

機関番号：86102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790616

研究課題名(和文) パーキンソン病における新規ミトコンドリア蛋白の関与：新たな治療ターゲットの確立

研究課題名(英文) Involvement of a novel mitochondria protein in the Parkinson's disease: The establishment of a new therapeutic target

研究代表者 黒田(牧) 由紀子 (KURODA 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)：ミトコンドリアとパーキンソン病(PD)の関連は、いくつかの家族性PDを生じる遺伝子に関する遺伝子産物の機能の解析からも、これを示唆する成績が得られている。パーキン(PARK2)は、ユビキチン・リガーゼ(E3)と同様にミトコンドリア関連の機能を含む多目的の神経保護タンパク質として機能する。我々はパーキンに結合し、ミトコンドリアへ運ぶ新しいタンパク質 Klokin 1 と命名した。Klokin 1 と ChPF Δ 996 は人間のコンドロイチン重合因子(ChPF)のスプライシング変異体であるが、Klokin 1 の機能は ChPF/ChPF Δ 996 と異なっていた。Parkin は正確にミトコンドリアに局在するが、ChPF/ChPF Δ 996 は主にミトコンドリアの外側で限局される。我々は、Klokin 1 と同様に ChPF/ChPF Δ 996 が酸化ストレスの状況下においても培養細胞で抗アポトーシスの機能を示すことを見出した。さらにパーキンのスプライシングが酸化ストレス時には変化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The association of mitochondria and Parkinson's disease (PD) has been reinforced by the recent finding that several genes cause familial PD and the gene products have mitochondria-related function. Parkin (PARK2) functions as a multipurpose neuroprotective protein including mitochondria-related function as well as ubiquitin ligase (E3). We herein report a novel protein, named Klokin 1 that carries Parkin to mitochondria. Klokin 1 and ChPF Δ 996 were splicing variants of human chondroitin polymerizing factor (ChPF) but the function of Klokin 1 differed from that of ChPF and ChPF Δ 996. Parkin is exactly localized in mitochondria but ChPF and ChPF Δ 996 are mainly localized outside them. We found that ChPF as well as Klokin 1 showed anti-apoptotic function in cultured cells with or without oxidative stress. We found that splicing of Parkin gene was altered at oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
21年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・神経内科学

キーワード：臨床神経分子遺伝学

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みられ、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。パーキンソ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。パーキンソン蛋白はユビキチン・リガーゼ (E3) 活性を有しており、パーキンソ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。私達は PARK 2 に関する研究を行う中で、パーキンソン蛋白がミトコンドリアと密接な関連があることを見出した。パーキンソンは、細胞の増殖・非増殖状態により細胞内局在が変化し、増殖期の細胞ではミトコンドリアに局在し、非増殖期にはミトコンドリアから遊離する。さらに、パーキンソンはミトコンドリアの転写・複製を促進すること、ミトコンドリアの膜電位を増大させ細胞のアポトーシスを抑制することを報告した。私達の成績は、パーキンソンが E3 以外にミトコンドリアに関連した機能を有しており、パーキンソン遺伝子欠損症によりパーキンソンニズムが発症する機序として孤発性パーキンソン病と同様のミトコンドリア障害が起こっていることを示唆するものである。一方、パーキンソン蛋白自体にはミトコンドリアへの移行シグナルは存在せず、パーキンソンに結合する未知の蛋白がパーキンソンをミトコンドリアへ運搬する可能性が強く示唆された。これらの知見をふまえて、我々はこの未知の蛋白を探索し、新規な遺伝子を発見し、これを Klokin 1 と命名した (徳島大学・知的財産本部より特許申請中)。Klokin 1 は chondroitin polymerizing factor (ChPF) の splicing variant であり、ChPF はもう一つの splicing variant である ChPF Δ 996 が存在することも見出した。

2. 研究の目的

私達の見出した Klokin 1 ファミリー遺伝子の転写産物がミトコンドリア障害とどのような関連を有するのか、パーキンソンと同様の抗アポトーシス作用を有するのかを検討する。さらにパーキンソン遺伝子のスプライシングが酸化ストレス時にはどのように変化するかを検討することで、このファミリーがパーキンソン病の治療ターゲットとなりうるか否

かを検討する。

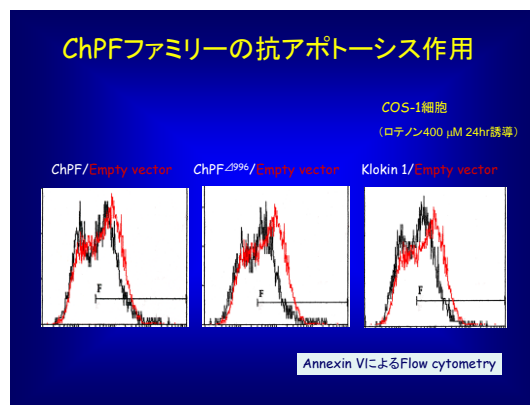
3. 研究の方法

平成20年度：種々の培養細胞系に Klokin 1 を過剰発現させ、ミトコンドリア膜電位、細胞内局在の変化を解析する。さらに培養細胞にミトコンドリアトキシンである MPTP、CCCP あるいはロテノンを添加し、これらのパラメーターがどのように変化するかを検討する。パーキンソンのスプライシングが酸化ストレス時には変化するか否かを検討した。

