

タチオンSトランスフェラーゼとの融合タンパク質として大腸菌で発現させた。発現タンパク質をグルタチオンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィにより均一に精製した。精製したタンパク質をウサギ二羽に免疫することにより抗血清を作製した。

マウス脳抽出液を用いたウエスタンブロッティング、および、マウス脳やヒト剖検脳に対する免疫組織化学は通常の方法により行った。

(倫理面への配慮)

ヒト剖検脳の使用に際しては、国立病院機構相模原病院の倫理委員会規定に則り、研究目的での臓器利用に関する同意の得られているものを用いた。

C.研究結果

まず、抗血清の特異性を確認するために、全長LRRK2をCOS細胞にトランスフェクションした細胞抽出液に対してウエスタンブロッティングを行った。キナーゼドメインの抗原を2羽のウサギに免疫することにより作製した2種の抗血清#1と#2は、どちらも全長LRRK2と考えられる280kDaのバンドを強く認識した。LRRK2をトランスフェクトしていないCOS細胞抽出液においてはこのバンドは現れなかった。#1と#2では、トランスフェクトしていないCOS細胞で現れる非特異的バンドが#1の方が少なく、#1の方が特異性の高い抗体であることが示唆された。#1の抗体を用いてマウス脳抽出液に対してウエスタンブロッティングを行ったところ、LRRK2をトランスフェクトしたCOS細胞で検出された280kDa付近のバンドと同じ位置にバンドを検出することができ、この抗体がマウス内在のLRRK2を認識できることが示された。また、280kDaのバンド以外に75kDa付近にも認識されるバンドがあり、LRRK2が脳内で限定分解産物としても存在している可能性が示唆された。

LRRK2の細胞内局在を調べるために、マウス脳を可溶性画分、ミトコンドリア画分、核画分に

分画してから、ウエスタンブロッティングによりLRRK2が検出される場所を調べた。その結果、可溶性画分にはLRRK2が検出されず、核やミトコンドリア画分にLRRK2が主に存在していることが判明した。

次にこの抗体を用いて、マウス脳に対する免疫組織化学的解析を行った。主にニューロンと考えられる大型の細胞が免疫陽性となった。この免疫陽性細胞は脳全体に広く分布しており、ドーパミンニューロンなど特定のニューロンには局在していないことが示された。

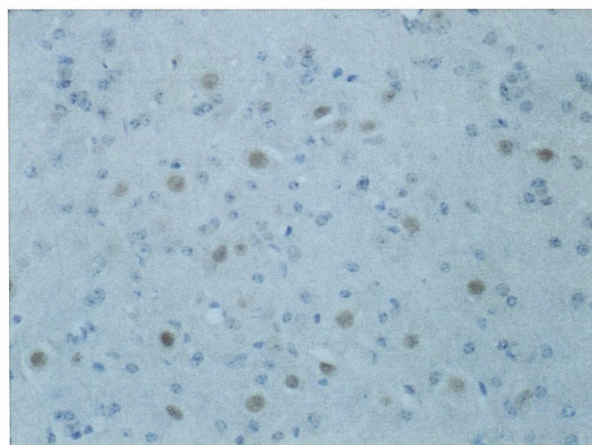


図1、マウス脳歯状回付近の免疫組織化学

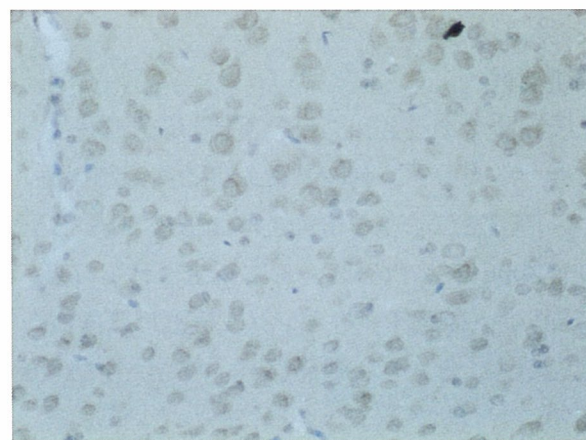


図2、マウス脳大脳皮質の免疫組織化学

脳の部位別に詳しく観察した結果、大脳基底核や海馬歯状回付近においては、核や核周囲に比較的強い免疫反応性が認められた(図1)。一方、大脳皮質や小脳プルキンエ細胞においては、核より

核周囲や細胞質部分に比較的強い免疫反応性が認められ(図 2)、脳の部位によって LRRK2 の細胞内局在が変化していると考えられた。

ヒト剖検脳においても同様の解析を行った。マウス脳と同様に、LRRK2 免疫陽性細胞は脳全体に広く分布した。細胞内局在においても核や核周囲が強く染色される部位と、核が染色されずに核周囲や細胞質が比較的強く染色される部位とが認められた。

D. 考察

今回の我々の解析から、LRRK2 がドーパミンニューロンに特に多く分布しているということは認められず、脳内の幅広いニューロンに広く散在していることが明らかとなった。LRRK2 の遺伝子変異がなぜドーパミンニューロンの変性をもたらすのか不明であるが、今回の結果から LRRK2 タンパク質自体の発現量とは直接関連しないことが示唆された。また、LRRK2 がニューロンの生存にとって重要な細胞内シグナルの伝達に関わっている可能性が高いことから、LRRK2 タンパク質の異常はパーキンソン病ばかりでなく、広く他の神経変性疾患を引き起こす可能性があることを示唆した。

また、LRRK2 の細胞内局在が同一個体においてもニューロンごとに差があることがわかった。さらに、隣り合っているニューロンでも LRRK2 陽性となる細胞と陽性とならない細胞があることがわかった。このような違いがどのような理由により生じているのか解明していくことが、LRRK2 の機能の解明に繋がっていくと考えている。今後さらに、本抗体を用いて LRRK2 と相互作用する分子の同定などを行っていく予定である。

E. 結論

LRRK2 に対する特異抗体の作製に成功した。本抗体を用いた免疫組織化学的解析から、LRRK2 が脳全体に広く散在していること、ニュー

ロンによって細胞内局在が異なっていることが明らかとなった。今後さらに本抗体を用いて LRRK2 によるパーキンソン病発症機構の解析を進めていく。

F. 文献

1. Funayama M. et al. Ann Neurol 51, 296-301, 2002
2. Paisan-Ruiz C. et al. Neuron 44, 595-600, 2004
3. Zimprich A. et al. Neuron, 44, 601-607, 2004
4. Funayama M. et al. Ann Neurol 57, 918-921, 2005

G. 健康危険情報

該当なし

H. 学会発表

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
該当なし

パーキンソン病患者血清に分泌される DJ-1 の動態に関する検討

分担研究者氏名 佐々木秀直¹⁾

研究協力者氏名 辻 幸子¹⁾，矢部一郎¹⁾，米田千夏²⁾，有賀寛芳²⁾，緒方昭彦³⁾、
濱田 毅⁴⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科病態神経学講座神経内科

2) 北海道大学大学院薬学研究院分子生物分野

3) 北海道脳神経外科記念病院

4) 北祐会神経内科病院

研究要旨

現在パーキンソン病では臨床的に使用できる血液データ異常は知られていない。DJ-1 は家族性パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子として同定され、酸化ストレスに応答して発現が増強する。パーキンソン病の病態には酸化ストレスの関与が強く疑われていることから、DJ-1 が血液検査上のバイオマーカーとなりうるかを検討した。研究は医の倫理委員会で承認を得て行なった。研究説明は文書により行ない、文書で同意を得た。対象はパーキンソン病患者及び健常コントロール、疾患コントロール、合計 161 名である。血清中 DJ-1 濃度は ELISA 法にて測定した。健常者とパーキンソン病患者の各重症度を比較したところ Yahr V 群で血清 DJ-1 濃度はやや低い傾向は見られた他には明らかな相関は得られなかった。Yahr V 群は症例数が少なかったため、更に症例数を増やして検討する必要があるとともに、今後は総 DJ-1 濃度だけでなく活性型 DJ-1 アイソフォームを区別して検討することが重要と考えられた。

