

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2014
 課題番号：25860389
 研究課題名(和文) V1のアクチン重合依存的なドパミン生合成酵素発現増強機構のパーキンソン病治療応用

研究課題名(英文) Therapeutic application of V-1 gene-dependent mechanism to Parkinson's disease potentiating dopamine biosynthesis coupled with actin dynamics

研究代表者
 川畑 伊知郎 (Kawahata, Ichiro)
 東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30579743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では申請者が明らかにしたV-1のドパミン(DA)生合成酵素群の遺伝子発現における生理機能発現機序について検討を行いパーキンソン病治療応用を目的とした。その結果V-1の生理機能発現には相互作用因子であるCPとの複合体形成、およびV-1アミノ酸残基44番が必須であることを明らかにした。またV-1はRhoA/Rac1/mDiaを協調的に活性化することでアクチン重合を促進しMAL/SRFシグナルを増強した。さらにV-1依存的に発現増強されるDA作動性マーカー群のプロモーター領域においてSRF応答配列の同定に成功し、これらのV-1機能発現機序がマウス生体レベルでも機能していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we demonstrated the molecular mechanism of V-1 gene to regulate the expression of DA biosynthesizing enzymes, aiming the clinical application of V-1 gene therapy. We identified that V-1 requires CP to form the complex at its 44 residue to maintain TH/AADC/Nurr1 expression. Also, V-1 coordinately potentiates RhoA/Rac1/mDia activity to accelerate actin polymerization accompanied by the augmentation of MAL/SRF-mediated transcription. We further successfully identified the CARG box in TH/AADC/Nurr1 promoter region. Finally our biochemical and immunohistochemical analysis revealed that these V-1 cascades are functional in vivo too.

研究分野：神経科学・応用薬理学

キーワード：V-1遺伝子 チロシン水酸化酵素 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 ドーパミン Nurr1 アクチン重合 RhoA パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴いパーキンソン病患者の増加は深刻な社会問題である。最近の研究によりパーキンソン病患者の脳内におけるドパミン (DA) 量減少に起因する生合成律速酵素チロシン水酸化酵素 (TH) の過剰なリン酸化とその分解 (Kawahata *et al.*, 2009 他) や、パーキンソン病の進行に伴う神経線維のアクチン脱重合による神経変性が認められ、パーキンソン病の臨床学的症状である運動機能の低下を引き起こすことが明らかになってきた。現在、パーキンソン病の L-DOPA をはじめとする対症療法は存在するが根本的治療法の確立には至っていない。より単純な治療法による脳内 DA 生合成関連酵素群量の回復と DA 量回復を伴う根本的治療の開発が期待されている。

2. 研究の目的

申請者は「V1 のドパミン生合成酵素群の発現制御機構を標的にした新規パーキンソン病治療法開発」(研究課題番号 23790594) において、V-1 遺伝子が RhoA 活性上昇によるアクチン重合促進依存的な MAL/SRF (血清応答因子) シグナルの増強により DA 生合成酵素群であるチロシン水酸化酵素 (TH)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) および DA 作動性マーカーである Nurr1 の発現を増大させる分子メカニズムを、PC12D 細胞および初代培養 DA 作動性ニューロンを用いて明らかにした。そこで本研究では、これまでに明らかにした V-1/actin capping protein (CP) 複合体による DA 作動性マーカーの統合的増強メカニズムの生体レベルにおける生理機能機序を、新規各種 V-1/CP 変異体および同発現レンチウイルスベクターを用いて解析し、V-1 のアクチン重合促進と DA 生合成酵素群の発現レベルおよび DA 量増大の統合的生理機能を利用した、パーキンソン病治療におけるより有用な治療法応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) V-1/CP 複合体による RhoA 活性制御の分子機序の検討

申請者は V-1 遺伝子が RhoA 活性を上昇させることをこれまでに見出したが、その分子機序は明らかでなかった。そこで本研究において各種 V-1 変異体および V-1 相互作用タンパク質である CP 変異体を作成し、PC12D 細胞および HeLa 細胞を用いて分子生物学的解析を行った。さらに active Rho および Rac pulldown assay により V-1/CP 複合体の生理

