

「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

H23 年度 実績報告

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. 研究実施体制

(1)「高橋」グループ

① 研究代表者: 高橋良輔 (京都大学大学院医学研究科、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)「武田」グループ

① 主たる共同研究者: 武田 俊一 (京都大学大学院医学研究科、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

・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)「森」グループ

① 主たる共同研究者: 森 和俊 (京都大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

・小胞体ストレス応答欠損個体・細胞を活用したパーキンソン病発症機構の解析

(4)「木下」グループ

① 主たる共同研究者: 木下 専 (名古屋大学大学院理学研究科、教授)

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

(5)「堀」グループ

① 主たる共同研究者: 堀 修 (金沢大学医薬保健研究域 医学系、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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は 3-1 に対応する)

パーキンソン病の成因には、遺伝要因と環境要因を介して、小胞体ストレス、酸化ストレス、ミトコンドリア障害、タンパク質分解異常、細胞骨格の障害等が、複雑に絡み合っていると考えられる。

本研究では、ニワトリ B リンパ球細胞株 DT40、メダカ、マウス、において、パーキンソン病の病因関連遺伝子、およびパーキンソン病発症への関与が示唆される小胞体ストレス関連遺伝子に変異を加えた多重遺伝子変異および毒物誘発性モデルによってパーキンソン病を引き起こす様々な遺伝子間のネットワークおよび遺伝要因と環境要因との相関を明らかにし、パーキンソン病の複合病態を解明する。さらに、このようなモデルを治療薬開発に役立てる。

本年度、まず DT40 では、常染色体劣性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである DJ-1 を完全破壊した DJ-1 欠損細胞を作製した。この細胞の表現型として、1)酸化ストレスに対する脆弱性、2)ミトコンドリアの膜電位低下、3)ミトコンドリアの断片化が見られた。これらはいずれも DJ-1 の生理的機能の喪失を反映したものであることが示唆される。従って、DJ-1 欠損 DT40 細胞は新たな家族性パーキンソン病モデルとして有用であると考えられる。さらにこの細胞を用いて、酸化ストレスによって惹起されるオートファジーの遂行に DJ-1 が関与している可能性を示した。その一方、DJ-1 がシナプス膜に局在する証拠が得られたのは DJ-1 と膜系の関わりを示唆する点で興味深い (Usami Y, *Neurobiol Dis.*, 2011)²⁾。また小胞体関連分解機構に関与する SEL1L をニワトリ DT40 細胞で遺伝子破壊したところ、可溶性の構造異常タンパク質の分解は抑制されたが、膜貫通型の構造異常タンパク質の分解は影響を受けなかった。これらの結果は、哺乳動物のノックダウン実験で得られている結果とよく一致した (Ninagawa S, *Cell Struc. Func.*, 2011)⁴⁾。

次にメダカでは常染色体劣性遺伝性パーキンソン病 (PARK9) 原因遺伝子の ATP13A2 をノックアウトしたメダカモデルを昨年度樹立し、ドパミンおよびノルアドレナリン細胞死に加えてリソソーム蓄積病類似の病理を示すことを見出した。このメダカ脳のマイクロアレイを行い、発現プロファイル上の異常を解析中である。また、安定的に ATP13A2 を培養細胞でノックダウンした場合、リソソーム蓄積病類似の表現型が得られた。一方、脊椎動物に存在する小胞体ストレス応答発動因子 ATF6 α 、ATF6 β 、PERK、IRE1 α 、IRE1 β のノックアウトメダカを同定し、いずれも胚性致死としないことを見いだしている。さらに ATF6 が哺乳動物と同様、小胞体ストレス応答のマスターレギュレーターであることを示した (Ishikawa, Y., et al. *Cell Struc. Func.*, 2011)⁵⁾。さらに ATF6 α と ATF6 β のダブルノックアウトは胚性致死をもたらすことが判明したが、その致死の原因を究明したところ、ダブルノックアウトメダカでは脊索の発達が不全となっていることが明らかになった。

マウスに関しては、マウス MPTP/P 慢性投与モデルにおける UPR 活性化物質タンゲレンチン (IN19) の神経保護作用が経口投与によっても認められることを確認した。また、IN19 以外の UPR 活性化物質 Salburinal (eIF2 α 脱リン酸阻害剤)、Metformin (糖尿病治療薬) についても、SH-SY5Y 細胞において MPP⁺ や 6-OHDA 由来の神経変性を抑制する事を見出した。更に、ポリフェノールの一種 3, 4-dihydrobenzalactone (DBL) に関して、SH-SY5Y 細胞を短時間 (1時間) DBL で前処理すると、

