

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893237

研究課題名(和文)パーキンソン病におけるミトコンドリア分裂・融合およびミトファジーの解明

研究課題名(英文)Elucidation of mitochondrial fission/fusion and mitophagy in Parkinson's disease

研究代表者

河尻 澄宏(Kawajiri, Sumihiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70707637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(以下PD)の原因遺伝子の一つであるVPS35のヒト由来培養細胞への過剰発現系で、ミトコンドリアは分裂傾向にあることが蛍光顕微鏡を用いたライブイメージングで観察された。しかし、VPS35とミトファジーとの関連は明らかにはできなかった。以上からVPS35がミトコンドリアを形態調節することよりミトコンドリア機能を維持している可能性があり、ミトコンドリアの形態制御破綻によるPD発症メカニズムが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I observed that mitochondrial fission was induced by VPS35 gene, one of Parkinson's disease (PD) causative gene, over-expression into human derived cultured cells using a fluorescence microscope live-imaging. However, I was not able to elucidate association between VPS35 and mitophagy. Based on these, I can consider that VPS35 regulates mitochondrial morphology and disruption of mitochondrial morphological regulation could lead to onset of PD

研究分野：パーキンソン病

キーワード：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 (以下 PD) は、発症原因が何らかのミトコンドリア異常であること以外はほとんど解明されておらず、根本的な治療はない。PD は加齢に伴い罹患率は上昇し、また運動機能障害を呈するため、超高齢化が進む我が国では更なる患者人口の増大およびそれに伴う医療費・介護関連費用の増大が危惧されており根本治療の開発が待たれる状況である。そのためには、まず原因の解明が第1である。近年、原因遺伝子の parkin と PINK1 がミトコンドリアの形態を制御する分裂・融合メカニズムやミトコンドリア機能をオートファジー機構により制御するミトファジーに関与することが明らかにされており^{1,2}、PD 発症原因に大きくかかわる可能性が示唆されている。しかし、詳細は不明のままである。

私は、これまで PD とミトファジーについての研究業績を持ち²、かつミトコンドリアの分裂・融合のメカニズムに関して第一線の研究を行なっている University of California Los Angeles (UCLA) の van der Bliek 研究室に 2011-2013 年に留学し、ミトコンドリアの分裂・融合の分子メカニズムとミトコンドリア・ライブイメージングについて学び、当研究計画は十分に実行可能なものである状況であった。

2. 研究の目的

上記背景からミトコンドリアの分裂・融合のメカニズムおよびミトファジーとの関連を parkin と PINK1 以外の PD 原因遺伝子 (α -synuclein、LRRK2、GIGYF2、DJ-1、ATP13A2、PLA2G6、FBXO7、HtrA2/Omi、NUCKS、VPS35、EIF4G1、GBA) との関連について明らかにすることで、ミトコンドリア形態制御からミトファジーへの経路のメカニズムをより明確にさせ、遺伝性 PD のみならず孤発性 PD の病態解明にせまり、根本治療開発へつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性 PD の原因遺伝子のミトコンドリアの形態への影響を検討

PD 原因遺伝子を発症様式から常染色体優性、常染色体劣性、その他、にわけて、ヒト由来培養細胞へ遺伝子導入を行うことによりミトコンドリアの形態変化が生じるかどうか、そしてミトファジーを制御するかどうかを、生化学的手法によりアプローチした。

具体的方法：ヒト由来培養細胞である HeLa 細胞等に、原因遺伝子のプラスミドを常染色体優性遺伝形式の場合は過剰発現系 (リポフェクション法) で遺伝子を導入した。

常染色体劣性遺伝形式の場合は siRNA によるノックダウン法と過剰発現系 (リポフェクション法) で遺伝子を導入した。

遺伝形式が明らかでないものは過剰発現系 (リポフェクション法) と siRNA によるノックダウン法で遺伝子導入した。

それぞれ、その後に蛍光顕微鏡を用いてライブイメージングで 300 個の細胞のミトコンドリアの形態を観察し normal、tubular (融合)、fragmented (分裂) に分類して定量評価をそれぞれ行った。

(2) ミトファジーとの関連の検討

ミトコンドリアの分裂もしくは融合を生じさせた遺伝子は候補遺伝子としてミトファジーとの関連の有無を明らかにした。

具体的方法：ヒト由来培養細胞である HeLa 細胞等に候補遺伝子を過剰発現後 (リポフェクション法) にミトファジーの上流であるミトコンドリアの膜電位低下の有無を JC-1 染色した後に蛍光顕微鏡を用いて 100 個の細胞のミトコンドリアを定量評価した (ミトコンドリアが赤色の場合は膜電位低下なし、緑色の場合は低下ありと評価した)。同様に候補遺伝子導入と同時に EGFP-parkin のプラスミドも導入して parkin のミトコンドリアへの移行の有無を 100 個の EGFP-parkin ポジテ

イブ細胞を蛍光顕微鏡で観察し定量評価をした。

4. 研究成果

(1) PD の常染色体優性遺伝形式で発症する原因遺伝子 (α -synuclein, LRRK2, GIGYF2) すべてにおいて、コントロールと比べどれもミトコンドリアの分裂をはじめとした形態変化は見られなかった (図 1)。

図 1 (単位は細胞の個数)

	Normal	Tubular	Fragmented
control	198	51	51
α -synuclein	190	46	64
LRRK2	210	44	46
GIGYF2	194	50	56

