

## 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5月15日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2011

課題番号：22710195

研究課題名（和文）パーキンソン病原因遺伝子の尿酸代謝系における役割の解析

研究課題名（英文）Identification of key uric acid synthesis regulator in novel Parkinson's disease model

## 研究代表者

天竺桂 弘子 (TABUNOKI HIROKO)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80434190

研究成果の概要（和文）：DJ-1 の機能損失は、疾患発症の引き金になることが報告されているが、病態進行におけるその役割は未解明なままである。DJ-1 は、パーキンソン病（PD）の原因遺伝子であり、遺伝的要因の家族性 PD の他にも発症原因が不明な孤発性 PD の発症にも深く関与していることが報告されている。

PD 患者の大規模メタボローム解析において、PD 病態進行の機序に尿酸代謝が深く関与していることが報告されているが、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無かった。そこで本研究では、PD 病態によく似た特性を持ち、かつ尿酸代謝系に異常を来したカイコ突然変異体を用い、哺乳動物モデル系では見出せなかった DJ-1 の尿酸代謝系における役割をマイクロアレイ解析によって明らかにした。

正常と変異体カイコのマイクロアレイデータを KeyMolnet で解析するために、カイコとヒト遺伝子を対応させる解析パイプラインを構築した。続いて変異体と正常カイコのマイクロアレイデータを KeyMolnet で解析し、DJ-1 を上流とするユニークな尿酸代謝パスウェイを同定した。このパスウェイに関係する遺伝子をリアルタイム PCR で検証したところ、変異体におけるすべての遺伝子発現が顕著に低下していた。さらには、変異体における DJ-1 の機能は、正常と比較して顕著に低下しており、DJ-1 の機能破綻により尿酸代謝系が異常を来していることが明らかとなった。本研究成果は、PD と尿酸代謝系の関係を分子レベルで説明し、PD 発症と病態進行の機序解明に大きく貢献できると思われる。

研究成果の概要（英文）： Parkinson's diseases (PD) is a common neurodegenerative disorder, oxygen radicals and other oxidants attack dopaminergic neuronal cells, causing damage and depletion of dopamine.

Uric acid (UA) is the final product of purine metabolism and plays an important role as a physiological antioxidant (Ames BN Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981). In recent years, several different groups have reported a correlation between decreased UA in PD and clinical progression and stage of PD (Church WH Brain Research Bulletin 1994, Andreadou E Clin. Neurol. Neurosurg. 2009, Weisskopf M.G. Am. J. Epidemiol. 2007, Bogdanov M Brain 2008, Cipriani S Biomark Med. 2010, Johansen KK PLoS One. 2010).

However, little is known about the molecular mechanisms of decreased UA under oxidative stress.

In animal models of PD, oxidative stress has been simulated using parkinsonian neurotoxins that are mitochondrial complex I inhibitors, namely 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA), paraquat (PQ) and rotenone (ROT) (Bove J NeuroRx. 2005). PD-associated gene knockout animal models have also been developed (Hatano T J. Neurochem. 2009).

Plasma UA might be expended to resist oxidative injury in PD, but the molecular mechanism of decreased plasma UA in advanced clinical stages of PD has not been analysed in either type of model.

We used our systematic functional annotation pipeline for silkworm genes to identify a

novel UA metabolic pathway regulator under oxidative stress in a UA metabolism mutant silkworm *Bombyx mori* PD model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：疾患関連遺伝子・パーキンソン病・尿酸代謝分子ネットワーク

### 1. 研究開始当初の背景

DJ-1(PARK7)は、当初癌研究から発見され、若年性発症型パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)および、大多数を占める弧発性PDの発症に関与する遺伝子である(Schapira AHV, Neurology 2008)。DJ-1は進化的に高度に保存され、強い抗酸化作用、プロテアーゼ活性、シャペロン機能などを有することが報告されている(Lev N. et al, J.Mol.NeuroSci. 2006)。DJ-1が変異または強い酸化によりその機能が損失されると、PDや癌を発症すると考えられているが、病態発症のメカニズムは依然として不明なままである。

全ゲノムが解読されたカイコ(*Bombyx mori*)は、ヒト疾患関連遺伝子オーソログを多数有しており(Tabunoki H et al, J. Biol. Chem. 2002:業績1)、遺伝子操作方法も既に確立されている(Xia, Q. et al., Science 2004、Tabunoki H et al, FEBS letters 2004:業績6)。日本は世界最大のカイコバイオ資源保有国であり、世界に先駆けて多種類の変異体を駆使した実験デザインを構築することが可能である。

