

令和元年6月25日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19525

研究課題名(和文)パーキンソン病原因遺伝子CHCHD2が織りなすシグナルネットワークの究明

研究課題名(英文)Characterization of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 and its molecular signaling network

研究代表者

孟 紅蕊 (Meng, Hongrui)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：90736498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CHCHD2の生体での役割を明らかにするため、CHCHD2遺伝子を欠失したハエモデルを複製し、PDと関連した表現型を解析した。哺乳類培養細胞からCHCHD2に結合するパートナーとして、ミトコンドリア呼吸活性、クリステの維持および細胞死が誘導される分子を同定しました。CHCHD2結合分子が形成するシグナルネットワークを明らかにするため、結合分子ハエ系統とCHCHD2変異ハエを掛け合わせ、遺伝学的相互作用解析を行いました。この解析同定された分子をCHCHD2ハエモデルに導入し、ミトコンドリアの不調を改善ならびにドーパミン神経変性の抑制させることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果は、ミトコンドリアの機能低下によるストレスと細胞死シグナルの活性化の分子レベルでの病態機序、およびそれを改善する遺伝子が明らかになりました。本研究で得られるCHCHD2ネットワークのハブとなる遺伝子は、CHCHD2変異あるいはミトコンドリア関連の遺伝子変異によるPDの神経変性において中心的な役割を持つことが考えられる。これらは学問的なインパクトとともに、ネットワークのハブとなる遺伝子産物の挙動変化が、CHCHD2変異にリンクするPDや孤発性PDの診断と治療の分子標的としての意義を明らかにするものであり、臨床応用への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mutations in a mitochondrial protein, CHCHD2, have been identified in familial Parkinson's disease (PD) cases. To understand the physiological and pathological roles of CHCHD2, we manipulated the expression of CHCHD2 in Drosophila and mammalian cells. The loss of CHCHD2 in Drosophila causes abnormal matrix structures and impaired oxygen respiration in mitochondria, leading to oxidative stress, dopaminergic neuron loss and motor dysfunction with age. These PD-associated phenotypes are rescued by the overexpression of human CHCHD2 but not its PD-associated mutants. CHCHD2 is upregulated by various mitochondrial stresses, including the destabilization of mitochondrial oxidative reaction and unfolded protein stress. CHCHD2 along with some molecular related to cell death signaling and mitochondria respiration, dynamically regulate mitochondrial oxidative phosphorylation and cell death in response to mitochondrial stress.

研究分野：神経内科学関連

キーワード：パーキンソン病 神経変性 ミトコンドリア CHCHD2

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

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳ドーパミン神経の変性を特徴とする難治性の神経変性疾患である。発症原因は不明ですが、一部にパーキンソン病を頻発する家系が存在し、パーキンソン病に関わる遺伝子が徐々に明らかになってきました。

近年、ミトコンドリア膜間腔に局在するタンパク質 CHCHD2 がパーキンソン病の優性遺伝形式原因遺伝子として同定された (Funayama, *Lancet Neurol*, 2015)。CHCHD2 は酵母からヒトまで高度に保存されているが、哺乳類培養細胞でノックダウンすると酸素消費量が低下し、呼吸鎖複合体 IV の活性が低下することが報告されている (Baughman, *PLoS Genet*, 2009)。また酵母の CHCHD2 ホモログの欠失変異体においても酸素消費量の低下、呼吸鎖複合体 III の活性低下が報告され、電子伝達系における CHCHD2 の役割が強く示唆される (Longen, *J Mol Biol*, 2009)。ミトコンドリアはアポトーシスの進行に重要な機能を担うが、CHCHD2 がアポトーシス阻害分子 Bcl-x1 と結合し細胞死を抑制すること、CHCHD2 の発現量低下により各種ストレスに感受性となり細胞死が起こることも報告されている (Liu, *Cell Death Differ*, 2015)。以上の研究は CHCHD2 がミトコンドリアの機能維持と関係することを強く示唆されたが CHCHD2 の分子機能と個体での役割は分かっていない。そこで CHCHD2 の分子機能をより理解するために、我々は CHCHD2 と関係するタンパク質を哺乳類培養細胞を用いて探索した。その結果、大きく 3 つの機能グループに分けられるミトコンドリアタンパク質が同定された。すなわち、ミトコンドリア呼吸鎖複合体、クリステの形態制御に関与する分子、ミトコンドリア介在性の細胞死シグナル関連分子である。これらは、いずれも CHCHD2 変異モデルの表現型を説明する可能性があり、関係ある分子相互作用がパーキンソン病神経変性と繋がることを考えられるがそのエビデンスは現在のところ分かっていない。

