

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700389
 研究課題名（和文）
 DJ-1 の膜輸送に関する研究
 研究課題名（英文）
 DJ-1 associates with membrane trafficking system.
 研究代表者
 波田野 琢 (HATANO TAKU)
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号：60338390

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病はドパミン神経細胞が変性し脱落する、変性疾患である。多くの遺伝的素因などが関係しているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。本研究では常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因である DJ-1 蛋白の詳細な細胞内局在を検討した。DJ-1 は細胞質だけでなく顆粒状に局在する事が明らかとなった。詳細に検討すると一部は Golgi 装置、シナプス小胞に局在を認めることが示された。シナプス小胞に局在している DJ-1 に関して immunoisolation 法を用いて検討したところ、Rab-3A および synaptophysin と同じ局在を示した。さらに、Förster resonance energy transfer 法を用いて living cell における DJ-1 と synaptophysin との機能について検討したところ、一部は相互作用している事が示された。また、シナプトソームおよび培養細胞の膜を精製してリコンビナント DJ-1 を用いて膜と DJ-1 との結合に関して検討した。正常型 DJ-1 は蛋白を介さず膜へ直接結合しているが、病的変異体である L166P は膜結合能が低下しており、これによりパーキンソン病を発症している可能性が示された。今回の結果より、DJ-1 は膜輸送に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder caused by loss of dopaminergic neurons. Although many reports have suggested that genetic factors are implicated in the pathogenesis of PD, molecular mechanisms underlying selective dopaminergic neuronal degeneration remain unknown. DJ-1 is a causative gene for autosomal recessive form of PARK7-linked early-onset PD. In this project, my colleagues and I revealed that DJ-1 distributes to the cytosol and membranous structures in a punctate appearance in cultured cells and in primary neurons obtained from mouse brain. Additionally, DJ-1 colocalizes with GM130, synaptophysin and Rab3A. Förster resonance energy transfer analysis revealed that a small portion of DJ-1 interacts with synaptophysin in living cells. Although the wild-type DJ-1 protein directly associates with membranes without an intermediary protein, the pathogenic L166P mutation of DJ-1 exhibits less binding to synaptic vesicles. These results indicate that DJ-1 associates with membranous organelles including synaptic membranes to exhibit its normal function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：DJ-1, 家族性パーキンソン病, 膜輸送, シナプトソーム, synaptophysin, Rab3A

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は運動障害を前景に認める

神経変性疾患である。患者は運動障害だけでなく認知症や自律神経障害など様々な非運動症状をみとめるため、日常生活の質が著し

く低下する。多くは孤発性であり疾患の原因は不明の点が多いが、5-10%に明らかな原因遺伝子の変異により発症する事が知られている。これらの遺伝子がコードする蛋白の機能を解析することでパーキンソン病における黒質神経細胞死のメカニズムを解明できる可能性がある。そのなかで、DJ-1は常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の一つであるPARK7の原因遺伝子として同定されている。DJ-1蛋白は酸化ストレスやミトコンドリア機能に関連すると報告されており、孤発性パーキンソン病のバイオマーカーになり得ることが示されており、孤発性を含めこの蛋白の機能障害はパーキンソン病における黒質神経細胞死に関わる事が示唆される。

2. 研究の目的

DJ-1の正確な機能や細胞内局在については不明の点が多い。そのため本研究の目的は、1) DJ-1の細胞内局在を免疫細胞二重染色方や生化学的分画法を用いて詳細に検討する。2) DJ-1はシナプス小胞に局在するかどうかを生化学的に証明する。3) 膜輸送に関連する蛋白と相互作用するかどうか免疫沈降法およびFRET法をもちいて検討する。4) 野生体および病的変異体のDJ-1は膜に結合するかどうかに関して検討する。

3. 研究の方法

培養細胞を蛍光免疫細胞染色法でDJ-1および各細胞内オルガネラマーカーを染色した。共焦点顕微鏡を用いて細胞内局在を検討した。また、培養細胞をソニケーターで破碎し膜成分および細胞質成分に分画しwestern-blot法で局在を検討した。マウス脳について

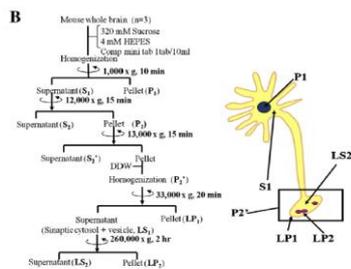
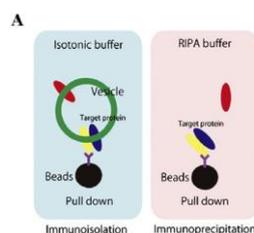


Fig 1 シナプトソーム分画法

DJ-1の局在を評価した。

シナプス小胞に局在していることを生化学的に証明するために synaptophysin で immunoisolation を行い DJ-1 が局在するかどうかを確認した。また、synaptophysin と相互作用するかどうかを確認するために immunoprecipitation を行い DJ-1 が直接結合するかどうか



