

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号	: 86102
研究種目	: 若手研究 (B)
研究期間	: 2011 ~2012
課題番号	: 23791010
研究課題名 (和文)	家族性および孤発性パーキンソン病の中樞神経における新規ミトコンドリア蛋白の関与
研究課題名 (英文)	Involvement of a new mitochondrial protein in the central nervous system of familial and sporadic Parkinson' s disease.
研究代表者	牧(黒田) 由紀子 (MAKI (KUROTA) YUKIKO) 独立行政法人国立病院機構徳島病院(臨床研究部)・研究員
研究者番号	: 70398014

研究成果の概要 (和文) : パーキン は家族性パーキンソン病の原因遺伝子 (PARK 2) であり、ユビキチン・リガーゼ活性(E3)を有していることが知られている。近年パーキンはミトコンドリアと関連した機能が報告されており、ミトコンドリアのオートファジーを介した品質管理の役割を有することが知られている。一方、私達は、パーキンをミトコンドリアへ運搬する未知の蛋白を探索し、Klokin 1 を発見した。Klokin 1 は Chondroitin polymerizing factor (ChPF) の変異体であり、ミトコンドリアに局在した。私達は、Klokin 1 ファミリーがパーキンの抗アポトーシス作用を補完しうることを見出した。KO マウスでは Klokin 1 ファミリーが脳の DA ニューロンにおいて、コントロールと比べて著明に増加した。この成績は Klokin 1 ファミリーがパーキン欠損を補完しうることを示すものであった。さらに PARK2 患者剖検脳では、正常脳に比べ Klokin 1 ファミリーの発現に変化が見られなかった。このことはマウスで認められたパーキン遺伝子欠損に対する Klokin 1 ファミリーの代償機転が、ヒトでは不十分であることを示唆するものと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Parkin is a neuroprotective protein with many functions, including maintaining mitochondrial homeostasis. Recent evidence suggests that Parkin is recruited from the cytoplasm to damaged mitochondria with low membrane potential. We found that intracellular localization of Parkin changed with cellular growth phase. Parkin was preferentially localized in the mitochondria of cultured cells in the late log phase of growth. The mitochondria with large amounts of Parkin showed preserved membrane potentials even during treatment with carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. Here we report a novel protein named Klokin 1 that transports Parkin to the mitochondria. Klokin 1 was localized to the mitochondria and enhanced mitochondrial expression of Parkin. Klokin 1 enhanced cell viability in Parkin-silenced cells. Klokin 1 expression was enhanced in the brains of Parkin-deficient mice but not in an autopsied PARK2 brain. Our findings indicate that mitochondrial Parkin prevents mitochondrial depolarization and cellular apoptosis and that Klokin 1 may compensate for Parkin deficiency.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・神経内科学

キーワード : 神経分子病態学 パーキンソン病 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は代表的な神経変性疾患の1つであり、大部分が孤発性に発症する。同病では、黒質のドーパミン産生細胞の選択的変性が見られ、病態として同細胞のミトコンドリア機能障害の関与が想定されている。しかしながらそのミトコンドリア障害の原因や機序は依然として不明である。一方、近年、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子が相次いで発見され、その解析を通して孤発性パーキンソン病の病態の解明が試みられつつある。パーキンは最も高頻度に発症する家族性パーキンソン病の原因遺伝子 (PARK 2) として発見された。パーキン蛋白はコピキチン・リガーゼ(E3)活性を有しており、パーキン遺伝子の変異により E3 活性の低下が起こり、有害な基質が蓄積することで黒質のドーパミン産生細胞の選択的な変性をきたす機序が推定されていた。パーキン遺伝子欠損症においてもミトコンドリア障害の関与が近年注目されてきた。特に、近年は、パーキンがミトコンドリアのオートファジー (ミトファジー) に中心的な働きをすることで、ミトコンドリアの品質管理を担っていることが注目されている。

2. 研究の目的

本研究ではパーキン遺伝子欠損症パーキン遺伝子欠損症および KO マウスの中枢神経系において、Klokin 1/ChPF ファミリーが代償機転を有しているか否かを明らかにするとともに、孤発性パーキンソン病患者の剖検脳においてもその発現様式を比較・検討することを計画した。さらにアポトーシスの原因としてミトファジーが関係しているかについても併せて検討する。

