

機関番号：32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591010

研究課題名 (和文) Lipid rafts における家族性パーキンソン病原因たんぱくの機能解析

研究課題名 (英文) Analyses of responsible protein for familial Parkinson's disease in lipid rafts.

研究代表者

久保 紳一郎 (KUBO SHINICHIRO)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20327795

研究成果の概要 (和文) : 家族性パーキンソン病の原因蛋白の異常が黒質神経細胞死という共通の結果につながることは確かであるが、その変性過程にこれらの蛋白がどのように関わっているのか、また各々の遺伝子産物の詳細な細胞内局在に関する情報はほとんどない。我々は α -synuclein と parkin に加え、LRRK2 がシグナル伝達、膜輸送などの細胞の重要な働きを担う細胞膜の microdomain である lipid rafts に結合することを証明した。さらに PINK1 および DJ-1 が膜結合能を有することを見出した。

研究成果の概要 (英文) : It is unknown how mutant proteins responsible for familial Parkinson's disease result in nigral degeneration as well as where these protein localize in neuronal cells. We have revealed that LRRK2, in addition to alpha-synuclein and parkin, associates with lipid rafts, microdomains of cell membranes which play important roles in signal transduction and membrane trafficking in the cell. We have, furthermore, found membrane-binding potentials of DJ-1 and PINK1 proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経学

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：家族性パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、運動障害を来す神経変性疾患としては最も頻度が高く、さらに PD に伴う認知機能障害 (レビー小体型痴呆も含む) は、アルツハイマー病 (AD) について頻度の高い認知症の原因疾患でもある。今後、高齢化社会に向けて増加することが予想されている。更に介護の負担を考えた場合、認知症の合併が大きいことが指摘されており、生

命予後を規定する因子に認知症が重要な役割をなしていることが報告されている。生命予後は、改善されているものの、生活の質を考えた場合、満足行く治療体系が確立されているとは言い難い。従ってその病態の解明は、創薬に向けて焦眉の急である。研究代表者は、parkin の機能解析のプロジェクトに参加し、parkin がリガーゼであることを見出し (Shimura et al. Nat Genet 25:302-305,

2000)、更に parkin が神経細胞の特徴的構造である神経軸索の終末（シナプス終末）に存在することを証明した (Kubo et al. J Neurochem 78:42-54, 2001)。Parkin は peripheral membrane protein として静電的にシナプス終末へ局在し、非常に興味深いのは、この parkin の膜構造への結合は 4°C 1% Triton X-100 の条件下でも保たれることである (Kubo et al. J Neurochem 78:42-54, 2001)。この生化学的特徴は parkin が lipid rafts を介して細胞膜と結合することを示唆する。実際にラット脳における生化学的解析により parkin が lipid rafts に結合することが示されている (Fallon et al. J Biol Chem 277:486-491, 2002)。さらに我々は alpha-synuclein も lipid rafts に結合することによりシナプス終末に局在することを証明した (Fortin et al. J Neurosci 24:6715-6723 and Kubo et al. J Biol Chem 280:31664-31672, 2005)。これらの事実はシグナル伝達、膜タンパクのソーティングなどの重要な細胞機能を担う細胞膜の microdomain である lipid rafts が PD の病態に関与することを示唆する。実際に我々は、これら lipid rafts に存在するタンパクが相互作用すること、すなわち alpha-synuclein がリガーゼである parkin の基質になることを示した (Shimura et al. Science 293:263-269, 2001)。また最近、DJ-1 および parkin が PI3K/Akt-signaling pathway を介して、神経細胞死を抑制することが報告された (Yang et al. Proc Natl Acad Sci 102:13670-13675, 2005)。PI3K/Akt-signaling に lipid rafts が重要な役割を担っていることが示されていることから、parkin そして DJ-1 の機能にも lipid rafts が関与している可能性が高い。さらに、PINK1 の発現を誘導する PTEN も lipid rafts を介して PI3K/Akt-signaling を抑制する。PI3K/Akt-signaling は cell survival に必要な伝達経路であり、PINK1 は PTEN の PI3K/Akt-signaling 抑制を阻害すべく誘導されていると考えられる。以上のことは黒質神経細胞死という共通の結果につながるこれら家族性 PD の原因タンパクが lipid rafts 介した共通カスケードに乗っていることを強く示唆する。事実、我々は LRRK2 も lipid rafts に結合するという結果を得ている (Hatano, Kubo et al. Hum Mol Genet 16:678-690, 2007)。これらの事実に基づき、黒質変性の原因究明のために、家族性 PD の原因タンパクと lipid rafts の相互作用が重要であると推測する。しかし、lipid rafts に着目した研究報告はほとんどなく、本課題は、世界をリー