かを確認した (Fig 2)。

Fig2 Immunoisolation/immunoprecipitation

また、相互作用は living cell で生じるかどうかについて FRET 法を用いて検討した。さらに DJ-1 の膜への結合能を確認するため GST-DJ-1 蛋白と培養細胞膜分画が結合するか検討した。

4. 研究成果

免疫染色では DJ-1 の免疫活性が細胞膜と細胞内に顆粒状に認め、細胞内の DJ-1 免疫活性は小胞

マーカーである Rab3A および VAMP2 と共局在していた。また、Golgi 装置のマーカーである GM130 とも共局在していた

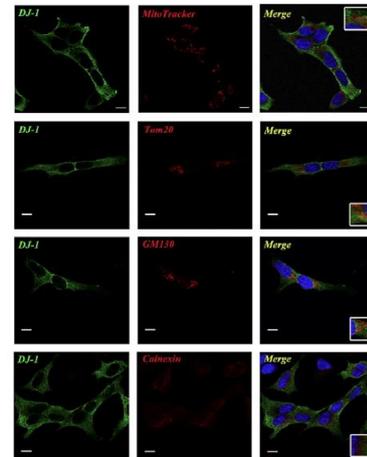


Fig3 DJ-1の細胞内局在

初代培養神経細胞による免疫染色およびマウス脳をシナプトソームに分画しwestern-blot法で確認したところ、細胞膜分画およびシナプス小胞分画に DJ-1 の免疫活性を認めた (Fig4)。

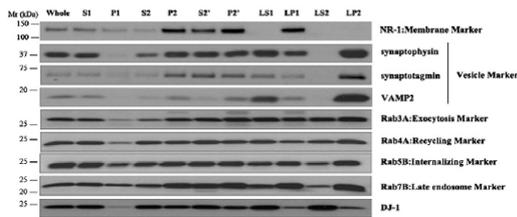


Fig4 DJ-1 はシナプトソームに局在する

上記より、DJ-1 は Golgi 装置やシナプス小胞といった膜系細胞小器官に局在する事を示した。Synaptophysin の抗体を用いて immunoisolation および immunoprecipitation を行ったところ DJ-1 は synaptophysin との直接結合は示せなかったが、synaptophysin が関係するシナプス小胞に局在していた (Fig5)。

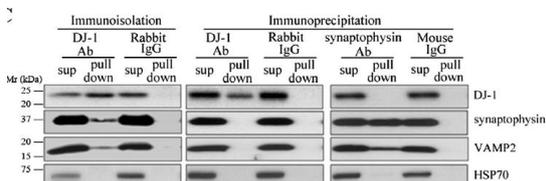


Fig5 DJ-1 はシナプトファイシンが局在するシナプス小胞に局在する

Living cell で synaptophysin と DJ-1 が結合するかどうか FRET 法で検討したところ、少ないながらも確実に一部の DJ-1 は synaptophysin と interaction する事が確認できた (Fig7)。

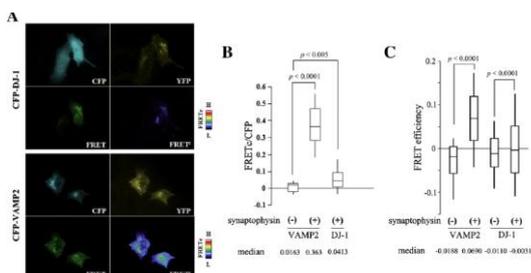


Fig7 DJ-1 とシナプトファイシンは相互作用さら

に野生体の GST-DJ-1 のリコンビナント蛋白は培養細胞膜に結合する事が示されたが、PARK7 の原因となる L166P 病的変異体は野生対と比較して膜への結合能は低下していた (Fig8)。

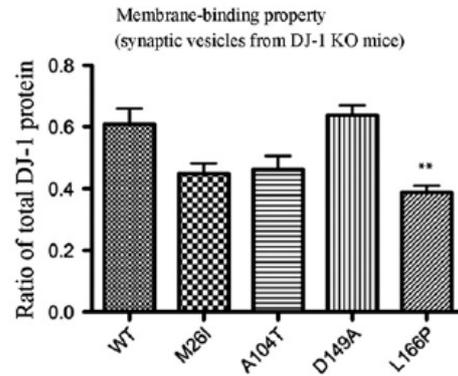


Fig8 L166P は膜結合能が低下する

上記の結果より、内因性 DJ-1 の一部は細胞膜・膜状小器官に局在していることから、DJ-1 は細胞内においてタンパク質の膜輸送系に深く関与している可能性が推察され、これらについて今後検討することにより、DJ-1-linked PD の発症機序解明につながるものと期待された。

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 12 件)