3. 研究の方法

(1) パーキン KO マウスの解析: パーキン KO 動物に関し、ショウジョウバエ (*Drosophila*) では DA ニューロンの減少が起こり、遺伝性パーキンソン病 PARK2 モデルとしての phenotype をとることが知られている。一方、KO マウスは世界で数種類作製されているものの、ミトコンドリアの機能障害をきたしたとする報告が見られるのみで、PARK2 に類似した症状は見られず DA ニューロンの脱落も観察されていない。私達は、その原因として Klokin1/ChPF ファミリーの代償作用がマウスでは顕著なためであるとの仮説を立てた。実際、供与されたパーキン KO マウスで検討したところ、脳の DA ニューロンにおいて、コントロールと比べて著明に Klokin1/ChPF ファミリーの発現が増加し、細胞内分布も全く異なったものであった。これらの成績はすべて Klokin1/ChPF ファミリーがパーキン欠

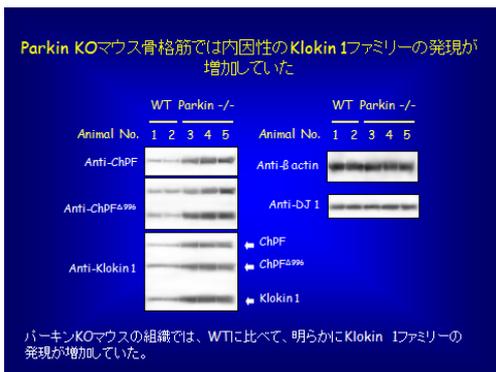
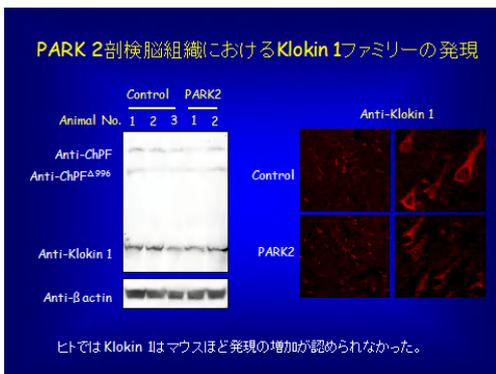
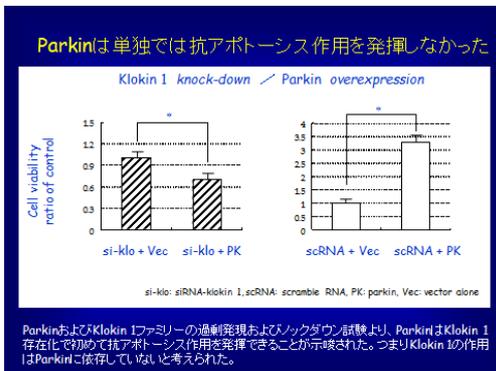
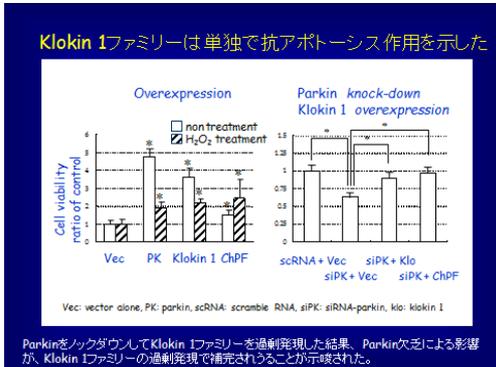
損を補完しうることを示すものである。本研究ではさらにパーキン KO マウスの embryonic fibroblast (MEF) や初代培養系を用い、パーキン KO マウスではさらに Klokin 1 をノックダウンするとパーキンの欠損していないコントロールに比べ、著明にアポトーシスをきたすか否かを検証する。

