

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390224

研究課題名(和文) 遺伝性パーキンソン病における共通分子基盤の解明

研究課題名(英文) Autophagy lysosomal dysfunction associate with the pathogenesis of early onset Parkinson's disease.

研究代表者

服部 信孝 (Hattori, Nobutaka)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80218510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の約10%に遺伝性のもが存在し、そのなかに常染色体劣性遺伝型を呈する若年発症パーキンソン病がある。その原因遺伝子としてPINK1、Parkin、ATP13A2がある。細胞やモデル動物を用いてそれら遺伝子産物の機能解析をおこなったところ、タンパク質分解システムに關与する因子が多いことが判明した。遺伝子変異による分解システムの破綻と、その結果生じた異常なミトコンドリアやタンパク質の蓄積が早期発症の要因であると推測された。

研究成果の概要(英文)：In general, the pathology of Parkinson disease(PD) has been implicated in oxidative damage and mitochondrial dysfunction, which are probably induced by both genetic predisposition and environmental factors. Recent discovery of genes associated with the etiology of familial PD has emphasized the role of autophagy lysosomal system. PINK1, Parkin and ATP13A2 have been identified as the causal genes responsible for hereditary early onset PD. Mechanistic insights into mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin have been revealed. In the process of mitochondria degradation (mitophagy), PINK1 dependent phosphorylation of Parkin is essential for accelerating E3 ligase activity of Parkin. On the other hands, ATP13A2 localizes in lysosome and regulates enzyme activity including cathepsin D. Autophagy lysosomal dysfunction may be the common pathogenesis of early onset PD.

研究分野：神経学

キーワード：遺伝性パーキンソン病 タンパク質分解 ミトコンドリア オートファジー リソソーム PINK1 Parkin ATP13A2

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患で黒質ドーパミン神経細胞が変性することにより動作が遅くなる、手足がふるえる等の運動障害が主な症状である。パーキンソン病の多くは孤発性であるが、その約 10%は遺伝性であり、これまでにいくつかの原因遺伝子が単離されパーキンソン病の病態解明に大きく貢献してきた。Parkin 遺伝子の変異を持つ患者の頻度は家族性パーキンソン病のなかでも最も多くの割合を占め、PINK1 の遺伝子変異を持つ患者も比較的多いことがわかってきた。これらの疾患群は若年発症であることや L-ドーパが有効であることなどの理由から非常に類似した疾患である。さらには、ショウジョウバエを用いた遺伝学的な研究から両分子は同じカスケード上で働いていることが判明した。このような臨床ならびに基礎研究からの知見により、両タンパク質の作用機序は近いものであることが推測されていた。一方、Kufor-Rakeb syndrome (KRS) は若年発症パーキンソニスムに認知症、錐体外路症状、ミオクローヌスを合併する常染色体劣性の原因不明の疾患群として知られていたが、2006 年に *ATP13A2* (PARK9) が原因遺伝子として同定された。*ATP13A2* はリソソームに局在する P-type ATPase であるが、その機能については不明な点が多い。本邦にも新規変異を有する家系が存在し、その変異を含めた機能解析から *ATP13A2* 変異体はリソソームの機能障害を引き起こすことが判明してきた。若年発症遺伝性パーキンソン病の病態の一端が明らかになるにつれオートファジーリソソーム系の障害が浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

パーキンソン病は遺伝的素因と環境要因が複雑に絡み合って発症すると推測されている。本研究課題の最終目的は孤発性パーキンソン病の病態解明と、病態を基盤とした治療

法の開発にある。一方で、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子が孤発性パーキンソン病のリスクに関与することに着目し、遺伝性パーキンソン病と孤発性パーキンソン病には共通の病態が存在するとの仮説のもと、遺伝子異常のスクリーニングと原因遺伝子産物の解析から共通分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

