

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461283

研究課題名(和文) マイクロRNAがRep1配列多型によるパーキンソン病発症リスク変化に与える影響

研究課題名(英文) Effects of microRNA on the risk of sporadic Parkinson disease associated with NACP-Rep1 polymorphic site

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：PARP1は、パーキンソン病の原因タンパク質 シヌクレインのプロモーター配列に結合することにより シヌクレインの発現を制御することが報告されている。培養細胞にPARP1全配列とmiRNA-124を導入したところ、PARP1発現量の有意な低下が認められた。さらに、PARP1の予測標的配列の一部の塩基配列を置換又は欠失した変異モデルを作成し、同様に検討したところ、miRNA-124によるPARP1発現量低下の回復傾向がみられた。miRNA-124は、直接的および間接的な作用によりPARP1発現を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Poly (ADP Ribose) Polymerase-1 (PARP1) binds to the NACP-Rep1 polymorphic site upstream of α -Synuclein (α -Syn) gene and negatively regulates α -Syn expression. When the construction of the plasmid carrying the PARP1 and miRNA-124 (miR-124) were cotransfected into cultured cells, miR-124 significantly reduced PARP1 expression. In order to specify the inhibitory mechanism, we mutated the predicted target sequence of miR-124 on the PARP1 mRNA 3' untranslated region in the plasmid by substitution or deletion of the nucleotides. The mutation partly eliminated the inhibition of PARP1 expression by miR-124. These results suggest that miR-124 inhibits PARP1 expression by binding not only directly to PARP1 mRNA 3' untranslated region, but also to another target mRNA.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経変性疾患 パーキンソン病 マイクロRNA SNP 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。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 シヌクレイン (α -Syn)、parkin、pink1 など様々な原因遺伝子が同定された。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增大することが明らかにされた¹⁾。そして、 α -Syn 遺伝子の重複変異が家族性 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た²⁾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。近年、NACP-Rep1 (Rep1) 領域の多型と孤発性の PD 発症との関連が注目されている。Rep1 は、 α -Syn 遺伝子のプロモーター領域に存在する二塩基反復配列で、 α -Syn タンパク質の発現を制御する。この部位の多型については PD 発症と相関するという報告とそうでないという結果が報告されている。このように相反する結果が得られることから、PD 発症には遺伝子型以外の因子が関係すると考えられる。Rep1 領域に poly-(ADP-ribose) transferase/polymerase-1 (PARP1) が結合することで、 α -Syn の発現が制御されていることが報告されていることから³⁾、申請者は、PD 発症のもう一つの因子として microRNA (miRNA) による PARP1 量の発現調節が関連するのではないかと考えた。

miRNA は 21-23nt 程度の一本鎖の 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、mRNA の分解やタンパク質翻訳阻害に関わることが知られている。これまでに千種類以上の 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^{4,5)}。miRNA は、DNA

メチル化やヒストン修飾などの遺伝子配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化や、酸化ストレスなどの環境因子によっても発現量変動することから、遺伝子型の違いだけでは説明できないタンパク質発現変化の原因である可能性が高い。

2. 研究の目的

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。患者の遺伝解析から、PD 病の原因タンパク質の一つである α -Syn のプロモーター上の NACP-Rep1 配列の多型と PD 発症リスクの関連が注目されている。本研究では、この配列に結合して α -Syn 転写を抑制的に制御する PARP1 の発現が、microRNA (miRNA) により抑制されて α -Syn 量が増加するため、孤発性 PD が発症しやすくなることを考えた。そこで、(1) PARP1 の発現を制御する miRNA とその調節機構、(2) PARP1 発現抑制 miRNA が細胞の α -Syn 発現と表現型に与える影響、(3) PARP1 発現抑制 miRNA が孤発性 PD 発症に与える影響を細胞レベルと PD モデルショウジョウバエを用いた個体レベルで明らかにする。本研究により、不明な点の多い孤発性 PD 発症機序の解明につながることを期待される。

3. 研究の方法

(細胞培養及び遺伝子または RNA の導入) HEK293 細胞は 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用い、5% CO₂、37 °C 条件下で培養した。PARP1 の相補的配列を含むプラスミドまたは miRNA と同じ配列の RNA 分子はリポフェクション法により導入し、24 時間以上培養した後、タンパク質の発現量を確認した。

(タンパク質の発現の確認) 細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解緩衝液を加えた。セルスクレーパーにより細胞を剥離し、溶解液を遠心チューブに移して氷上で 20 分間放置した。沈殿物を遠心除去して上清を以降の実験に用いた。上清中のタンパク質濃度は BCA protein assay により定量し、濃度を揃えてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、分子量で分離した。分離したタンパク質をメンブレンに転写した。メンブレンは 5% スキムミルク含有 Tris 緩衝生理食塩水+0.1% Tween-20 (TBS-T) で 30 分間ブロッキングした後、2.5% スキムミルク含有 TBS-T で希釈した一次抗体を加えて、4 °C で一晩反応させた。一次抗体には抗 actin 抗体、抗 PARP1 抗体を用いた。TBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、2% スキムミルク含有 TBS-T で希釈した二次抗体を加えて、室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、メンブレン上のタンパク質のバンドを化学発光法により検出した。