A. 研究目的

DJ-1 は 1997 年に新規癌遺伝子として同定され、更に 2003 年に家族性パーキンソン病（PARK7）の原因遺伝子であることが判明した。DJ-1 には抗酸化ストレス、転写制御因子、プロテアーゼ、ミトコンドリア複合体 I 制御などの多彩な機能が知られているが、PARK7 は常染色体劣性遺伝形式をとり、DJ-1 の機能不全が発症に関与すると考えられている。DJ-1 は 3 カ所の酸化部位を持ち、106 番のシステインが適度に酸化されること

が活性に必須である¹⁾。孤発性パーキンソン病の脳内では未酸化型 DJ-1 の消失や過剰酸化型アイソフォームの蓄積が報告されており、孤発性パーキンソン病においても DJ-1 の活性低下が病態に関与している可能性が示唆されている²⁾。また、軽症パーキンソン病患者では髄液中 DJ-1 の増加が報告されている³⁾。

DJ-1 は全身の諸臓器に普遍的に発現しており、酸化ストレス下で増加する。血清 DJ-1 は脳梗塞急性期や各種癌などで増加する⁴⁾ことや肺癌の予

後⁵⁾と相関することが知られており、これらの疾患でバイオマーカーとしての価値が検討されている。現在、パーキンソン病では診断や病勢判定に有用な特徴的な血液検査異常は知られていないことから、今回我々はパーキンソン病患者の血清 DJ-1 を測定し臨床応用が可能かを検討した。

B. 研究方法

Yahr I-V の患者、健常コントロール、疾患コントロールにおいて、血清総 DJ-1 量を cyclex 社製 ELISA キットを用いて測定した。さらに、Wismarll 社製 FRAS4 を用いて血清ヒドロキシラジカル測定による酸化ストレス度を測定した。

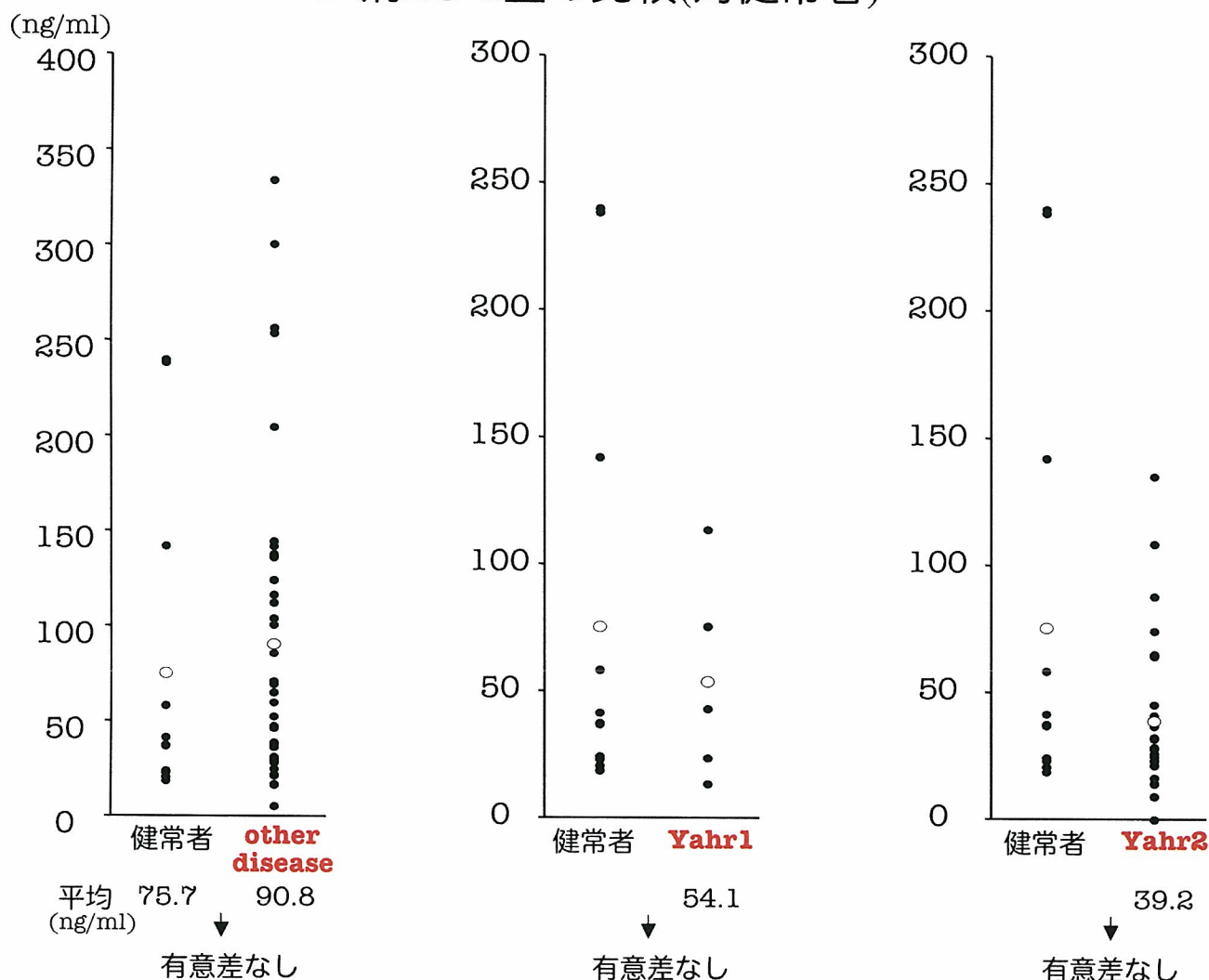
研究は医の倫理委員会で承認を得た。対象者への説明は文書により行ない、文書により同意を得た。

C. 研究結果

健常コントロール 13 名 (63.1±12.4 歳)、疾患コントロール 39 名 (61.5±11.9 歳)、パーキンソン病間 109 名 (67.1±9.35 歳) から承諾を得て採血した。血清中総 DJ-1、酸化ストレス度の平均値はそれぞれ健常コントロール群 75.7 (ng/mL)、25.53 (J.CARR)、疾患コントロール群 90.8、295.2、パーキンソン病群 Yahr I 度 54.1、292.4、Yahr II 度 39.2、315.4、Yahr III 度 81.6、290.7、Yahr IV 度 44.9、304.7、Yahr V 度 22.8、366.7 であり、各群の健常者群との比較では、Yahr V 度のみ有意に血清 DJ-1 は低値を示した。しかし Yahr V 度の患者は 4 名しか含まれていないことから、結論を出すにはさらに症例数を増やして検討する必要があると考えられた。

血清 DJ-1 基礎値が年齢によって影響を受ける可能性を考慮し、年代毎に分類し検討を加えたが、患者間では年齢による有意な変化は見られな

血清 DJ-1 量の比較(対健常者)



かった。

血清酸化ストレス度の測定は健常コントロール、疾患コントロール、パーキンソン病の各重症度間で有意差はみられなかった。年代別の検討でも有意差はみられなかった。

D. 考察

今回の検討では血清総 DJ-1 量を測定し有意な差を得ることができなかったが、DJ-1 の活性は 106 番システインの-HSO₂化を必須とするため、その機能の変化をみるには総量のみでなく、酸化型アイソフォームの分画や全体に占める活性化型の割合を検討する必要がある。現在、酸化型アイソフォーム測定法を検討中で、実用化できればこの観点から再度検討が必要と思われる。