カイコ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。我々が見出した変異体は、尿酸蓄積または尿酸生成が異常なため皮膚が油紙のように透けた状態をしており、尿酸代謝系に異常を来していることが報告されている(Tamura T, J.Seric.Sci.Jpn. 1999, Komoto N, Insect.Biol.Mol.Biol. 2002, 2003)。しかしながら、未だ大部分の油蚕原因遺伝子の産物が不明であり、尿酸代謝系の全貌は不明のままである。

一方、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病態進行のバイオマーカーになることが報告されている(Bogdanov M, Brain 2008)。また、血中尿酸値が高いPD患者は病気の進行が遅いことも報告されている(Weisskopf M.G, Am J Epidemiol. 2007)。このようにPD病態進行の機序に、尿酸代謝が関与していることは明らかである。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. 研究の目的

DJ-1の機能損失は、疾患発症の引き金になることが報告されているが、病態進行におけるその役割は未解明なままである。パーキンソン病(PD)患者の大規模メタボローム解析において、PD病態進行の機序に尿酸代謝が関与していることが報告されている。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無い。本研究では、哺乳動物モデル系では見出せなかったDJ-1の尿酸代謝系における役割を、プロテオームおよびバイオインフォマティクスのアプローチを用いて明らかにする。

### 2. 研究の方法

1. DNAマイクロアレイにより、尿酸代謝系に異常のあるカイコ変異体の遺伝子発現パターンを同定し、分子ネットワーク解析を行う。これにより、DJ-1と尿酸代謝系関連分子との関係を明らかにする。

2. プロテオーム解析により、DJ-1と相互作用する分子を同定する。分子間相互関係の情報と分子ネットワーク解析の情報から、DJ-1の発現を調節する分子も突き止めることが

出来、変異体の表現系と DJ-1 の関係、すなわち DJ-1 の尿酸代謝系における役割を確定する。

### 3. 研究成果

DJ-1 の機能損失は、神経変性疾患発症の引き金になることが報告されているが、病態進行におけるその役割は未解明なままである。本研究は哺乳動物モデル系では見出せなかった DJ-1 の尿酸代謝系における役割を、カイコモデル系を用いた解析により明らかにすることを目的とし、DJ-1 の機能を損失した変異体カイコを用いて DJ-1 の機能解析を行った。その過程において、カイコ DJ-1 (BmDJ-1) は①カイコ発生ステージおよび5 齢幼虫から成虫期間の主要な組織における BmDJ-1 の発現をウエスタンブロッティングで検討したところ BmDJ-1 の発現が日毎に変動すること、②Rotenone による酸化ストレスに対し、哺乳類と同様に抗酸化作用を持つこと、③BmDJ-1 は、NO 供与剤 ISDN 添加により酸化され、発現量が増加することを突き止めた。本研究成果は、PLoS ONE に投稿した (Tabunoki H et al, PLoS ONE 2011)。

正常と変異体カイコのマイクロアレイデータを KeyMolnet で解析するために、カイコとヒト遺伝子を対応させる解析パイプラインを構築した。続いて変異体と正常カイコのマイクロアレイデータを KeyMolnet で解析し、DJ-1 を上流とするユニークな尿酸代謝パスウェイを同定した。このパスウェイに関する遺伝子をリアルタイム PCR で検証したところ、変異体におけるすべての遺伝子発現が顕著に低下していた。さらには、変異体における DJ-1 の機能は、正常と比較して顕著に低下しており、DJ-1 の機能破綻により尿酸代謝系が異常を来していることが明らかとなった (Tabunoki H et al, 投稿準備中)。本研究成果は、PD と尿酸代謝系の関係を分子レベルで説明し、PD 発症と病態進行の機序解明に大きく貢献できると思われる。

### 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1件)

Tabunoki H, Ode H, Bannno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishi-Nozawa R, Satoh J.

BmDJ-1 Is a Key Regulator of Oxidative Modification in the Development of the Silkworm, *Bombyx mori*. PLoS ONE 査読有 6 巻 2011、e17683

[学会発表] (計3件)

① Tabunoki H, Bannno Y, Katsuma S,

Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Satoh J.

BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of silkworm, *Bombyx mori*.

Queenstown Molecular Biology (QMB) 2011, Aug/30/2011 Queenstown, NZ

② Tabunoki H, Bannno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Satoh J.

BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of silkworm, *Bombyx mori*.

Neuroscience 2011, Nov/14/2011

Washington DC USA

③ 天竺桂弘子、伴野豊、勝間進、嶋田透、佐藤準一

カイコ DJ-1 は NO により酸化される  
日本生化学会第 84 大会 2011.9.22  
京都

[図書] (計0件)  
該当なし

[産業財産権]  
○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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://www.my-pharm.ac.jp/~satoj/>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

天竺桂 弘子 ( TABUNOKI HIROKO )  
研究者番号：80434190

(2)研究分担者  
該当なし

研究者番号：

(3)連携研究者  
該当なし

研究者番号：