ドするきわめて重要な研究領域である。

2. 研究の目的

PD のほとんどは孤発型であり、臨床症状も個々症例により異なり、多様性の高い疾患群と考えられている。そのため単一性の高い家族性 PD からの解明が、戦略的にも遺伝性のみならず孤発型 PD の病態解明にも効率の良いアプローチと考えられている。事実最近の PD の病態に関する情報は、家族性 PD から得られた知見といっても過言ではない。これまで家族性 PD 原因遺伝子として *alpha-synuclein* (PARK1, PARK4)、*parkin* (PARK2)、*UCH-L1* (PARK5)、*PINK1* (PARK6)、*DJ-1* (PARK7)、*LRRK2* (PARK8)、*ATP13A2* (PARK9) が同定・単離されている。これら原因遺伝子産物の異常が黒質神経細胞死という共通の結果につながることは確かであるが、その変性過程にこれらの遺伝子産物がどのように関わっているのか、また各々の遺伝子産物の詳細な細胞内局在に関する情報はほとんどない。近年、alpha-synuclein と parkin に加え、LRRK2 がシグナル伝達、膜タンパクソーティングなど細胞の重要な働きを担う細胞膜の microdomain である lipid rafts に結合することが我々の研究グループにより明らかにされた (Hatano, Kubo et al. Hum Mol Genet 16:678-690, 2007)。AD、プリオン病でも lipid rafts の関与が指摘されており、神経疾患と lipid rafts の関連が最近注目されている。本課題では、lipid rafts における全ての遺伝子産物の機能解明を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

家族性 PD の原因タンパクの異常が lipid rafts を介した黒質神経細胞死という共通の結果につながるという作業仮説の通り、これまでに同定されている家族性 PD の原因タンパク (alpha-synuclein、parkin、PINK1、DJ-1、LRRK2) について、生化学的、免疫組織および細胞化学的に、さらにモデル動物、プロテオーム解析の技術を利用して機能解明を行う。alpha-synuclein、parkin、PINK1、DJ-1、LRRK2 タンパクが黒質変性の共通カスケードを形成しているとの仮説に基づき、これらを様々な組み合わせで培養細胞に共発現させ、免疫沈降法、fluorescent resonance energy transfer (FRET) を用い

てそれぞれの結合を解析する。さらに alpha-synuclein、parkin、LRRK2 は lipid rafts に存在することが証明できていることから、lipid rafts に関わる分子と相互作用すると推測される。そこで、げっ歯類脳、培養細胞から生化学的に lipid rafts を精製し、免疫沈降法や recombinant タンパクを用いて、相互作用する既知および未知分子を分離同定する。また各遺伝子産物の代表的な点変異やドメインを欠いている変異型を作成し、局在の変化を検討する。PINK1、DJ-1、ATP13A2 と lipid rafts の結合解析としてそれぞれのタンパクを培養細胞に発現させ、細胞免疫染色および同細胞から lipid rafts を生化学的に精製することにより、PINK1、DJ-1 と lipid rafts の結合を解析する。さらに recombinant タンパクを用いて in vitro においてもこれらの結合を解析する。alpha-synuclein、parkin、PINK1、DJ-1、LRRK2 の cell viability についての解析として培養細胞に発現する内在性のこれらタンパクを siRNA でノックダウンすることにより cell viability の変化を観察する。またこれらの変異タンパク強制発現の効果についても検討する。Akt、PTEN を共発現させることによる cell viability の変化を解析し、PI3K/Akt signaling が細胞死の共通経路となっているかを検討する。さらにこれらのタンパク発現をノックダウンした細胞にノックダウンした以外のタンパクを様々な組み合わせで共発現させ、細胞死がレスキューできるかを調べる。これにより細胞変性カスケードの上流から下流のどこで各々のタンパクが機能しているのかを推定する。またモデル動物を用いた実験として alpha-synuclein、parkin のノックアウトマウス、LRRK2 のト