E. 結論

血清総 DJ-1 量は健常コントロールと比べ重症

パーキンソン病患者で増加している可能性が示唆された。

F. 文献

- 1) 有賀寛芳：神経内科 135-139, 2006
- 2) Waragai M., et al. : BBRC 967-972, 2006
- 3) Bandopadhyay R, et al.: Brain. 420-430, 2004
- 4) Allerd M., et al.: Clin Chem 2001-2002, 2005
- 5) Kim RH. Et al.: Cancer Cell267-273, 2005

G. 健康危険情報

特になし

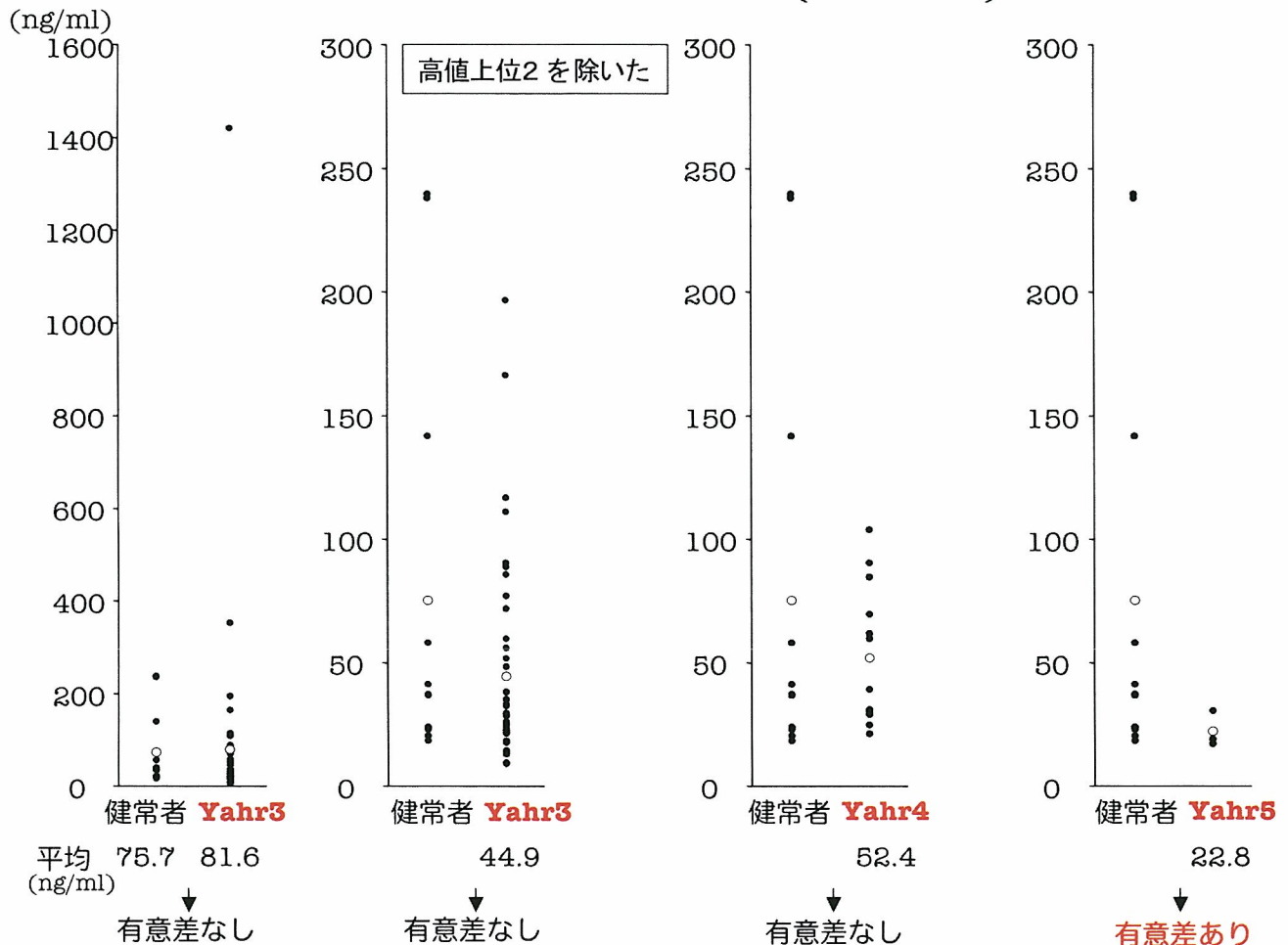
H. 学会発表

未定

I. 知的所有権の取得状況

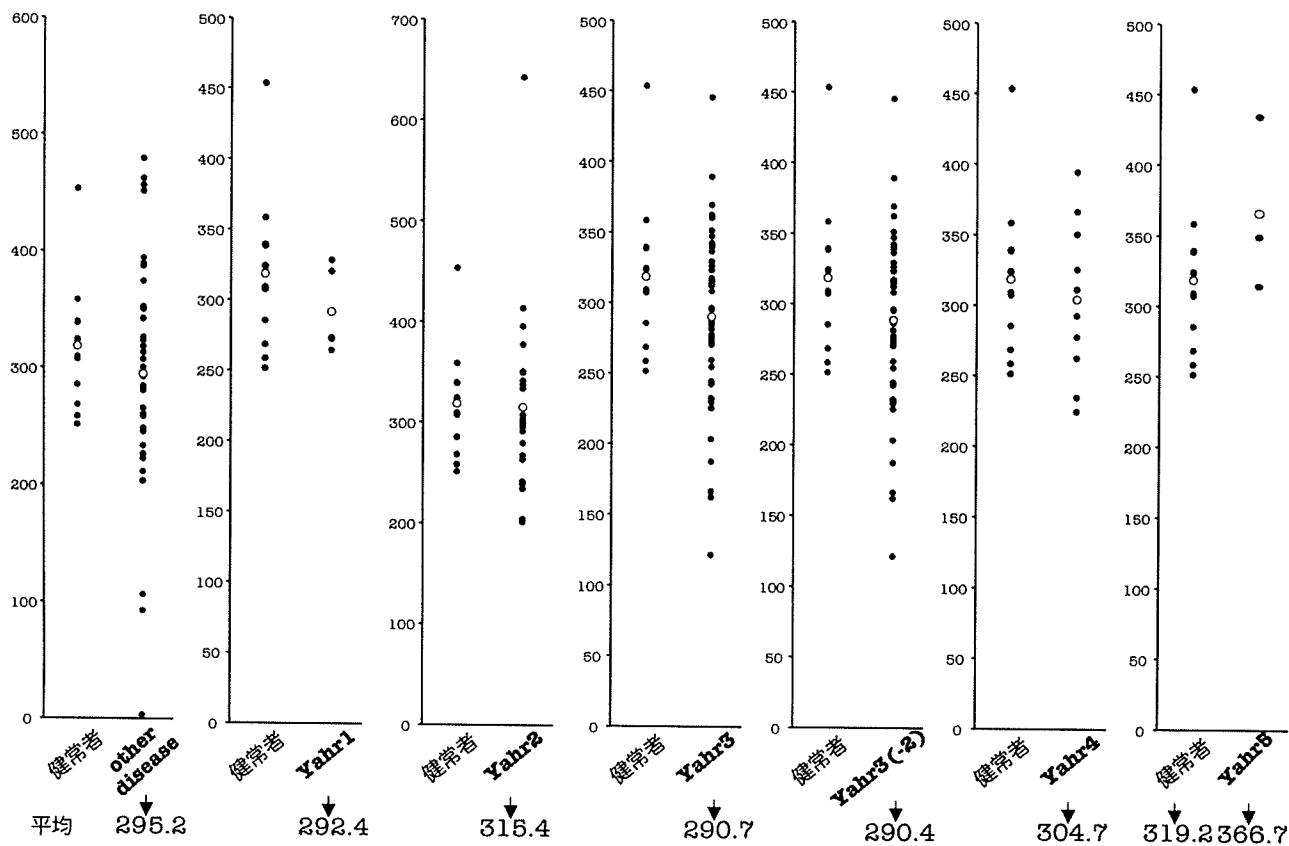
- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

