

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790302

研究課題名(和文) 老人性神経変性疾患原因遺伝子群に対する多面的スクリーニング法の確立

研究課題名(英文) Development of a multiphase screening method for genes responsible for age-dependent neurodegenerative disorders

研究代表者

今居 謙(IMAI YUZURU)

順天堂大学大学院・医学研究科・先任准教授

研究者番号：30321730

研究成果の概要(和文)：プロテオミクスとショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを組み合わせた新しいスクリーニング法を開発し、この方法を若年性および晩発性パーキンソン病原因遺伝子 *PINK1* および *LRRK2* に関して適用した。その結果、*PINK1* シグナルおよび *LRRK2* シグナルに関与する新しい分子群を同定することに成功し、パーキンソン病でおこるドーパミン神経変性の病理メカニズムを理解するために貢献した。

研究成果の概要(英文)：*PINK1* and *LRRK2* are the genes responsible for early-onset and late-onset familial forms of Parkinson's disease, respectively. I developed a new approach that combines a proteomics analysis and a *Drosophila* genetic screening to understand the pathogenesis of Parkinson's disease caused by *PINK1* and *LRRK2* mutations. Using this approach, I successfully determined molecules that are involved in the *PINK1* and *LRRK2* pathology, which will contribute to understanding of pathogenesis in these diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	975,168	292,551	1,267,719
2011年度	224,832	67,449	292,281
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：パーキンソン病、LRRK2、PINK1、Parkin、神経変性疾患、ドーパミン神経、ショウジョウバエ、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳黒質ドーパミン神経が選択的に変性欠落することにより発症するが、その神経変性メカニズムに関しては未解明のままである。現在までに幾つかの遺伝性パーキンソン病原因遺伝子が同定され

ている。そのうち若年性パーキンソン病原因遺伝子 *PINK1* と *parkin* が、活動状態が低下したミトコンドリアを選択的に除去する「ミトコンドリアの品質管理機構」で働くことが明らかとなっていた。*parkin* 遺伝子産物 Parkin はユビキチンリガーゼであり、遺伝学

的にミトコンドリア局在キナーゼ PINK1 のシグナルの下位に位置する。すなわち PINK1-Parkin 経路がミトコンドリアの機能を維持することにより、神経細胞の生存性が支えられると考えられる。

一方、*PARK8* 遺伝子座にリンクする晩発性遺伝性パーキンソン病は、一般的な（孤発性）パーキンソン病に臨床症状・病理ともに類似しており、本疾患の病因の根幹をなすと予想されている。*PARK8* の原因遺伝子 *LRRK2* は複雑なドメイン構造をもつキナーゼをコードし、疾患型の変異は *LRRK2* のキナーゼ活性の亢進を導くことが示唆されているが、*LRRK2* 変異がドーパミン神経変性を導く分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

この研究背景を受けて、本研究では PINK1 と Parkin がミトコンドリアの機能を制御する分子メカニズム、および *LRRK2* の疾患型変異がドーパミン神経変性を導くメカニズムを新規に確立したアプローチで明らかにすることを目的とした。具体的には、PINK1 および *LRRK2* に結合する分子を生化学的に同定し、その中で PINK1 および *LRRK2* シグナル伝達に関与する重要な分子をショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングで同定することを試みた。

3. 研究の方法

FLAG タグを付加したヒト PINK1 および *LRRK2* を安定的に発現するヒト培養細胞を作製し、大量浮遊培養を行った。その後、その細胞ライゼートより PINK1、*LRRK2* およびその結合タンパク質を抗 FLAG 抗体カラムにて精製した。PINK1、*LRRK2* 精製画分に特異的なタンパク質群を分取、質量分析解析により網羅的に同定した。

次に同定した PINK1、*LRRK2* 結合タンパク

質に対応する遺伝子に変異のあるショウジョウバエと PINK1 変異ショウジョウバエ（PINK1 ノックダウンおよびノックアウトショウジョウバエ）、ハエ *LRRK2* オルソログ（*dLRRK*）トランスジェニックショウジョウバエを掛け合わせ遺伝学的スクリーニングを行った。

4. 研究成果

PINK1 結合タンパク質の生化学的同定と、ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングにより、ホスホグリセリン酸ムターゼ 5 (*PGAM5*) という遺伝子を単離することに成功した。*PGAM5* 遺伝子を喪失すると PINK1 変異ショウジョウバエの羽の表現型（図 1、羽の下垂）が完全に抑制できた。PINK1 の変異による羽の下垂は、羽を制御する筋肉のミトコンドリアの異常な融合と変性によって起こる。組織学的な解析により、*PGAM5* 遺伝子を除去するとこのミトコンドリアの変性が部分的に抑制されることが分かった。

