

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591257

研究課題名(和文)パーキンソン病関連SNPが関わるmiRNAによるシヌクレイン発現調節機構の解明

研究課題名(英文)The effects of a SNP in 3'UTR on the microRNA-mediated regulation of alpha-Synuclein gene

研究代表者

水野 英哉 (MIZUNO, Hideya)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：90322578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性パーキンソン病発症リスクの増加に関与する α -Synuclein(α -Syn)遺伝子3'非翻訳領域(3'UTR)内のSNP(rs356165)の違いにより α -Syn発現抑制活性に影響を与えるmiRNAの探索を行った。SNP G型(メジャーアレル、PD発症リスク高)及びA型(マイナーアレル)の α -Syn 3'UTRを含むベクターを作成し、miRNAと共に細胞へ導入してレポーター活性及び α -Synタンパク質発現を調べた。miR-7、-153による活性の抑制が認められたが、A/G型間に差はなかった。

研究成果の概要(英文)：a SNP in 3'UTR of alpha-Synuclein (aSyn) gene (rs356165) contributes to the increase of the risk for sporadic Parkinson's disease (PD). We searched the miRNAs regulating aSyn expression the regulation of which is affected by the SNP. We made vectors inserting aSyn 3'UTR including G type (major allele, high risk type for PD) or A type (minor allele) of the SNP. The vectors was introduced into cultured cells with miRNAs and the reporter activities and aSyn protein expression were measured by luciferase assay or western blotting. miR-7 and -153 inhibited the aSyn expression. However, there was no difference in the negative regulation by miR-7 or -153 between G and A type

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：神経変性疾患 パーキンソン病 SNP マイクロRNA シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、我が国では高齢者医療の充実が急がれる。日本で約 12 万人もの患者が罹患しているパーキンソン病(PD)は、加齢に伴って発症する神経変性疾患で、対策が急がれる疾患の一つである。PD は黒質ドーパミンニューロンがレビー小体と呼ばれる封入体の出現を伴って進行性に変性脱落し、その結果ドーパミン枯渇により発症する。治療法としては L-dopa 等の補充・対症療法はあるが、病態進行には無効であり、根本的な治療法の開発のためには発症機序の解明が重要である。近年、家族性 PD の分子遺伝学的研究により *α-synuclein* (*α-Syn*), *parkin*, *pink1* など様々な原因遺伝子が同定されたが申請者はこれまでレビー小体の主要成分であり、PD 病態への関与が最も深いと考えられている *α-Syn* に着目して、PD 発症機序に関する研究に携わってきた。

α-Syn は家族性 PD の原因として最初に発見された遺伝子で、*α-Syn* のミスセンス変異によりタンパク質の凝集性が増大することが明らかにされた。そして、*α-Syn* 遺伝子の multiplication 変異が家族性 PD の原因となることが報告され、また *α-Syn* を過剰発現するトランスジェニックモデル動物でも *α-Syn* の凝集・蓄積と神経変性が認められることから、*α-Syn* の発現量変化が PD 発症において重要な役割を担うと考えられている。しかしながら、*α-Syn* の遺伝子異常が認められるのは PD 全体の 5-10% しかない家族性 PD のごく一部に過ぎず、残りの約 90% 以上を占める孤発性 PD と *α-Syn* 発現異常との関連は不明であった。戸田らのグループは *α-Syn* 遺伝子の 3' 非翻訳領域(3'UTR)内の一塩基多型(SNP: rs356165) が孤発性 PD の発症リスクと強く関連することを見出した。しかし、この SNP が PD 発症リスクに関わる分子機序については不明である。

最近、神経細胞に多く発現している microRNA (miRNA) の一つである microRNA-7 (miR-7) が、*α-Syn* 遺伝子の 3'UTR に特異的に結合して *α-Syn* の発現量を抑制的に調節していることが報告された。miRNA は 21-23nt 程度の本鎖の RNA 分子で、ゲノムから転写されていくつかのプロセスを経て成熟型になり、メッセンジャー RNA の 3'UTR を標的として結合することにより、タンパク質翻訳阻害に関わることが知られている。これまでに数百種類の miRNA が同定されており、様々な miRNA が脳や心筋の分化に関与することが報告されている。また、アルツハイマー病などの神経変性疾患を含む種々の疾患において miRNA の発現量変化が認められ、疾患の発症機序と miRNA の関連が注目されている。さらに、癌など様々な疾患と遺伝子 3'UTR 内の SNP との関連において、miRNA の関与が報告されている。

