

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390040
 研究課題名（和文） 家族性パーキンソン病発症メカニズムを規範とした孤発性パーキンソン病発症機構解析
 研究課題名（英文） Pathogenetic mechanism of sporadic Parkinson's disease based on familial Parkinson's disease
 研究代表者
 太田 茂 (OHTA SHIGERU)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：60160503

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、パーキンソン病患者（PD）脳脊髄液中で増加傾向にある1BnTIQがβチューブリンに結合し、parkinによるユビキチン化を阻害することを明らかにしてきた。本研究では、PD関連神経毒MPP⁺を用いて、βチューブリンのユビキチン化に与える影響を調べたところ、これまでに毒性に関する報告が殆どない10 μM MPP⁺がβチューブリンのユビキチン化を阻害した。また、これに伴ってNonidet P-40不溶性画分におけるβチューブリンも増加した。このようなチューブリンのユビキチン化阻害とそれに伴う蓄積は、PDにおけるドパミン神経細胞死に関与している可能性が考えられる

研究成果の概要（英文）：We have reported that 1BnTIQ, which is increased in parkinsonian cerebrospinal fluid, binds to β-tubulin and inhibits its ubiquitination. In this study, we examined the effect of MPP⁺ on β-tubulin ubiquitination. MPP⁺ (10 μM) reduced the content ubiquitinated β-tubulin. Consistent with this, β-tubulin in 1% Nonidet P-40-insoluble fraction was accumulated in a time-dependent manner. Thus, the inhibition of tubulin ubiquitination and its accumulation may involved in neuronal cell death in Parkinson's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：パーキンソン病、β-チューブリン、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病（PD）は、中脳黒質から線条体に投射するドパミン神経が選択的に細胞死を起こすことを最大の特徴とする代表

的な運動系神経変性疾患であり、神経難病に指定されている重篤な疾患として位置付けられている。PD患者のうち1割弱は、特定の遺伝子異常に起因すると考えられる家族性

(遺伝性) PDであるが、残りの9割強は遺伝子異常との関係が認められない孤発性PDである事が知られている。

ある種の家族性 PD の原因は、*parkin* 遺伝子がコードする *parkin* タンパク質の機能不全であることが明らかとなっている。*Parkin* はユビキチン E3 リガーゼであり、様々な基質にユビキチンを付加することによりプロテアソームで分解されるようにする機能を担っている(右図)。家族性 PD では *parkin* に変異があるため、*parkin* の基質となるタンパク質が分解されずに細胞内に蓄積される。現在までに十数種類のタンパク質が *parkin* の基質として報告されている。また、*parkin* 自身も *parkin* の基質となることが報告されている。このいずれかのタンパク質が細胞内に蓄積されることが、家族性 PD 発症の鍵を担っている可能性が考えられ、また家族性のみならず孤発性 PD の解明の手掛かりとなる可能性がある。

一方、孤発性 PD についてはある種の遺伝的素因が発症に関与することは認められているものの、その影響は大きくなく、発症に環境因子が大きく関与していると考えられている。今から約 25 年前に MPTP という合成麻薬の副産物が PD に酷似した病理学的、生化学的、行動学的変化をもたらすことが明らかにされて以来、MPTP に化学構造や作用の似た化学物質が孤発性 PD の原因物質として考えられるようになったが、脳内濃度付近においても毒性を発現し発症を引き起こす化合物の特定には至っていない。

我々は脳に存在するテトラヒドロイソキノリン (TIQ) 骨格を有する低分子化合物の神経毒性と PD との関連について長年研究を行ってきた。例えば 1-ベンジル-TIQ (1BnTIQ) は、PD 患者脳脊髄液中濃度が他の神経疾患患者と比較して約 3 倍高いことを報告している (Kotake et al., J. Neurochem. (1995))。また最近、光親和性標識プローブを用いて 1BnTIQ 結合タンパクの 1 つがチューブリン β であり、PD 患者脳脊髄液中に存在する濃度の 1BnTIQ によりチューブリン β のユビキチン化が起こりにくくなっていることを示唆するデータを得た。チューブリンは *parkin* の基質となることが報告されており

