

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月9日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450465

研究課題名(和文)パーキンソン病原因遺伝子DJ-1が関与する尿酸合成系路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of DJ-1 for the uric acid synthesis pathway in the silkworm *Bombyx mori*

研究代表者

天竺桂 弘子 (Hiroko, Tabunoki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80434190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)では、血中尿酸値の低下がPD重症度と相関することが報告されているが、詳細は不明である。尿酸合成が異常なカイコ変異体の遺伝子発現を解析したところ、PD責任遺伝子DJ-1を上流とする新規な尿酸代謝経路を見出した。本研究ではこれに関与する分子の機能を解析した。DJ-1と尿酸合成の関係を調べるために、RNAiによりDJ-1遺伝子の発現を抑制したところ、尿酸合成において中心的役割を果たす酵素遺伝子の発現も低下した。また、変異体カイコの原因遺伝子領域を解析したところ、DJ-1と結合する可能性が予測されたmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコの幼虫は皮膚に尿酸を蓄積するため、白く見える。日本には皮膚が"白くない"カイコ変異体が存在し、尿酸とパーキンソン病の関係を解析できる唯一の動物モデル生物である。カイコを用いて尿酸とパーキンソン病原因遺伝子DJ-1の関係を解析したところ、これらはお互いを制御する関係にあることを見出した。このように本研究は尿酸合成の基本的な分子メカニズムの理解に貢献できた。日本国内では460万人ものパーキンソン病を含む神経変性疾患患者が推定されている。このため、新規予防法や治療薬開発に対する社会的要請は非常に高い。尿酸がパーキンソン病態進行の鍵を握ることが分かれば、治療法の開発にも貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Plasma uric acid (UA) levels decrease following clinical progression of Parkinson's disease (PD). This observation indicates that UA is utilized as the alternative anti-oxidative system when disruption of anti-oxidative system. However, the molecular mechanisms underlying decreases in plasma UA levels remain unclear. We found novel uric acid synthesis pathway in the *B. mori* mutant using Microarray analysis. Also, the mRNA level of xanthine dehydrogenase (BmXDH) was significantly decreased by RNA interference of *Bombyx mori* DJ-1 (BmDJ-1), indicating that BmDJ-1 would be controlled function of BmXDH. BmDJ-1 is homolog of human PD causative gene PARK-7 and, BmXDH is key enzyme in uric acid synthesis pathway. Additionally, a bioinformatics analysis was showed the target sequence of our discovered miRNA might be bind to BmDJ-1. Our findings are expected to elucidate the molecular mechanism of decreased plasma UA levels in the clinical stage progression of PD.

研究分野：生化学

キーワード：パーキンソン病 DJ-1 尿酸 カイコガ miRNA 個体機能低下

1. 研究開始当初の背景

(1)パーキンソン病と尿酸

パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)はミトコンドリア機能障害による酸化的ストレスが原因で中脳黒質緻密質のドパミン分泌細胞の減少によりドパミン産生が不足し、運動障害を引き起こす疾患である。PD患者の大規模メタボローム解析から、血中尿酸値の低下がPD重症度と相関することや(Bogdanov M, Brain 2008.)、中脳黒質の尿酸含量の低下を来することが報告されている(Cipriani S Biomark Med. 2010)。一方で、血中尿酸値が高いPD患者は症状が軽いことも報告されている(Weisskopf M.G, Am J Epidemiol. 2007)。これは尿酸が脳の恒常性維持のために何らかの重要な機能を有する可能性を示唆している。ところが、PD病態と尿酸代謝系の関係を分子レベルで解析した研究は、国内外を通じて報告がない。