2. 研究の目的

家族性パーキンソン病(PD)の研究は進んでいる一方で、PD 患者の大部分を占める孤発性 PD の発症機序は未解明である。最近孤発性 PD において、神経細胞内にレビー小体として蓄積する *α-Synuclein*(*α-Syn*)の遺伝子 3'非翻訳領域(3'UTR)内の一塩基多型(SNP)が、発症と関連することが見出された。また、ごく最近 microRNA (miRNA)が、*α-Syn* 遺伝子 3'UTR を標的として *α-Syn* の発現制御に関わることが明らかになった。申請者らは、*α-Syn* 遺伝子 3'UTR 内の SNP が miRNA による *α-Syn* の発現制御に影響を与えて孤発性 PD の発症に関与する可能性を考え、本研究では レポーターアッセイによる関連 miRNA のスクリーニング、及び ショウジョウバエを用いた個体レベルでの表現型の解析を行い、SNP により *α-Syn* 発現制御に影響を受ける miRNA を同定する。本研究により、これまで原因不明であった孤発性 PD の発症機序の解明が期待される。

3. 研究の方法

孤発性 PD 発症に関連する *α-Syn* 遺伝子 3'UTR 内の SNP (rs356165) の違いにより、*α-Syn* 発現抑制活性に影響を受ける miRNA を、1)レポーターアッセイを用いた細胞レベルでの関連 miRNA のスクリーニング、および 2)ショウジョウバエモデルによる個体レベルでの解析を行い、同定する。

(1) レポーターアッセイを用いて、*α-Syn* の発現を抑制する miRNA をスクリーニングし、*α-Syn* 3'UTR SNP (G/A 型)の違いにより、*α-Syn* 発現抑制活性に影響を受ける miRNA を同定する。

さらに、培養細胞を用いて、この miRNA が *α-Syn* タンパク質発現に及ぼす影響を明らかにする。

(2) *α-Syn* 3'UTR SNP (G/A 型)を持つ ショウジョウバエを作成し、様々な miRNA 変異体との遺伝学的交配により、*α-Syn* SNP による miRNA の *α-Syn* 発現量、封入体形成、複眼変性、運動障害などの表現型に対する影響について個体レベルでの解析を行い、孤発性 PD の発症機序を解明する

4. 研究成果

(1) *α-Syn* mRNA は 3215 塩基、タンパク質翻訳領域は 264-686 (423bp) で、下流が 3'UTR である。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y から全 RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を得た。この cDNA を用いて、SNP G 型(メジャーアレル、PD 発症リスク高)及び A 型(マイナーアレル)の *α-Syn* 3'UTR の一部(686-1765)を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、合成 miRNA と共に HEK293 細胞へ導入してレポーター活性を測定した。*α-Syn* 発現を制御することが既に知られている miR-7、-153 を用いたところ、これらの miRNA によるレポーター活性

の抑制が確認できた。A型及びG型におけるこれらのmiRNAによる抑制の程度を比較したところ、A型とG型の間に差は認められなかった。また、神経細胞特異的なmiR-9、miR-132では、A型とG型のどちらの場合も α -Synの抑制は見られないことが分かった。(図1)

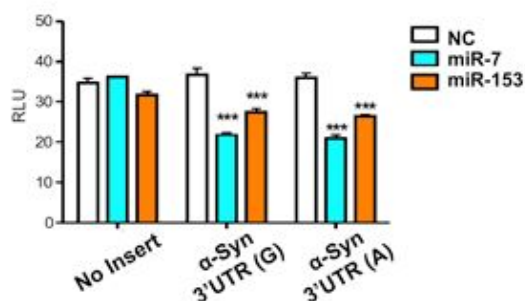


図1 miRNAによる α -Syn発現抑制に対する3'UTR SNPの影響～ルシフェラーゼアッセイの結果

(2) SNP G型及びA型の α -Syn 3'UTRの一部を含む α -Syn発現ベクター(塩基配列264番から1765番まで)を作成し、合成miRNAと共にHEK293細胞へ導入し、ウェスタンブロッティングにより α -Synタンパク質発現量を比較した。miR-7、-153による抑制はA型とG型の間に差は認められなかった。(図2)