次に常染色体劣性遺伝形式で発症する原因遺伝子 (DJ-1, ATP13A2, PLA2G6, FBXO7) については siRNA によるノックダウン法のための siRNA オリゴの質がどれも低く評価の対象にすることができなかった。過剰発現系においては、すべてにおいてコントロールと比べミトコンドリアの分裂をはじめとした形態変化は見られなかった (図 2)。

図 2 (単位は細胞の個数)

	Normal	Tubular	Fragmented
control	186	66	48
DJ-1	190	50	60
ATP13A2	186	64	50
PLA2G6	201	50	49
FBXO7	193	52	55

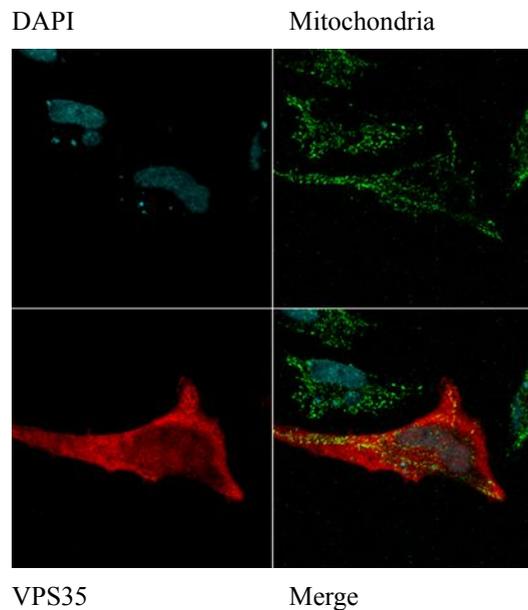
次に遺伝形式が明らかでない原因遺伝子 (HtrA2/Omi, NUCKS, VPS35, EIF4G1, GBA) については siRNA によるノックダウン法のための siRNA オリゴの質がどれも低く評価の対象にすることができなかった。過剰発現系では VPS35 でコントロールと比べミトコ

ンドリア分裂を生じさせる傾向が確認された。VPS35 以外の遺伝子ではコントロールと比べミトコンドリアの形態変化は見られなかった (図 3,4)。

図 3 (単位は細胞の個数)

	Normal	Tubular	Fragmented
control	210	43	47
HtrA2/Omi	193	47	60
NUCKS	217	51	33
VPS35	177	21	102
EIF4G1	201	52	47
GBA	183	54	63

図 4 (代表図)



以上から VPS35 はミトコンドリアを分裂させる候補遺伝子と想定し次のステップを試みた。

(2) VPS35 の過剰発現によるミトコンドリアの膜電位低下の有無を JC-1 染色後に蛍光顕微鏡で行ったが、コントロールと比べミトコンドリアの膜電位低下は観察できなかった (図 5)。

図 5 (単位は細胞の個数)

	赤(膜電位低下なし)	緑(膜電位低下あり)
Control	78	22
Positive control (CCCP 投与後)	25	75
VPS35	73	27

(CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine は脱共役剤でミトコンドリア膜電位を低下させる薬剤)

次に VPS35 の過剰発現による parkin のミトコンドリアへの移行の有無を蛍光顕微鏡で観察したが、parkin の移行はコントロールと比べても見られなかった (図 6)。

図 6 (単位は細胞の個数)

	parkin の移行あり	parkin の移行なし
Control	0	100
Positive control (CCCP 投与後)	84	16
VPS35	0	100

以上の結果から PD の原因遺伝子の一つである VPS35 はミトファジーにまでは強く関連しないものの、ミトコンドリアの分裂・融合メカニズムの特に分裂を制御する分子であることが明らかになった。よって孤発性における PD 発症のメカニズムにもミトコンドリアの形態制御機構の破綻が関わっている可能性が示唆された。VPS35 は小胞輸送に関連する分子と想定されており、また近年、小胞輸送とミトコンドリアとそれらの品質管理の関連も数多く報告されていることから、今後も着目し更なる詳細なメカニズムの解明が重要であり課題であると考えた。VPS35 とミトコンドリア分裂および神経細胞死までの経路の詳細なメカニズムを培養細胞レベルで明らかにできた後はマウスモデルを用

いた実験系までつなげられ、PD 根本治療開発へもつながる可能性があると考えた。

引用文献

1. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, **Kawajiri S**, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. **J Cell Biol** 189:211-21 (2010)
 2. **Kawajiri S**, Saiki S, Sato S, et al. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. **FEBS Lett** 584:1073-9 (2010)
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 3 件)
1. **Kawajiri S**, Noda K, Ikeda A, Koinuma T, Tomizawa Y, Hattori N, Okuma Y. Low dose of clonazepam is effective in the treatment of painless legs and moving toes syndrome: a case report. **Case Rep Neurol**. 7(1):59-62 (2015) 査読有
 2. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, **Kawajiri S**, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N. p150 glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. **PLoS One**. 9(4):e94645 (2014) 査読有
 3. Shen Q, Yamano K, Head BP, **Kawajiri S**, Cheung JT, Wang C, Cho JH, Hattori N, Youle RJ, van der Bliek AM. Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. **Mol Biol Cell**. 25(1):145-59 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. **Kawajiri S**, Yang H, Hattori N, van der Blik AM. OMA1 regulates PINK1/Parkin pathway through Tim complex. International Symposium on Mitochondria. 2013. Tokyo. Japan

〔図書〕(計1件)

1. **河尻澄宏**、大熊泰之. 神経疾患最新の治療 2015-2017. 301 (156-158). 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河尻 澄宏 (KAWAJIRI Sumihiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70707637