4. 研究成果

本研究では miRNA が PARP1 の発現に与える影響を明らかにすることを目的として以下の研究を行った。

ヒト胎児由来腎臓細胞 HEK293 に非翻訳領域を含む PARP1 全配列と miRNA 標的配列予測プログラムにより抑制することが予想された miR-124 と miR-506、神経細胞において多く発現していることが知られる miR-7、9、132、153 をそれぞれ 50 nM の濃度になるようにリポフェクション法により導入し、PARP1 発現量の変化をウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、miR-7、124、506 では PARP1 発現量の低下が認められた。(図 1)

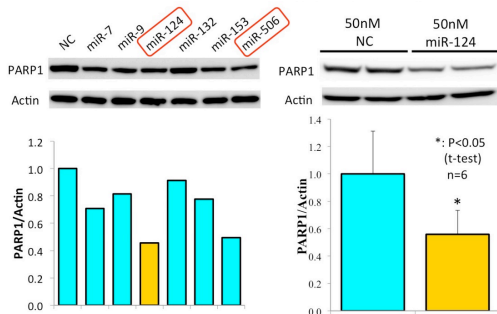


図 1 miR-124 は PARP1 発現を抑制する。

そこで発現量の低下率が最も大きかった miR-124 に注目して検討した。50 nM において発現量の有意な低下及び、miR-124 の濃度に依存した PARP1 の発現量の低下が認められた。(図 2)

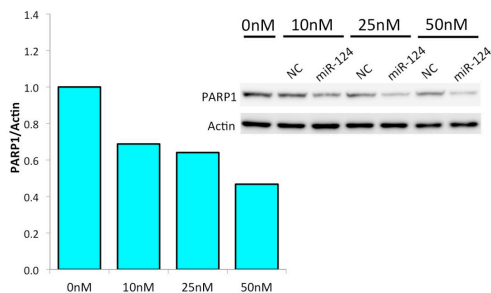


図 2 miR-124 は濃度依存的に PARP1 発現を抑制する。

さらに、miRNA 標的配列予測プログラムにより予測された PARP1 3'非翻訳領域上の miR-124 の標的配列を 5 塩基置換又は 5 塩基欠失した変異モデルを作成し、同様に検討した。変異及び欠失の両モデルにおいて完全ではないものの miR-124 による PARP1 発現量の低下の回復がみられた。(図 3)

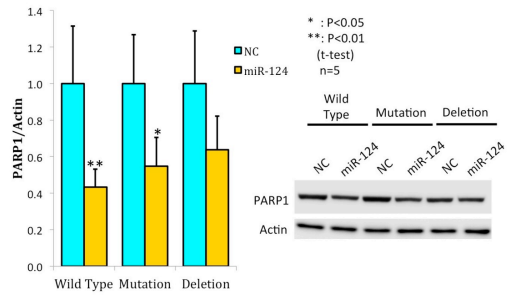


図 3 標的配列の変異は miR-124 による発現量低下を回復させた。

以上の結果より、miR-124 が PARP1 3'非翻訳領域を標的として PARP1 の発現を抑制する可能性が示唆された。今後は異なる部位の変異モデルを作成し、正確な標的配列を同定することを予定している。通常、miRNA は複数の標的をもつことから、他の標的 mRNA の翻訳抑制を介して間接的に PARP1 発現を抑制している可能性についても検討する必要がある。

さらに、神経細胞モデルである SH-SY5Y を用いて、miR-124 を作用させた際の内在性 PARP1 の発現量の変化について検討するとともに、PARP1 が発現を制御していると報告されている α -Syn の発現量の変化についても検討する予定である。さらに、エピジェネティックな α -Syn 発現制御、及び Rep1 配列多型による α -Syn 発現変化における PARP1 発現抑制 miRNA の影響について、培養細胞や PD モデルショウジョウバエの表現型 (α -Syn 発現量、封入体形成、複眼変性、運動障害など) を解析することを予定している。本研究によって miRNA が PARP1 の発現量を抑制するメカニズムが明らかにされることで、PD の治療法の開発につながる事が期待される。

<引用文献>

- ① Giasson et al, J Biol Chem, 274, 1999, 7619-7622
- ② Farrer et al, Ann Neurol, 55, 2004, 174-179
- ③ Chiba-Falek et al, Am J Hum Genet, 76, 2005, 478-492
- ④ Hebert et al, Proc Natl Acad Sci USA, 105, 2008, 6415-6420
- ⑤ Kim et al, Science, 317, 2007, 1220-1224

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ①水野英哉 「microRNA が PARP1 タンパ

ク質発現に与える影響について」日本薬学会
第137年会 2017年3月25日、仙台国際セ
ンター（宮城県・仙台市）

〔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) 連携研究者

永井 義隆 (NAGAI, Yoshitaka)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60335354