(2) PARK2 の解析: ヒトについてはパーキン・Klokin1/ChPF ファミリーが豊富に発現するリンパ球で検討したところ、PARK2 患者ではやはり健常に比べ Klokin1/ChPF ファミリーの発現は変化が見られなかった。このことはマウスで認められたパーキン遺伝子欠損に対する Klokin1/ChPF ファミリーの代償機転がヒトでは不十分であることを示唆するものと考えられた。一方、孤発性パーキンソン病患者リンパ球ではその発現が著明に増加していた。私達は最近、PARK2 患者剖検脳を広島大学より供与を受けた。本研究では、その剖検脳を用いて Klokin1/ChPF ファミリーの発現を解析する。

4. 研究成果

私達は新規のパーキン結合蛋白 Klokin 1 が、ミトコンドリア移行シグナル(MTS)を有し、MTS を欠くパーキンをミトコンドリアまで運搬することを見出した。さらに、Klokin 1 は Chondroitin polymerizing factor (ChPF) の変異体であり、ChPF はもう一つの変異体である ChPF Δ996 も見出した。また Klokin 1 の機能解析に関して、Klokin 1 とパーキンの内因性蛋白の発現を RNAi で抑制した時、あるいは過剰発現させた培養細胞において、ミトコンドリアに関連した抗アポトーシス作用を検討した結果、Klokin 1 あるいはパーキン発現を抑制した場合にはアポトーシスが增加すること、パーキン発現を抑制しアポトーシスをきたした細胞に Klokin 1 を過剰発現させるとアポトーシスが減少することを見出した。一方、Klokin 1 発現を抑制した細胞のアポトーシスはパーキンを過剰発現させてもそれを抑制することはできなかった。このことは、パーキンの抗アポトーシス作用は Klokin 1 の存在を必要とするのに対して、Klokin 1 はパーキンをミトコンドリアに運搬するのみならずミトコンドリア内で独自の抗アポトーシス作用を発揮すること、その作用はパーキンの作用を代償しうることを示唆された。また、パーキン KO マウスでは黒質 DA 細胞内でコントロールに比べ Klokin 1 の発現が著明に増加していることを見出した。このことは、生体においてもパーキン欠損による細胞障害を Klokin 1 が代償していることを強く示唆するものであった。さらに PARK2 患者剖検脳では、正常脳に比べ Klokin 1/ChPF ファミリーの発現に変化が見

られなかった。このことはマウスではマウスで認められたパーキン遺伝子欠損に対する Klokin 1/ChPF ファミリーの代償機転が、ヒトでは不十分であることを示唆するものと考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kuroda Y, Sako W, Goto S, Sawada T, Uchida D, Izumi Y, Takahashi T, Kagawa N, Matsumoto M, Matsumoto M, Takahashi R, Kaji R, Mitsui T. Parkin interacts with Klokin1 for mitochondrial import and maintenance of membrane potential.

(査読有) Hum Mol Genet. 2012;21(5):991-1003.

2. Mitsui T, Kuroda Y, Ueno S, Matsui N, Kaji R. FK506 attenuates thymic output in patients with myasthenia gravis. Arch Med Sci (査読有) (in press)

3. Kuroda Y, Fujimoto M, Kaji R, Mitsui T. Effect on mitochondrial gene of Parkin. J Tokushima Natl Hosp (査読有) 2: 32-35, 2011

4. Fujimoto M, Kuroda Y, Kawamura K, Kaji R, Mitsui T. Examination of cell viability using the primary culture system of skin fibroblast. J Tokushima Natl Hosp (査読有) 2011;2:23-26.

5. Mitsui T, Kuroda Y, Ueno S, Kaji R. The effects of FK506 on refractory inflammatory myopathies. Acta Neurol Belg. (査読有) 2011;111:188-194.

6. [学会発表] (計 2 件)

① 牧(黒田) 由紀子 パーキンのミトコンドリア膜電位に対する関連蛋白の関与 53 回日本神経学会総会 平成 24 年 5 月 21 日 日本・東京

② 牧(黒田) 由紀子 パーキンの細胞内局在・機能に対する関連蛋白の関与 第 52 回日本神経学会総会 平成 23 年 5 月 19 日 日本・名古屋

③ [図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokusimahosp-nho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者牧(黒田) 由紀子

(MAKI (KUROTA) YUKIKO)

独立行政法人国立病院機構徳島病院(臨床
研究部)・研究員

研究者番号：70398014

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：