

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22700381
 研究課題名（和文） 新規オートファジープローブ Keima によりパーキンソン病発症機構を可視化する
 研究課題名（英文） Visualization of pathogenic mechanism of parkinson's disease with Keima, the novel autophagy probe.
 研究代表者
 片山 博幸 (KATAYAMA HIROYUKI)
 独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・研究員
 研究者番号：00415126

研究成果の概要（和文）：

本研究では新規オートファジープローブ Keima の開発を行った。このプローブはシグナルが残存、蓄積するため、感度が高く、オートファジー総量を定量できた。また、LC3 と異なり、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であった。さらに、ミトコンドリア局在型の mt-mKeima により、マイトファジーが検出、可視化出来た。

このプローブは国内外の研究室に配布し、オートファジー研究に役立てていただいている。

研究成果の概要（英文）：

We produced Keima, a novel autophagy probe. Because the signal of Keima remains and accumulates after termination of autophagy, this probe has high sensitivity and can determine total amount of autophagy. While this probe can detect not only macroautophagy, but also other autophagy. mt-mKeima, a mitochondria targeting construct, can detect mitophagy.

This probe has been distributed and used in some dozen laboratory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード: オートファジー、パーキンソン病、ミトコンドリア、マイトファジー、イメージング、蛍光タンパク質、Keima、Parkin、

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

Parkin は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) オートファジーとオートファジーマーカー LC3

オートファジーは飢餓時の栄養素供給をはじめ分化、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することが報告されている。上記 parkin の関与する障害ミトコンドリアもこのオートファジーにより除去される。このオートファジーの検出、定量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。

1. オートファジーには幾つかの種類が存在するが、LC3 はそのひとつマクロオートファジーしか検出できない。
2. オートファゴソーム上の LC3 は速やかにリソソームで分解されるため、そのシグナルは一過性である。そのためこのシグナルを検出するにはオートファジーが起こっている瞬間を捉える必要がある。このことはライブイメージングが難しい動物個体を用いた実験の際、特に問題になる。

2. 研究の目的

本研究では蛍光タンパク質を用いてオートファジー、マイトファジーを検出、可視化する系を確立し、このツールを用いてパーキンソン病発症時のマイトファジーを観察してこの疾患の発症メカニズムの解明を目指した。

オートファジーにより基質は最終的にリソソームに運ばれ、分解を受ける。また、一般的に細胞質やミトコンドリアなどのオルガネラは中性-弱アルカリ性で、リソソームは pH4-5 ほどの酸性である。本研究ではこの pH ギャップを利用し、分解される基質が中性条件下から酸性条件下に移行したことを捉えることでオートファジーの検出、可視化を試みた。

コモンサング由来の蛍光タンパク質 Keima は、中性では 440nm に励起ピークを持つが、酸性条件化では 586nm にもう一つの励起ピークが現れ、環境の pH に応じてこの二つの励起ピークが増減する。申請者はこの Keima が二波長励起一波長測光型のレシオメトリック pH プロブとして利用できること、オートファジーによる細胞質基質、オルガネラの酸性化を検出できることを見出した。一般的にサング由来の蛍光タンパク質は酸性条件下でも極めて安定で、リソソームプロテアーゼにも抵抗性を持つ為、そのシグナルはリソソーム内で蓄積する。

このように Keima は

1. 全てのオートファジーを検出、定量できる。
2. シグナルが一時的でなく、蓄積するため高感度な検出が可能。

であり、LC3 の欠点を克服しうる優れたオートファジープロブとして利用可能であった。

本研究は、このオートファジープロブ Keima を利用して、ミトコンドリアオートファジーを *in vivo*、*in vitro* で検出し、

・パーキンソン病発症におけるミトコンドリアオートファジーの役割

・何故、黒質ドーパミンニューロンのみが障害を受け、変性、脱落するのか

・患者由来 parkin によるパーキンソン病発症機構

について検討し、パーキンソン病発症のメカニズム解明を目指し、根源的な治療法の開発に道を開くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Keima によるオートファジー、マイトファジーの検出、可視化系の確立

培養細胞を用い、Keima を用いてオートファジー、マイトファジーの検出が可能であることを示した。想定通り Keima はこれらの現象を検出可能であり、マクロオートファジー

不能な Atg5^{-/-} MEF 細胞を用いた実験からマクロ以外のオートファジーも検出可能であること、そのシグナルはすぐには消滅せず残存することが示された。

(2) ミトコンドリア局在型プローブ mt-mKeima を発現する Tg-mice の作製と、それを用いたパーキンソン病発症メカニズムの解析

パーキンソン病は中脳黒質ドーパミンニューロンの特異的変性と脱落を特徴としているが、何故この領域の神経細胞のみが特異的にダメージを受けるのかは不明な点が多い。この神経細胞が MPTP やロテノンなどミトコンドリアに作用する毒素に極めて感受性の高いことや、parkin の障害ミトコンドリア除去作用などを考え合わせると、この部位の神経細胞がミトコンドリア障害を受けやすく、生存のためにそれらを速やかに除去する必要あるという仮説が考えられる。本研究ではこの部位の神経細胞とミトコンドリアオートファジーとの関係を解析するために、神経細胞特異的にミトコンドリア局在型 Keima を発現する Tg mice を作製した。

作製した Tg マウスを用い、

・黒質ドーパミンニューロンとその他の領域のミトコンドリアオートファジー活性を比較する。

・パーキンソニズムを引き起こすミトコンドリア毒 MPTP やロテノンをこの Tg マウスに投与した際の黒質ドーパミンニューロンのミトコンドリアオートファジー活性を解析し、これらの毒素のパーキンソニズム誘導機序について解析する。

・患者由来 Parkin を発現する Tg マウスとの掛け合わせ、ほかの家族性パーキンソン病関連遺伝子 K0 マウスとの掛け合わせにより、この領域のミトコンドリアオートファジーの活性変化を観察する。

などを試行しようとした。

4. 研究成果

Keima が有用なオートファジープローブであること、マクロ以外のオートファジーも検出可能であること、そのシグナルは残存し、シグナルメモリ型のプローブとして機能すること、ミトコンドリア局在型 mt-mKeima がマイトファジーを検出できることを示し、学術論文一報、学会発表四件、特許出願一件を成果とした。

このように *In vitro* の実験系は順調であったが、*In vivo* の実験系は作製した

mt-mKeima 発現マウスの蛍光が微弱で、それ以降の計画を行うことができなかった。現在、プローブや発現系を改良し、新たなマウスの作製を目指している。

また、このプローブについては国内外数十研究室に配布し、オートファジー研究の推進に役立てていただいている。

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 1 件)

① A Sensitive and Quantitative Technique for Detecting Autophagic Events Based on Lysosomal Delivery.

Hiroyuki Katayama, Takako Kogure, Noboru Mizushima, Tamotsu Yoshimori, Atsushi Miyawaki
Chem. & Biol. 査読有、18 (8) 1042-1052 (2011)

[学会発表] (計 1 件)

① 発表者: 片山博幸(発表者)、宮脇敦史、小暮貴子、吉森保、水島昇、山本章嗣
発表演題: Keima, a lysosomal proteases-resistant and pH-sensitive GFP-like protein, enables the visualization of autophagy.

学会名: 第 62 回日本細胞生物学会大会

開催日: 平成 22 年 5 月 19-21 日

開催地: グランキューブ大阪

[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

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20110826/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 博幸 (KATAYAMA HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技

術開発チーム・研究員
研究者番号：00415126

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし