

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07830

研究課題名（和文）パーキンソン病原因遺伝子が α -synuclein凝集・伝搬に関わる分子機序の解明研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of Parkinsons disease causative genes of α -synuclein aggregation and propagation

研究代表者

井下 強（Inoshita, Tsuyoshi）

順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：20601206

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患パーキンソン病の発症機序解明のため、原因遺伝子間の相関解明を試み、LRRK2遺伝子が、他の原因遺伝子と相関することを特定した。また、LRRK2を含む複数の原因遺伝子の機能欠失が、酸性オルガネラに局在し、神経伝達物質を含む有芯小胞にも局在するsmall GTPase, Arl8の神経細胞での局在異常を引き起こすことを明らかにした。Arl8のシナプス終末での集積が、有芯小胞の順行輸送の過剰な亢進によるものであり、Rab3, unc-104の関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、細胞内のオルガネラ動態制御に関わるPD関連遺伝子の相関関係を明らかにし、より中心的な役割を持つ遺伝子としてLRRK2を特定した。さらに、他のPD関連遺伝子の機能欠失単独でも起きるArl8の動態異常に関わる分子機構として、unc-104を介した有芯小胞の順行輸送を特定したことで、この分子機構の正常化がPD患者へのより広範な治療法に繋がること期待できる。適切な治療標的の最適な治療法の特定が難しいPDの研究や新規治療法開発において、順行輸送のさらなる研究やその正常化を可能にする新規薬剤の開発は、PDの新規治療法の発見に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the pathogenesis of the neurodegenerative disease Parkinson's disease, we attempted to clarify the correlation between the causative genes, and identified that the LRRK2 gene correlates with other causative genes. In addition, functional deletion of multiple causative genes including LRRK2 causes accumulation of small GTPase, Arl8, which is localized in acidic organelles and also in dense-core vesicles containing neurotransmitters. This study found that the accumulation of Arl8 at synaptic terminals was due to excessive enhancement of anterograde transport of cored vesicles, and the involvement of Rab3 and unc-104.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 神経科学 小胞輸送 LRRK2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢化が進む本邦では、加齢を発症要因とする神経変性疾患であるパーキンソン病(以下 PD)の患者は増加している。PD を発症すると、運動障害や非運動性の障害が生じるが、根本的な治療法は、未だ確立されておらず、症状の進行を遅らせることしかできていない。そのため、早期発見や予防、新規治療法の研究が進められている。

PD では、中脳黒質での シヌクレインの蓄積とドーパミン神経の変性、脱落が病理的特徴であるが、患者の 9 割は孤発性であり、発症原因の特定には至っていない、残りの 1 割は、家族性であり、その遺伝子解析から、20 個を超える原因遺伝子やリスク遺伝子が同定されている。こうした遺伝子の機能を解明することは、PD の発症機序解明や新規治療法の発見につながると考えられる。申請者の所属グループでは、培養細胞や実験動物であるショウジョウバエを用いて PD の原因遺伝子やリスク遺伝子の機能解析を行ってきた。

(2)

申請者は、ショウジョウバエを用いることで PD の原因遺伝子 Vps35 の機能を解析し、Vps35 と別の PD 原因遺伝子 LRRK2 との遺伝的相関を明らかにした(文献 1)。Vps35 も LRRK2 も神経細胞において神経伝達物質の放出を担うシナプス小胞の動態を制御している遺伝子であるが、その分子機能は異なる。また、他の PD 関連遺伝子にも細胞内のオルガネラ動態制御に関わる遺伝子が複数含まれていることから、それらの遺伝子に関わる共通した分子機構に生じる異常が PD の発症に関わる可能性が推察されていたが、その分子機能の特定には至っていなかった。PD 関連遺伝子が共通して関わる分子機能を特定し、その中でより重要な分子を特定することで、PD の新規治療標的を探索することが期待されていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、20 個以上の PD 関連遺伝子のうち、細胞内のオルガネラ動態制御に関わると考えられる遺伝子のうち、8 個の遺伝子に着目し、以下の 4 項目を明らかにすることを目的とした。1) 複数の PD 遺伝子に関わる分子機構の特定、2) より重要なカギとなる遺伝子の特定、3) カギとなる遺伝子の分子機構に関わる新規遺伝子の探索、4) カギとなる遺伝子や新たに特定する関連遺伝子の機能阻害により生じる神経機能異常の解明を目指し、研究を進めた。