(Ren et al., J. Neurosci. (2003))、このことはすなわち遺伝性疾患のタンパク質の異常と同じ現象(ここではチューブリンのユビキチン化阻害)が環境因子によって引き起こされる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究の目的は、PD 関連神経毒 MPP⁺による、チューブリンのユビキチン化に与える影響を明らかにし、このような環境因子によるチューブリンのユビキチン化阻害がドパミン神経に及ぼす影響と、パーキンソン病発症との関連について調べることである。

3. 研究の方法

(1) MPP⁺がチューブリンおよび *parkin* のユビキチン化に与える影響を調べるため、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に 48 時間までの短期間曝露を行い、以下の方法により検討した。

① SH-SY5Y 細胞に MPP⁺を曝露し一定時間経過後、1% Nonidet P-40 含有 TNE バッファーにて細胞を回収した。抗チューブリン抗体で免疫沈降し、抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロッティングを行い、ユビキチン化チューブリン量の変化を調べた。また、*Parkin* 自身のユビキチン化についても調べるため、抗 *parkin* 抗体で免疫沈降し、抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロッティングを行い、ユビキチン化 *parkin* についても調べた。

② チューブリンおよび *Parkin* タンパク質の蓄積を調べるため、SH-SY5Y 細胞に MPP⁺を一定時間添加した後、1% Nonidet P-40 含有 TNE バッファーで可溶化したものを TNE 可溶性画分、TNE 不溶性画分を 2% SDS 含有 tris バッファーで可溶化したものを TNE 不溶性画分とし、各画分の時間と濃度による変化をウエスタンブロッティングにより調べた。

(2) MPP⁺について長期曝露による影響を調べるため、10 μ M MPP⁺を最大 1 ヶ月間曝露し、(1) ②と同様の方法により、チューブリンおよび *parkin* の蓄積について調べた。

(3) (2)と関連して parkin の蓄積による細胞生存率への影響を調べるために、MPP⁺の長期曝露による細胞生存率を調査した。細胞生存率は、生細胞のミトコンドリア還元能を指標にした WST-1 assay により測定した。細胞に MPP⁺を曝露した後、WST-1 試薬を加え、3 時間インキュベーションし吸光度を測定した。

(4) MPP⁺によるチューブリンのユビキチン化阻害メカニズムを調べる目的で、in vitro ユビキチン化アッセイを構築し、MPP⁺によるユビキチン化阻害が直接的であるか否かを調べた。

4. 研究成果

10 μM MPP⁺によりユビキチン化チューブリン量は時間依存的に増加した。この際、チューブリンタンパク質蓄積について調べたところ、1% Nonidet P-40 不溶性画分においてチューブリンの増加が認められた。更に 10 μM MPP⁺を最大 1 ヶ月間曝露したところ、1% Nonidet P-40 不溶性画分において、更に顕著なチューブリンタンパク質の蓄積が認められた。チューブリンのユビキチン化を行う Parkin タンパク質自身も、チューブリンと同様にユビキチン化阻害や蓄積が認められた。細胞生存率を調べたところ、最初の数日間に変化がなかったものの曝露期間とともに徐々に減少し、4 週間曝露により細胞生存率は約 40%に減少した。

最後に in vitro ユビキチン化アッセイにおいても、10 μM MPP⁺はチューブリンのユビキチン化に対して弱い阻害作用を示したことから、MPP⁺はチューブリンあるいは parkin に直接作用し、ユビキチン化を阻害している可能性が考えられる。

本研究で用いた 10 μM MPP⁺はこれまでに毒性報告のない濃度であり、ミトコンドリア呼吸鎖阻害を引き起こす濃度より低濃度 MPP⁺により起こるチューブリンのユビキチン化阻害はパーキンソン病発症に繋がるかもしれない現象として注目される。

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 22 件)

1. Ohta K, Goto T, Fujii S, Kawahata M, Oda A, Ohta S, Yamaguchi K, Hirono S, Endo Y. Crystal structure, docking study and structure-activity relationship of carborane-containing androgen receptor antagonist 3-(12-hydroxymethyl-1,12-dicarba-closo-dodecaboran-1-yl)benzotrile. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 3540-3548 (2011). (査読有)