細胞内グルタチオン量が増加し、6-OHDA により誘導される酸化ストレス、小胞体ストレス、細胞死が抑制される事を明らかにした。一方、ATF6a ノックアウトマウスの解析を通じてMPTP/P 慢性投与モデルにおいて黒質神経細胞死の増強、ユビキチン陽性の蛋白質凝集体を認める事を確認した。

また、パーキンソン病では責任蛋白質シヌクレインが aggresome (レヴィ小体) を形成する。しかしそのメカニズムには不明な点が多いため、副成分セプチンに着目してシヌクレイン病態にアプローチしている。本年度は①セプチン欠損マウス脳に多発する aggresome の構成成分を分析した。② aggresome 形成に関与する脱アセチル化酵素 HDAC6 とセプチンとの相互作用を見出し、その生理的意義の一端を明らかにした。現在、黒質ドーパミンニューロンにおいてレヴィ小体様 aggresome (シヌクレインとセプチンを含有する) を多発するシヌクレイン病モデルマウスの作製を目指している。

最近、常染色体劣性遺伝性家族性パーキンソン病の病因遺伝子 Parkin と PINK1 を中心に、ミトコンドリアとその品質管理機構であるミトファジーの障害がパーキンソン病の病因として注目されているので、その方向でも研究を展開している。本年度は PINK1 がミトコンドリア呼吸機能にも重要な働きを有し、PINK1 の欠損による異常ミトコンドリアの蓄積が若年発症に起因することを報告した (Amo et al. *Neurobiol Dis.* 2011)¹⁾。また、Parkin の基質のひとつがミトコンドリアの細胞内輸送に関わる Miro という分子であり、Parkin が Miro を分解することによって、ミトファジーの前にミトコンドリアを隔離することを明らかにした (*Liu, S., *Sawada, T., et al. *Plos Genetics*, 2012: *equal contributor)³⁾。さらにミトコンドリア障害の際に Parkin がミトコンドリアに集積する過程に影響を与える薬物のスクリーニング系を確立し、その過程を促進、抑制する薬物を同定し、その詳細な作用機序を解析中である。

その他、常染色体優性遺伝性パーキンソン病 PARK4 の原因遺伝子であり、さらに孤発性パーキンソン病の最も有力な感受性遺伝子である α -synuclein に関して、PARK4 をモデルとした BAC (細菌人工染色体) トランスジェニックマウスの作製・解析を行った。黒質神経細胞死は認められなかったが、不安の低下・運動量増加という行動異常を認め、SERT (セロトニン・トランスポーター) の発現量増加を伴っていた。 α -synuclein の in vivo における効果を反映したものと考えられ、孤発性パーキンソン病の創薬における in vivo モデルとしても有用であると考えられた (Yamakado, H., et al. *Neurosci Res.*, 2012)⁶⁾。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf A M, Toyomizu M, Gautier C A, Shen J, Ohta S, Hattori N. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. (2011) *Neurobiology of Disease*, 41(1), 111-118 [doi: 10.1016/j.nbd.2010.08.027]
2. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S, Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F, Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H, Shen J, Hattori N. DJ-1 associates with synaptic membranes. (2011) *Neurobiol Dis*, 43(3), 651-662. [doi: 10.1016/j.nbd.2011.05.014]
3. Liu S, Sawada T, Lee S, Yu W, Silverio G, Alapatt P, Millan I, Shen A, Saxton W, Kanao T, Takahashi R, Hattori N, Imai Y, Lu B. Parkinson's Disease-Associated Kinase PINK1 Regulates Miro Protein Level and Axonal Transport of Mitochondria. (2012) *PLoS Genet*, 8(3), e1002537. [doi: 10.1371/journal.pgen.1002537]
4. Ninagawa S, Okada T, Takeda S, Mori K. SEL1L is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal proteins but not transmembrane proteins in chicken DT40 cell line. (2011) *Cell Struc Func*, 36, 187-195 [pii: JST.JSTAGE/csf/11018]
5. Ishikawa T, Taniguchi Y, Okada T, Takeda S, Mori K. Vertebrate unfolded protein response: mammalian signaling pathways are conserved in medaka fish. (2011) *Cell Struc Func*, 36, 247-259 [pii: JST.JSTAGE/csf/11036]
6. Yamakado H, Moriwaki Y, Yamasaki N, Miyakawa T, Kurisu J, Uemura K, Inoue H, Takahashi M, Takahashi R. α -synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion. *Neurosci Res*. in press [doi:10.1016/j.neures.2012.03.010]

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数 (国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 1 件)