血清DJ-1量の比較その2(対健常者)



- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

健常者と Yahr 分類間における酸化ストレス度の比較



パーキンソン病関連遺伝子探索と機能解析

戸田達史¹⁾、水田依久子¹⁾、佐竹渉¹⁾、
猪子英俊³⁾、山本光利⁴⁾、服部信孝⁵⁾、村田美穂⁶⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学、²⁾東海大学分子生命科学 2、
³⁾香川県立中央病院神経内科、⁴⁾順天堂大学脳神経内科、⁵⁾国立精神・神経センター武蔵病院神経内科

研究趣旨

我々は多因子遺伝疾患である孤発性パーキンソン病（PD）感受性遺伝子を明らかにするために、種々のアプローチを進めてきた。ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析では 124-250 人単位の pooled DNA と、27,158 個の MS マーカーを用いて、1-3 次スクリーニングを完了し、 $P < 0.0001$ の MS を 3 個発見した。多数の候補遺伝子、SNP マーカーを用いた関連解析により、孤発性 PD の確実な感受性遺伝子として *SNCA* を同定することができた。プール SNP array 手法は、患者対照各 500 人の、100 K SNP 関連解析を、超短期間・低コストで行うことを可能にした。また中国の AD-PD 家系を見出し新規 PARK 家系であると考えられた。

はじめに

パーキンソン病（PD）は多因子遺伝性疾患と考えられ、家族性 PD の原因遺伝子として α -synuclein や parkin、DJ-1、NR4A2、PINK1 遺伝子が発見されたが、患者の大部分を占める孤発性 PD では疾患感受性遺伝子は同定されていない。

また孤発例では、振戦を主体とする群、抗パーキンソン病薬で副作用を起こしやすい群など、その経過・中心となる症状・薬剤の効果は患者により異なり、このことは従来 PD として一括して行われていた遺伝解析に階層化を可能にし、遺伝子多型によって患者個人個人に必要な薬剤を必要な量投与するオーダーメイド医療が可能であることを意味する。

本研究では、1) ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析、多数の候補遺伝子 SNP に基づく階層化を考慮した大規模関連解析、または罹患同胞対法などのノンパラメトリック連鎖解析などを行い、疾患感受性遺伝子を同定する、2) SNP と各薬剤への反応性、副作用との関連を明らかにしテラーメイド治療法を確立する、ことを行う。

対象および方法

①ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析 pooled DNA スクリーニングで絞り込まれた 280 個の MS に関して、個別検体タイピングによる関連の検証を完了する。有意な MS に関して、周辺 SNP を関連解析する。

②候補遺伝子 SNPs 解析では、2 次スクリーニングで強い相関を持つ SNP を捜し、連鎖不平衡マッピング、シーケンス、機能解析により、PD 感受性遺伝子の同定を目指し、機能解析へとすすめる。

③SNP chip を用いた全ゲノム関連解析を開始させる、とともに中国の新規 PARK 家系の全ゲノム連鎖解析を行う。

④さらに患者検体の収集に努める。関連が微妙な SNP は、より多数検体での検証に努める。

研究結果

ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析

124-250 人単位の pooled DNA と、27, 158 個の MS マーカーを用いて、1-3 次スクリーニングを完了し、候補領域を 280 個所に絞り込んだ。113 個の MS に関して、個別検体を用いた関連の検証が終了し、 $P < 0.0001$ の MS を 3 個発見した。

多数の候補遺伝子 SNP に基づく関連解析

数百個の候補遺伝子上 SNP マーカーを用いた患者・対照関連解析では、家族性 PD、ドーパミン、タンパク質分解などに関連する 121 個の候補遺伝子上の計 268SNPs を解析し、二次スクリーニングとして、患者・対照各約 900 人に増やして関連解析した結果、 α -synuclein (SNCA) 遺伝子の intron 4 上に存在する SNP に $p=5.0 \times 10^{-10}$ という極めて強い関連を見出した。この SNP の周辺で連鎖不平衡マッピングを行い、さらに関連解析にて、その SNP と高い r^2 値 (>0.85) をとる周囲の計 6 個の SNPs が全て PD と強い関連 ($p=2.0 \times 10^{-9}$ – 1.7×10^{-11}) を示すこ

とを見出した。これらの SNP の各遺伝子型ごとに SNCA 発現をみたところ、剖検脳にて PD associated allele の数に応じ、SNCA 遺伝子発現が増加している傾向がみられた。これらの SNPs について、ルシフェラーゼアッセイや EMSA による機能解析を進行中である。

PD として過去の関連解析はサンプル数も 200-300、 p 値も 0.01-0.001 程度で、追試で反対の結果が出たりするなど、確実に発症リスクを高める遺伝因子は現在まで確認されていなかった。今回同定された α -synuclein 遺伝子は p 値も 10^{-11} と極めて強い相関を示しこのようなものは初めてで、はじめて確実なパーキンソン病疾患感受性遺伝子を同定したことになる、といえる。

さらに、二次スクリーニングで $P=10^{-3}$ – 10^{-4} の SNPs についてはさらに検体を増やして再現性を確認していく。

100 K SNP array と pooled DNA を用いた関連解析

アレル頻度が既知の混合検体を作成し、100 K SNP array の定量性を観察したところ、RAS 値と、アレル頻度は強い正の相関を示した。PD 患者 500 人と対照 500 人から成る pooled DNA を作成し、100 K SNP array のシグナル強度より、RAS 値を算出、推定アレル頻度を算出し、関連解析を行った。有意な関連が予想された SNP について、個別検体を用いて、TaqMan 法で関連を検証したところ、 $P = 6.6 \times 10^{-4}$ の関連を示す SNP を見出した。さらに、周辺の Tag SNP 解析により、 $P = 5.7 \times 10^{-5}$ の関連を示す SNP を発見した。このように、本手法は、

患者対照各 500 人の、100 K SNP 関連解析を、超短期間・低コストで行うことを可能にした。

新規 PARK 家系の発見

中国における、AD 形式で 3 世代にわたり連鎖する PD 大家系を見出した。既知の AD-PD 遺伝子は、SNCA, LRRK2 のみであるが、これら近傍（数百 kb 内）の MS を用いて連鎖解析を行ったところ、本家系との連鎖は棄却され、本家系は新規 PARK 家系であると考えられた。現在全ゲノム連鎖解析中である。

考察

プール SNP array 手法は、患者対照各 500 人の、100 K SNP 関連解析を、超短期間・低コストで行うことを可能にした。また中国の AD-PD 家系は新規 PARK 家系であると考えられた。

文献

1) Mizuta I et al. *Hum Mol Genet* 15:1151-1158, 2006

健康危険情報

特になし

研究発表

1. 論文発表

Mizuta I et al. *Hum Mol Genet* 15:1151-1158, 2006

Nishioka K et al. *Ann Neurol* 59:298-309, 2006

Tomiyama H et al. *Mov Disord* 21:1102-1108, 2006

Funayama M et al. *Neuroreport* (in press)

2. 学会発表

日本神経学会 2006

日本人類遺伝学会 2006

アメリカ人類遺伝学会 2006
北米神経科学会 2006
2th GEO-PD 2006

知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

認知症を伴う遺伝性パーキンソニズムにおける α -synuclein 遺伝子重複の検討

高野弘基¹⁾, 池内 健²⁾, 春日健作^{1,2)}, 志賀 篤^{1,2)}, 金子博之^{1,2)}, 柿田明美^{2,3)},
内山 剛⁴⁾, 大橋寿彦⁴⁾, 石川 厚⁵⁾, 高橋 均³⁾, 西澤正豊¹⁾, 小野寺理

¹⁾新潟大学脳研究所神経内科, ²⁾同 生命科学リソース研究センター, ³⁾同 病理学,
⁴⁾聖隷浜松病院神経内科, ⁵⁾阿賀野病院神経内科

研究要旨

認知症を伴うパーキンソン病 (PDD) およびレビー小体型認知症 (DLB) を表現型とする家系において, α -synuclein 遺伝子 (*SNCA*) の点変異, 重複変異, LRRK2 遺伝子点変異, presenilin 1 遺伝子変異などが報告されている. 本研究では, 遺伝性 PDD/DLB における *SNCA* 重複変異の検討と, 認知症発病機序について検討した. 3家系において *SNCA* 二重変異を認めた. 遺伝子重複のゲノム DNA における範囲は, 3家系とも異なっており, 異なる founder が推定された. いずれの家系も, 強い認知障害, もしくは精神症状を伴っていた. 既報と我々の結果を総合すると, *SNCA* 二重重複の臨床型は, 特発性パーキンソン病に類似のものから重度の認知症を伴うもの, あるいはレビー小体型認知症を呈するものまで幅広いものが示唆された.