2. Nakamura S, Tezuka Y, Ushiyama A, Kawashima C, Kitagawara Y, Takahashi K, Ohta S, Mashino T. Ipso substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity. *Toxicol. Lett.* 203, 92-95 (2011). (査読有)

3. Hashida T, Kotake Y, Ohta S. Proteindisulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J. Toxicol. Sci.* 36, 1-7 (2011). (査読有)

4. Uramaru N, Shigematsu H, Toda A, Eyanagi R, Kitamura S, Ohta S. Design, synthesis, and pharmacological activity of nonallergenic pyrazolone-type antipyretic analgesics. *J Med Chem.* 253, 8727-8733 (2011). (査読有)

5. Tayama Y, Sugihara K, Sanoh S, Miyake K, Morita S, Kitamura S, Ohta S. Effect of tea beverages on aldehyde oxidase activity. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 26, 94-101 (2010). (査読有)

6. Nurrochmad A, Ishii Y, Nakanoh H, Inoue T, Horie T, Sugihara K, Ohta S, Taketomi A, Maehara Y, Yamada H. Activation of morphine glucuronidation by fatty acyl-CoAs and its plasticity: a comparative study in humans and rodents including chimeric mice

- carrying human liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25, 262-273 (2010). (査読有)
7. Goto T, Ohta K, Fujii S, Ohta S, Endo Y. Design and synthesis of androgen receptor full antagonists bearing a p-carborane cage: promising ligands for anti-androgen withdrawal syndrome. *J. Med. Chem.* 53, 4917-4926 (2010). (査読有)
8. Nakatsu Y, Kotake Y, Takai N, Ohta S. Involvement of autophagy via mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition in tributyltin-induced neuronal cell death. *J. Toxicol. Sci.* 35, 245-251 (2010). (査読有)
9. Kohta R, Kotake Y, Hosoya T, Hiramatsu T, Otsubo Y, Koyama H, Hirokane Y, Yokoyama Y, Ikeshoji H, Oofusa K, Suzuki M, Ohta S. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline binds with tubulin beta, a substrate of parkin, and reduces its polyubiquitination. *J. Neurochem.* 114, 1291-1301 (2010). (査読有)
10. Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Tateno C, Nishikura Y, Oofusa K, Harada D, Naito S, Horie T, Ohta S. Approach for in vivo protein binding of 5-n-butylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry. *Chem. Res Toxicol.* 23, 152-158 (2010). (査読有)
11. Ohta K, Ogawa T, Suzuki T, Ohta S, Endo Y. Novel estrogen receptor (ER) modulators: carbamate and thiocarbamate derivatives with m-carborane bisphenol structure. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7958-7963 (2009). (査読有)
12. Nakatsu Y, Kotake Y, Takishita T, Ohta S. Long-term exposure to endogenous levels of tributyltin decreases GluR2 expression and increases neuronal vulnerability to glutamate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 292-298 (2009). (査読有)
13. Fujimoto N, Suzuki T, Ohta S, Kitamura S. Identification of rat prostatic secreted proteins using mass spectrometric analysis and androgen-dependent mRNA expression. *J. Androl.* 30, 669-678 (2009). (査読有)
14. Inoue T, Sugihara K, Ohshita H, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of human disposition toward S-3H-warfarin using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24, 153-160 (2009). (査読有)
15. Tayama Y, Miyake K, Kanazawa E, Kaneko T, Sugihara K, Toyomi A, Morita S, Kobayashi M, Ohta S. Current situation of drug information in the kindergarten and nursery teacher: a pilot study. *Yakugaku Zasshi.* 129, 617-622 (2009). (査読有)
16. Ogawa T, Ohta K, Iijima T, Suzuki T, Ohta S, Endo Y. Synthesis and biological evaluation of p-carborane bisphenols and their derivatives: structure-activity relationship for estrogenic activity. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 1109-1117 (2009). (査読有)
17. Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 160, 61-68 (2009). (査読有)
18. Inoue T, Nitta K, Sugihara K, Horie T, Kitamura S, Ohta S. CYP2C9-catalyzed metabolism of S-warfarin to 7-hydroxywarfarin in vivo and in vitro in chimeric mice with humanized liver. *Drug*