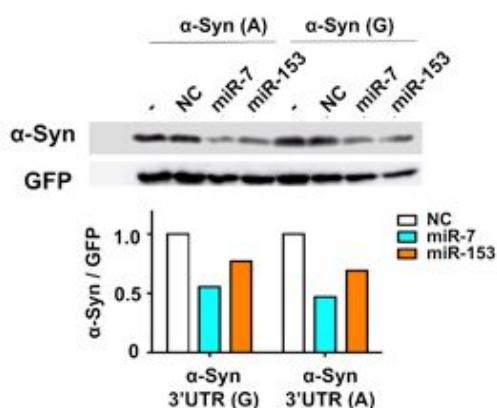


図2 miRNAによる α -Syn発現抑制に対する3'UTR SNPの影響～ウェスタンブロッティングの結果

(3) 合成miRNAを導入した場合、細胞内のmiRNAが多すぎてA型とG型で差が出ない可能性が考えられる。そこで、miRNAの阻害剤を用いて、内在性のmiR-7、-153の効果を見ることを試みた。(1)と同様の条件で、レポーター活性を測定したが、レポーター活性の上昇は認められなかった。神経細胞ではないHEK293細胞では、内因性miR-7、-153

の効果を見るのは難しいことが分かった。

(4) これまで使用していたプラスミドは、レポーターアッセイでは3'UTRの一部のみ、ウェスタンブロッティングではタンパク質翻訳領域と3'UTRの一部(1765番まで)あることから、生理的条件下での反応を表していない可能性が考えられる。RNA二次構造予測プログラム(<http://www.ncrna.org>)によると、miR-7の予測結合部位付近の構造は、A型とG型で大きく異なるという結果が得られた。そこで、 α -Syn完全長cDNAをクローニングした。三千塩基以上のため、レポーターアッセイではなく、ウェスタンブロッティングにより検討した。 α -Syn完全長cDNAをタンパク質発現プラスミドに組み込み、これをHEK293細胞に導入して α -Synタンパク質発現量をA型とG型で比較した。25nM miR-7、-153による抑制はA型とG型の間に差は認められなかった。(図3)

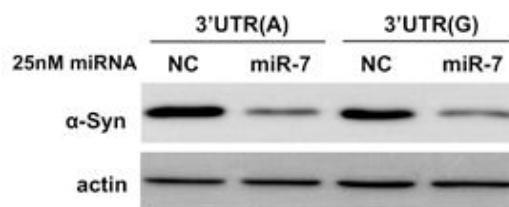


図3 miRNAによる α -Syn発現抑制に対する3'UTR SNPの影響～完全長 α -Synを導入した結果

これまでの結果により、無刺激時にはA型とG型で差が無いことが分かった。しかしながら、ドーパミンやロテノン処理下など α -Syn発現誘導条件についてはまだ検討できていない。今後はこれらの条件下において検討する必要があると考えられる。また、遺伝子導入の容易なHEK293細胞だけでなく、分化誘導したSH-SY5Yやラット胎児初代培養神経細胞などの神経系の細胞を用いて比較する必要もある。

(5) α -Syn発現ショウジョウバエの作成と複眼変性、免疫染色、ウェスタンブロッティングを利用した神経変性の評価法はすでに確立した。3'UTR SNPに影響を与えるmiRNAが判明した場合は、実験計画に基づいた評価をする準備ができています。

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 1 件)

水野 英哉、横山 千恵子、鮫島 由香、河

端 真実、中林 利克 「microRNA と低分子量
G タンパク質 Rhes が細胞表現型に与える影響
について」日本薬学会第 134 年会(熊本)2014
年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~seika1/publications.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 英哉 (MIZUNO, Hideya)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：90322578

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

永井 義隆 (NAGAI, Yoshitaka)

独立行政法人国立精神・神経医療研究セン

ター・神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号：60335354