

氏名(本籍)	千 葉 満 (北海道)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博 甲 第 5574 号
学位授与年月日	平成 22 年 11 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Existence of <i>Pink1</i> Antisense RNAs in Mouse and Their Localization. (マウスにおける <i>Pink1</i> antisense RNA の存在とそれらの局在)
主 査	筑波大学教授 博士(理学) 入 江 賢 児
副 査	筑波大学教授 医学博士 玉 岡 晃
副 査	筑波大学准教授 博士(医学) 江 口 清
副 査	筑波大学講師 博士(医学) 加 野 准 子

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

パーキンソン病 (Parkinson's disease : PD) は中脳黒質緻密質のドーパミン産生細胞の変性を病態とする神経変性疾患であり、高齢になるほど発症率・有病率が増加することが知られている。腫瘍抑制因子 PTEN によって転写活性される遺伝子として同定された *PTEN*-induced kinase 1 (*PINK1*) の変異が PD 患者の多くから見つかった。それゆえ *PINK1* は PD における原因遺伝子のうちのひとつとして強く示唆されている。*PINK1* 遺伝子は 581 個のアミノ酸配列をコードしており、ミトコンドリア標的モチーフである 34 個のアミノ酸配列と、高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼドメインを有している。実際に、*PINK1* タンパクはミトコンドリア内に局在し、機能していることが報告されている。*Drosophila* の *PINK1* ホモログ遺伝子をノックアウトした場合、オスの不妊、筋肉変性、ミトコンドリア形態異常、酸化ストレスを含む多くのストレス感受性が亢進することが報告されている。加えて、*Drosophila* における *PINK1* ホモログの変異は飛翔筋やドーパミン作動性神経変性を示す。このように変異した *PINK1* による影響によってドーパミン作動性ニューロンの死が誘導され、ヒトにおいて PD を発症することが示唆されている。より詳細に PD 発症における *PINK1* の関連を調べるために、PD のモデル動物として *Pink1* を down-regulation したマウスやノックアウトマウスがこれまでに開発されてきた。ヒトにおける近年の研究では *PINK1* の antisense RNA が *PINK1* 遺伝座における発現を制御していることが証明された。しかしながら、マウスにおいて *Pink1* の antisense RNA はこれまでに公共のデータベースを含めて報告されていない。本研究では、マウス脳における *Pink1* の antisense RNA の存在を確認し、*Pink1* antisense RNA の詳細な発現情報や発現部位を解明することが目的とされた。また、脳に発現する antisense RNA の網羅的解析、パーキンソン病関連遺伝子における antisense RNA の発現についても解析された。

(対象と方法)

本研究では、C57BL/6J マウスの 14 日胚、17 日胚、新生児、1 週齢、8 週齢の組織が使用された。Total RNA は 8 週齢の組織から抽出された。*in situ* hybridization のために、組織サンプルが固定されパラフィン包

埋ブロックが作成された。マウス *Pink1* antisense RNA を同定するために、FirstChoice RLM-RACE kit (Ambion) を使用して 5'RACE が行われた。増幅された PCR 産物の塩基配列を確認するために、シーケンス解析が行われた。Northern blot による転写産物の解析には、³²P ラベル化 antisense または sense cRNA probe が合成されハイブリダイゼーションに使用された。検出は X 線フィルムへの感光によって行われた。mRNA と antisense RNA の発現を区別して定量するために、strand-specific な primer を使用して cDNA が合成されリアルタイム PCR が実施された。*In situ* hybridization による組織上における発現部位の解析には、digoxigenin ラベル化 antisense または sense cRNA probe が合成されハイブリダイゼーションに使用された。検出は NBT/BCIP システムによって行われた。マウス脳に発現する sense/antisense RNA の検出には、C57BL/6J マウスの脳から抽出した Total RNA が使用された。Microarray 解析には、Agilent 44 K x 4 mouse sense/antisense custom microarray slide (Design ID = 021137) が使用された。