Metab. Dispos. 36, 2429-2433 (2008). (査読有)

19. Ohta K, Goto T, Fijii S, Suzuki T, Ohta S, Endo Y. Design and synthesis of carborane-containing androgen receptor (AR) antagonist bearing a pyridine ring. Bioorg. Med. Chem. 16, 8022-8028 (2008). (査読有)

20. Nakatsu Y, Kotake Y, Hino A, Ohta S. Activation of AMP-activated protein kinase by tributyltin induces neuronal cell death. Toxicol. Appl. Pharmacol. 230, 358-363 (2008). (査読有)

21. Kitamura S, Nitta K, Tayama Y, Tanoue C, Sugihara K, Inoue T, Horie T, Ohta S. Aldehyde oxidase-catalyzed metabolism of N1-methylnicotinamide in vivo and in vitro in chimeric mice with humanized liver. Drug. Metab. Dispos. 36, 1202-1205 (2008). (査読有)

22. Sugihara K, Okayama T, Kitamura S, Yamashita K, Yasuda M, Miyairi S, Minobe Y, Ohta S. Comparative study of aryl hydrocarbon receptor ligand activities of six chemicals in vitro and in vivo. Arch. Toxicol. 82, 5-11 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. 太田 茂 パーキンソン病発症原因について 筑波大学講演会 (招待講演) 2010 年 11 月 10 日 つくば

2. 廣兼裕司、古武弥一郎、幸田龍紀、太田 茂 パーキンソン病関連神経毒MPP+によるparkin活性阻害と基質タンパク質tubulinの蓄積 第49回日本薬学会中国四国支部学術大会 2010年11月6日 米子

3. 佐溝茂良、古武弥一郎、廣兼裕司、幸田龍紀、太田 茂 カテコール骨格を有するパーキンソン病関連神経毒がユビキチンE3リガーゼparkinに与える影響 フォーラム2010衛生薬学・環境トキ

シクロロジー 2010年9月9日 東京

4. 廣兼裕司、幸田龍紀、古武弥一郎、太田 茂 家族性パーキンソン病原因タンパク Parkin に対する1BnTIQの影響 日本薬学会第130年会 2010年3月30日 岡山

5. 佐溝茂良、古武弥一郎、横山雄一、細井 徹、小澤光一郎、太田 茂 パーキンソン病関連神経毒は Parkin に影響を与え、小胞体ストレスを誘発する 日本薬学会第130年会 2010年3月30日 岡山

6. 太田 茂 パーキンソン病発症機構の解明に向けて 平成21年度北陸大学学術フロンティア年次研究集会・総括集会 (招待講演) 2010年3月16日 金沢

7. 山脇裕一郎、幸田龍紀、古武弥一郎、太田 茂 α -synuclein オリゴマー化に対するパーキンソン病関連神経毒の影響 第48回日本薬学会中国四国支部学術大会 2009年11月8日 徳島

8. 山脇裕一郎、幸田龍紀、古武弥一郎、太田 茂 パーキンソン病関連神経毒による tubulin 結合タンパク質 α -synucleinのオリゴマー化 フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009年11月6日 沖縄

9. 廣兼裕司、幸田龍紀、古武弥一郎、太田 茂 パーキンソン病関連神経毒による Parkin タンパク質の不溶化および不活性化 フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009年11月6日 沖縄

10. 佐溝茂良、古武弥一郎、横山雄一、細井 徹、小澤光一郎、太田 茂 パーキンソン病関連脳内性アミンTIQ誘導体の小胞体ストレス誘発作用 フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009年11月6日 沖縄

11. 太田 茂 パーキンソン病発症機構の分子メカニズム 鳥取パーキンソン病症例検討会 (招待講演) 2009年7月10日 米子

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60160503

(2) 研究分担者

古武 弥一郎 (KOTAKE YAICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20335649

杉原 数美 (SUGIHARA KAZUMI)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：20271067

(3) 連携研究者

()

研究者番号：