

[別紙 1]

論文の内容の要旨

Thioredoxin suppresses Pael-R-induced neurotoxicity in *Drosophila*
— Relation to pathology of Parkinson's disease—

Pael-R の神経毒性に対するチオレドキシンの効果に関する研究
—パーキンソン病との関連—

指導教員 大内 尉義教授 (東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座)
相垣 敏郎教授 (首都大学東京大学院理学研究科生物科学)

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏 名

はじめに

ショウジョウバエのゲノム配列 120Mb は、全ゲノムショットガン法を用いてわずか 3 ヶ月でその概要が決定され、2002 年 11 月にゲノム配列完全版(第 3 版)が発表された。ショウジョウバエのゲノムには、ヒトの約半数の遺伝子が存在するが、ゲノムサイズはヒトの 1/20 と非常にコンパクトである。ヒト疾患遺伝子のうちの 74% はショウジョウバエに相同遺伝子が存在する。遺伝学や分子生物学の主要なモデル生物であると同時に、近年は、疾患発症の機構や病理学的過程を分子レベルで解剖するための疾患モデルとしても利用されている。本研究では、ショウジョウバエの神経にパエル受容体 (*Pael-R: Parkin associated endothelin receptor-like receptor*) を強制発現し生じる神経変性と運動機能の低下を、チオレドキシンの抑制作用をもつことを明らかにした。

パーキンソン病(PD)は進行性の運動障害を主症状とする神経変性疾患で、

日本での患者数は約 10 万人と推定される。神経病理学的には中脳黒質のドーパミン作動性神経(DA)の選択的変性が特徴である。PDのうち、約5%の患者は遺伝性であり、家族性PDの原因遺伝子として *Park1* から *Park11* までマップされている。PDの病因として酸化ストレスやユビキチンプロテアソーム系の障害が考えられている。

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (AR-JP) は 40 才以下で発症する PD である。原因遺伝子は、1998 年北田らによって、ユビキチンリガーゼである *Parkin* 遺伝子 (*Park2*) の欠損と報告され、その後、*Parkin* 結合蛋白として膜蛋白質である *Pael-R* が同定された。*Pael-R* は *Parkin* によって分解が促進され、ヒト *Pael-R* を強制発現させたショウジョウバエにおいては、DA ニューロン特異的な神経変性が *Parkin* の強制発現によって抑制されることが報告されている。*Pael-R* は、脳のオリゴデンドログリア細胞に強く発現し、特に AR-JP の病変部位である中脳黒質の DA では例外的に強く発現している。AR-JP ではフォールディングに失敗した *Pael-R* の異常蓄積により、DA が選択的に細胞死に陥って発症に至ると考えられている。一方、PD の発症機構に関しては、酸化ストレスの関与も強く示唆されている。これらのことは、抗酸化活性やシャペロン活性をもつ物質は PD を効率的に抑制する因子となりうると思われる。

チオレドキシシン (TRX) は、約 105 アミノ酸残基からなる抗酸化タンパク質として知られている。その活性部位には Cys-Gly-Pro-Cys-Lys の配列をもつ。細胞増殖、分化、がん化、細胞死など、多様な細胞機能に関わっており、これらは TRX タンパク質のレドックス作用、すなわち、システイン残基上のチオール基が可逆的構造変化により、他の分子を酸化還元する機能に基づくものと考えられている。また、大腸菌 TRX においては、シャペロン活性を持つことが報告されている。TRX の神経保護作用を証明した報告もあり、抗酸化作用とシャペロン活性を併せ持つ TRX は PD の抑制作用を示すことが期待されるが、生体内の実験系で証明されていない。

ショウジョウバエのゲノムには TRX ファミリータンパク質をコードする 3 つの遺伝子が存在する。しかし、それらの生化学的な性状については、十分明らかにされていない。本研究では、ショウジョウバエ *TrxT* について、試験管内で抗酸化活性、およびシャペロン活性について明らかにするとともに、*Pael-R* の異常蓄積を起こすショウジョウバエ *in vivo* において、神経