A. 研究目的

認知症を伴う遺伝性パーキンソニズムおよび遺伝性レビー小体型認知症の遺伝子変異として α -synuclein 遺伝子 (*SNCA*) 重複変異の有無, および認知症の発現機序について検討する.

B. 研究方法

患者より同意をえて当科ゲノム DNA バンクに保存されているサンプルを用い, *SNCA* 内および周辺のマイクロサテライト多型マーカーを用い半定量 PCR 解析を行った. さらに, *SNCA* および周辺遺伝子の遺伝子量を決定するために real-time PCR を行った. また, ApoE 多型を, 制限酵素 *HhaI* を用いた PCR-RFLP

により決定した.

剖検例の凍結脳組織から異なる界面活性剤 (Tris-HCl, Triton X-100, Sarkosyl, urea) にてタンパクの可溶化を既報の方法により行った^{1,2)}. Triton X-100 分画における総タンパク濃度を BCA にて測定し, サンプル量を補正した. SDS-PAGE にて分離後, 抗 α -synuclein 特異抗体 (syn-1, LB509, p-syn#64) および抗 A β 特異抗体 (82E1) を用いて免疫ブロットにて解析した³⁾.

C. 研究結果

SNCA exons 2 と 6 領域にプライマーを設定し, real-time PCR にて遺伝子量の検討を行ったところ, 3

家系において遺伝子量が約1.5を示し、duplicationが生じているものと思われた。ゲノム DNA 上における duplication の範囲を決定するために、周辺の遺伝子における遺伝子量を real-time PCR 法にて調べたところ、3家系とも異なる範囲の duplication を認めた。

次に、duplication を認めた家系の発症者について ApoE のタイピングを行ったところ、1家系は、すべての発症者が ApoE ε4 をヘテロもしくはホモ接合体で有していた。しかしながら、他の2家系の発症者では ApoE ε3/3 であった。

剖検脳を用いた解析では、Tris 分画、Triton X-100 可溶性分画ではコントロール脳と差異を見いだせなかったが、duplication を呈した患者脳の Sarkocyl 不溶性 urea 可溶性分画では、α-synuclein の異常蓄積を認めた。異常蓄積していたα-synuclein はリン酸化抗体に反応性であり、リン酸化α-synuclein が蓄積していることが示唆された。興味深いことに、ApoE ε4/4 の患者脳においてα-synuclein の dimer/oligomer 形成が、ApoE ε3/4 と比較し顕著に増加していた。

Duplication を認めた発症者の臨床病型を検討したところ、2家系はパーキンソニズムで発症し、発病後2～11年で認知症を合併した。1家系では抑うつ、神経症で発病し、後にパーキンソニズムおよび視覚性の幻覚を伴い Lewy 小体病に特徴的な病型を示した。

D. 考察

SNCA の triplication 変異を有する既報の家系では、発症年齢が平均30歳代と若く、臨床的には認知症を伴う頻度が高いことが報告されている^{4,5)}。一方、SNCA duplication 変異を有する家系では、認知症を伴うことは稀であり、特発性のパーキンソン病類似の表現型をとることが多いと報告されている⁶⁻⁸⁾。我々が検討した duplication を呈した家系では、いずれも強い認知症あるいは精神症状を認めており^{9,10)}、この点は既報と異なっていた。

認知症を生じる機序として ApoE ε4 多型が関与する可能性を考え、ApoE 多型を解析したところ、1家系において ApoE ε4 を認めた。さらに、剖検脳を用いた解析では、ApoE ε4 ホモ接合体の患者脳では、α-synuclein の dimer/oligomer 蓄積が上昇していた。従って、ApoE ε4 単独で認知症の発現機序を説明するのは困難であると思われたが、剖検脳を用いた解析をも考慮すると、α-synuclein の凝集機序、ひいては認知症発現に ApoE ε4 が部分的に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

遺伝性 PDD/DLB3 家系に SNCA 重複変異を見だし、本邦においては比較的頻度の高い変異と考えられた。今回の結果と既報を合わせると、SNCA 二重変異の臨床型は、特発性パーキンソン病に類似のものから重度の認知症を伴うもの、あるいは Lewy 小体型認知症を呈するものまで幅広いものが示唆された。認知症の併発には、ApoE ε4 が部分的に関与しているものの、それ以外の遺伝的要因も存在し、今後の検討課題と思われた。

F. 文献

1. Fujiwara H, et al. Nat Cell Biol 4:160-164, 2002
2. Hasegawa M, et al. J Biol Chem 277:49071-49076, 2002
3. Ikeuchi T, et al. J Biol Chem 278:7010-7018, 2003
4. Singleton AB et al. Science 302:841, 2003
5. Farrer M, et al. Ann Neurol 55:174-179, 2004
6. Chartier-Harlin MC, et al. Lancet 364:1167-1169, 2004
7. Ibanez P, et al. Lancet 364:1169-1171, 2004
8. Nishioka K, et al. Ann Neurol 59:298-309, 2006
9. Wakabayashi K, et al. Acta Neuropathol 96:207-210, 1998
10. Ishikawa A et al. Eur Neurol 38(Suppl 1):34-38, 1997

G. 健康危険情報

特になし

H.学会発表

志賀篤ほか: α -Synuclein 遺伝子重複を認めた遺伝性Lewy小体病の分子遺伝学および生化学的解析.
第25回日本認知症学会学術集会(広島), 2006年
10月

I.知的所有権の取得状況

特になし

α-synuclein のドパミン神経毒性に対する UCH-L1 の効果

水野美邦¹⁾、安田徹¹⁾、和田圭司³⁾、望月秀樹^{1),2)}、服部信孝²⁾

¹⁾順天堂大学老人性疾患病態・治療研究センター、

²⁾順天堂大学医学部脳神経内科、

³⁾国立精神神経センター神経研究所

研究要旨

現在まで、家族性パーキンソン病 (PD) の原因遺伝子が次々と同定されているが、本研究ではその遺伝子産物の中でα-synuclein と UCH-L1 蛋白質に注目し、それぞれの生体内における機能相関を調べることにより、全体の 90%以上を占める孤発型 PD の発症原因を解明することを目指した。

野生型、あるいは家族性 PD 型変異を持つ UCH-L1 のトランスジェニック (Tg) マウス、及び先天性に UCH-L1 を欠損する *gad* マウスに対し、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) を用いてα-synuclein を過剰発現させ、黒質ドパミンニューロンに対する影響を調べた。その結果、家族性 PD 型変異を持つ UCH-L1 の Tg マウスにおいてのみ、顕著なドパミンニューロンの脱落が見られたことより、UCH-L1 の毒性獲得が原因であることが示唆された。孤発例においても同様の分子機構により PD 発症が引き起こされる可能性が考えられる。