(2)カイコは尿酸代謝遺伝子解析モデルとして最適である

カイコ(*Bombyx mori*)の幼虫は皮膚の真皮細胞に尿酸を蓄積することが知られている。そのため、皮膚の色は白い。カイコには尿酸代謝系が異常な変異体が26種類存在する(土井良 日蚕誌 1959)。見た目には皮膚が油紙のように透けた状態をしており、通称油蚕(あぶらこ)と呼ばれている。皮膚が油紙のように見えるのは真皮細胞に尿酸を蓄積できないため、これまでの研究により油蚕の原因は、キサンチンオキシダーゼ遺伝子の変異による尿酸生成異常型(Tamura T, J.Seric.Sci.Jpn. 1999, Komoto N, Insect.Biol.Mol.Biol. 2002, 2003)または尿酸運搬タンパク質遺伝子変異による尿酸蓄積異常型(Kiuchi T. et al., Insect.Biol.Mol.Biol. 2011)の2通りに区分されている。しかしながら未だ多くの油蚕原因遺伝子の産物が不明である。

研究グループはドパミンを合成に必須であるチロシンヒドロキシラーゼの脳内発現量が著しく低下し、体が震える、食欲および性欲低下の異常行動を示す油蚕変異体系統opを発見した。パーキンソン病の患者に似た形質を示すop変異体は現在においても原因遺伝子が同定されていない。

(3)予測された原因遺伝子はパーキンソン病責任遺伝子オルソログ

カイコでは遺伝子の機能アノテーションが未整備なために、公共のデータベースやソフトウェアを用いた大規模遺伝子解析はこれまで不可能であった。そこで研究グループはカイコのような非モデル生物種においても哺乳類同等の大規模遺伝子解析が可能となるプログラム“カイコ遺伝子機能アノテーションパイプライン”を開発し、カイコ変異体opのカスタムマイクロアレイデータを解析した。その結果DJ-1を上流とする新規な尿酸合成 pathway を同定し(図1)、op変異

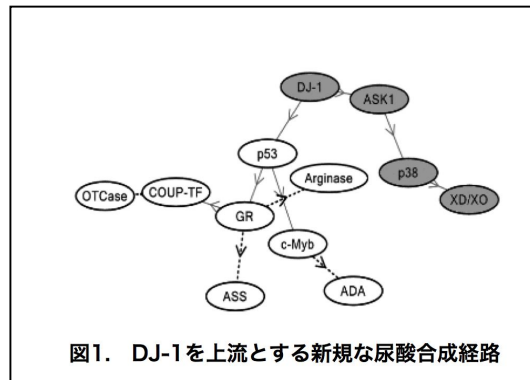


図1. DJ-1を上流とする新規な尿酸合成経路

体の原因遺伝子候補がパーキンソン病の責任遺伝子 PARK7 (DJ-1) である可能性を見出した(Tabunoki H et al, Plos ONE 2013)。

本研究で原因遺伝子候補として見出したDJ-1は、正常カイコでその機能を解析済みであった(Tabunoki H et al, Plos ONE 2011)。

2. 研究の目的

これまでの成果を踏まえて、変異体カイコでは Pathway の上流に位置する DJ-1 の機能損失が原因でその後のシグナル伝達が不全になり尿酸合成に異常を来している可能性が予測された。そこで、本研究ではカイコ変異体 op を用いてPD 責任遺伝子 DJ-1 が関与する尿酸代謝の仕組みを以下のように解析した。

1. op 原因遺伝子の同定。
2. DJ-1 の発現を正常カイコで RNA 干渉(RNA interference)により低下させ、DJ-1 とその下流分子への影響および尿酸合成系への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1)変異体カイコの原因遺伝子の解析
高速シーケンサーを用いて op 変異体カイコの全ゲノム配列およびRNA-seq 解析を実施し、マイクロアレイでは見出だせなかった分子機構を浮き彫りにするとともに、op の原因遺伝子を調べた。正常および op 変異体カイコのゲノム配列の違いについて検討するために、それぞれの遺伝子配列をアラインし比較した。