変性を抑制する作用があるかどうかを検討した。

方法

TRX 蛋白の酸化還元を担うレドックス活性の測定には、Insulin disulfide reduction assay 法を、シャペロン活性の測定は Citrate synthase assay 法を用いて行なった。ショウジョウバエの TRX は、すでに報告されている 3 種類 (*Dhd*, *Trx-2*, *TrxT*) を用い、強制発現系を作成し、*human Pael-R* と *Parkin* のハエは B. Lu, Rockefeller University より譲与されたものを用いた。レドックス機能欠損変異体として、35 番目のシステインをアラニンに置換した *TrxT*[C35A]、および 26 番目のアスパラギン酸と 57 番目のリジンそれぞれアラニンとイソロイシンに置換した *TrxT*[D26A/K57I] を作製した。野生型、および変異体 *TrxT* を大腸菌で発現させて、精製したものを生化学的実験に用いた。また、野生型、および変異体 *TrxT* 遺伝子を導入した形質転換個体を作製して、運動機能解析、DA ニューロンの免疫組織学的解析、および寿命の実験に用いた。

ショウジョウバエの運動機能は、Climbing assay (直径 2cm、長さ 20cm のガラス瓶を 18 秒間で底から登る高さ) を用いた。免疫組織学的解析においては、ハエの脳を解剖し、抗 TH (Tyrosine Hydroxylase) 抗体で染色し、数が安定しているといわれている dorsomedial clusters 内の DA ニューロン数をカウントした。寿命は、25°C で 30 匹/本を 3 本飼育し、エサを 2 日おきに交換して、死亡したハエの個体数を数えて生存曲線を求めた。

培養細胞における酸化ストレス耐性を測定するために、S2 培養細胞に pUAS-*TrxT*, pUAS-*TrxT*[C35A], pUAS-*TrxT*[D26A/K57I] を形質転換し、20mM の過酸化水素で 16 時間処理して、酸化ストレスを負荷した。相対的な細胞の生存度は、遠心で得られた上清のガラクトシダーゼ活性に基づいて算出した。

結果

・ *Pael-R* を神経系に強制発現すると 25 日齢において Climbing assay で 7 ± 1.0 cm しか登らないのに対し、*Pael-R* と *TrxT* を共発現させた 2 つの系統では、それぞれ 13.8 ± 1.2 cm、 17.0 ± 2.8 cm と有意に高い位置まで登ることができた。ユビキチンリガーゼ *Parkin* を共発現させたハエでは、14.0

± 2.2cm と高く、negative control として *GFP* を共発現させた場合、神経毒性の抑制は見られなかった。*TrxT* だけでなく、他の *TRX* ファミリー (*dhd*、*Trx-2*) でも同様の回復が見られ、*TRX* 自体の機能で *Pael-R* 強制発現による加齢に伴う運動機能低下が抑制することがわかった。

・ *DA* の細胞数は 5 日齢に平均約 18 個見られた。25 日齢において、*Pael-R* 強制発現系では平均 4.3 個まで減るが、*TrxT* と *Parkin* を共発現させた場合、8.2~13.8 個まで有意に数の減少を防ぐことができた。

・ *TrxT* がレドックス作用とシャペロン活性の両方を持つことを、蛋白実験で証明した。また、*TRX* の活性部位であるレドックス作用を欠損させた蛋白は、抗酸化作用は持たず、シャペロン活性のみもつことも証明した。レドックス欠損系統 (ハエ)、タンパク (*TrxT*[C35A]、*TrxT*[D26A/K57I]) を作成し、これらの変異体の強制発現が *Pael-R* 強制発現系の表現型にどのような影響を与えるか検討した。その結果、これらの変異タンパク質は、野生型 *TrxT* と同様に *Pael-R* 強制発現系の神経保護作用を示した。

・ 類似の結果は、培養細胞系でも確認された。培養細胞にレドックス作用がなくなった蛋白 *TrxT*[C35A]、*TrxT*[D26A/K57I] を形質転換し、過酸化水素による酸化ストレスを加えた場合でも、野生型 *TrxT* と同様に細胞生存率の上昇がみられた。このことは、*TrxT* による神経保護作用には、レドックス機能はあまり重要ではなく、シャペロン活性を含む他の機能が重要な役割をもつことを示唆している。

・ *TrxT* を単独で神経に発現させた場合、加齢に伴う運動機能の低下は改善され、寿命も 39.1 ± 0.6 、 36.7 ± 0.7 日とコントロール (33.9 ± 1.1 日) に比べ 8.0~15.3% 延長した。

まとめ

Pael-R 強制発現系に *TRX* を作用させると、*DA* ニューロンの消失が抑制し、運動機能低下も抑制することがわかった。驚くことにレドックス機能欠損変異体 *TrxT* でも同様の作用が認められた。これは *TrxT* の抗酸化物質としての機能があまり重要でなく、シャペロン活性を含むほかの機能が重要であることを示唆する結果であった。