

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790856

研究課題名(和文) パーキンソン病関連遺伝子 GIGYF2 のシグナル伝達における機能解析

研究課題名(英文) Investigation of effect of GIGYF2 on signal transduction

研究代表者

東 晋二 (HIGASHI SHINJI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員

研究者番号：30365647

研究成果の概要(和文)：PARK11 関連のパーキンソン病(PD)より同定・分離された GIGYF2 の機能解析を行った。GIGYF2 は膵臓、精巣、脳を含め幅広く発現し、細胞内では主に Rab4 陽性リサイクリングエンドゾームに局在していた。GIGYF2 は主にインスリン様成長因子-1 の刺激において ERK1/2 のシグナル伝達を増幅させるが、この機序として GIGYF2 による膜輸送動態の変化が影響していると考えられた。黒質での発現が微弱であり、PD 脳内でもレビー病変への局在はみられず、報告された遺伝子変異体でもシグナル伝達への影響は確認されなかったことから、PD 発症への関与を評価するには更なる報告が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：GIGYF2 has been reported as a candidate gene for PARK11-linked Parkinson's disease (PD). GIGYF2 was widely expressed, most highly in the pancreas and testis, and moderately in brain. GIGYF2 was present in Rab4-positive endosomes. Expression of GIGYF2 altered insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor trafficking and enhanced IGF-1-induced ERK1/2 activation. We failed to find any differences in IGF-1-induced signaling between cells expressing wild-type and mutant GIGYF2 and observed only minimal expression of GIGYF2 in the nigrostriatal pathway, indicating no contribution of GIGYF2 to the pathogenesis of PD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) はアルツハイマー病に次いで多い加齢性神経変性疾患であり、人口 10 万人に 100 人程度の割合で発症する比較的頻度の多い疾患であるが、その発症機序の多

くは不明であり、実際の治療法はドーパミン補充などの対症療法に留まっているのが現状である。2008 年 4 月に家族性 PD の原因遺伝子として報告された GIGYF2 は、主に常染色体優性遺伝の形式で罹患し、臨床症状や発症年齢は孤発性の患者群と非常に酷似

している。これらのことから、GIGYF2 の分子生物学的な機能の解明は PD の病態機序の理解や新規治療法の開発において重要な情報を与えると考え、研究課題とした。

## 2. 研究の目的

GIGYF2 はその機能のほとんどが知られていない未知の物質である。唯一報告されている機能が受容体型チロシンキナーゼのシグナル伝達に關与するアダプターたんぱく質の1つである Grb10 と結合することから、細胞の分化や発達、もしくは細胞死とも関連していると考えられている。以上より、GIGYF2 は少なくともインスリンや IGF-1 などを含めた細胞内シグナル伝達の制御と關与していることが想定される。インスリン/IGF-1 シグナルは代謝系疾患との関連に加え、加齢性変化やヒトの長寿など多くの機能と関わり合っているとされている。今回の目的は、この GIGYF2 の発現がシグナル伝達系にどのような影響を与えているのかを調べることであり、また、その GIGYF2 の機能がパーキンソン病の病態に与える影響についても考察を行うために、野生株と変異株の機能変化や PD 患者の脳内での変化についても検討を行う予定である。

## 3. 研究の方法

(1)GIGYF2 の機能を調査するために、2 種類の抗ウサギポリクローナル GIGYF2 抗体を作成した。これらの抗体はヒト、マウスの検体を使用したウエスタンブロット法にて、想定される分子量に一致して GIGYF2 を特異的に認識した。この抗体を使用した免疫染色法、ウエスタンブロット法にて、マウスの臓器ごとの発現量の差異、マウス・ヒト脳内の発現分布、培養細胞やマウス・ヒト神経細胞の細胞内局在を同定する。

(2)GIGYF2 を強発現、もしくは siRNA により発現抑制させた細胞系を用い、IGF-1 シグナル伝達経路でどのような影響が出現するのか、また、これが報告された PD 関連遺伝子変異で影響があるのかを調査する。