A. 研究目的

孤発性 PD 発症の分子メカニズムを解明するため、家族性 PD の原因遺伝子産物であるα-synuclein と UCH-L1 の *in vivo* における機能相関を調べた。

B. 研究方法

正常型 UCH-L1、及び家族性 PD である PARK5 型の変異 Ile93Met を持つ UCH-L1 の Tg マウスの中脳黒質において、rAAV を用いてα-synuclein を過剰発現させ、ドパミンニューロンに対する影響を調べた。また同様の方法で、自然発症型 UCH-L1 欠損マウスである *gad* マウスにおいて検討を行った。

C. 研究結果

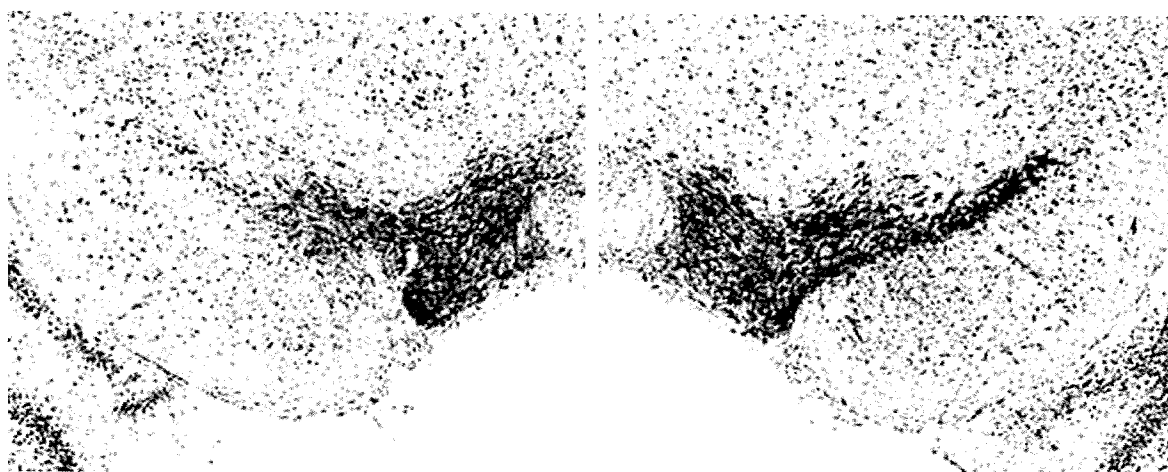
rAAV-α-synuclein の投与 4 週後、Ile93Met 型 UCH-L1 の Tg マウスにおいて、黒質ドパミンニューロンの有意な脱落が確認された。正常型 UCH-L1 の Tg マウス、及び non-Tg マウスではこのような脱落は顕著ではなかった。この結果は 3 ヶ月齢、及び 12 ヶ月齢の Tg マウスで確認された。一方、*gad* マウスにおいては、コントロール群と比べ、α-synuclein のドパミン神経毒性は 8 週、及び 13 週後でも変化しなかった。

D. 考察

これらの結果は、PARK5 がハプロ不全でなく、毒性獲得型変異により発症するという仮説を支持するものと考えられる。孤発性 PD においても UCH-L1 に対する何らかの修飾が、同様の結果を引き起こす可能性が考えられる。

E. 結論

α-synuclein のドパミン神経毒性は、PARK5 型変異を持つ UCH-L1 により増強され、一方 UCH-L1 の欠損により影響は受けない。



rAAV- α -synuclein-injected side

Intact side

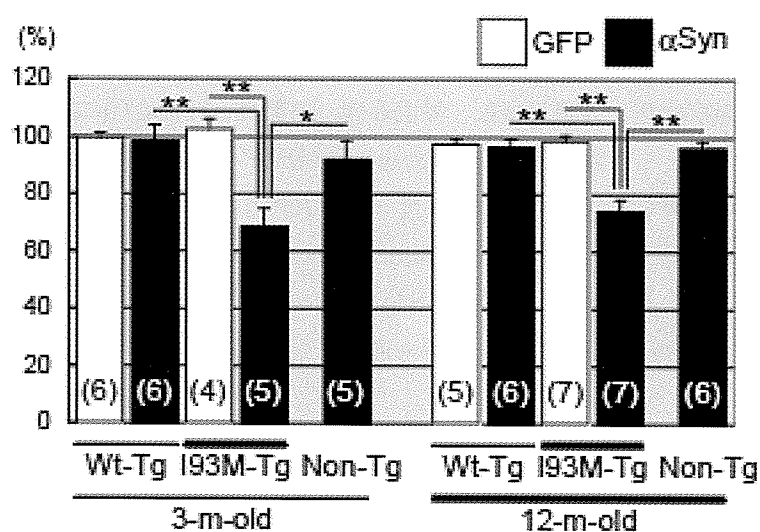


Figure 1. Dopaminergic neurodegeneration in UCL-L1(Ile93Met) transgenic mice. rAAV-mediated overexpression of α -synuclein caused significant loss of nigral dopaminergic neurons in 3- and 12-month old UCL-L1(Ile93Met) transgenic mice compared with age-matched UCL-L1(wild-type) transgenic and non-transgenic mice. Injection of rAAV-GFP did not affect the survival of dopaminergic neurons.

F.文献
特になし

G.健康危険情報
特になし

H.学会発表
特になし

I.知的所有権の所得状況
特になし

ロテノン細胞毒性に対する 17-AAG(17-Allylaminogeldanamycin)の 保護効果の検討

分担研究者 佐々木秀直¹⁾

研究協力者 岸本利一郎¹⁾、辻幸子¹⁾、田代淳¹⁾、新保和賢¹⁾、菊地誠志²⁾、武田篤³⁾

¹⁾北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野

²⁾国立病院機構札幌南病院神経内科

³⁾東北大学大学院医学研究科神経内科学分野

研究要旨

孤発性パーキンソン病の発症機序には遺伝要因、環境要因、加齢などが複合的に関与していると考えられている。環境要因の一つとしてはロテノン(rotenone)、MPTP などミトコンドリア障害をきたす物質が知られており、動物実験ではロテノンの慢性投与が選択的な黒質線条体ドパミン神経細胞変性をきたすことが報告されている。また、近年 Heat Shock Protein-90(Hsp90)阻害剤である 17-AAG の神経細胞保護効果に関する報告が増加しており、注目されている。今回は、パーキンソン細胞モデルとしてドパミン作動性の SH-SY5Y 細胞にロテノンを暴露した系を用いて、17-AAG の細胞保護効果を検討した。

A.研究目的

パーキンソン病の病態には、遺伝要因としての α -synuclein 遺伝子の変異・重複、Parkin、UCHL-1、DJ-1 などの遺伝子異常、また環境要因として農薬の成分であるロテノンや、MPTP などによるミトコンドリア障害物質が知られており、これらに加齢性要因が加わり発症するとの機序が考えられている。動物実験においては、ロテノンの慢性投与が黒質線条体ドパミン神経細胞に Lewy 小体様封入体を形成し、神経細胞変性を起こさせることが報告されている。また、近年 Hsp90 阻害剤による種々の神経細胞保護効果が報告されている。17-AAG は Hsp90 阻害剤である Geldanamycin の誘導体で、いくつかの癌関連蛋白を選択的に分解することから、抗がん剤として期待されている物質であり、

Geldanamycin と比較して腎臓・肝臓に対する毒性が低いことから、臨床的応用が有望視されている物質である。今回は、パーキンソン病細胞モデルとしてドパミン作動性の SH-SY5Y 細胞にロテノンを暴露した系に 17-AAG を添加することにより、細胞保護効果の有無を検討した。また、野生型 α -synuclein 過剰発現 SH-SY5Y 細胞を用いて、比較検討を行った。

B.研究方法

ヒト α -synuclein 遺伝子の cDNA コンストラクトをリポフェクション法により過剰発現させた SH-SY5Y 細胞と、mock plasmid として CAT 遺伝子を遺伝子導入した SH-SY5Y 細胞の 2 種を用いた。(過剰発現系は武田篤志先生のご厚意により分与。)

