

# 論文内容要旨

## 論文題目

パーキンソン病の新規リスク遺伝子 *Midnolin* の発現調節機構と病態生理的な役割の解明

責任講座： 薬理学 講座  
氏名： 提箸 尚貴

## 【内容要旨】(1,200字以内)

ES細胞において2000年に発見されたMidbrain Nucleolar Protein (*Midnolin*, *MIDN*)は、胎生期のマウス中脳において強く発現する。成体になると様々な組織で発現し、細胞内では主に核および核小体に局在する。詳細な役割は明らかになっていなかったが、2017年および2019年に *MIDN* がパーキンソン病 (PD) の新規リスク遺伝子であることを当講座が報告した。しかし、個体レベルでの *MIDN* の役割は明らかではなく、またヒトの細胞や組織で、*MIDN* 遺伝子の発現がどのように調節されているかも解明されていない。そこで、本研究ではヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、*MIDN* 遺伝子の発現調節機構を解明するとともに、*Midn* ノックアウトマウスを作製して、その病態生理学的な役割を明らかにすることを目的とした。

SH-SY5Y 細胞をインスリンで処置すると ERK1/2, PI3K 依存的に *MIDN* 遺伝子の発現が誘導された。レチノイン酸で分化誘導した SH-SY5Y 細胞においては BDNF 処置によっても、同様の発現誘導が確認された。*MIDN* 遺伝子の発現調節領域を同定するため、様々な塩基長のプロモーターをルシフェラーゼと連結させたプラスミドを作製し、*MIDN* プロモーター活性を測定した。その結果、*MIDN* 遺伝子上流 -121/-99 bp に *MIDN* 遺伝子の発現を抑制する領域が、-71/-57 bp に発現を促進する領域があることが判明した。データベースを用いた解析により、前者の領域には TFAP2 が後者の領域には AP-1 および CREB が結合することが予想された。実際に、SH-SY5Y 細胞をインスリンで処置すると、ERK1/2 依存的に AP-1 ファミリーである *c-FOS* 遺伝子の発現および CREB のリン酸化が誘導された。

ゲノム編集法により2系統の *Midn* ヘテロノックアウトマウスを作製した。マウス中脳の *Midn* 遺伝子の発現を定量したところ、26週齢のヘテロ KO マウスで *Midn* 遺伝子の発現減少が確認された。また、8週齢マウスの黒質および線条体のドパミン作動性神経細胞を観察したところ、ヘテロ KO マウスの線条体への投射が大幅に減少していた。85週齢マウスの自発運動量をオープンフィールド試験で測定したが、総移動距離や平均速度には大きな変化はなかった。

これまでの結果をまとめると、1. *MIDN* 遺伝子はインスリンによって MAPK および PI3K/Akt 経路を介して発現が誘導されることが明らかになった。2. MAPK 経路は CREB/ATF, AP-1 を活性化し、*MIDN* 遺伝子発現を調節することが示唆された。3. TFAP2 ファミリーが結合する *MIDN* 遺伝子上流 -121/-99 bp は、*MIDN* 遺伝子の発現を抑制的に調節していることが示された。4. *Midn* ヘテロノックアウトマウスでは、*Midn* 遺伝子の発現が減少し、ドパミン神経の投射が減少する PD 様の病理学的特徴が見られ、それは *MIDN* が PD のリスク遺伝子であることを支持する所見と思われた。

2021  
2020年 1月 6日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 提箸 尚貴

論文題目： パーキンソン病のリスク遺伝子 *Midnolin* の発現調節機構と病態生理的な役割の  
解明 新規

審査委員：主審査委員 太田 康之

副審査委員 藤井 聡

副審査委員 中島 修



審査終了日： 2021  
2020年 1月 4日

### 【 論文審査結果要旨 】

*Midnolin* (*MIDN*) は、胎生期のマウス中脳において強く発現するが、成体では様々な組織で発現し、細胞内では主に核および核小体に局在している。2017年および2019年に、山形大学薬理学講座において、*MIDN* がパーキンソン病 (*PD*) の新規リスク遺伝子であることを報告したが、個体レベルでの *MIDN* の役割は明らかではなく、またヒトの細胞や組織で、*MIDN* 遺伝子の発現がどのように調節されているかも解明されていない。そこで、本研究ではヒト神経芽細胞腫 *SH-SY5Y* 細胞を用いて、*MIDN* 遺伝子の発現調節機構を解明するとともに、*Midn* ノックアウトマウスを作製して、その病態生理学的な役割を明らかにすることを目的とした。

*SH-SY5Y* 細胞をインスリンで処置すると、*ERK1/2* および *PI3K* 依存的に *MIDN* 遺伝子の発現が誘導された。次に、*MIDN* 遺伝子のプロモーターにおける発現調整領域を同定するために、様々な塩基長のプロモーターをルシフェラーゼと連結させたプラスミドを作製し、*MIDN* プロモーター活性を測定した。その結果、*MIDN* 遺伝子上流-121bp から-99bp に *MIDN* 遺伝子発現抑制領域が、-71bp から-57bp に発現促進領域があることが判明した。データベースによる解析により、前者の領域には *TFAP2* が結合し、後者の領域には *AP-1* と *CREB* が結合することが予想された。さらに、*SH-SY5Y* 細胞をインスリンで処置すると、*ERK1/2* 依存的に *AP-1* ファミリーである *c-FOS* 遺伝子発現や *CREB* リン酸化が誘導された。以上の結果より、インスリンが *ERK1/2* 依存的に *AP-1* と *CREB* を活性化することで、*MIDN* プロモーター活性を増強している可能性が示唆された。

ゲノム編集法により2系統の *Midn* exon3 ヘテロノックアウトマウスを作製し、26週齢においてマウス中脳の *Midn* 遺伝子発現減少を確認した。ノックアウトマウスの運動機能低下や、中脳黒質ドパミン神経細胞減少を認めなかったが、8週齢の線条体におけるチロシン水酸化酵素の発現減少を認め、中脳黒質ドパミン神経細胞の神経投射減少の可能性が考えられた。

本研究は、*MIDN* 遺伝子のインスリンによる *ERK1/2* および *PI3K* 依存的な発現調整機構を初めて明らかにし、*Midn* 遺伝子発現減少が中脳黒質ドパミン神経細胞の神経投射減少を誘発する可能性を示唆する結果を示しており、博士 (医学) の学位に相当する研究と判断した。