(2)DJ-1 の尿酸合成への影響を RNAi(RNA interference)により検討

正常カイコまたはカイコガ培養細胞株でDJ-1 の発現を RNAi(RNA interference)により抑制し、尿酸合成への影響を調べた。そのノックダウン効果は定量 RT-PCR およびイムノブロットングで調べ、マイクロアレイによる解析で同定した DJ-1 の下流にある尿酸合成に関与する遺伝子の発現について定量 RT-PCR で検討した。以上の方法により DJ-1 が関与する新規な尿酸代謝経路について検討した。

4. 研究成果

(1)変異体カイコの原因遺伝子の解析

カイコ変異体の原因遺伝子の究明のため、次世代シーケンサーによる全ゲノムおよびRNA-seq解析を実施した(業績)。当初の予定では既に公開されているカイコ全ゲノム配列リファレンスデータを利用してカイコ変異体と正常型の違いを迅速に決定する予定であったが、実際にデータをリファレンスデータにマッピングすると、正常型配列の約半分程度しか当てはまらず、リファレンスデータと本研究で解析したデータに大きな違いがあることが明らかになった。そこで、配列解析手法を見直し、プログラミングを変更し配列解析を進めるとともに、opの原因遺伝子候補領域をポジショナルクローニングにより絞り込み、再度解析を行った。

その結果、その責任遺伝子領域にmiRNAと予測される配列を見出した。マイクロRNA(miRNA)は標的とするmRNAに結合し、細胞内において転写や翻訳調節に関与し、個体の発生や、疾患の分子病態において重要な役割を持つことが近年報告されている(鈴木洋 生化学 2015)。

そこで先の研究により見出した尿酸合成経路関連遺伝子(Tabunoki H et al Plos One 2013, 図1)と、このmiRNAが結合するかについてバイオインフォマティクスにより検討したところ、カイコDJ-1と結合することが予測された。

(2)DJ-1と尿酸合成の関係の検討

DJ-1と尿酸合成経路の関係について検討するために、カイコ培養細胞を用いてRNA干渉によりカイコDJ-1のmRNAおよびタンパク質の発現を抑制した。

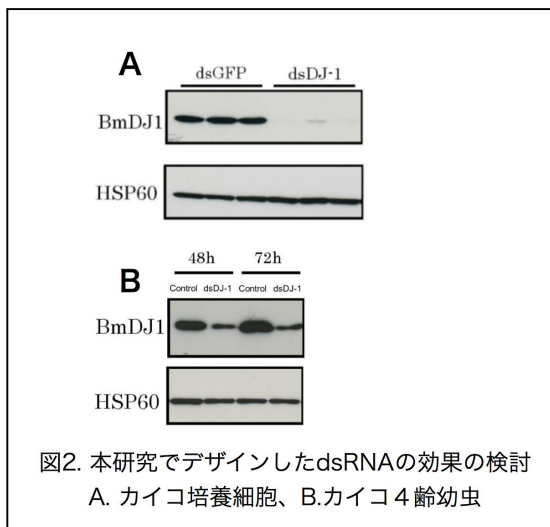


図2. 本研究でデザインしたdsRNAの効果の検討
A. カイコ培養細胞、B. カイコ4齢幼虫

培養細胞を用いてDJ-1の発現を効果的に抑制出来る条件を詳細に検討したところ、個体においても一定の効果が得られるdsRNA配列を決定できた(図2)。

カイコガ培養細胞を用いてDJ-1の発現を抑制し、尿酸合成経路に関与する遺伝子との関係を検討したところ、ASK-1, p38の転写には影響を与えなかったが、尿酸合成の鍵酵素(キサンチンデヒドロゲナーゼ)の転写を著