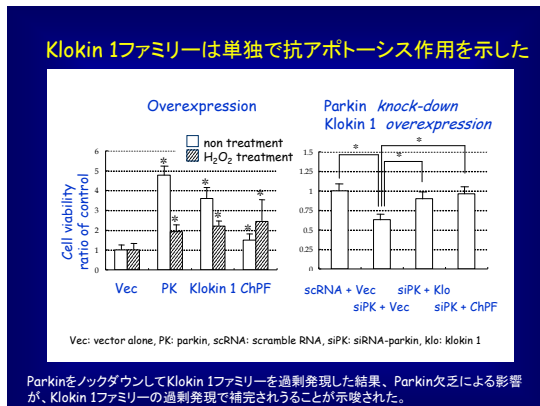
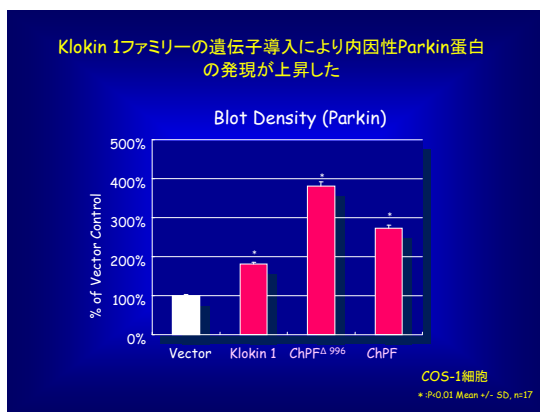
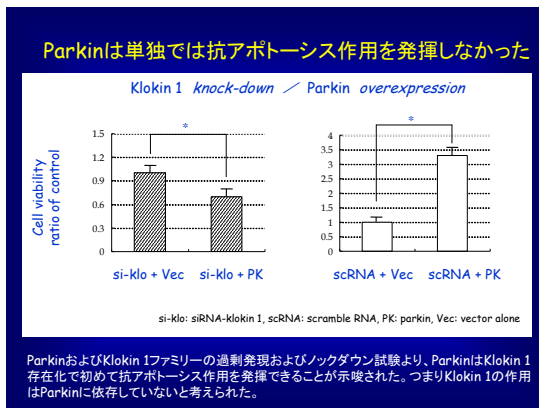
平成21年度：種々の培養細胞に Klokin 1 ファミリーを過剰発現させ、内因性パーキンソン蛋白をウエスタンブロット解析した。また、パーキンソンと Klokin 1 が同一経路をたどっているかを調べるため、パーキンソンと Klokin 1 の siRNA を用いて Cell Viability を検討する。

4. 研究成果

①培養細胞系への Klokin 1 の導入：Annexin V/PI を用いたフローサイトメトリー (FACS) 法によりアポトーシスに対する影響を検討した結果、Klokin 1 および ChPF の導入ではアポトーシスは抑制され、この効果は MPTP あるいはロテノンを添加した細胞で著明であった。



②内因性パーキンソン蛋白の解析および Cell Viability の測定：Klokin 1 ファミリーの過剰発現で、内因性パーキンソン蛋白の上昇が認められた。さらにパーキンソンをノックダウンして Klokin 1 を過剰発現した場合は、生細胞数の増加が認められたが、逆に Klokin 1 をノックダウンして、パーキンソンを過剰発現させた場合には、生細胞数の増加は認められなかった。



③パーキン遺伝子のスプライシング異常が酸化ストレスに認められたことは、別紙論文で供覧。

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2件)

1. Kuroda Y, et al. Effect of oxidative stress on splicing of parkin gene. *J Tokushima Natl Hosp* (査読有り)

1:41-44, 2010

2. Takao Mitsui, Kuroda Y, et al. Effect of angiotensin II type 1-receptor blocker candesartan in hypertensive Parkinson's disease. *J Tokushima Natl Hosp* (査読有り) 1:1-5, 2010

[学会発表]

①黒田 由紀子 パーキン結合蛋白による抗アポトーシス作用の検討 第49回日本神経学会総会 平成20年5月16日 日本・横浜
②黒田 由紀子 パーキン蛋白の糖化修飾機構 第50回日本神経学会総会 平成21年5月21日 日本・仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[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

黒田(牧)由紀子 (KURODA YUKIKO)

研究者番号: 70398014

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし