

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07046

研究課題名(和文)新規シグナル蓄積型マイトファジープローブ発現マウスでパーキンソン病発症機構に迫る

研究課題名(英文)The research of Parkinson's disease with a new mitophagy reporter mice.

研究代表者

片山 博幸 (Katayama, Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：00415126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：作製した新規オートファジー、マイトファジープローブは培養細胞レベルでは良好な結果が得られたが、全身性にERT2-Creを発現するマウスと掛け合わせた誘導型ノックインマウスでは発現誘導にいくつかの問題が見られた。まず、誘導型オートファジープローブマウスでは発現が安定せず、非誘導時の蛍光プローブの発現漏れ、誘導時の発現が不安定などが見られ、実験に使用できる品質ではなかった。また、誘導型マイトファジープローブマウスでは脳以外では、良好な誘導が観察され、これらの器官でのマイトファジーの観察が可能であることが推察された。

今後、脳以外の器官でのマイトファジー研究に関する共同研究を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジー、マイトファジーはパーキンソン病などの様々な疾患に関係している。本プローブはこれらを促進、阻害する薬剤のスクリーニングに有用である。また、個体でのマイトファジーを観察することで、様々な疾患の発病メカニズム、病態の進行にどのようにマイトファジーが関与しているかを研究可能にしている。

研究成果の概要(英文)：New autophagy or mitophagy probe that we made work well in some culture cells. But the inducible KI mice that we made have some problems. the autophagy reporter mice indicated unstable expression and the mitophagy reporter mice showed fine expression except brain. this mitophagy probe enables us to observe mitophagy in mice.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー マイトファジー 蛍光タンパク質プローブ パーキンソン病 脳神経疾患 蛍光タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病とミトコンドリア

パーキンソン病の多くは孤発性であるが、一部は遺伝子異常に由来する家族性であり、その異常遺伝子産物の解析は発症の機構について多くの情報を与えてくれる。

Parkin はこのような家族性パーキンソン病の一型である常染色体劣性遺伝性パーキンソン病 (AR-JP) の病因タンパク質である。この Parkin はユビキチンリガーゼであり、その活性低下により基質タンパク質が異常蓄積して AR-JP を発症するモデルが提唱されているが、Parkin の変異がユビキチン・プロテアソーム系を介してパーキンソン病を引き起こすメカニズムについては不明な点が多い。

これとは別に、ミトコンドリアを標的とする MPTP、ロテノンなどの神経毒がパーキンソン様病状を引き起こすこと、孤発性のパーキンソン病においてミトコンドリア呼吸鎖の機能障害が観察されることなどから、この病気の原因としてミトコンドリア機能障害仮説が提唱されてきた。近年、Parkin が膜電位を失い、断片化した(ダメージを受けた)ミトコンドリアに移行し、特異的オートファジーによってミトコンドリアを分解に導くことが報告された。この現象は Parkin が傷ついたミトコンドリアの除去に関与しており、その活性が低下すると障害ミトコンドリアが蓄積、毒性を発揮し発症に至るという可能性を示唆している。

(2) オートファジーマーカー LC3 とオートファジープローブ Keima

オートファジーは飢餓時の栄養素供給をはじめ、感染細菌、変性タンパク質や障害オルガネラの除去等様々な生理的現象に関与している。上記の Parkin の関与する障害ミトコンドリアの除去もこのオートファジーを介して行われる。このオートファジーの検出にはオートファゴソームマーカーである LC3 が最も一般的に使用されているが、この LC3 には以下のような欠点がある。

オートファジーには幾つかの種類が報告されているが、LC3 はその内の一つ、マクロオートファジーしか検出できない。

LC3 のシグナルは一過性であり、オートファジーが起こっている瞬間しかシグナルは検出できない(すなわちどれだけオートファジーによる分解が行われてもその痕跡は残らない)このことはライブイメージングの難しい動物個体を用いた実験の際、致命的な問題になる。

申請者は以前、LC3 のこれらの欠点を克服できる、新しいデザインのオートファジープローブ Keima を作製、発表した(1. Katayama et al. 2011)。