(結果)

マウスにおける *Pink1* antisense RNA の発現を検出し、配列を決定するために、5'RACE 法とシーケンス解析が実施された。その結果、キャップ構造をもった様々な antisense RNA が *Pink1* exon 8 あるいは *Pink1* exon 8 の下流領域から転写されていることが明らかにされた。またマウス *Pink1* antisense RNA はヒトの場合のように、近隣遺伝子の *Ddost* 領域から転写されているものがあることが明らかにされた。*Pink1* antisense RNA のサイズを詳細に知るために Northern blot 解析が行われた。sense cRNA probe を使用して Northern blot が行われ、様々なサイズの antisense RNA が検出された。興味深いことに、約 350 base の位置にシングルバンドの antisense RNA が検出された。これらの *Pink1* antisense RNA を定量するために、strand-specific real-time PCR が実施された。その結果、antisense RNA 発現量は mRNA 発現量の約 70% ほどであることが明らかにされた。*Pink1* antisense RNA の組織上における発現部位を調べるために、発生ステージにおけるマウス脳を使用して *in situ* hybridization 法が実施された。8 週齢マウス脳では antisense RNA は mRNA と同様に脳の全領域の神経細胞で弱い発現が認められた。発生ステージにおいては *Pink1* mRNA は新生児、1 週齢のステージで特に海馬に多く局在することが明らかにされた。加えて、*Pink1* antisense RNA も新生児、1 週齢の海馬で発現の局在が認められた。14 日胚、17 日胚では全体的に発現が認められた。

マウス脳に発現する sense/antisense RNA の網羅的解析から、sense 側 16216 個、antisense 側 10403 個の発現が認められた。これらのうち、sense/antisense pair で発現しているものが 9129 個存在した。この 9129 個のうち、sense が antisense よりも 3 倍以上発現しているが 4722 個、antisense が sense よりも 3 倍以上発現しているが 713 個存在することが明らかにされた。また、この網羅的解析から、*Pink1*、*Parkin*、*Uchl1*、*Lrrk2*、*Atp13a2* 遺伝子に antisense RNA が発現していることが明らかにされた。

(考察)

本研究では、はじめてマウス *Pink1* 遺伝子の反対鎖側から antisense RNA が発現していることが証明された。ヒト細胞の研究において、*PINK1* mRNA を標的にする siRNA は *PINK1* mRNA を down-regulation するが、*PINK1* natural antisense RNA を標的にする siRNA は *PINK1* mRNA のスプライシングバリエーション (*svPINK1*) を down-regulation することが報告されている。細胞内において *PINK1* natural antisense RNA は *svPINK1* の安定性に関与していることが結論づけられている。マウスにおいて *Pink1* mRNA を標的にする siRNA はヒトの場合同様に *Pink1* mRNA の down-regulation を誘導することが報告されている。これらの知見から、本研究で発見された *Pink1* natural antisense RNA も *Pink1* mRNA の安定性へ関与していることが予想された。

マウス脳に発現する sense/antisense RNA の網羅的解析から、非常に多くの遺伝子から antisense RNA が発現していることが明らかにされた。また、他のパーキンソン病関連遺伝子 *Parkin*、*Uchl1*、*Lrrk2*、*Atp13a2* 遺伝子に antisense RNA 発現が確認され、これらの antisense RNA がパーキンソン病発症に関連する可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究では、マウス脳における *Pink1* の antisense RNA の同定、*Pink1* の antisense RNA の詳細な構造や発現部位の解析がなされ、マウス *Pink1* 遺伝子の反対鎖側から antisense RNA が発現していることがはじめて証明された。また、マウス脳には非常に多くの antisense RNA が発現し、*Pink1* 以外のパーキンソン病関連遺伝子にも antisense RNA が発現することが明らかにされた。これらの研究成果は、パーキンソン病の発症メカニズムを解析する上で重要な知見であり、高く評価される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。