(3)PD 患者剖検脳を使用した免疫染色やウエスタンブロット法を用い、GIGYF2 がレビー病変などの不溶性封入体に關与しているかを検索する。

## 4. 研究成果

(1)GIGYF2 はマウスにおいて、膵臓と精巢に強く発現していた。その他、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺など、幅広く各臓器に発現していた。反面、筋肉や脂肪組織への発現は微弱であった。このように、GIGYF2 は臓器ごとで発現量に差異が認められた。

(2)マウス脳内では主に大脳皮質、海馬アンモン角、齒状回の顆粒細胞、小脳プルキンエ細胞、嗅球の僧帽細胞、三叉神経運動核や顔面神経核などの脳幹の神経細胞の細胞質や近位樹上突起に発現していた。これらの神経細胞や培養細胞内の GIGYF2 免疫陽性像は細かい顆粒状を呈しており、これは Rab4 の免疫陽性像と共局在していたことから、主に GIGYF2 はリサイクリングエンドソームに局在していると考えられた。

(3)マウス脳を濃度の異なるショ糖溶液を用いて細胞成分ごとに分画抽出したところ、GIGYF2 は他の膜タンパク質が存在する S3 分画(0.32M ショ糖溶液で 100,000g で遠心した上清成分)に特異的に存在した。この分画内の GIGYF2 は 1%のトライトン-X100 で膜成分から分離されるが、高濃度の塩では分離されないことから、内在性膜タンパク質のように強固に膜成分と結合していると考えられた。

(4)GIGYF2 を強発現させた培養細胞 (Neuro2a 細胞、HeLa 細胞、HEK293T 細胞、COS-7 細胞)では、GIGYF2 陽性のリサイクリングエンドソームの拡大が認められる。これに一致して、内在性の IGF-1 受容体の局在の変化が認められる。このことは、GIGYF2 が細胞内の膜輸送、特に IGF-1 受容体のようなシグナル伝達に關わり合う受容体輸送やその分解の制御と關わり合っていることを示唆すると思われた。

そこで GIGYF2 の発現量増加によって受容体膜輸送が変化したときのシグナル伝達への影響を調べた。GIGYF2 が強発現された HEK293T 細胞を一晩無血清培地で培養し、100ng/ml の IGF-1 を添付した後に IGF-1 受容体と、その下流にあたる Akt と ERK1/2 のリン酸化をウエスタンブロット法で定量したところ、GIGYF2 の発現は IGF-1 受容体と Akt 受容体のリン酸化に影響を与えなかったが、ERK1/2 のリン酸化を有意に増強した。siRNA のトランスフェクションによって GIGYF2 が発現抑制された HEK293T 細胞においても、IGF-1 受容体と Akt のリン酸化には変化が認められなかったが、ERK1/2 のリン酸化の有意な抑制が認められた。ERK1/2 は Akt と異なり細胞膜直下の IGF-1 受容体のみならずエンドソームとして取り込まれた後の IGF-1 受容体からも影響を受けることが知られている。このことから、GIGYF2 のシグナル伝達経路への選択的な影響は、エンドソームの膜輸送の変化と関係していることが考えられた。これは、最初のリガンドの刺激により、下流の枝分かれしたいくつかのシグナル伝達がその後どのようにそれぞれ制御されるかについて証明した重要な所見であろう。

一方、家族性 PD を引き起こすと報告された遺伝子変異型、N56S と N478T の GIGYF2 ではこれらのシグナル伝達系に変化はみられなかった。

(5) PD とレビー小体型認知症の剖検脳を使用し GIGYF2 の発現を調べたが、これらの疾患の神経病理学的診断特徴であるレビー小体やレビー関連神経突起に GIGYF2 の局在は認められなかった。また、レビー小体型認知症の下側頭回を使用し、ウエスタンブロット法にて1%トライトン X-100 不溶性成分における GIGYF2 の発現を調べたが、正常対象群と比較して疾患群で有意な不溶化は認められなかった。PD は黒質緻密部のドーパミン細胞の変性により線条体のドーパミン量が減少することによりパーキンソニズムを呈する疾患であるが、その黒質緻密部と線条体で GIGYF2 の発現は微弱であった。このように本研究では GIGYF2 と PD の病態機序において有意な結果は得られず、GIGYF2 が真に PD の原因遺伝子であるかは再考が必要と考えられ、遺伝研究によるさらなる証明が必要であると考えた。