現在報告されているすべてのオートファジーはリソソームにより分解される。リソソーム内は酸性 (pH<5) であり、移行に伴う pH 変化を捉えればすべてのオートファジーを検出できる。Keima はその蛍光変化によりこの pH 変化を検出可能な上、酸性条件下で極めて安定でリソソームプロテアーゼにも抵抗性であるため、そのシグナルはオートファジーが終わった後もリソソーム内で蓄積し、高感度な検出、定量化が可能となっている。

しかし、pH 変化に伴う Keima の蛍光変化は可逆的であり、固定などの処理でリソソームの pH 勾配がなくなったサンプルではそのシグナルは失われてしまう。このことはサンプルを免疫染色に供するときや、マウスなどの個体サンプルから標本作製する際に大きな問題となる。

(References)

2. 研究の目的

前述のように、Parkinがオートファジーによる障害ミトコンドリアの分解除去(マイトファジー)に関与し、この働きを介してパーキンソン病の発症を抑制している可能性が示唆されている。申請者はこのマイトファジーを *in vivo*、*in vitro*で検出できる新しいオートファジープローブを開発した。この新規プローブは高感度でシグナルが蓄積し、固定後でもシグナルが残存するため、動物個体のどこで、どれだけオートファジーがおきていたのかを容易に検出、定量化することが可能である。本研究ではこのプローブを発現する遺伝子組み換え動物を用い、パーキンソン病発症のメカニズム(マイトファジーと本症発症の関係、黒質ドパミンニューロンの変性脱落の原因など)の解明を目指す。

3. 研究の方法

オート、マイトファジーシグナルが不可逆で、固定可能なプローブの作製はすでに完了しており、*in vitro*での良好な結果が得られている。本課題ではCreによりプローブが発現するノックインマウスを作製し、ERT2-Creを全身性に発現するマウスと掛け合わせて、Tamoxifen投与により、プローブが誘導される遺伝子組換えマウスを作製した。

4. 研究成果

目的のマウスを作製し、Tamoxifenによる誘導を行い、発現を検討した結果
誘導型オートファジープローブ発現ノックインマウス

- ・誘導系が機能しない個体が観察された。
- ・Tamoxifen誘導前からプローブを発現している個体も散見された。これらのマウスでは著しいオートファジーシグナルの蓄積が観察された。

など、誘導が不安定であった。親マウスの組み合わせ、交配時期などを検討してみたが、改善は見られず、本マウスの使用は断念した。

誘導型マイトファジープローブ発現ノックインマウス

- ・多少の発現漏れ(数百、数千細胞に数個)が観察されるものの、観察した脳以外の器官では良好な発現誘導が観察された。
- ・脳では非誘導のマウスでもプローブの発現が観察され、それに伴うマイトファジーシグナルの蓄積が観察された。

脳以外の器官では望むとおりのタモキシフェンに制御された発現誘導が確認され、プローブによるマイトファジーの可視化、解析が可能であることが示されたが、残念ながら脳ではタモキシフェンによる誘導前からプローブが発現しており、すでにシグナルを蓄積してしまっている(このプローブはシグナル蓄積型であるため、観察するまでのマイトファジーシグナルを溜め込んでしまう)ので解析には不向きであることが示唆された。

発現誘導不良の原因についてであるが、今回使用したB6.Cg-Tg(UBC-Cre_{ERT2})EjbjマウスのERT2-Creが器官特異的に核に漏れ出し、Creを切断してプローブの発現をONにしている

可能性が考えられる。週齢や、飼育方法などの検討を行ったが、根本的な改善は見られなかった
ので、脳に関してはこのマウスでの観察は断念し、他の誘導系(テトラサイクリン誘導システム、
他のERT2-Creマウスとの掛け合わせなど)を利用したマウスの作製を検討している。

このマウスで解析可能な脳以外の器官に関してはこのまま観察を進め、各器官でのマイトフ
ァジー検出能を確認した後に、脳以外の器官でのマイトファジー研究を行う研究室と共同研究を
進める予定である。

5．主な発表論文等

6．研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等につ
いては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。