遺伝子産物 *PGAM5* はミトコンドリアに局在する機能未知のタンパク質である。PINK1 と

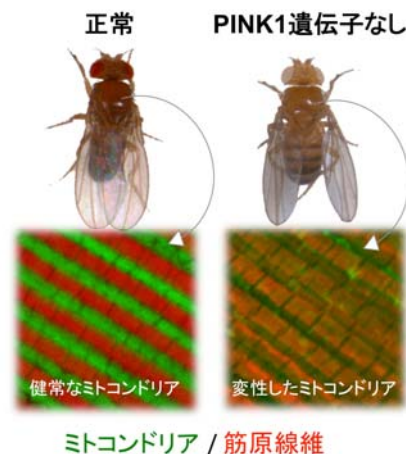
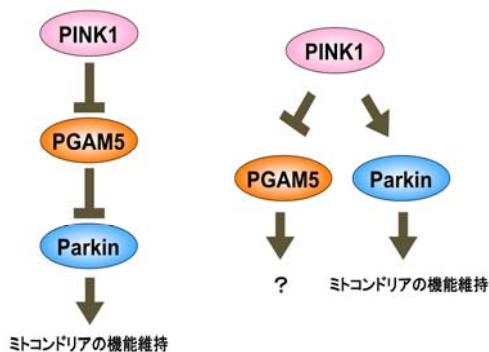


図 1. PINK1 変異ショウジョウバエの可視化表現型

ショウジョウバエにおいて PINK1 遺伝子の機能が失われると、羽を制御する筋肉のミトコンドリアの変性（下）が起こり、羽が下垂する（上）。*parkin* 遺伝子のノックアウトショウジョウバエも同じ表現型を示す。

PGAM5 の結合はヒトおよびショウジョウバエ培養細胞にて観察でき、その分子関係が種を超えて保存されていることが示唆された。PINK1 はキナーゼ活性を持つことから、次に PINK1 が PGAM5 をリン酸化基質とするかどうかを *in vitro* キナーゼアッセイで検討したところ、その可能性が低いことが分かった。

ショウジョウバエ遺伝学による解析から、*parkin* は *PINK1* の下位に位置することが示唆されている。*PGAM5* の機能喪失変異が、*PINK1* 変異による表現型を抑制することから、*PGAM5* も *PINK1* の下位に位置すると考えられた。そこで、*PGAM5* と *PINK1* の遺伝学的な位置関係を検討した。*parkin* 変異ショウジョウバエは、*PINK1* のそれと同じ表現型（筋肉のミトコンドリアの変性）を示す。しかし、*parkin* 変異ショウジョウバエから *PGAM5* 遺伝子を取り除いてもミトコンドリアの変性は抑制できなかった。以上の結果から、*PGAM5* は *parkin* の上位遺伝子であるか、あるいは *PGAM5* と *parkin* は、*PINK1* の下位で独立に働



ることが考えられた (図2)。

図2. 遺伝学的解析から考えられる PGAM5 の役割 (作業仮説)

左、*PINK1* 遺伝子と *parkin* 遺伝子の間に位置し、Parkin の活性を抑制する。

右、*PINK1* 遺伝子の下流に位置し、Parkin とは独立に働く。PGAM5 はミトコンドリアの機能を調節していると考えられるが、その詳細の解明は今後の課題である。

LRRK2 結合タンパク質として約 100 種類の分子が同定されたが、このうち LRRK2 に特異的に結合する分子を、免疫沈降法とショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングを組み合わせて絞った。その中で、LRRK2-binding protein 1 (LBP1) と LBP2 に注目し LRRK2 機能におよぼす影響の解析を行った。LBP1 は巨大な HECT 型ユビキチンリガーゼで、LBP2 は Neur ドメインをもつ機能未知のタンパク質である。免疫沈降実験により、LRRK2 は、LBP2 を介して LBP1 に結合することが明らかとなった。さらに LRRK2, LBP1, LBP2 は、免疫細胞化学的解析によりエンドソームに部分的に共局在していることが観察された。