ランスジェニックマウス (Dr. Matthew Farrer, Mayo clinic と共同研究)、さらに MPTP 投与ラットを用いて、PINK1、DJ-1 の発現量および細胞内局在をウェスタンブロット、免疫組織染色にて検討する。

4. 研究成果

PINK1 を培養細胞に発現させ、細胞免疫染色および生化学的解析から同タンパクの一部は膜に局在し、界面活性剤不溶性画分に回収されることを確認した。さらに PINK1 と parkin を培養細胞に共発現させ、免疫沈降法、fluorescent resonance energy transfer を用いてこれらタンパクの結合を明らかとした。また、この相互作用により parkin が PINK1 を安定化することを解明し、実際に parkin ノックアウトマウスの脳では PINK1 の発現が低下していることを報告した。また、もうひとつの常染色体劣性パーキンソン病の原因タンパクである DJ-1 についてもその細胞内局在を培養細胞およびマウス脳を用いて詳細に検討し、同タンパクがシナプトソームの膜成分に結合することを見出した。さらに培養細胞の免疫細胞化学的検討において DJ-1 はシナプス小胞の膜タンパクと共染することを明らかにした。この DJ-1 のシナプス小胞の膜への結合はイムノアイソレーションにても証明し得た。さらに DJ-1 患者に認められた変異体ではこの膜結合が低下することを証明し、現在論文投稿中である。

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 7 件)

① Kubo S, Iwatake A, Ebihara N, Murakami A, Hattori N: Visual impairment in Parkinson's disease treated with amantadine: Case report and review of the literature. *Parkinsonism Relat Disord* 14:166-169, 2008

② Funayama M, Li Y, Tsoi TH, Lam CW, Ohi T, Yazawa S, Uyama E, Djaldetti R, Melamed E, Yoshino H, Imamichi Y, Takashima H, Nishioka K, Sato K, Tomiyama H, Kubo S, Mizuno Y, Hattori N: Familial Parkinsonism with digenic parkin and PINK1 mutations. *Mov Disord* 23:1461-1465, 2008

③Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo S, Mizuno Y, Toda T, Hattori N: LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. J Hum Genet 53:1012-1015, 2008

④Kamigaichi R, Kubo S, Ishikawa K, Yokoyama K, Ogaki K, Usui C, Hatta K, Arai H, Mochizuki H, Hattori N: Effective control of catatonia in Parkinson's disease by electroconvulsive therapy: a case report. Eur J Neurol 16:e6, 2009

⑤Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Mizuno Y, Kubo S, Toda T, Hattori N: Mutation analysis for DJ-1 in sporadic and familial parkinsonism: screening strategy in parkinsonism. Neurosci Lett 455:159-161, 2009

⑥Shiba K, Arai T, Sato S, Kubo S, Ohba Y, Mizuno Y, Hattori N: Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. Biochem Biophys Res Commun 383:331-335, 2009

⑦Hatano T, Kubo S, Shimo Y, Nishioka K, Hattori N: Unmet needs of patients with Parkinson's disease: interview survey of patients and caregivers. J Int Med Res 37:717-726, 2009
〔学会発表〕（計 2 件）

① PINK1 binds to cellular membrane. The Movement Disorder Society. June 24, 2008, Chicago

② Possible localization of DJ-1 on the plasma membrane in the mouse brain and cultured cell lines. The Movement Disorder Society. June 24, 2008, Chicago

〔図書〕（計 3 件）

① 河尻澄宏、久保紳一郎:ここまでわかったパーキンソン病研究 医歯薬出版別冊「医学のあゆみ」100, 2008

② 久保紳一郎:Q67. 1 日 300mg 以上の塩酸アママンタジンがジスキネジアを抑制するといわれますが、同じ薬物が維持量の違いによってパーキンソニズムに効いたり、ジスキネジアに効いたりする機序は何なのでしょうか？. パーキンソン病診療 Q&A110, 水野

美邦、中外医学社、東京、205-209, 2009

③ 久保紳一郎: Q2.パーキンソン病の原因は？. パーキンソン病 Q&A, 服部信孝、日本医事新報社、東京、5-8, 2009
〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 紳一郎 (KUBO SHINICHIRO)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20327795