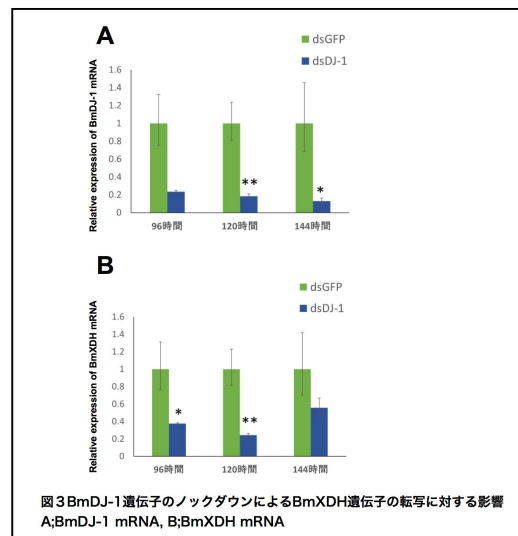


図3 BmDJ-1遺伝子のノックダウンによるBmXDH遺伝子の転写に対する影響
A:BmDJ-1 mRNA, B:BmXDH mRNA

しく低下させた(図3)。

以上のことから、DJ-1は、キサンチンデヒドロゲナーゼの転写を正に制御し、尿酸合成に直接関与することが明らかになった。今後、本研究で見出したmiRNAとDJ-1の関係が解明できると、尿酸合成経路の全貌を明らかに出来る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Kikuchi A, Nakazato T, Ito K, Nojima Y, Yokoyama T, Iwabuchi K, Bono H, Toyoda A, Fujiyama A, Sato R, Tabunoki H. Identification of functional enolase genes of the silkworm *Bombyx mori* from public databases with a combination of dry and wet bench processes. BMC Genomics. 2017,18(1):e83. 査読有り

Ito K, Yoshikawa M, Fujii T, Tabunoki H, Yokoyama T. Melanin pigmentation gives rise to black spots on the wings of the silkworm *Bombyx mori*. J Insect Physiol. 2016, 91-92:100-6. 査読有り

Tabunoki H, Gorman MJ, Dittmer NT, Kanost MR. Superoxide dismutase 2 knockdown leads to defects in locomotor activity, sensitivity to paraquat, and increased cuticle pigmentation in *Tribolium castaneum*. Sci Rep. 2016, 6:e29583. 査読有り

Mang D, Shu M, Tanaka S, Nagata S, Takada T, Endo H, Kikuta S, Tabunoki H, Iwabuchi K, Sato R. Expression of the fructose receptor BmGr9 and its involvement in the promotion of feeding, suggested by its co-expression with neuropeptide F1 in

Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol. 2016, 75:58-69. 査読有り

Ito K, Shimura S, Katsuma S, Tsuda Y, Kobayashi J, Tabunoki H, Yokoyama T, Shimada T, Kadono-Okuda K. Gene expression and localization analysis of *Bombyx mori* bidensovirus and its putative receptor in *B. mori* midgut. J Invertebr Pathol. 2016, 136:50-6. 査読有り

Tabunoki H, Bono H, Ito K, Yokoyama T. Can the silkworm (*Bombyx mori*) be used as a human disease model? Drug Discov Ther. 2016, 10(1):3-8. 査読有り

Ito K, Katsuma S, Kuwazaki S, Jouraku A, Fujimoto T, Sahara K, Yasukochi Y, Yamamoto K, Tabunoki H, Yokoyama T, Kadono-Okuda K, Shimada T. Mapping and recombination analysis of two moth colour mutations, Black moth and Wild wing spot, in the silkworm *Bombyx mori*. Heredity (Edinb). 2016, 116(1):52-9. 査読有り

Nojima Y, Ito K, Ono H, Nakazato T, Bono H, Yokoyama T, Sato R, Suetsugu Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Satoh J, Tabunoki H, Fugo H. Superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, play a distinct role in the fat body during pupation in silkworm *Bombyx mori*. PLoS One. 2015, 10(2):e0116007. 査読有り

〔学会発表〕(計 33 件)

1 福澤侃、藤原恒司、中根わかな、横山岳、荻原勲、天竺桂弘子、小山清隆、木下薫
アマミナナフシ(*Entoria okinawaensis*)の糞からの医薬品シード化合物の探索と活性評価
日本薬学会 137 回年会 (宮城県仙台市)
2017.3.28-30