3. 研究の方法

本課題では、主にショウジョウバエの神経細胞を用いて、免疫染色や電子顕微鏡による分子動態、オルガネラ動態の可視化、電気生理学的記録による神経機能の解析、生体イメージングによる細胞機能の解析、行動実験による生理機能の解析を行った。

1) ショウジョウバエは、全ゲノム配列が既に読まれており、PD 関連遺伝子の相同遺伝子のほとんどが同定されている。また、分子遺伝学的手法が確立され、任意の遺伝子の機能欠失体や遺伝子組み換え体の作製が容易である。そこで、8 個の PD 関連遺伝子、Vps35、LRRK2、Vps13、Auxilin、Synaptojanin、INPP5F、FRME-8、Rab32 の機能欠失体入手し、神経細胞におけるオルガネラの局在や電気生理学的神経応答の解析を行った。

ショウジョウバエの幼虫の運動神経は、細胞体が中枢にあり、軸索が各体節の神経筋接合部に伸び、神経筋接合部にはシナプス終末がある。免疫染色を行うことで、細胞体から軸索、シナプス終末までの分子の局在を可視化することが可能である。細胞内の各オルガネラのマーカーとなる分子の抗体を入手し、免疫染色により運動神経内の局在を調べ、PD 関連遺伝子の機能欠失体で生じるオルガネラ局在異常を解析した。また、電気生理学的手法により、運動神経の神経応答を記録可能である。PD 関連遺伝子の機能欠失体から神経機能に異常が生じる遺伝子の探索を進めた。

2) 神経細胞内でのオルガネラ局在異常や神経機能異常を引き起こす PD 遺伝子の機能欠失体同士の交配を行い、PD 関連遺伝子の機能欠失の組み合わせにより、1) の手法でオルガネラ局在や神経機能の異常が増悪/改善する組み合わせを探索し、8 個の PD 関連遺伝子間の遺伝的相関を調べた。さらに、より重要な遺伝子を特定し、電子顕微鏡による超微細構造の解析によりどのオルガネラ局在に異常が生じているかを明らかにした。

3) 特定したカギとなる遺伝子の分子機構やその機能欠失により生じるオルガネラ局在や、神経機能に関わる遺伝子の機能欠失や変異体、遺伝子組み換え体を用いて、カギとなる遺伝子と遺伝的相関がある遺伝子の特定を進めた。オルガネラの動態を可視化可能な蛍光タンパク質をつなげた遺伝子組み換え体を利用することで、生体内でのオルガネラの局在を可視化し、カギとなる遺伝子の機能欠失により生じるオルガネラ動態異常を解析し、そこに関連する新たに特定した遺伝子の発現調節による改善効果を明らかにした。

4) 特定したカギとなる PD 関連遺伝子や関連遺伝子の欠失や発現調節が行動異常を生じることを行動実験により特定し、運動機能異常原因となることを明らかにした。

4. 研究成果

研究の主な成果

1) まず、8 個の PD 関連遺伝子の機能欠失体の幼虫運動神経におけるオルガネラの局在異常を免疫染色により解析した。ミトコンドリアや小胞体、リソソームなどのオルガネラマーカーとなる抗体を用いて、PD 関連遺伝子の機能欠失により局在異常が生じる遺伝子を探索したところ、リソソームやシナプス小胞などの酸性オルガネラの動態制御を制御している small GTPase, Arl8 の局在が、複数の PD 関連遺伝子の機能欠失で変化していた。LRRK2 や Vps35, Auxilin, INPP5F の機能欠失体では、より中枢から遠いシナプス終末で Arl8 の集積が生じていた (図 1)。また、これら遺伝子の機能欠失体では、電気生理学的神経活動にも異常が生じており (図 2)、Arl8 の動態制御に複数の PD 関連遺伝子が関わり、その異常が神経機能の異常につながる可能性が示唆された。

2) そこで、Arl8 の局在に関わる PD 関連遺伝子機能欠失系統同士を交配させ、2 つの PD 関連遺伝子の機能欠失を組み合わせた時の Arl8 の局在を観察し、Arl8 のシナプス終末での集積に対し、遺伝的相関により改善 / 増悪する組み合わせを探索した。その結果、LRRK2 の機能欠失と Auxilin, INPP5F の機能欠失の組み合わせで、Arl8 の集積が増悪していた。また、INPP5F, Vps35, RME-8 の遺伝子組み換え体を用いて、LRRK2 の機能欠失体にこれら遺伝子の異所発現を行うことで、LRRK2 機能欠失により生じる Arl8 の集積を改善できた。こうした結果から、細胞内の小胞動態制御に関わる PD 関連遺伝子のなかで LRRK2 がより重要なカギとなる遺伝子であることが示唆された。