2. 研究の目的

ミトコンドリア膜間腔に局在するタンパク質 CHCHD2 の変異が神経変性疾患パーキンソン病の病因遺伝子として同定されました。しかし、CHCHD2 がミトコンドリアでどのような機能を持つのか、そのアミノ酸変異がパーキンソン病神経変性を導くのかは明らかになっていませんでした。そのうち本研究は、ミトコンドリア障害の表現型が検出でき、遺伝学的な解析に有利なショウジョウバエモデルと分子レベルの解析が容易な哺乳類細胞モデルを用いて、CHCHD2 の生理的と病理的役割、関係する分子とのネットワークを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

CHCHD2 の生理的と病理的役割、CHCHD2 と関係する分子のネットワークを明らかにするため、ゲノム編集の手法を用い CHCHD2 遺伝子欠失ショウジョウバエモデルを作製しました。まずこのモデルを用い PD 関連表現型を評価しました。次に CHCHD2 欠失或変異ハエと関連分子のハエ系統を掛け合わせ、ミトコンドリア表現型に関する遺伝学的相互作用解析を行いました。遺伝的相互作用が確認できた関連分子は、分子レベルの解析が容易な培養細胞を用いて詳細に遺伝的位置関係を確定しました。クリステ形態、呼吸活性および細胞死を引き起こすに関連分子の発現操作による分子挙動、お互い影響等を CHCHD2 欠失マウス由来の細胞を用いて、変異体導入するより解析しました。クリステ形態維持、活性酸素種発生を抑える遺伝子およびミトコンドリア膜電位安定させできる細菌由来の光駆動型プロトンポンプ mito-dR を CHCHD2 モデルハエに導入し、PD 関連する表現型回復されるかどうかを評価しました。

4. 研究成果

(1) まず CHCHD2 ノックアウト(KO)ハエを作製し、CHCHD2 の個体での生理的な役割を

探った。その結果、筋肉ミトコンドリアクリステの形態異常、機能低下（ATP 産生量と呼吸機能低下）、中枢ドーパミン神経細胞の加齢依存的な減少、PD 関連毒物や酸化ストレスへの高感受性、寿命短縮、運動機能の低下など、PD と関連のある表現型再現できることを確認しました。これらの表現型は CHCHD2 が電子伝達系における役割が強く示唆された、CHCHD2 変異とミトコンドリア機能喪失に繋がることをわかりました。

（２）CHCHD2 結合分子探索とその機能解析においては、同定された結合分子候補であった p32 の内在性レベルでの結合は生化学的な解析で見られた。しかし、結合分子 p32 は内在性レベルでの結合が、ショウジョウバエの遺伝的相互作用解析の結果から有意な機能的関係が見いだせなかった。すなわち、p32 の組織特異的のノックダウン（ノックアウトは致死）で、CHCHD2 変異によるミトコンドリア表現型の増悪はみられなかった。また、p32 の過剰発現で CHCHD2 変異によるミトコンドリア変性を回復させる効果も見られなかった。

（３）一方、CHCHD2 自分自身がホモ 2 量体を形成すること、病変変異体で 2 量体の形成効率、可溶性度の低下を観察し、病変変異により、タンパク質構造が変化し結合パートナーが不安定化することが示唆された。哺乳類細胞において CHCHD2 と CHCHD10 の結合が示された。また、CHCHD2 がホモダイマーを形成すること、病変変異体では、ホモダイマーの形成効率が低下していることを明らかにしている。こうした知見と先行論文から、ミトコンドリア膜電位低下より CHCHD2 と CHCHD10 のヘテロダイマー形成、CHCHD2 のホモダイマー形成が、ミトコンドリア機能維持に重要な役割を持つと考えられる。CHCHD2 病変変異では、タンパク質構造が変化しホモ・ヘテロダイマー形成に異常が生じることでミトコンドリア機能に異常が生じ、パーキンソン病の発症につながると推察できる。