順天堂大学ゲノムバンクに登録されている日本人優性遺伝性 PD 300 家系、孤発性 PD 433 名、非血縁健常者 579 名に対して同遺伝子の変異の検索を行う。新規変異が同定された場合はショウジョウバエ、メダカ、マウスなどの動物種において病的変異を有するモデル動物を作製し、その原因遺伝子産物の機能を明らかにする。

4. 研究成果

ATP13A2 遺伝子変異と機能解析

遺伝子同定当時、このタンパク質はリソソームに局在すること、すべての臓器にわたり広範囲に発現する一方で、特に中脳に強く発現することがわかっているものの、その機能についてはほとんどが謎であった。しかしながら研究の進展に伴いその機能が明らかになりつつある。我々の解析によると遺伝子の変異によって 2 種類の局在を呈することがわかってきた。すなわち変異の導入により ER に留まるタイプと、変異を加えてもリソソームに局在するタイプからなる。本邦での F182L の変異体は ER に留まるタイプの変異であった。常染色体劣性の遺伝形式を呈することから病態としては Loss of function が推測されるがまさに本来の働き場所であるリソソームに局在できないことにより本来の機能が果たせないことが推測される。一方の変異群に関しては変異の導入によって本来有する機能不全を引き起こすことが考えられる。また、免疫電顕によって野生型の局在を確認したがリソソームに局在するタンパク質で

あることは間違いなさそうである。解析の一端として恒常的に ATP13A2 を欠損した安定細胞株を採取し解析を行ったところ神経系の細胞では細胞死を引き起こすものの、肝臓系の細胞では細胞死が認められなかった。このことは ATP13A2 が神経において重要な機能を有していることを示唆している。さらにノックダウン細胞においてリソソームの局在を確認するためにリソソームマーカーである Lamp1 と内在性の分解酵素であるカテプシン D で二重染色したところ、コントロールに比べ不正な形態の vesicle が核周囲に集積していた。さらにリソソームの特徴を明確にするために電顕による観察を行ったところ、オートファゴソーム様のリソソームとフィンガープリント構造を有する凝集体の集積を認めた。フィンガープリント構造についてはカテプシン D 欠損マウスでの報告があり、同様にカテプシン D の活性を測定したところノックダウン細胞では有意に活性の低下を認めた。

ATP13A2 ノックダウンメダカの解析と病態

さらに ATP13A2 の機能を明らかにするためメダカを用いて *in vivo* の検討を行った。メダカはヒトの ATP13A2 に相当する唯一の相同遺伝子を有する。TILLING 法により病的変異(exon 13 欠損)を有すノックダウンメダカの獲得に成功した。このノックダウンメダカでは約 20% に ATP13A2 の発現が低下していた。ホモの変異を有するメダカでは 1 年の経過でドーパミン細胞の欠損と finger print 構造が観察された。ATP13A2 については中脳において高度な発現が観察されることから、特にドーパミン細胞において重要な機能を有することが推測された。さらにカテプシン D の活性を測定したところ同様に活性の低下を認めた。ATP13A2 はリソソーム膜に局在する ATPase であることから pH の調整に関与している可能性が高く、実際 pH の上昇を指摘し

ている報告もある。また酵母の実験からはマンガンの代謝に関与することが示唆されている。また、患者由来の線維芽細胞には synuclein が蓄積しており、カテプシン D の活性低下が synuclein の分解に重要であることを示唆している。さらに ATP13A2 の欠損細胞ではミトコンドリアの断片化が観察される。我々の研究結果を総合すると ATP13A2 の欠損はリソソームの機能不全を引き起こし、synuclein や異常なミトコンドリアの蓄積をもたらすものと推測される。