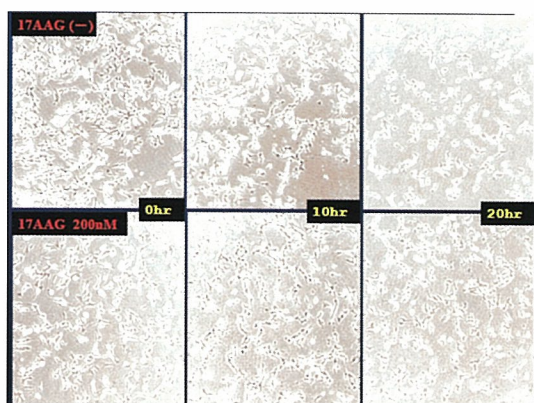
DMEM+10%FBS 培地に 10 μ M レチノイン酸を加え 37°C、5%CO₂ の条件で 4~5 日間培養した後に、BDNF を加えた無血清培地に変更し 2~3 日を培養することにより、神経細胞様に擬似分化をさせた。次に、細胞に 17-AAG を 0、25、50、100、200、400、800nM の 7 段階の濃度にふって添加し 12 時間培養を行った後、200nM ロテノンに 26 時間の暴露した。

評価として、①細胞の形態学的な観察、②Hoechst33342 核染色による核の分断化・凝集をカウントすることによりアポトーシスの比率を算出、③SDS-PAGE 法により Hsp90、Hsp70、Hsp40 の発現の確認、などを行った。

C.研究結果

① 細胞の形態学的変化の観察

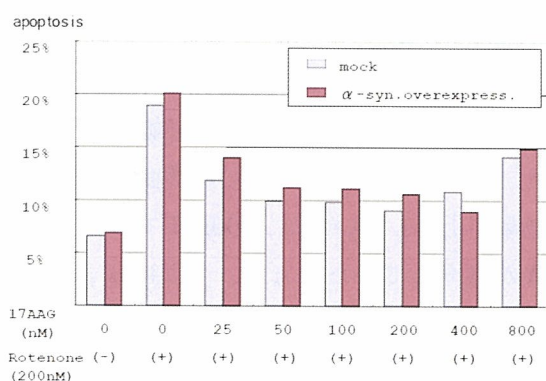
SH-SY5Y 細胞にロテノンを添加すると、形態学的には細胞突起は徐々に分断されてゆき、その後細胞体は丸く凝集し細胞死に至る。今回 17-AAG 投与群では、非投与群と比較して神経突起の分断化がゆっくりと進行する様子が観察された。また、20 時間後において 17-AAG 投与群では細胞体の変化がより少なく、残存する神経突起が多く認められた。(図 1)



《図 1》17-AAG 非投与群 (上段) と 17-AAG 200nM 投与群 (下段) の比較。

②Hoechst33342 核染色によるアポトーシスの評価

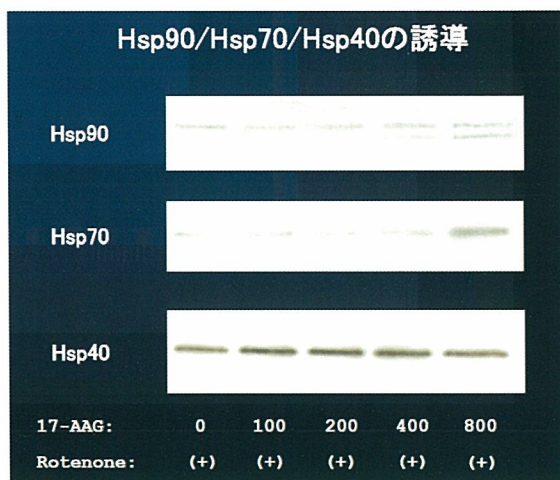
Hoechst33342 核染色で核の凝集・分断化した細胞をアポトーシスとカウントした。これらの細胞の多くは、cleaved-caspase-3 染色と同時に染色されており、caspase-3 依存性のアポトーシスと考えられた。mock SH-SY5Y 細胞では、17-AAG 非投与群が 18.9%にアポトーシスを起こしていたのに対して、17-AAG 投与群では 400nM まで濃度依存性に細胞保護効果を示し、9.0%まで低下していた。 α -synuclein 過剰発現 SH-SY5Y 細胞では、17-AAG 非投与群では 20.1%にアポトーシスが認められたのに対して、17-AAG 投与群では 200nM まで濃度依存性に細胞保護効果を示し、8.9%まで低下していた。(図 2)



《図 2》(注：実験は二度しか繰り返されていないため、統計処理は行っていない。)

③SDS-PAGE 法による Hsp90、Hsp70、Hsp40 の発現の検討

Hsp90、Hsp40 では 17-AAG 濃度間で明らかな差は認められなかったが、Hsp70 は 400nM から発現が増加し、800nM で最も多く発現していた。(図 3)



《図 3》

D. 考察

今回の検討では、SH-SY5Y 細胞にロテノンに暴露するパーキンソン細胞モデルにおいては、caspase-3 依存性のアポトーシスが惹起されていた。17-AAG による前処置は、ロテノン細胞毒性に対する保護効果がある可能性が示唆された。17-AAG 濃度に関しては濃度依存性に保護効果が上昇していたが、800nM では逆に保護効果が減弱していた。また、今回は α -synuclein 過剰発現も用いてロテノン毒性と 17-AAG の細胞保護効果を比較検討をしたが、両者において著明な差は認められなかった。

近年 Hsp90 阻害薬の神経細胞保護効果が注目されており、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、脳梗塞などのモデル動物で神経保護作用が報告されており、特に球脊髄性モデル動物での保護効果が注目されている。

17-AAG は、HSF-1 を介して Hsp70 など他の HSPs を誘導されることが報告されており、この機序が細胞保護効果の原因と類推されてもいる。しかし、今回の HSP の誘導の結果では、細胞保護効果の減弱する 17-AAG が 800nM の時に Hsp70 が多く誘導されていることから、単純に Hsp70 の誘導増加だけでは説明できなかった。今後、HSP 誘導の time course の検討や他の作用機序を検討していく必要性が考えられた。

E. 結論

今回の実験系では 17-AAG の神経細胞保護効果が示された。今後さらに神経細胞保護効果の機序を明らかにすべく検討を進める予定である。

F. 文献

Waza M, et al., J Mol Med, 84:635-646 (2006)
Auluck PK, et al., J Biol Chem, 280:2873-2878 (2005)

G. 健康危険情報

特記事項なし

H. 学会発表

未

I. 知的所有権の取得状況

特記事項なし

Neurosin (kallikrein-6)は α -synuclein の NAC domain を切断する

笠井高士¹⁾、徳田隆彦¹⁾、水野敏樹¹⁾、渡邊義久²⁾、山口希²⁾、亀谷富由樹³⁾、中川正法¹⁾

¹⁾京都府立医科大学大学院医学研究科 神経病態制御学、

²⁾京都府立医科大学大学院医学研究科 分子病態検査医学、

³⁾東京都精神医学総合研究所分子神経生物学研究チーム

研究要旨

Neurosin は中枢神経系に分布する serine protease であり、Parkinson 病(PD)の key protein である α -synuclein を分解し重合を阻害すると報告されているが、その酵素的性質の詳細は明らかではない。今回、われわれは neurosin による α -synuclein の酵素的切断部位を検討した。また家族性 PD の原因となる点突然変異を有する変異型 α -synuclein と野生型との間で neurosin による分解速度を比較した。Neurosin は α -synuclein を特定の部位で切断し、その主たる切断部位は NAC domain の中央部に相当する K80/T81 間であった。また変異型と野生型 α -synuclein の比較では、A30P 変異は neurosin による切断を受けにくい傾向がみられた。Neurosin は α -synuclein の重合に重要な NAC domain を切断することにより、 α -synuclein の重合を阻害していると推察された。