（４）クリステは酸素呼吸に関わる酵素群が配置されている場所です。次に、哺乳類培養細胞から CHCHD2 に結合するパートナーとして、クリステの維持およびチトクロム c の安定化に関わる MICS1 を同定しました。CHCHD2 がなくなることにより、チトクロム c の不安定化、活性酸素種の発生、細胞死シグナルの活性化が起こり、神経細胞死が誘導されることがわかりました。CHCHD2 ハエモデルに MICS1 を発現させて、崩壊しているミトコンドリアクリステを改善させることをわかりました。これらの結果は CHCHD2 の変異により細胞死シグナルの活性化が起こり、神経細胞死に繋がることをわかりました。

（５）ミトコンドリアの膜電位維持或いは酸化ストレスを抑制するとミトコンドリア機能改善、PD 神経変性を抑えると考えられる。ミトコンドリアからの活性酸素種発生を抑える遺伝子として 4E-BP を見出しました。そこで、CHCHD2 ノックアウトハエへ 4E-BP を遺伝子導入したところ、ミトコンドリアの形態および機能改善ならびにドーパミン神経変性の抑制に成功しました。

（６）最近、CHCHD2 変異 PD 患者剖検脳から、顕著なレビー小体の蓄積が認められた。これらの病理学的な結果は、CHCHD2 がその変異により、異常なたんぱく質蓄積の原因となることを示唆している。そこで、CHCHD2 変異体を導入したハエモデルを用いて α -シヌクリンの加齢依存的な凝集や神経脱落等を確認した。さらに、 α -シヌクリン発現 CHCHD2 変異ハエでは、加齢と共に界面活性剤であるサルコシルに不溶性の α -シヌクリンが増加した。CHCHD2 の変異により生じるミトコンドリアの機能異常が、酸化ストレスによる細胞質内ユビキチン化修飾、タンパク質分解系の障害、脂質変化等を導き異常なタンパク質凝集促進をもたらすと考えられる。

（７）細菌由来の光駆動型プロトンポンプ mito-dR は、ミトコンドリアの膜電位維持ならびに酸化ストレスを抑制する有効な手段と考えられる。酸化ストレスの抑制には、ミトコンドリア

mild uncoupling が関与していると考えられ、細菌由来の光駆動型プロトンポンプを CHCHD2 変異ハエミトコンドリアへ導入することにより、膜電位が回復し、活性酸素種発生が抑制されることを明らかとした。この結果は、ミトコンドリアの機能低下による酸化ストレスが異常なタンパク質凝集化を促進すること、人為的なミトコンドリアの機能回復で、その凝集化が抑制できることを示していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1). Imai Y, Meng H, Shiba-Fukushima K, Hattori N. Twin CHCH Proteins, CHCHD2, and CHCHD10: Key Molecules of Parkinson's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Frontotemporal Dementia. *International Journal of Molecular Sciences*. 10.3390/ijms20040908. (2019)(査読あり)
- (2). Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, et al.: Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nature Communications*. 8, 10.1038/ncomms15500. (2017)(査読あり)
- (3). Meng H, Yamashita C, Hattori N, Imai Y. Measurements of the mitochondrial respiration and glycolytic activity in *Drosophila* embryonic cells. *Protocol Exchange*. 10.1038/protex.2017.069. (2017) (査読無し)
- (4). Inoshita T, Arano T, Hosaka Y, Meng H, et al.: Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*. 26:2933-2948. (2017) (査読あり)
- (5). Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Meng H, et al.: Monitoring Mitochondrial Changes by Alteration of the PINK1-Parkin Signaling in *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology* doi: 10.1007/7651_2017_9. (2017) (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1). Meng H, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Ikeda A, Nishioka K, Imai Y, Hattori N : Mutations of CHCHD2 exacerbate α -synuclein accumulation in *Drosophila*. 第 41 回日本分子生物学会 横浜、2018 年 12 月 29 日
- (2). Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Imai Y, Hattori N: Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial cristae structure and facilitates cytochrome c release from mitochondria. 第 40 回日本神経学会学術大会 千葉、2017 年 7 月 22 日
- (3). Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Funayama M, Sato S, Imai Y, Hattori N: Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜、2016 年 12 月 1 日

(4). Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Imai Y, Hattori N: CHCHD2, a Parkinson's disease associated protein, regulates the mitochondrial cristare integrity and function in Drosophila. 第 39 回日本神経学会学術大会 横浜、2016 年 7 月 21 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。