

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 入月 浩美
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 987 号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Degeneration of dopaminergic neurons and impaired intracellular trafficking in Atp13a2 deficient zebrafish.
(Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュにおけるドーパミン神経変性と細胞内輸送障害)

論文審査委員 主査 教授 池内 健
副査 教授 上野 将紀
副査 准教授 菱田 竜一

博士論文の要旨

【背景】

ATP13A2 は、常染色体劣性遺伝性の若年発症パーキンソン病 (PARK9) の原因遺伝子である。PARK9 は Kufor-Rakeb 症候群としても知られ、レボドパ反応性パーキンソニズム、核上性注視麻痺、錐体路症状、認知障害を特徴とする。ATP13A2 はリソソーム膜に局在する ATPase であることから、オートファジーリソソーム系の機能維持において重要な役割を担っていると考えられている。申請者らは過去に、Atp13a2 欠損メダカにおいてドーパミン神経変性とカテプシン D 特異的なリソソーム機能障害を報告した。しかし、ATP13A2 の分子生物学的機能は未だ不明な点が多く、パーキンソン病 (Parkinson's disease ; PD) の病態との関連も十分に解明されていない。

【目的】

本研究では、新たなモデル生物として Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュを作製し、ATP13A2 の分子生物学的機能および PD 発症メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

1. Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュを作製するため、ガイド RNA を設計・作製し、Cas9ヌクレアーゼと混合して1細胞期のゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクション法で注入した。PCR-ダイレクトシーケンシングで遺伝子型を決定し、ヘテロ接合体同士を交配して、ホモ接合変異体 (Atp13a2 欠損) を得た。

2. atp13a2 mRNA 発現量の評価

変異型および野生型のゼブラフィッシュ脳組織から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。半定量的 RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法を用いて、atp13a2 mRNA 発現量を評価した。

3. TH 陽性神経細胞数のカウント

4 か月および 12 か月の野生型ゼブラフィッシュと変異型ゼブラフィッシュ各 5 匹から脳を摘出し、切片

を作製した。抗体反応の後、共焦点顕微鏡で解析し、後部結節および青斑核の TH 陽性神経細胞数をカウントした。

4. イムノブロット法

12 か月の野生型ゼブラフィッシュと変異型ゼブラフィッシュ各 6 匹から脳を摘出した。サンプル調整後、SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロット法でカテプシン D 及び β -アクチンのタンパク質発現量を観察した。

5. 透過型電子顕微鏡

37 か月の変異型ゼブラフィッシュ脳組織を用いて透過型電子顕微鏡解析を行った。

6. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析

28 か月の野生型ゼブラフィッシュと変異型ゼブラフィッシュ各 2 匹から脳を摘出し、タンパク質を抽出した。液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いて、各サンプルで発現しているタンパク質を同定し、相対的定量を行った。得られたデータをもとに、遺伝子オントロジー分析を行い、倍率変化が 1.5 より大きい場合を有意と見なし、タンパク質発現変動の解析を行った。

【結果】

1. Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュの作製

CRISPR/Cas9 システムを使用して atp13a2 のエクソン 2 に 10 塩基欠失を導入し、ホモ接合変異体を得た。半定量的 RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法で、変異型において atp13a2 の mRNA 発現が低下していることを確認した。

2. Atp13a2 欠損がもたらすドーパミン神経変性およびリソソーム異常

ゼブラフィッシュ脳の TH 陽性神経細胞を免疫染色しカウントした結果、後部結節と青斑核の TH 陽性神経細胞数は、4 か月、12 か月ともに変異型で有意に減少していた。その内訳は、ドーパミン神経が 4 か月で 64% ($p < 0.001$)、12 か月で 37% ($p < 0.05$) の減少、ノルエピネフリン神経が 4 か月で 52% ($p < 0.001$)、12 か月で 40% ($p < 0.05$) の減少だった。これらは変異型ゼブラフィッシュにおけるドーパミン神経変性を示す結果であり、PD の病態と一致していた。

続いて、イムノブロット法を用いて、ゼブラフィッシュ脳におけるカテプシン D タンパク質発現を調べた。その結果、変異型においてカテプシン D の発現が有意に低下していることが分かった (60%, $p < 0.05$)。

さらに、変異型の中脳を用いて透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、凝集体の蓄積とフィンガープリント様構造をもつリソソーム様構造が観察された。

3. Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュにおける細胞内小胞輸送の障害

ゼブラフィッシュ脳を用いて液体クロマトグラフィータンデム質量分析を行い、野生型と変異型におけるタンパク質発現を比較した。その結果、変異型において、ゴルジ体の膜癒合に関連するタンパク質発現の有意な低下を認めた ($p < 0.001$)。これは、変異型において細胞内輸送障害が生じていることを示す結果であり、前述のリソソーム異常と併せて、PARK9 における神経変性の主要な原因である可能性を示唆するものと考えられた。

【考察】

本研究では、PARK9 のモデル生物として Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュを作製し、ドーパミン神経変性、カテプシン D の発現低下及びリソソームの組織学的異常を確認した。さらに、細胞内小胞輸送に関連するタンパク質の発現が変異型で有意に減少していることを発見した。小胞輸送障害は PD の病態の一つとして知られ、複数の遺伝子の関与がこれまでに報告されているが、本研究の発見は ATP13A2 異常による PD もこれらと類似の病態をもつ可能性を示すものである。リソソーム機能異常に関連した細胞内小胞輸送障害は PARK9 における神経変性の主要な原因である可能性がある。本研究の成果は細胞内小胞輸送を標的とした

PD の新規治療法の開発につながる可能性がある。

審査結果の要旨

ATP13A2 変異は、遺伝性パーキンソン病 (PARK9) などの神経変性疾患の原因となる。ATP13A2 はリソソームに局在する ATPase をコードしていることから、オートファジー・リソソーム系の機能維持に重要な役割を担っていると考えられる。従来までに ATP13A2 を欠損するモデルマウスやメダカが作製されているが、神経変性を惹起する病態機序は未だ明らかにされていない。本研究では、新たなモデル動物として Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュを作成し、ATP13A2 欠損により生じる個体レベルの病態機序を検討した。Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュでは、TH 陽性神経細胞が減少し、ドーパミン神経変性が生じていた。またカテプシン D 発現の減少、リソソームにおいてフィンガープリント様構造が形成される等の組織学的異常が認められた。質量分析を用いた網羅的なタンパク解析により、Atp13a2 欠損ゼブラフィッシュではゴルジ体の膜融合に関連するタンパク量が有意に減少しており、細胞内輸送が生じている可能性が示唆された。

本研究により、ATP13A2 欠損の新規モデル動物が樹立され、ATP13A2 欠損によりリソソーム機能異常と細胞内小胞輸送障害が生じる病態を明らかにした点に、学位論文としての価値を認める。