LBP1, LBP2 は機能未知のタンパク質であるが、Notch シグナルに関与する分子がもつ特

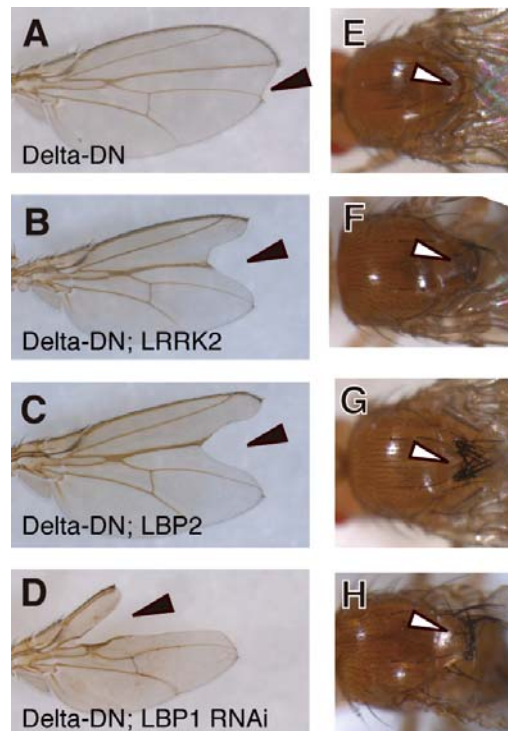


図3. LRRK2, LBP1, LBP2 と Delta との遺伝的相互作用

(A, E) ショウジョウバエの羽・胸部原基に、Delta ドミナントネガティブ変異体 (Delta-DN) を 18°C 飼育下で発現させると、羽の縁の欠失 (A, 黒矢頭) および胸部の剛毛の増加 (E, 白抜き矢頭) が見られる。(B-H) LRRK2, LBP2 の過剰発現、LBP1 のノックダウンは、Delta-DN の表現型を増強する。

徴的なドメインをそれぞれ有している。そこで Notch シグナルに關与するかどうかを、ショウジョウバエ遺伝学により解析した。その結果、LRRK2, LBP2, LBP1 RNAi は Notch 受容体のリガンドの一つである Delta のドミナントネガティブ変異体 (Delta-DN) による表現型を増強した (図 3)。Delta-DN はその細胞質領域を欠失しエンドサイトーシスおよびその後の分解を受けないため、Notch シグナルの cis-inhibition を起こす。LRRK2, LBP2 が、Notch シグナルの cis-inhibition と同様の作用を及ぼすことを、Hes-1 レポーターアッセイ、ライブセルイメージング、マウス胎児脳への *in utero* electroporation による神経発生への影響で確認した。さらに、LRRK2, LBP1, LBP2 が、ショウジョウバエにおいて Rab5, Rab7, Rab11 と遺伝的相互作用を持つことから、LRRK2, LBP1, LBP2 は、エンドソーム-リソソーム経路に関わる小胞輸送を制御することにより、Notch シグナルを修飾する可能性が示唆された。

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 10 件)

1. Imai, Y., Lu, B.: Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Parkinson's disease: Disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder. *Curr Opin Neurobiol.* 21: 935-941 (2011) 査読有
2. Imai, Y., Venderova, K., Park, DS., Cai, H., Schmidt, E.: Editorial; Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* Article ID 364328 (2011). 査読なし
3. Imai, Y.: Dysregulation of microRNA-mediated translational repression is involved in neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Bulletin.* 75 39-56 (2011). 査読なし

4. Imai, Y., Kanao, T., Sawada, T., Kobayashi, Y., Moriwaki, Y., Ishida, Y., Takeda, K., Ichijo, H., Lu, B., Takahashi, R.: The Loss of PGAM5 Suppresses the Mitochondrial Degeneration Caused by Inactivation of PINK1 in *Drosophila*. *PLoS Genet.* e1001229 (2010). 査読有

5. Kanao, T., Venderova, K., Park, DS., Unterman, T., Lu, B., Imai, Y.: Activation of FoxO by LRRK2 induces expression of proapoptotic proteins and alters survival of postmitotic dopaminergic neuron in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* 19: 3747-3758 (2010). 査読有

6. Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N., Lu, B.: Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature.* 466: 637-641 (2010) 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 澤田知世, 金尾智子, 小林芳人, 高橋良輔, 今居 讓: The HECT-type ubiquitin ligase Huwe1/Mule mediates the stability of PINK1. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月17日
2. Imai, Y.: Translational control and stress response in Parkinson's disease. 12th INTERNATIONAL CONGRESS ON AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, Aug. 1. 2011
3. 澤田知世, 金尾智子, 小林芳人, 高橋良輔, 今居 讓: HECT型ユビキチンリガーゼ Mule/Huwe1 による PINK1 安定性の調節. 第52回日本神経学会学術大会、名古屋、2011年5月18日
4. Sawada, T., Kanao, T., Kobayashi, Y., Takahashi, R., Imai, Y.: The HECT-type ubiquitin ligase HUWE1 mediates the stability of PINK1. 3rd Asian and Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, Taipei, Mar. 26. 2011
5. Imai, Y.: Pathogenic mechanisms in familial forms of Parkinson's disease revealed by *Drosophila* models.

