaticanol B (4)、③dibenzoylmethane(DBM)誘導体 14-26 (5)、④carbazole 誘導体 16-14 を得た。この内、tangeretin による小胞体ストレスに対する保護作用は、緩徐に小胞体ストレスシグナル unfolded protein response (UPR)を活性化させ、細胞内ストレス防御系を強化することと関連していた。更に、MPTP 投与マウスで起こる黒質緻密層の神経変性は、tangeretin 前投与により改善し、その効果も UPR の活性化(小胞体内分子シャペロンの誘導)と関連していた(論文 2)。今後、これら化合物が異なるパーキンソン病モデル

(α -synuclein の過剰発現等)に対しても有効であるかどうか検証して行く予定である(2)。その際、モデル作製のためのツールとして必要な α -synuclein 発現用アデノウイルスベクターや α -synuclein 過剰発現細胞株の作製は終了した。

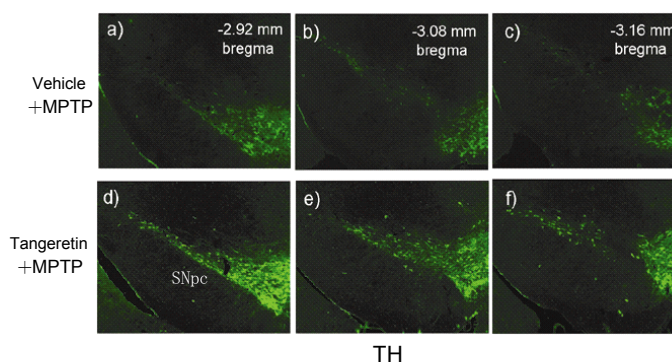


図 tangeretinによる神経保護作用

SNpc: 黒質緻密層

3. 研究実施体制

(1)「京都大学 高橋」グループ

① 研究分担グループ長:高橋 良輔(京都大学、教授)

② 研究項目

・家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルの作製と解析

(2)「京都大学 武田」グループ

① 研究分担グループ長:武田 俊一(京都大学、教授)

② 研究項目

・メダカでの遺伝性パーキンソン病モデルの樹立と、遺伝子破壊が確実にできるニワトリ Bリンパ細胞株、DT40 を使った小胞体ストレス応答機構の解析

(3)「京都大学 森」グループ

① 研究分担グループ長:森 和俊(京都大学、教授)

② 研究項目

・小胞体ストレス応答欠損固体・細胞を活用したパーキンソン発症機構の解析

(4)「順天堂大学 服部」グループ

① 研究分担グループ長:服部 信孝(順天堂大学、教授)

② 研究項目

・家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルマウス・メダカの作製と解析

(5)「京都大学 木下」グループ

① 研究分担グループ長:木下 専(京都大学、講師)

② 研究項目

・モデルマウスを用いたシヌクレインおよびタウによる神経変性機構と抑制系の解析

(6)「金沢大学 小川」グループ

① 研究分担グループ長:小川 智(金沢大学、教授)

② 研究項目

・小胞体理論に基づく新規リード化合物のスクリーニング

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

高橋グループ

1. Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S., Takahashi, R. L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependent manner. *Neurosci. Res.*, in press

小川グループ

2. Takano K, Kitao Y, Tabata Y, Miura H, Sato K, Takuma K, Yamada K, Hibino S, Choshi T, Iinuma M, Suzuki H, Murakami R, Yamada M, Ogawa S, Hori O. A dibenzoylmethane (DBM) derivative protects dopaminergic neurons against both oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Dec;293(6):C1884-94.