A. 研究目的

近年の生化学的及び分子遺伝学的研究によって、 α -synuclein が Lewy 小体の主たる構成成分であること(1)、および α -synuclein 遺伝子の点突然変異 (A30P、E46K、A53T)が家族性パーキンソン病の原因になることが明らかにされている (2-4)。これらの事実は、 α -synuclein がパーキンソン病の発症機序において重要な分子であることを示している。また最近、 α -synuclein 遺伝子の triplication の家系では早期発症で重症のパーキンソン症状を呈すること (5)、一方その duplication の家系は高齢発症で特発性パーキンソン病に類似した臨床症状を呈すること (6, 7)が明らかにされている。このことは、

正常の α -synuclein でも過剰に発現するとパーキンソン病の原因になり、また α -synuclein の発現量が家族性パーキンソン病の患者における臨床的な重症度を決定することを示唆している。一方で、パーキンソン病患者の大部分を占める孤発性パーキンソン病患者では α -synuclein の過剰産生は報告されておらず、その発症には α -synuclein の産生と分解の imbalance が関与していると考えられる。 α -synuclein の分解系についてはこれまで十分な検討はなされていないが、Ubiquitin-proteasome pathway(UPP)が α -synuclein の分解に関与することが知られており (8)、UPP に関与する分子の異常が一部の家族性パーキンソン病の原因となること

が報告されている (9-11)。しかし、proteasome を単独で阻害しただけでは細胞内の α -synuclein の分解を抑制するには十分ではなく (12)、また proteasome 阻害薬の投与によるパーキンソン病動物モデルの作成実験では、パーキンソン病の表現型を安定して再現することはできない (13,14)。これらの事実は、ubiquitin independent な α -synuclein 分解系が存在し、それが α -synuclein の代謝に関与している可能性を示唆している (15)。

Neurosin(kallikrein-6)は中枢神経系に豊富に存在する serine protease である (16)。Neurosin は α -synuclein に対する分解活性を有するだけでなく、 α -synuclein の重合を濃度依存性に阻害すること、Lewy 小体の中心部に蓄積することから ubiquitin independent な α -synuclein 分解系の候補の一つと考えられている (17)。しかし、neurosin による α -synuclein の分解過程についての報告は少なく、十分な検討はなされていない。今回、われわれは neurosin による α -synuclein に対する酵素的切断部位を検討し、また家族性パーキンソン病の原因となる既知の点突然変異を有する変異型 α -synuclein (A30P、E46K、A53T) と野生型 α -synuclein との間で neurosin による分解速度を比較した。

B. 研究方法

1) Neurosin の作成・精製および活性化

Neurosin の precursor である Proneurosin cDNA 配列のうち、precursor 配列部分 (M1-K21) を trypsin II の precursor 配列 (MNLILLILTFVAAVAAPFDDD DK) に置換した modified proneurosin cDNA を作成し、plasmid vector を用いて CHO 細胞系に導入した。その培養上清を濃縮し、高速液体クロマトグ

ラフィー (SMART system, GE health care) を用いて modified proneurosin を精製した。クロマトグラフィーは Mono Q PC1.6/5 column (GE health care) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを 2 回、Superdex 75 PC3.2/30 column (GE health care) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを 1 回行った。精製された modified proneurosin に recombinant enterokinase (Novagen) を反応させ precursor 配列を切断し full-length の neurosin を得た。Precursor 配列を切断後、EKaptureTM Agarose (Novagen) を用いて recombinant enterokinase を除去した。

2) Neurosin の活性評価

neurosin の酵素活性は *t*-Butyloxycarbonyl- L-Glutamyl- L-Alanyl- L-Arginine 4-Methyl-Coumaryl- 7-Amide (Boc-Gln-Ala-Arg-MCA) (ペプチド研究所) を用い、22°C、pH7.4 の条件下で 5 時間反応させた。酵素反応によって遊離した 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) を蛍光分光光度計を用い励起波長 380nm、蛍光波長 440nm で測定した。

3) Neurosin による α -synuclein の分解

0.5mg/ml の recombinant α -synuclein (野生型、A30P、E46K、A53T) (rPeptide) と 10 μ g/ml の neurosin を 20mM Tris-HCl pH 7.4、50mM NaCl、2mM CaCl₂ の buffer 中で、37 度で反応させた。反応産物 10 μ l を SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色によって neurosin によって酵素的に切断された α -synuclein 由来ペプチドのバンドを検出した。また同一ゲル上で濃度既知の α -synuclein を泳動し、サンプルのバンド濃度と比較することによって、残存する α -synuclein 量を半定量的に計測し、分解速度を評価した。

4) Neurosin による α -synuclein の分解産物の一時

構造解析

上記3)のSDS-PAGEゲルから、Neurosinによって酵素的に切断された α -synuclein由来ペプチド断片を示すバンドを切り抜き、脱色・乾燥させた後、25mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)に溶解した125ng modified trypsin (Roche Applied Science)を加えて37度で20時間、ゲル内消化した。ゲル内消化産物を0.1% TFA 2% acetonitrileに溶解し、LC-MS/MS解析 (HPLC system; paradigm MS4, Microm BioResources, Inc, Auburn, CA.)(ion trap mass spectrometer; LCQ Advatage, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA)を行った。

C. 研究結果

今回作成・精製したneurosinは既に報告されているneurosinの基質であるBoc-Gln-Ala-Arg- MCAを分解した。Proneurosinには活性はなかった。Neurosinの酵素活性はcysteine protease およびserine proteaseのinhibitorであるleupeptinによって部分的に阻害され、serine protease inhibitorであるAEBSFによって完全に阻害されたが、その他のprotease inhibitorでは阻害されなかった (図1)。Neurosinと α -synucleinとをco-incubateすると6時間で約9kDaに α -synuclein由来のfragment (major fragment)が出現し、12時間で10~13kDaに3種類のminor fragmentが出現した。これらの分解反応はAEBSFによって全て阻害された(図2, 3)。切断断片はすべて α -synucleinのN末端を含むfragmentであった。Major fragmentは α -synucleinのN末端からK80までのpeptideであり、3種類のminor fragmentはそれぞれ、N末端からK97 (K96)、N末端からD115、N末端からD121までのfragmentであった。野生型と変異型 α -synucleinのneurosinによる分解速度の

比較ではA30P変異が分解を受けにくい傾向がみられた(図4、 $p < 0.01$)。

D. 考察

以上の結果からは、neurosinが α -synucleinの分解活性を有しており、neurosinによる α -synucleinの主たる切断部位はK80/T81であることが分かった。K80/T81は α -synucleinのNAC domainの中央部に相当する。同部位は α -synucleinの重合・凝集に重要であることが報告されており(18)、neurosinは同部位を切断することによって α -synucleinの重合を阻害している可能性がある。

変異型 α -synuclein (A30P変異)がneurosinによる分解を受けにくい傾向がみられたが、A53T、E46K変異では α -synucleinの線維形成能が著しく亢進していることが報告されており、このことがこれらの変異におけるパーキンソン病発現機序の分子的基盤であると推測されているが、A30P変異の線維形成能亢進作用の有無は報告により一定ではなく明らかなものではない(19)。A30P変異においては、今回われわれが示したようなneurosinによる α -synucleinの分解活性が点突然変異の存在によって低下することが、その家族性パーキンソン病発症に関連しているのかもしれない。今後はパーキンソン病発症に関与しているとされる、 α -synuclein oligomerやニトロ化ないしリン酸化された α -synucleinに対するneurosinの影響を評価していく必要がある。

E. 結論

Neurosin による α -synuclein の分解について以下の知見が得られた。

1) Neurosin は α -synuclein を特定の部位で切断し