3) LRRK2 が、カギとなる遺伝子であり、Arl8 の動態制御に関わることが示唆されたことから、LRRK2 の機能欠失や病原性変異体の発現と Arl8 局在異常、それに関連するオルガネラ動態異常や関連分子の特定を進めた。家族性 PD 患者の遺伝子解析から、複数の LRRK2 病原性変異が報告されている。そこで、LRRK2 の病原性変異の遺伝子組み換え体入手し、その発現がシナプス終末での Arl8 集積を生じるかを解析した。その結果、LRRK2 の病原性変異体の発現は、LRRK2 の機能欠失体同様、シナプス終末での Arl8 集積を生じていた。一方、野生型の LRRK2 を過剰発現しても Arl8 集積は生じないことから、LRRK2 の量的変化ではなく、機能に関わる変異が Arl8 集積を生じていることが示唆された。また、Arl8 集積が生じているシナプス終末の超微細構造を電子顕微鏡と免疫染色を組み合わせた光電子相関顕微鏡法で観察したところ、神経伝達物質のうちドーパミンなどのモノアミンを含む有芯小胞の集積が観察された (図 2)。Arl8 の集積が生じる Auxilin や INPP5F, Vps35 の機能欠失体のシナプス終末では、有芯小胞の有意な増加が生じていた。そこで、有芯小胞の動態を観察し、有芯小胞のシナプス終末での集積の原因を解析した。蛍光タンパク質 GFP を Arl8 に繋げた遺伝子組み換えタンパク質をショウジョウバエ幼虫の運動神経で発現させ、生体の運動神経軸索での Arl8 の動態を観察したところ、LRRK2 の機能欠失によって順行性の Arl8 シグナルの輸送が増加していたが、逆行性の輸送には影響がなかった。こうした結果から、順行性の有芯小胞の輸送が増えた結果、シナプス終末における有芯小胞の集積が起きていると推測された。

Arl8 の集積が順行性軸索輸送の亢進によるものと考えられることから、有芯小胞の輸送に関わる遺伝子と LRRK2 の相関を調べた。Rab GTPase は、様々なオルガネラの局在に関わるが、その中の Rab3 は、神経伝達物質を含むシナプス小胞や有芯小胞の輸送に関わることが知られている。そこで、Rab3 のキナーゼ活性が Arl8 の輸送に関わることを解析したところ、Rab3 の活性依存的な順行性輸送の制御と LRRK2 との遺伝的相関が示唆された。さらに、軸索輸送に働くモータータンパク質 unc-104, khc, glued と LRRK2 の相関を Arl8 の集積を指標に解析したところ順行性輸送に関わる unc-104 だけが LRRK2 と相関することが示唆された。

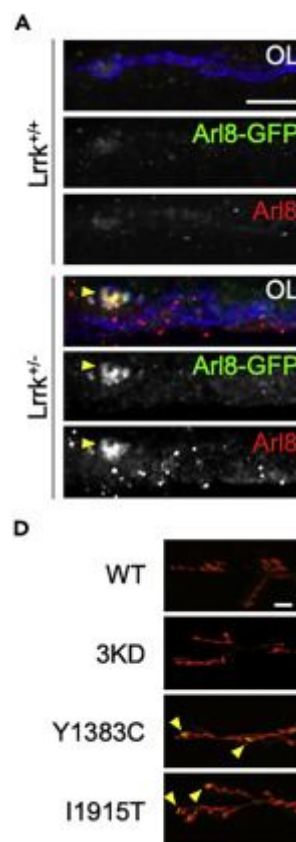


図 1 : LRRK2 の欠失や病原性変異体 (Y1383C, I1915T) の発現は、シナプス終末での Arl8 集積 (矢頭) を生じる

4) 最後に、LRRK2 の機能欠失や病原性変異が、Arl8 動態異常を引き起こすことが、PD 患者で起きているような運動障害の原因となることを調べるため、LRRK2 の欠失体、病原性変異発現体、Arl8 のシナプス終末での集積が生じる Arl8 過剰発現体の運動機能を行動実験で解析したところ、いずれも運動機能の低下を生じていた。

