

平成 22 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：平成 20 年度 ~ 平成 21 年度
課題番号：20790626
研究課題名 (和文) DJ-1 の細胞内局在ならびに膜輸送における役割に関する研究

研究課題名 (英文) Research for the localization of DJ-1 on the plasma membrane and functional roles of DJ-1 in membrane trafficking systems

研究代表者

今井 哲司 (IMAI SATOSHI)

星薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：80468579

研究成果の概要(和文):DJ-1 に起因した家族性パーキンソン病の病態を解明する一手として、内因性 DJ-1 の細胞内局在について詳細な検討を行った。本研究において、DJ-1 が神経終末部の有芯小胞体上に局在しており、分泌小胞体の膜輸送に関与する低分子量 G タンパク質である Rab 3 と共局在していることを見出した。また、研究代表者は、DJ-1 が細胞内の膜タンパク質輸送に関与している可能性を見出した。

研究成果の概要 (英文) : The aim of the present study is to investigate the precise subcellular distribution of endogenous DJ-1 in mouse brain and several cultured cell lines. In the present study, we found that DJ-1 was collected in the synaptic plasma membrane fractions together with integral membrane proteins. In agreement with this finding, double immunolabelling assay showed that DJ-1-immunoreactivity was highly detected in the membrane compartment of cultured cells and overlapped with integral membrane proteins on the cell surface. The findings strongly suggest that DJ-1 is associated with the plasma membrane in the mouse brain and cultured cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：神経科学、脳・神経、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease;

PD) は中脳黒質のドーパミン (DA) 細胞が変性することで発症する神経変性疾患である。

発症原因となる背景において、単一遺伝子異常で発症する家族性 PD (familial Parkinson's disease; FPD) の研究は分子レベルで黒質変性の病態を解明できる可能性があり注目されている。これまで FPD の原因遺伝子として *a-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。*DJ-1* 遺伝子異常に起因する FPD (DJ-1-linked FPD) では、*parkin* 変異家系で発症が認められる FPD に臨床症状が酷似しており、剖検例はいまだ報告されていないが黒質神経細胞が比較的選択的に障害されていることが予想される。すなわち、DJ-1 タンパク質の機能を明確にすることは、PD における DA 神経変性死の機序解明において重要な意味を持つと思われる。

2. 研究の目的

現在までの分子生物学的研究から、DJ-1 はミトコンドリア内に局在し、は抗酸化ストレス機能を有することが示されている。従来から孤発性 PD の病因には酸化ストレスの関与が指摘されており、DJ-1 の機能解明は孤発性 PD の病態解明につながる可能性を秘めている。しかしながら、これらの所見はあくまで DJ-1 を過剰発現させた培養細胞系での実験結果に基づいたものがほとんどであり、内因性 DJ-1 の細胞内局在ならびに脳内における機能的役割については未だ不明な点が多く残されている。そこで、我々は DJ-1-linked FPD の病態を解明する一手として、1) DJ-1 の細胞内局在を明確化、2) DJ-1 が細胞内の膜輸送への関与およびその機序を検討、3) DJ-1 変異体による膜輸送機構の変化を評価し、それらの知見をもとに DJ-1 の機能障害がいかに黒質神経細胞死を引き起こすかについて解明することを目指す。

3. 研究の方法

マウス全脳からシナプトソームを単離し、Western-blot 法にて DJ-1 の局在について評価した。また、マウス脳シナプトソームからショ糖密度勾配法 (0.2 M-2.0 M) により小胞体画分を細分画し、Western-blot 法にて同様の検討を行った。さらに、小胞体画分を用

いて、免疫沈降法ならびに免疫単離法に従い、DJ-1 の細胞膜結合形式について検討を行った。また、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞における内因性 DJ-1 の細胞内局在について共焦点顕微鏡法にて検討を行った。

4. 研究成果

まず、我々はマウス脳より単離したシナプトソームの各画分における DJ-1 の局在について検討を行った。その結果、細胞膜マーカーである transferrin receptor および NR-1 と同様に、DJ-1 がマウス脳シナプトソームの細胞膜画分に局在していることを確認した (図 1)。

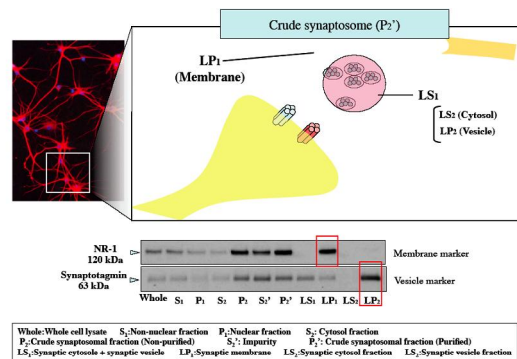


図 1 マウス脳シナプトソームにおける内因性 DJ-1 の局在検討

次に、シナプトソームから単離した小胞体画分における DJ-1 の局在について検討を行った。一般に、小胞体はシナプス小胞 (Synaptic vesicle) と呼ばれる小型の膜構造体と有芯小胞 (Dense core vesicle) と呼ばれる大型の膜構造体で大別されることが知られている。本研究においても、我々は小胞体マーカーである synaptophysin が、低密度および高密度画分に、2 層性の局在ピークを示すことを確認した。興味深いことに、小胞体画分における DJ-1 の免疫活性ピークは、高密度画分で認められる synaptophysin の局在ピークと一致していた。さらに、小胞体の膜輸送に関与する低分子量 G タンパク質である Rab ファミリーについても同様の検討を行った。その結果、分泌小胞体の膜輸送に関与する低分子量 G タンパク質である Rab 3 の局在ピークは synaptophysin および DJ-1 のそれと部分的に一致した (図 2)。

