

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640123

研究課題名(和文)モデル動物によるパーキンソン病/アルツハイマー病原因遺伝子の周辺因子の網羅的網定

研究課題名(英文)Global identification of factors acting with Parkinson disease/Alzheimer disease genes.

研究代表者

久本 直毅 (Hisamoto, Naoki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80283456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病およびアルツハイマー病に関わる因子の研究はその発病機序の理解に重要である。LRRK2とAPP遺伝子はそれぞれパーキンソン病およびアルツハイマー病に関わることが知られているが、これらの遺伝子と共に機能する因子については不明の点が多い。本研究では、C.エレガンスをモデルとしてそれらの周辺で機能する因子の探索を行った。その結果、線虫LRRK2ホモログと共に機能する因子や、線虫APPホモログのタンパク質量を制御する因子を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Studies about factors associated with Parkinson's disease and Alzheimer's disease are important for understanding the mechanism of pathogenesis in these diseases. In humans, LRRK2 and APP genes are known to be involved in Parkinson's disease and Alzheimer's disease, respectively. However, little is known about the factors that function together with these genes. In this study, we screened for such factors using *Caenorhabditis elegans* as a model organism. As a result, we identified factors that act together with the *C. elegans* LRRK2 homolog, as well as factors that regulate the amount of a *C. elegans* APP homolog protein.

研究分野：分子生物学

キーワード：C. elegans APP LRRK2

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病およびパーキンソン病は深刻な神経変性疾患であり、高齢化社会においてその原因の理解は極めて重要なものとされている。近年の遺伝学、生化学および分子生物学的解析により、その原因とされる遺伝子変異や蛋白質が複数同定されており、その機能についての知見も蓄積しつつある。とはいえ、上記疾患には不明の点が多く、それゆえ更なる研究が必要であることは論を俟たない。疾患遺伝子が判明している場合、その上下流で機能する因子を悉く同定し解析することは研究を加速するための有効手段である。しかし、ヒトやマウス等を用いた従来の実験系は、上下流で機能する遺伝子を網羅的に単離・同定するスクリーニングには適していない。そしてこのような実験系の特性が、上記の疾患研究の迅速な進展を阻む理由の一つであると考えられる。

アルツハイマー病およびパーキンソン病の原因遺伝子の多くは、ヒトだけでなく多くの動物において保存されている。我々は、これまでに *C.エレガンス* をモデル動物として、アルツハイマー病およびパーキンソン病の原因遺伝子の機能や制御機構について、それぞれ独自に開発したアッセイ系を用いた解析を行っている。これまでに、ヒト家族性/孤発性パーキンソン病の原因遺伝子である *LRRK2* の *C.エレガンス* ホモログ *LRK-1* を同定し、これが神経細胞において神経非対称的な蛋白質輸送やミトコンドリア機能を制御することを報告した (Sakaguchi-Nakashima et al., Curr. Biol., 2007)。一方、アルツハイマー病の原因遺伝子であるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の *C.エレガンス* ホモログ *APL-1* が、微小管モーター蛋白質であるキネシン/ダイニン連携による逆行輸送により制御されることも見出していた (Arimoto et al., J. Neurosci., 2011)。

2. 研究の目的

上記の研究を踏まえ、本研究では *C.エレガンス* をモデル動物として、アルツハイマー病の原因遺伝子 APP およびパーキンソン病の原因遺伝子 *LRRK2* の周辺で機能する因子群を、独自のアッセイ系とゲノムワイド RNA 干渉スクリーニングの組み合わせにより網羅的に同定する。その後、*C.エレガンス* と哺乳動物培養細胞の両方の系を用いることにより、それらの機能についてそれぞれ解明する。

3. 研究の方法

(1) パーキンソン病の原因遺伝子 *LRRK2* の周辺因子の網羅的探索と同定

LRRK2 はパーキンソン病の原因遺伝子のひとつとして同定されているが、その生理学的な機能や制御については不明の部分が多い。そこでゲノムワイド RNA 干渉スクリーニングにより、*LRRK2* の *C.エレガンス* ホモログ *LRK-1* の変異体と同様の表現型を示すもの、