2012

- 1) Hatano T. PINK1 autophosphorylation facilitates Parkin recruitment to mitochondria: new insight in the mechanisms of quality control for mitochondria in young-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27:1613
- 2) Hatano T, Kubo SI, Nijima-Ishii Y, Hattori N, Sugita Y. Levodopa-responsive Parkinsonism following bilateral putaminal hemorrhages. *Parkinsonism Relat*

- Disord. 2012 in press.
- 3) Sekigawa A, Fujita M, Sekiyama K, Takamatsu Y, Hatano T, Rothenstein E, La Spada AR, Mashiah E, Hashimoto M. Distinct mechanisms of axonal globule formation in mice expressing human wild type α -synuclein or dementia with Lewy bodies-linked P123H α -synuclein. *Mol Brain* 2012;5:34.
Doi: 10.1186/1756-6606-5-34.
 - 4) Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27:1413-7
 - 5) Hasegawa T, Ichiba M, Matsumoto SE, Kasanuki K, Hatano T, Fujishiro H, Iseki E, Hattori N, Yamada T, Tabira T. Urinary homocysteic Acid levels correlate with mini-mental state examination scores in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 2012 Jan 1;31(1):59-64.
 - 6) Nagayama H, Kubo S, Hatano T, Hamada S, Maeda T, Hasegawa T, Kadowaki T, Terashi H, Yoshioka M, Nomoto N, Kano O, Inoue M, Shimura H, Takahashi T, Uchiyama T, Watanabe H, Kaneko S, Takahashi T, Baba Y; Young Japanese Expert Group for Parkinson's Disease and Movement Disorders: YJ-EXPANDS. Validity and reliability assessment of a Japanese version of the Snaith-Hamilton pleasure scale. *Intern Med.* 2012;51:865-9.
 - 7) Ujiie S, Hatano T, Kubo SI, Imai S, Sato S, Uchihara T, Yagishita S, Hasegawa K, Kowa H, Sakai F, Hattori N. LRRK2 I2020T mutation is associated with tau pathology. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18:819-23.
- 2011
- 8) Morita A, Okuma Y, Kamei S, Yoshii F, Yamamoto T, Hashimoto S, Utusmi H, Hatano T, Hattori N, Matsumura M, Takahashi K, Nogawa S, Watanabe Y, Miyamoto M, Hirata K. Pramipexole reduces the prevalence of fatigue in patients with Parkinson's disease. *Intern Med.* 2011;50:2163-8.
 - 9) Takeichi T, Takarada-Iemata M, Hashida K, Sudo H, Okuda T, Kokame K, Hatano T, Takanashi M, Funabe S, Hattori N, Kitamura O, Kitao Y, Hori O. The effect of Ndr2 expression on astroglial activation. *Neurochem International.* 2011;59:21-7.
 - 10) Hatano T, Shimada Y, Kono A, Kubo S, Yokoyama K, Yoritaka A, Nakahara T, Takahashi Y, Hattori N. Atypical Miller Fisher syndrome associated with glutamate receptor antibodies. *BMJ Case Rep* 2011 doi:pii: bcr0820103228.
10.1136/bcr.08.2010.3228.
 - 11) Hatano T. A novel protein degradation system in young-onset Parkinson's disease: mitophagy is a therapeutic target as a quality control for

damaged mitochondria. *Mov Disord*
2011;26:773

- 12) 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. *Neurobiol of Dis.* 2011;43:651-62.

[学会発表] (計3件)

- 1) 膜輸送の障害は **Lewy** 小体形成に関与するか. 波田野 琢, 久保 紳一郎, 高梨 雅史, 王子 悠, 森 聡生, 板谷 昌子, 服部 信孝 第52回日本神経学会 (東京国際フォーラム) 平成24年5月22-25日
- 2) DJ-1 の細胞内局在検討. 宇佐見 由紀子, 波田野 琢, 久保 紳一郎, 齋木 臣二, 佐藤 栄人, 大場 雄介, 有賀 寛芳, 服部 信孝 第52回日本神経学会 (名古屋) 平成23年5月18-20日
- 3) DJ-1 associates with synaptic membranes. Hatano T, Usami Y, Kubo SI, Saiki S, Sato S, Oba Y, Ariga H, Shen J, Hattori N. The movement disorders society' s 16th international congress of Parkinson' s disease and movement disorders (International Congress; Dublin Ireland) May 17 2013 - May 21 2013

[図書] (計2件)

- 1) Hatano T and Hattori N. Chapter 1. Etiology and pathogenesis of Parkinson' s disease. In: Rana AQ, ed. Etiology and pathophysiology of Parkinson' s disease. Rijeka: INTECH; 2011:1-14
- 2) Hatano T and Hattori N. Parkinson Disease. In eLS. Chichester: John Wiley & Sons; 2011: DOI: 10.1002/9780470015902.a0006026.pub2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波田野 琢 (HATANO TAKU)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60338390