“MicroRNAs in Neurodegenerative diseases” The 3rd International Symposium of Neurodegeneration Control Research Center. Seoul, Feb. 10. 2011

6. Imai, Y., Kanao, T., Sawada, T., Kobayashi, Y., Moriwaki, Y., Ishida, Y., Takeda, K., Ichijo, H., Lu, B., Takahashi, R.: The Loss of PGAM5 Suppresses the Mitochondrial Degeneration Caused by Inactivation of PINK1 in *Drosophila*. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 口演およびポスター、神戸、2010年12月7, 8日
7. Kanao, T., Sawada, T., Davies, S.A., Moriwaki, Y., Takahashi, R. Imai, Y.: Nitric oxide signal modulates FoxO's activity and alters dopaminergic neuron survival and motor activity in *Drosophila*. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 口演およびポスター、神戸、2010年12月8日
8. Sawada, T., Kanao, T., Kobayashi, Y., Takahashi, R. Imai, Y.: Identification of Mule as a candidate ubiquitin ligase of PINK1. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 ポスター、神戸、2010年12月8日
9. 澤田知世, 金尾智子, 小林芳人, 高橋良輔, 今居 譲: PINK1 のユビキチンリガーゼ候補としてのMule/Huwl の解析、平成 22 年度 Movement Disorder Society Japan 学術大会 ポスター、神戸、2010 年 10 月 9 日
10. Sawada, T., Kanao, T., Kobayashi, Y., Takahashi, R., Imai, Y.: Regulation of the PINK1 signaling by a mitochondrial protein PGAM5, 第 33 回日本神経科学大会 口演、神戸、2010 年 9 月 2 日
11. 今居 譲, グローバルCOEセミナー「ショウジョウバエパーキンソン病モデルを用いたLRRK2シグナルの解析」京都大学、2010年3月5日
12. Kanao T., Venderova, K., Park, D.S., Lu, B., Imai, Y.: LRRK2 phosphorylates FoxO and alters dopaminergic neuron survival in *Drosophila*, 第 32 回日本分子生物学会年会 口演およびポスター、横浜、2009 年 12 月 9 日

13. Imai, Y., Kanao T., Venderova, K., Park, D.S., Lu, B: Phosphorylation of FoxO by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*, 第 32 回日本神経科学大会 口演、名古屋、2009 年 9 月 18 日

14. 澤田知世, 今居 譲, 服部信孝, 北山滋雄, 高橋良輔: Analysis of Pael-R complex components as Parkin substrates, 第 32 回日本分子生物学会年会 ポスター、横浜、2009 年 12 月 11 日

15. 澤田知世, 今居 譲, 服部信孝, 北山滋雄, 高橋良輔: Parkinの基質としてのPael-R複合体の解析, 第 32 回日本神経科学大会 口演、名古屋、2009 年 9 月 16 日

[図書] (計 4 件)

1. 今居 譲: 「遺伝性パーキンソン病発症の分子基盤」ブレインサイエンス・レビュー、クバプロ社、185-204 (2011)

2. 今居 譲: 「パーキンソン病原因遺伝子研究の進展」最新医学 第 65 巻 4 号: 799-805 (2010)

3. 今居 譲: 「遺伝性パーキンソン病原因遺伝子研究の新展開」実験医学増刊号 第 28 巻 5 号: 172-178 (2010)

4. 今居 譲, 高橋良輔: 「遺伝性パーキンソン病研究の最前線: 分子標的治療にむけて」*Brain and Nerve* 第 61 巻 8 号: 903-913 (2009)

[その他]

(1) 研究室ホームページ

(2) 研究成果報道のウェブページ

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2010/12/press20101203-01.html>

http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/frontiers/news_41/news_41a.html

(3) 研究成果の報道

NHK仙台放送、日本経済新聞、河北新報、東北大学および加齢医学研究所ホームページ (2010年12月)、長陵新聞 (2012年1月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今居 譲 (IMAI YUZURU)

順天堂大学大学院・医学研究科・前任
准教授
研究者番号 ; 30321730