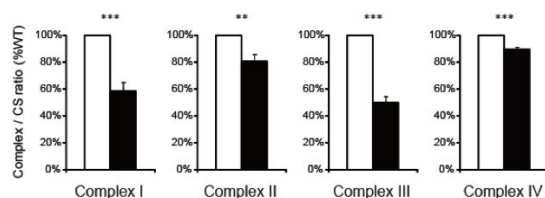
VPS35 遺伝子変異の本邦における頻度

Vacuolar protein sorting 35 (VPS35) は欧米の高齢発症優性遺伝性パーキンソン病家系からエクソーム解析法を用いて単離された常染色体優性遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子である。そこで順天堂大学ゲノムバンクに登録されている日本人優性遺伝性パーキンソン病 300 家系、孤発性パーキンソン病 433 名、非血縁健常者 579 名に対して同遺伝子の変異の検索を行った。その結果、D620N (c.1858G>A) を優性遺伝性 PD 3 家系、孤発性パーキンソン病 1 例からヘテロ接合体で同定した。当該アミノ酸は酵母からヒトまで種を超えて保存されていた。また、健常群ではいずれの変異も認めなかった。VPS35 の D620N 変異の頻度を欧米人パーキンソン病の頻度と比較すると欧米人パーキンソン病では 0.1-0.2% で D620N が陽性である。VPS35 の機能としてはタンパク質の輸送に関与することからリソソームへの輸送障害に伴う二次的なタンパク質分解不全が起きることが予想される。

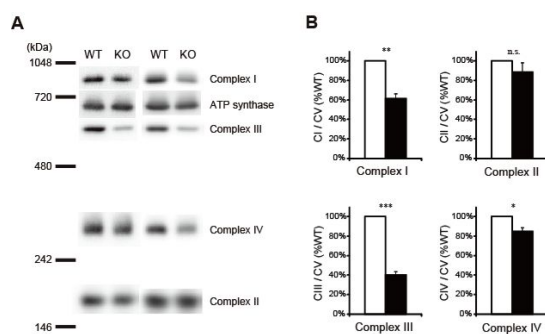
PINK1 のミトコンドリアにおける機能解析

家族性パーキンソン病の中にあって Parkin と PINK1 を原因遺伝子とする若年発症パーキンソン病はミトコンドリア機能異常がその病態の中核をなす疾患として注目されている。PINK1 は損傷ミトコンドリアを認識し除

去(ミトファジー)することにより細胞内環境を健全に保つ機能を有する。その一方で、ミトコンドリアにも局在する PINK1 自身がミトコンドリア機能にいかに関与しているかは未だ不明な点が多い。そこで PINK1 ノックアウト MEF を用いて呼吸鎖や膜電位への影響を以下のように検討したところ PINK1 ノックアウト MEF ではガラクトース培地にて増殖の低下が顕著であった。またミトコンドリアからのプロトンリークや ATP 合成能には変化は認められないものの、基質酸化能は低下していることが判明した。さらにはミトコンドリアの膜電位も 2 次的低下を認めると共に、細胞当たりの ATP は約 80% に低下していた。そこで実際にミトコンドリア呼吸活性を観察したところノックアウト MEF では明らかに活性の低下が認められた(下図 1,2)。



(図 1)ミトコンドリア呼吸鎖を基質代謝によって評価



(図 2) BN-PAGE によるミトコンドリア活性の評価

以上の結果から PINK1 自身の機能が十分でない場合は異常なミトコンドリアが細胞内に蓄積することが推測された。

ミトコンドリア品質管理の分子機構

損傷ミトコンドリアは呼吸鎖の異常をきたし膜電位が低下することが推測される。

Parkin はこの膜電位低下を察知してミトコンドリアに移行する。この際、Parkin が膜上の何を認識し移行するのは興味深い点であるが、PINK1 のミトコンドリア外膜での蓄積は 1 つのシグナルとなる。PINK1 自身はキナーゼ活性をもつが、同時に Parkin をリン酸化することによりミトコンドリアへと誘導し活性化する。活性化 Parkin はユビキチンリガーゼ活性を発揮し、ミトコンドリア膜上の基質をユビキチン化する。このユビキチン化が契機となりオートファジーが誘導され、損傷ミトコンドリアの分解が行われる。このように健全な細胞内では異常なミトコンドリアの分解機構(品質管理)が備わっているが、PINK1 や Parkin の病的変異による機能障害はミトコンドリア品質管理の破綻をきたす。その結果、損傷ミトコンドリアが蓄積し細胞死を引き起こすと推測される。

