

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830043

研究課題名(和文)新規オートファジープローブによりパーキンソン病でのミトファジーの働きを解明する

研究課題名(英文)The analysis of the mitophagy in Parkinson's disease with new autophagy probes.

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・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00415126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：2つの特性の異なる蛍光タンパク質を用い、新規オートファジー、ミトファジープローブを作製した。このプローブはそれぞれオートファジー、ミトファジーを感度良く検出可能で、固定後もシグナルが消失しないため、固定が必要な動物個体での観察に適している。実際にこのプローブを発現するマウスを用い、灌流固定後切片を作製して飢餓時の肝臓におけるオートファジーを検出、可視化した。
現在このプローブを発現するマウスを作製している。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have produced new autophagy and mitophagy probes with the two fluorescent proteins. These were able to detect autophagy and mitophagy in mammalian cells, respectively. The signals of those remained after fixation. so, those are suitable for observing with fixed samples. Actually, this autophagy probe was able to detect the starvation induced autophagy signal in mouse liver sections prepared using perfusion fixation.
These new probes would be good tools for autophagy and mitophagy research.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 蛍光タンパク質 ミトファジー パーキンソン病

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。

(3)更に新しく有用なオートファジープローブの作製

本研究では、シグナルが不可逆的で、固定

などの処理後でも蓄積したオートファジーシグナルが残存するような、さらに新しいオートファジープローブを作製する。

申請者の過去の解析から (2. Katayama et al. 2008) 一般的にクラゲ由来の蛍光タンパク質は酸性環境に弱くリソソーム内で不安定で、サンゴ由来のそれは酸性環境に強く、リソソーム内でも安定なものが多いことが明らかになっている。これら二種の蛍光タンパク質を組み合わせることでシグナルが不可逆的なオートファジープローブを作製する (下図参照)。

現在までにこのようなオートファジープローブを何種か作製し、精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験、培養細胞を用いた実験から

- ・固定、強制中性化などにより蓄積したオートファジーシグナルが消失しないこと。
- ・マクロオートファジー以外のオートファジーも検出可能なこと
- ・ミトファジーも検出可能なこと

が確認されている。

最終的には、このプローブを導入した遺伝子組み換え動物を作製し、

- ・個体レベルでのミトファジーの検出、定量とマップ化。
- ・パーキンソン病発症におけるミトファジーの役割の解明。
- ・本症の病原部位である黒質ドーパミンニューロンの神経変性とミトファジーとの関係の解明。

などを行い、パーキンソン病発症のメカニズム解明、治療法の開発に道を開くことを目指す。

(References)

1. Katayama et al. Chem. & Biol. 18 (8) 1042-1052 (2011)

2. Katayama et al. Cell Struct. Funct. 33 (1) 1-12 (2008)

2. 研究の目的

近年 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 (ミトファジー) 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た。本研究ではこのミトファジーを *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する。この新規プローブは高感度でシグナルが蓄積し、固定後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 (ミトファジーと本症発症の関係、黒質ドー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

(1) 新規オートファジー、ミトファジープローブの作製

目的に合致するようなオートファジープローブを作製するため、酸性条件下やリソソーム分解酵素に抵抗性の蛍光タンパク質と、非抵抗性の蛍光タンパク質を組み合わせ、蛍光タンパク質ペアの組み合わせのスクリーニング、それらの結合の順番、蛍光タンパク質間のアミノ酸の削除、リンカーの最適化などを行って、目的の「シグナル残存型蛍光オートファジープローブ」を作製する。

(2) 哺乳類細胞、動物個体での新規オートファジー、ミトファジープローブの評価

作製したプローブを、哺乳類細胞、動物個体にて発現させ、オートファジー、ミトフ

ァジーを誘導してプローブを評価する。また、これらを固定し、細胞が死んだ後もそのシグナルが残存するか確認する。

4. 研究成果

(1)新規オートファジー、マイトファジープローブの作製

目的に合致するようなオートファジープローブを作製するため、酸性条件下やリソソーム分解酵素に抵抗性の蛍光タンパク質と、非抵抗性の蛍光タンパク質を組み合わせ、蛍光タンパク質ペアの組み合わせのスクリーニング、それらの結合の順番、蛍光タンパク質間のアミノ酸の削除、リンカーの最適化などを行って、目的の「シグナル残存型蛍光オートファジープローブ」を作製した。しかしさらに検討と解析を進めたところ、このオートファジープローブは、連結後の片方の蛍光タンパク質の蛍光強度があまり強くないため、自家蛍光などの影響を受けやすい。上記の蛍光タンパク質の光安定性が低く、シグナル消失のおそれがある。などプローブとして望ましくない特性を持つことが明らかになった。

そこでこれらの点を改善する為、遺伝子変異導入法により問題のある蛍光タンパク質を改良し、元の蛍光タンパク質と置換して、より大きな蛍光強度を持ち、励起後も消光しにくいより良いプローブを得ることができた。

(2)哺乳類細胞、動物個体での新規オートファジー、マイトファジープローブの評価

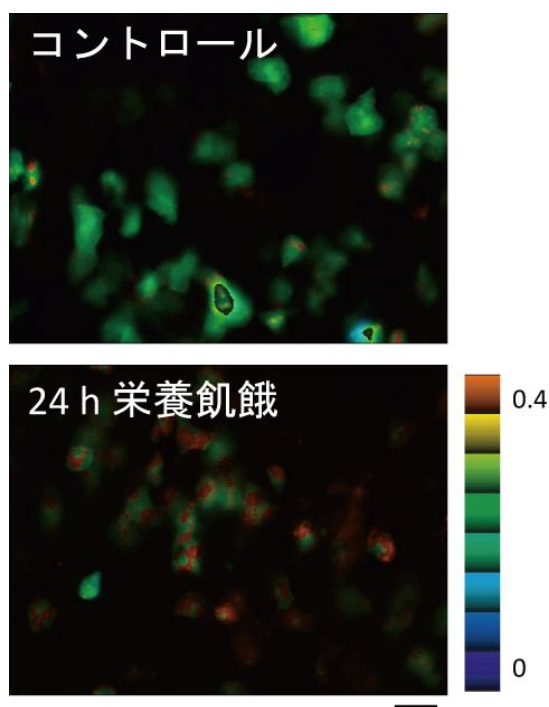
このプローブをMEF細胞に導入し、HBSSへの培地置換にて誘導した栄養飢餓によるオートファジー、CCCP添加によるマイトファジーを感度良く検出すること、固定処理後もそのシグナルが残存することを確認した。また、マウス生体内細胞用遺伝子導入試薬により、一過性にマウスにこのプローブを発現

させ、飢餓処理後、固定して肝細胞を観察し、個体内でのオートファジーも検出可能であることも確認した(下図参照)。

(図)灌流固定後のマウス肝切片を用いた栄養飢餓誘導オートファジーの検出

(上)コントロール 自由に摂食させたマウス

(下)栄養飢餓 24時間断食させたマウス
各処理後、マウスを灌流固定し、肝臓から切片を作製、蛍光観察した。図はレシオ表示しており、赤いシグナルがオートファジーを示す。(バー:10 μ m)



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 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：pH 応答性のタンパク質分解プローブ

発明者：宮脇敦史、片山博幸

権利者：宮脇敦史、片山博幸

種類：特許権

番号：特願 2015-12426

出願年月日：2015/06/19

国内外の別：国内

取得状況（計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 博幸 (Hiroyuki katayama)

所属研究機関：国立研究開発法人理化学研究所

部局：脳科学総合研究センター

職名：研究員

研究者番号：00415126

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：