2 中村尚、福澤侃、中根わかな、小山清隆、横山岳、荻原勲、仲里 猛留、木下薫、天竺桂弘子
ツمامラサキマダラ *Euploea mulciber* 幼虫
フン由来抗癌成分の探索
日本応用動物昆虫学会第 61 回大会
2017.3.27-29 東京農工大学 小金井キャンパス(東京都小金井市)

3 野島陽水、横山岳、天竺桂弘子
カイコガの脱皮変態期における細胞内 ROS 蓄積メカニズムの解明
日本応用動物昆虫学会第 61 回大会
2017.3.27-29 東京農工大学 小金井キャンパス (東京都小金井市)

4 西子まあや、松本崇史、天竺桂弘子
コクヌストモドキ新規 SOD 遺伝子の解明

第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

5 小林裕太、野島陽水、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコガの新規 SOD 予測遺伝子の配列と mRNA 発現の解析
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

6 松本崇史、西子まあや、天竺桂弘子
コクヌストモドキ DJ-1 の機能解析
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

7 安楽尚也、天竺桂弘子
カイコ培養細胞 BmN における BmDJ-1 を標的とした RNAi 法による尿酸合成経路への影響の検討
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

8 菊地晃、伊藤克彦、横山岳、坊農秀雅、天竺桂弘子
公共データベースを利用したカイコガエノラーゼ配列の抽出と特性解析
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

9 坂本真唯、菊地晃、天竺桂弘子
カイコガ神経栄養因子 BmMANF の配列解析およびタンパク質精製
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

10 野島陽水、横山岳、天竺桂弘子
カイコガの脱皮・変態期における細胞内 ROS 蓄積メカニズムの解明
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

11 中村尚、中根わかな、福澤侃、小山清隆、木下薫、天竺桂弘子
ツمامラサキマダラ *Euploea mulciber* 幼虫
フン由来抗癌成分の探索
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

12 中根わかな、中村尚、福澤侃、小山清隆、木下薫、天竺桂弘子
ジャコウアゲハ体液及び抽出成分の抗癌活性スクリーニング

第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

13 市野史佳、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
ヒト経口投与薬腸管吸収予測モデルとしてのカイコ幼虫利用の可能性
第二回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 宇都宮大学 2016.11.5 (栃木県宇都宮市)

14 坊農秀雅 天竺桂弘子
公共データベースを使い倒した知のめぐりのよい研究 Kaiko Functional Annotation Pipeline を例に: 第 1 回オモロイ生き物研究会 北海道 札幌 2016.10. 23

15 Nojima Y, Ito K, Yokoyama T, Tabunoki H
Bombyx mori superoxide dismutase 1 and 2 play a role as metamorphosis Initiator
2016/9/26 ICE 2016 XXV International Congress of Entomology (フロリダ オールランド USA)

16 Ito K, Yoshikawa M, Tabunoki H, Yokoyama T
Characterization of the moth color mutation, Wild wing spot, in the silkworm *Bombyx mori*
2016/9/27 ICE 2016 XXV International Congress of Entomology (フロリダ オールランド USA)

17 Tabunoki H, Ito K, Bono H, Yokoyama T
Can the silkworm (*Bombyx mori*) be used as a human disease model?
2016/9/28 ICE 2016 XXV International Congress of Entomology (フロリダ オールランド USA)

18 天竺桂弘子
医薬品シードとして有用な昆虫由来化合物の探索
JST 新技術説明会 2016/6/16 (東京千代田区)

19 福澤侃、藤原恒司、中根わかな、横山岳、荻原勲、天竺桂弘子、小山清隆、木下薫
アマミナナフシ(*Entoria okinawaensis*)の糞からの医薬品シード化合物の探索
日本薬学会 136 年会 2016/3/28 (神奈川県横浜市)