またはその表現型を抑圧するものについて、それぞれ網羅的に同定し検証する。

(2) アルツハイマー病の原因遺伝子の周辺で機能する因子群の網羅的探索と同定

APP はアルツハイマー病の原因遺伝子のひとつとして同定されており、またその遺伝子産物の一部はアルツハイマー病で見られるアミロイド班の構成成分である。これまでの研究から、ヒト APP 遺伝子の重複がアルツハイマー病の発症原因の一つであることが遺伝学的に示されていることから、APP のタンパク質量の増大がアルツハイマー病の一因である可能性が考えられている。しかしそのタンパク質量の制御については未知の部分が多い。そこでゲノムワイド RNA 干渉スクリーニングにより、APP の線虫ホモログ *APL-1* の蛋白質質量を制御する因子群を網羅的に同定し、その後検証解析を行う。

4. 研究成果

(1) パーキンソン病候補遺伝子のスクリーニング

神経細胞は軸索と樹状突起と呼ばれる異なる神経突起を同時に持ち、それら 2 種類の突起はそれぞれ異なる機能を果たしている。パーキンソン病の原因遺伝子 *PARK8* の線虫ホモログ *LRK-1* が欠損すると、通常は軸索特異的にしか局在しないシナプス小胞 (SV) タンパク質が樹状突起にも局在するようになる。そこでパーキンソン病候補遺伝子を得る目的で、遺伝子ノックダウンにより *lrk-1* 変異体と同様に SV タンパク質が樹状突起に異常局在する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、*lrk-1* 変異体と同様に頭部感覚神経において樹状突起への SV タンパク質の局在異常を起こすものを複数同定した。そのうちのひとつは JNK 結合タンパク質 *JIP3* の線虫ホモログ *unc-16* と同一だったので、これについてさらに詳細な解析を行った。*UNC-16* は、線虫の JNK-1 MAP キナーゼおよび *JKK-1* MAP キナーゼキナーゼと結合して D 型運動神経で機能することがわかっている。しかし、*jnk-1* 変異体および *jjk-1* 変異体では、*unc-16* 変異体とは異なり頭部感覚神経における樹状突起への SV タンパク質の局在異常の表現型が見られなかった。このことから、*UNC-16* は頭部感覚神経における SV タンパク質の局在制御を JNK-1 非依存的なメカニズムにより行っていると考えられる。また、哺乳動物培養細胞を用いた生化学的実験により、*UNC-16* と *LRK-1* の結合が確認された。さらに遺伝学的解析から、*UNC-16* が *LRK-1* の上流で機能することも示唆された。これらのことから、*UNC-16* は *LRK-1* と複合体を形成してこれを制御することにより、JNK MAP キナーゼカスケードに依存しない形で SV タンパク質の局在を制御すると考えられる。

樹状突起への SV タンパク質の局在異常を起こすもののうち、2 番目に詳細に解析した

遺伝子は、リン脂質である PI(3,5)P2 の合成を制御する因子のホモログをコードしていた。この遺伝子(A とする)の変異体を作成して調べたところ、通常の状態では局在異常の表現型が弱いものの、線虫個体に飢餓ストレスを与えると著しく上昇することが判明した。このことは A 遺伝子の機能と飢餓ストレスとの間に何らかの関係があることを示唆している。この研究と並行して、我々は BAG2 の線虫ホモログである UNC-23 が、HSC70 ホモログ HSP-1 を介して LRK-1 に結合し、そのゴルジ体への局在を制御することも見出し、論文として報告した(発表論文参照)。興味深いことに、A 遺伝子の変異体は SV タンパク質の局在異常だけでなく、*unc-23* 変異体と類似した頭部形態異常も示す。この形態異常は *lrk-1* 変異体では見られないものであることから、A 遺伝子は LRK-1 よりむしろその上流で機能する UNC-23 の近傍で働く因子なのではないかと推測される。