機能発現機序に必要なアミノ酸残基の生化学的および免疫細胞化学的解析を行った。

(2) 新規 V-1 変異体発現ベクターを用いた各種 DA 作動性マーカーおよび SRF 依存的転写活性の検討

V-1/CP 依存的な Rho/mDia/LIMK シグナルの増強が MAL/SRF 依存的シグナルカスケードにもたらす影響を、分子生物学的、生化学的、および免疫細胞化学的解析により検討した。具体的には TH および AADC のプロモーター活性変異レポーター発現プラスミド、V-1/CP 変異体発現ベクター、MAL/SRF の変異体発現ベクターを用い、TH、AADC、SRF 依存的転写活性および MAL の核内移行を解析することで、V-1 依存的 DA 作動性マーカーの発現カスケードを検討した。

(3) ChIP-qPCR による TH、AADC および Nurr1 における V-1 依存的 MAL/SRF 応答配列の検討

申請者は想定される TH、AADC および Nurr1 のプロモーター領域における V-1 応答性を持つ MAL/SRF 応答配列を同定するために特異的 primer を設計し、ChIP-qPCR 法により V-1 応答性を有する CArG 領域の同定を行った。

(4) MPP+処置ドパミン作動性ニューロンにおける V-1 遺伝子導入のドパミン作動性マーカー群発現量変化と神経保護作用の検討

初代培養 DA 作動性ニューロンに MPP+処置を行い、神経変性による DA 量低下状況下において、V-1 遺伝子導入による DA 作動性マーカー群の発現量回復効果を生化学的および免疫細胞化学的解析により検討する。

(5) *In vivo* における V-1 依存的 DA 作動性マーカー発現制御の情報伝達機構の生化学的解析

タグ結合 V-1 発現レンチウイルスベクター (野生型および変異型) を設計作製し、C57BL/7 マウス脳内に投与した。脳内投与 1 カ月後に還流固定し、スライス切片を作成後黒質部分をパンチアウトして V-1 シグナルカスケードおよび各種 DA 作動性マーカーの発現レベル変化を Western blot 法による生化学的解析により検討した。

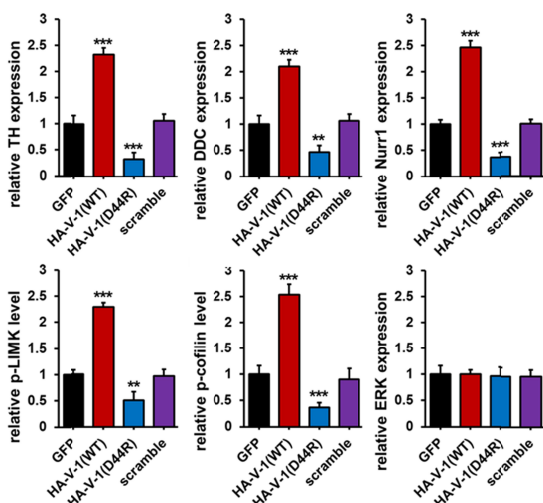
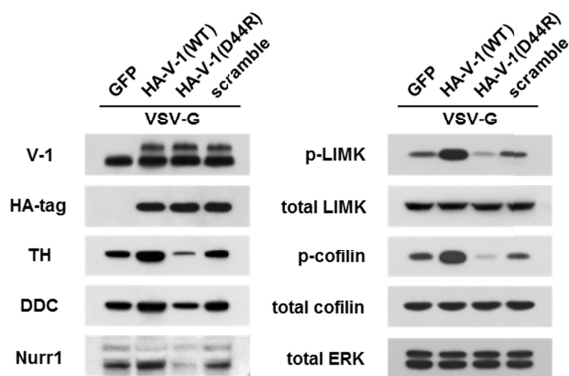
(6) *In vivo* における V-1 依存的 DA 作動性マーカー発現制御の情報伝達機構の免疫組織化学的解析

野生型および変異型 V-1 発現レンチウイルスベクターを脳内投与した還流固定済み C57BL/7 マウス中脳部位からスライス切片を作成し、V-1 シグナルカスケードおよび各種

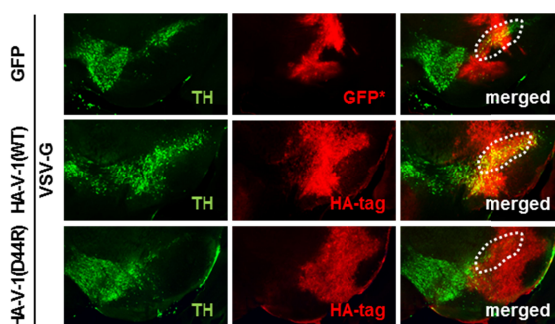
DA 作動性マーカーの発現レベル変化を蛍光多重染色による免疫組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