20 伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコ濃核病ウイルス 2 型抵抗性 / 感受性遺伝子の中腸における発現領域とウイルス感染性との関係
日本応用動物昆虫学会第 59 回大会
山形大学小白川キャンパス 2015/03/27 (山

形県山形市)

21 野島陽水、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコ SOD タンパク質の発現は 20hydroxyecdysone に影響される
平成 28 年度蚕糸昆虫機能利用学術講演会 2016.3.17 京都繊維大学 (京都府京都市)

22 福澤侃、横山岳、荻原勲、小山清隆、木下薫、天竺桂弘子
カイコガおよびブルーベリーにおける医薬品シードとなる有用成分の検索
201502/26 第 1 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
東京農工大学小金井キャンパス 小金井市

23 菊地晃、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコガエノラーゼの cDNA クローニングおよび特性解析
201502/26 第 1 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

24 市野史佳、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコガ ABC トランスポーター ABCB, ABCC の mRNA 発現解析
201502/26 第 1 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

25 小林裕太、野島陽水、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
新規 SOD モチーフを有するカイコガタンパク質の配列および組織分布の解析
201502/26 第 1 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

26 野島陽水、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコガ脂肪体における BmSOD2 の発現解析
201502/26 第 1 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

27 安楽尚也、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコ培養細胞での BmDJ-1 を標的とした RNAi の検討
201502/26 第 1 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

28 菊地晃、伊藤克彦、横山岳、坊農秀雅、天竺桂弘子
カイコガエノラーゼの cDNA クローニングおよび特性解析

2015/12/2 BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)(兵庫県神戸市)

29 市野史佳、伊藤克彦、横山岳、天竺桂弘子
カイコガ ABC トランスポーター-ABC, ABCC mRNA 発現解析

2015/12/1 BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)(兵庫県神戸市)

30 小林裕太、野島陽水、伊藤克彦、横山岳、坊農秀雅、天竺桂弘子
カイコガの新規 SOD 予測遺伝子の配列および mRNA 発現の解析

2015/12/1 BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)(兵庫県神戸市)

31 天竺桂弘子
公共データベースを利用した昆虫ストレス応答分子の探索

2015/12/3 BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)(兵庫県神戸市)

32 Tabunoki H, Ito K, Yokoyama T, Bono H, Fugo H; Identification of key uric acid synthesis pathway in a unique mutant silkworm *Bombyx mori*.

2014/7/15 Seventh International Symposium on Molecular Insect Science (アムステルダム・オランダ)

33 天竺桂弘子
比較ゲノム学的手法を用いた昆虫ヒト疾患モデル系の開発
塩基配列データアーカイブをフル活用するための大規模データ解析技術開発研究会(遺伝研)2014.6.27 (静岡県三島市)

〔図書〕(計1件)

今日から使えるデータベース・ウェブツール
内藤雄樹、高木利久、中村保一、片山俊明、粕川雄也、坊農秀雅、岩崎歩、伊藤真和史、他 57 名 天竺桂弘子 "GOLD 様々な生物種のゲノム配列情報を集めたデータベース" 羊土社 2014 246:70-71
〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:新規トリテルペン、その製造方法及びそれを含有する組成物
発明者:天竺桂弘子、木下薫、福澤侃
権利者:同上
種類:特許
番号:特願 2016-091377
出願年月日:2016年4月28日
国内外の別:国内

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://web.tuat.ac.jp/~insecta/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

天竺桂 弘子 (TABUNOKI, Hiroko)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号:80434190

(2)研究分担者

坊農 秀雅 (BONO, Hidemasa)
大学共同利用機関法人情報・システム
研究機構・DBCLS・准教授
研究者番号:20364789

(3)連携研究者

横山 岳 (YOKOYAMA, Takeshi)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号:20210635

(4)研究協力者

伊藤 克彦 (Ito, Katsuhiko)