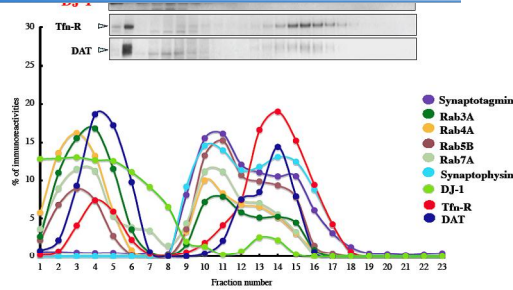
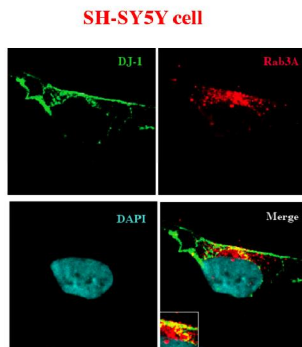


図2 マウス脳シナプトソーム由来小胞体画分における内因性 DJ-1 の局在検討

マウスの脳内において、DJ-1 が神経終末部の細胞膜ならびに細胞内小胞体に局在する可能性を示すものと考えられる。さらに、マウス脳シナプトソームから作製した小胞体画分サンプルを用いて、免疫沈降法ならびに免疫単離法に従い、DJ-1 と小胞体膜の結合形式について生化学的な検討を行った。その結果、内因性 DJ-1 は小胞体上の機能タンパク質ではなく、直接的に小胞体膜に結合している可能性を見出した。

次に、ヒト由来神経芽細胞株である SH-SY5Y 細胞における内因性 DJ-1 の局在について、共焦点顕微鏡法にて検討を行った。その結果、DJ-1 の免疫活性が、細胞膜と細胞内において顆粒状に検出され、さらに細胞内の DJ-1 免疫活性は分泌小胞マーカである Rab3A と共局在を示した (図 3)。



Rab3A:神経伝達物質の開口放出、新規合成膜蛋白の細胞膜への輸送

図3 SH-SY5Y 細胞における内因性 DJ-1 の細胞内局在検討

一方、本実験では、ミトコンドリアにおける DJ-1 の局在は観察されなかった。さらに、SH-SY5Y 細胞より作製した細胞膜分画を除タンパク質処理し、リコンビナント DJ-1 の膜結合実験を行った結果、以上、野生型 DJ-1 は著明な結合性を示したのに対し、DJ-1 の病原変異体は結合性を示さなかった。最後に、

SH-SY5Y 細胞に DJ-1 およびその病原変異体をそれぞれ発現させ、SH-SY5Y からの液性因子の分泌あるいは dopamine transporter などの細胞膜タンパク質の代謝回転について比較検討を行った。しかしながら、残念ながら、いずれの DJ-1 を発現させた群においても、有意な差は認められなかった。

本研究の結果より、マウス脳内および SH-SY5Y 細胞において、内因性 DJ-1 が細胞膜ならびに小胞体上に局在していることがはじめて明らかとなった。また、DJ-1 が分泌小胞に局在を示したことから、DJ-1 がタンパク質の細胞内輸送に関与している可能性が示唆された。また、DJ-1 の病原変異体が細胞膜への結合性を示さなかったことから、DJ-1-linked FPD の発症には、DJ-1 が制御する膜輸送システムの破綻が関与している可能性が考えられた。今後、細胞内輸送経路における DJ-1 の機能的役割についてさらに検討することにより、DJ-1-linked FPD の病態解明につながるものと期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

Satoshi Imai, Possible localization of DJ-1 on the plasma membrane in the mouse brain and cultured cell lines, 12th International congress of Parkinson's disease and movement disorders (Hilton Chicago, Chicago, USA), 2008. 6. 22-27

今井 哲司, Possible association of DJ-1 with the synaptic membrane in the mouse brain, 第31回日本神経科学大会 (東京国際フォーラム、東京)、2008. 7. 9-11

今井 哲司, 家族性パーキンソン病原因分子 DJ-1 の細胞膜および細胞内小胞体における局在に関する検討、生体機能と創薬シンポジウム 2008 (星薬科大学、東京)、2008. 9. 5-6

disorder society Japan (国立京都国際会議
場、京都)、2008. 10 .2-4

Satoshi Imai, Possible localization of
DJ-1 on the plasma membrane in the mouse
brain and cultured cell lines,
Neuroscience 2008 (Renaissance Washington
DC Hotel, Washington DC, USA)、2008. 11.
15-19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 哲司 (IMAI SATOSHI)
星薬科大学・薬学部・研究員
研究者番号：8 0 4 6 8 5 7 9