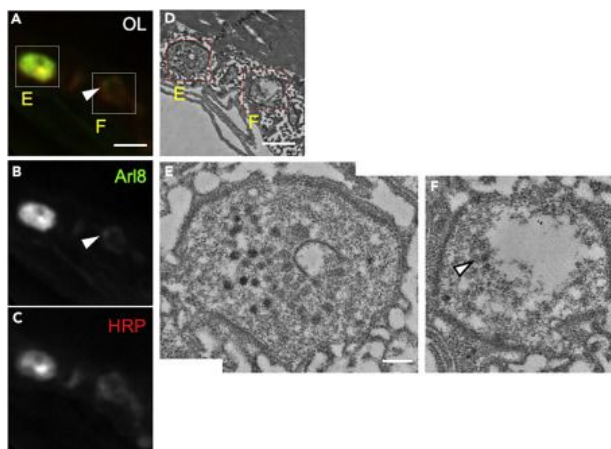


図 2 : シナプス終末の Arl8 集積部位では、電子密度が高く黒く染まった有芯小胞が集積している

以上の結果から、PD の発症において、unc-104 を介した有芯小胞の軸索輸送に LRRK2 を中心とした複数の PD 関連遺伝子が関わっておりことが明らかになった。このことから、unc-104 を介した有芯小胞の順行性輸送を正常化することが PD の新規治療法につながる可能性が示唆された。

本研究課題の結果は、査読のある学術誌にて発表した(文献 2)。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

家族性 PD 患者の遺伝子解析から、20 個以上の原因遺伝子やリスク遺伝子が見つかるが、その機能は多様であるため、適切な治療標的の最適な治療法の特定が難しい。本研究結果は、細胞内のオルガネラ動態制御に関わる PD 関連遺伝子の相関関係を明らかにし、より中心的な役割を持つ遺伝子として LRRK2 を特定した。さらに、他の PD 関連遺伝子の機能欠失単独でも起きる Arl8 の動態異常に関わる分子機構として、unc-104 を介した有芯小胞の順行輸送を特定したことで、この分子機構の正常化が PD 患者へのより広範な治療法に繋がること期待できる。Unc-104 を介した順行輸送のさらなる研究やその正常化を可能にする新規薬剤の開発は、PD の新規治療法の発見に繋がること期待できる。

今後の展望

本研究結果では、unc-104 を介した有芯小胞の動態制御が PD 発症機序に関わるということが強く示唆された。しかし、PD の病理的特徴である シヌクレインの蓄積との関連は、十分には解明できていない。シヌクレインが、シナプス小胞の放出に関わることは報告されているが、有芯小胞の動態との関連は未解明であり、有芯小胞がシナプス終末に集積する状態でのシヌクレインの局在、動態を解明することで、PD 患者に見られる シヌクレインの蓄積や伝播の分子機構解明の解析を進めることで、PD の病態解明につなげる。

文献

1) Tsuyoshi Inoshita, Taku Arano, Yuka Hosaka, Hongrui Meng, Yujiro Umezaki, Sakiko Kosugi, Takako Morimoto, Masato Koike, Hui-Yun Chang, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori, Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in *Drosophila*, *Human Molecular Genetics*, Volume 26, Issue 15, 1 p2933–2948, 2017, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx179>

2) Tsuyoshi Inoshita, Jun-Yi Liu, Daisuke Taniguchi, Ryota Ishii, Kahori Shiba-Fukushima, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai, Parkinson disease-associated Leucine-rich repeat kinase regulates UNC-104-dependent axonal transport of Arl8-positive vesicles in *Drosophila*, *iScience*, Volume 25, Issue 12, 105476, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105476>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuyoshi Inoshita, Jun-Yi Liu, Daisuke Taniguchi, Ryota Ishii, Kahori Shiba-Fukushima, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai	4. 巻 Volume 25, Issue 12
2. 論文標題 Parkinson disease-associated Leucine-rich repeat kinase regulates UNC-104-dependent axonal transport of Arl8-positive vesicles in Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井下 強、劉 俊逸、谷口 大祐、高梨 雅史、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病関連遺伝子はsmall GTPase, Arl-8の動態制御を介し -シヌクレインのターンオーバーを調節する。
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害性疾患コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoshita T, Liu J, Taniguchi D, Cui C, Takanashi M Imai Y, Hattori N
2. 発表標題 Parkinson's disease-associated genes regulate a-Synuclein turnover through the dynamics of a small GTPase Arl-8 at synapses.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuzuru Imai	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana imprint	5. 総ページ数 217
3. 書名 Experimental Models of Parkinson's Disease	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------