(6) 今回の研究により、IGF-1 などの受容体型チロシンキナーゼのシグナル伝達に関与する GIGYF2 の局在と機能が明らかとなった。GIGYF2 は脳内で特有の発現分布を示すことから脳機能において重要な役割を果たすことが推測されるとともに、インスリン関連シグナルの調整機能や膵臓での強い発現から代謝性疾患の病態関与の研究や治療法開発などでも将来的な展望が期待される。また GIGYF2 の局在を調べることによって受容体のエンドサイトーシスによる内在化とその後の膜輸送、特に膜のリサイクリングなどの調整に関与していることを示し、一方で受容体刺激後の下流のシグナル伝達分子を選択的に調整していることを明らかにした。このように、膜輸送とシグナル伝達経路の関係を詳細に示したことは、今後の分子生物学研究に多くの示唆を与えることが期待される。

家族性 PD の家系は世界中で報告されているが、その家系数は必ずしも多くなく、病態機序の理解と新規治療法の開発に向けて正確な情報が求められている。PARK11 と呼ばれる遺伝子座位から同定された GIGYF2 が真に PD の原因となっているのかは、PD を含めた加齢性神経変性疾患の病態機序を理解する上で重要である。本研究は、世界で初めて、PD との関連が報告された遺伝子変異が GIGYF2 の分子生物学的機能に影響を与えるのか、GIGYF2 が PD の患者脳内で生化学的、神経病理学的に変化しているのかを明らかにした報告となった。これは今後の遺伝学的、分子生物学的な神経変性疾患研究において

示唆に富んだ知見であると思われる。

## 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 6 件)

- ① Higashi S, Moore DJ, Minegishi M, Kasanuki K, Fujishiro H, Kabuta T, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Hino H, Kosaka K, Sato K, Arai H, Wada K, Iseki E. Localization of MAP1-LC3 in vulnerable neurons and Lewy bodies in brains of patients with dementia with Lewy bodies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 査読有 70 巻 2011 年 264-280
- ② 東晋二、井関栄三 レビー小体型認知症と遺伝要因 老年精神医学雑誌 査読無 22 巻 2011 年 93-98
- ③ Higashi S, Tsuchiya Y, Araki T, Wada K, Kabuta T. TDP-43 physically interacts with Amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant CuZn superoxide dismutase. *Neurochemistry international*. 査読有 57 巻 2010 年 906-913
- ④ 東晋二、井関栄三 妄想性障害と若年性認知症をどう診分けるか-レビー小体病を中心に- 精神科治療学 査読無 25 巻 2010 年 1305-1309
- ⑤ Higashi S, Iseki E, Minegishi M, Togo T, Kabuta T, Wada K. GIGYF2 is present in endosomal compartments in the mammalian brains and enhances IGF-1-induced ERK1/2 activation. *Journal of Neurochemistry*. 査読有 2010 年 115 巻 423-437
- ⑥ Higashi S, Moore DJ, Yamamoto R, Minegishi M, Sato K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Hino H, Kosaka K, Emson PC, Wada K, Dawson VL, Dawson TM, Arai H, Iseki E. Abnormal localization of LRRK2 to the endosomal-lysosomal compartment in Lewy body disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 査読有 2009 年 68 巻 994-1005

[学会発表] (計 2 件)

- ① Higashi S, et al., GIGYF2 is present in endosomal compartments in the mammalian brains and enhances IGF-1-induced ERK1/2 activation. 14<sup>th</sup> European Federation of Neurological Societies (EFNS) Congress. 2010 年 9

月 26 日 スイス ジュネーブ Palexpo  
Congress Centre

- ② 東晋二 他 レビー小体型認知症患者剖  
検脳における LRRK2 のエンドソームコン  
パートメントへの局在 第 50 回日本神経  
病理学会 2009 年 6 月 6 日 香川県高松市  
サンポートホール高松・かがわ国際会議  
場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 晋二 (HIGASHI SHINJI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神  
医学総合研究所・研究員  
研究者番号：30365647

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

井関 栄三 (ISEKI EIZO)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：30203061

Moore Darren

ローザンヌ工科大学・ブレインマインド研  
究所・准教授