申請者は、パーキンソン病患者において低下が報告されているアクチン重合機能および DA 生合成酵素群の発現レベルに着目し、新規 V-1/CP 複合体によるそれらの統合的再活性化機構を明らかにして、パーキンソン病の新たな根本治療法への応用にむけた生体レベルでの V-1/CP 生理機能発現機序の解明を行った。その結果、V-1 遺伝子の生理機能発現には CP が必須であり、特に V-1/CP 複合体の形成が重要であることが明らかになった。さらに V-1 の 44 番アミノ酸残基が CP との結合に最重要であり、この変異体 V-1 発現ベクターの導入は RhoA、Rac1 の活性を低下させアクチン重合が減弱することを明らかにした。V-1/CP 複合体は RhoA/mDia/LIMK 経路の活性化により MAL/SRF 依存的転写活性を促進し、SRF の TH、AADC および Nurr1 のプロモーター領域における V-1 依存的な結合を増大することを明らかにした。また TH、AADC および Nurr1 プロモーター領域内の CArG box の同定にも成功し、V-1 による DA 作動性マーカーの発現制御機構を示した。



また培養 DA 作動性ニューロンにおいて MPTP 処置処置を行うと神経変性が起こることが知られるが、V-1 遺伝子の導入は DA 作動性マーカーの発現量、すなわち TH、AADC、Nurr1 および DAT、VMAT2 発現レベルを回復させた。さらに in vitro 系で明らかになった V-1 シグナルカスケードは in vivo でも機能しており、この生理機能発現には V-1 の 44 番アミノ酸残基が重要であることを明らかにした (論文投稿中)。本研究の結果により、これまで着目されてこなかった V-1 依存的な DA 生合成酵素群の発現増強メカニズムが明らかとなり、さらに V-1/CP 複合体の生理機能発現に必要な分子機序を in vitro および in vivo で明らかにすることができた。



この成果から、V-1 のアクチン重合と DA 生合成酵素群発現の再賦活化機能におけるパーキンソン病治療応用が提唱できたと考える。今後、この V-1 シグナル増強機能をさらに最適化、高効率化し、安全性を実証するために詳細な検討を行う予定である。

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)

1. Ichiro Kawahata, Biosynthetic and degradative regulation of nigrostriatal dopaminergic function - novel concept for the dopaminergic selective neurodegeneration and fundamental therapy of Parkinson's disease. Biogenic Amines. *in press*. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 川畑 伊知郎、延新 来、大宅 史織、森田 淳一、加藤 茂樹、富岡 佳久、田淵 明子、福地 守、津田 正明、一瀬 千穂、近藤 一直、泉 安彦、久米 利明、赤池 昭紀、大

橋 一正、水野 健作、一瀬 宏、小林 和人、山国 徹「V-1 遺伝子によるアクチン重合依存的な黒質線条体ドパミン合成酵素群の統合的新規発現制御機構」第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、横浜。(O2-I-6-1)

2. 川畑 伊知郎、大宅 史織、来 延新、森田 淳一、田淵 明子、津田 正明、一瀬 宏、加藤 成樹、小林 和人、泉 安彦、久米 利明、赤池 昭紀、富岡 佳久、山国 徹「V-1 によるアクチン重合依存的な黒質線条体ドパミン合成酵素群の発現制御機構」第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台。(O1F-5-3)
3. Ichiro Kawahata, Shiori Ohtaku, Yanxin Lai, Junichi Morita, Shigeki Kato, Akiko Tabuchi, Masaaki Tsuda, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Yasuhiko Izumi, Toshiaki Kume, Akinori Akaike, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Ichinose, Kazuto Kobayashi, and Tohru Yamakuni. V-1 maintains and augments nigrostriatal dopaminergic function through actin polymerization *in vitro* and *in vivo*. Neuroscience 2013, November 9, 2013, San Diego, USA. (Nanosymposium 10.05)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東北大学 大学院 薬学研究科
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川畑 伊知郎 (KAWAHATA ICHIRO)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：30579743

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：