(2) アルツハイマー病候補遺伝子のスクリーニング

我々はまず、APP の C.エレガンスホモログである APL-1 に GFP をつなげた融合遺伝子を用いて、そのタンパク質量を個体内で可視化するシステムを構築した。それを用いた解析から、APL-1 タンパク質の軸索における量を制御する機構のひとつが、ダイニンによる逆行輸送であることを見出した。一方、ヒトでは γ -セクレターゼであるプレセニリンもアルツハイマー病の原因遺伝子であることが分かっており、その切断も APP 代謝制御のひとつとされている。そこで C.エレガンスの γ -セクレターゼホモログである *sel-12* 変異について調べたところ、この変異によっても APL-1 タンパク質量が増加することを見いだした。SEL-12 による APL-1 蛋白質量の制御と、前述のダイニンによる制御との関係を調べる目的で、ダイニン変異と *sel-12* 変異の二重変異体を作成して、その APL-1 タンパク質量を調べたところ、それぞれ単独の変異体と比べて APL-1 タンパク質量の顕著な増加が認められた。このことから、この 2 つの経路は異なる経路であると考えられる。上述の結果を踏まえ、次に APL-1 のタンパク質量を制御する新たな遺伝子のスクリーニングを行った。その結果複数の候補を単離したが、そのひとつは JNK 結合タンパク質のひとつ JIP1 の線虫ホモログ JIP-1 であった。そこで *jip-1* 遺伝子欠損変異体を作成し、その APL-1 タンパク質量を調べたところ、その量が明らかに増加することを見出した。この増加は JNK MAP キナーゼ経路の変異体では起こらないことから、JIP-1 は JNK 経路に依存しない形で APL-1 タンパク質量を制御すると思われる。Yeast two-hybrid 法を用いた解析では、JIP-1 は APL-1 タンパク質の細胞質ドメインと結合する。さらに、遺伝学的解析から、*jip-1* 変異体での APL-1 タンパク質量の増大はプレセ

ニリンとは別経路であるが、ダイニンと同一経路であることも明らかになった。さらなる解析から、*jip-1* 変異体ではダイニン変異体と同様に APL-1 タンパク質の逆行輸送が消失していることも判明した。これらのことから、JIP-1 は APL-1 に結合してダイニンによる逆光輸送を制御することにより、APL-1 タンパク質量を制御していることが示唆された。これとは別に、APL-1 タンパク質量を制御する他の因子として、低分子量 G タンパク質をコードする RAB7 の線虫ホモログ RAB-7 も同定された。RAB-7 はリソソームへの輸送経路で機能することから、リソソームでの分解経路も APL-1 のタンパク量の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

(3) まとめ

以上の結果から、アルツハイマー病およびパーキンソン病の原因遺伝子の候補となりうる遺伝子を、それぞれ複数同定することに成功した。スクリーニングで同定されたものの未解析の因子がまだ複数あり、それらについての詳細な解析は萌芽的研究の範疇を越えるため別の研究に委ねることになるが、少なくともその一部については既存因子との関係性や相互作用まで確認できたことから、萌芽的研究としては一定の成功を収めたものと考えられる。

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 5 件、すべて査読あり)

Alam Tanimul, Hiroki Maruyama, Chun Li, Strahil Ivanov Pastuhov, Paola Nix, Michael Bastiani, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto.

Axotomy-induced HIF/serotonin signaling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*.

Nature Communications 7, 10388 (2016).

doi:10.1038/ncomms10388

Takashi Fukuzono, Strahil Ivanov Pastuhov, Okunobu Fukushima, Chun Li, Ayuna Hattori, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Hiroshi Shibuya, Hiroshi Hanafusa, Kunihiro Matsumoto, Naoki Hisamoto.

The chaperone complex BAG2-HSC70 regulates localization of *C. elegans* Leucine-rich repeat kinase LRK-1 in the Golgi.

Genes to Cells, 21, 311-324(2016).

doi: 10.1111/gtc.12338.

Chun Li, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto.

Axon regeneration is regulated by Ets-C/EBP transcription complexes generated by activation of the cAMP/Ca²⁺-p38 MAPK signaling pathways. **PLoS Genetics 11, e1005603 (2015)**. doi: 10.1371/journal.pgen.1005603.

Strahil Ivanov Pastuhov, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto. MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*. **Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences 91, 63-75 (2015)**. doi: 10.2183/pjab.91.63.

Naoki Hisamoto, Chun Li, Motoki Yoshida, Kunihiro Matsumoto. The *C. elegans* HGF/plasminogen-like protein SVH-1 has protease-dependent and -independent functions. **Cell Reports 9, 1628-34 (2014)**. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.056.

〔学会発表〕(計 1 件)

久本直毅、線虫HGF/プラスミノゲン様タンパク質SVH-1は増殖因子としてだけでなく細胞外マトリクスを調節するプロテアーゼとしても機能する。日本分子生物学会第36回年会、2014年11月27日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔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

久本 直毅(ヒサモト ナオキ)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：80283456

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：