パーキンソン病の新規原因遺伝子の同定

遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子として CHCHD2 遺伝子変異(T61I, R145Q)を本邦の常染色体優性遺伝形式を呈する 4 家系から同定した。151 アミノ酸からなる CHCHD2 は N 末にミトコンドリア移行シグナル、C 末に coiled-coil 構造を有する。細胞に一過性にタグ付き CHCHD2 を発現させて細胞分画ならびに免疫染色を行ったところミトコンドリアへの局在を観察した。その詳細な機能は未だ不明であるが、今回、ミトコンドリアに関連した因子が見出されたことは遺伝性パーキンソン病の病態にミトコンドリア障害の関与を強く示唆するものである。

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 14 件)

1.Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohny RP, Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. J Neurol

- Neurosurg Psychiatry. pii:jnnp-2014-309676. 2015, doi:10.1136/jnnp-2014-309676 (査読有)
2. Matsuo H, Tomiyama H, Satake W, Chiba T, Onoue H, Kawamura Y, Nakayama A, Shimizu S, Sakiyama M, Funayama M, Nishioka K, Shimizu T, Kaida K, Kamakura K, Toda T, Hattori N, Shinomiya N. ABCG3 variant has opposing effects on onset ages of Parkinson's disease and gout. *Ann Clin Transl Neurol.* 2:302-6. 2015, doi: 10.1002/acn3.167 (査読有)
 3. Nishioka K, Oyama G, Yoshino H, Li Y, Matsushima T, Takeuchi C, Mochizuki Y, Mori-Yoshimura M, Murata M, Yamasita C, Nakamura N, Konishi Y, Ohi K, Ichikawa K, Terada T, Obi T, Funayama M, Saiki S, Hattori N. High frequency of beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) among patients with intellectual disability and young-onset parkinsonism. *Neurobiol Aging.* pii:S0197-4580(15) 00054-8, 2015, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.020. (査読有)
 4. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol.* 14:274-82, 2015, doi: 10.1016/S1474-4422(14)70266-2. (査読有)
 5. Kubo S, Hatano T, Hattori N. Lipid rafts involvement in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 20:263-79, 2015 (査読無)
 6. Asano T, Koike M, Sakata S, Takeda Y, Nakagawa T, Hatano T, Ohashi S, Funayama M, Yoshimi K, Asanuma M, Toyokuni S, Mochizuki H, Uchiyama Y, Hattori N, Iwai K. Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. *Neurosci Lett.* 588:29-35, 2015, doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.052. (査読有)
 7. Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y. PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 10:e1004391. 2014, doi: 10.1371/journal.pgen.1004391. (査読有)
 8. Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y. Lysine 63-linked Polyubiquitination Is Dispensable for Parkin-mediated Mitophagy. *J Biol Chem.* 289:33131-6. 2014, doi: 10.1074/jbc.C114.580944. (査読有)
 9. Maraschi A, Ciammola A, Folci A, Sassone F, Ronzitti G, Cappelletti G, Silani V, Sato S, Hattori N, Mazzanti M, Chierregatti E, Mulle C, Passafaro M, Sassone J. Parkin regulates kainate receptors by interacting with the GluK2 subunit. *Nat Commun.* 5:5182. 2014, doi: 10.1038/ncomms6182. (査読有)
 10. Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, Hattori N. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. *Neurosci Lett.* 580:37-40, 2014, doi: 10.1016/j.neulet.2014.07.045. (査読有)
 11. Hatano T, Funayama M, Kubo S, Mata IF, Oji Y, Mori A, Zabetian CP, Waldherr SM, Yoshino H, Oyama G, Shimo Y, Fujimoto K, Oshima H, Kunii Y, Yabe H, Mizuno Y, Hattori N. Identification of a Japanese family with LRRK2 p.R1441G-related Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 35:2656.e17-23, 2014 doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.025. (査読有)
 12. Hattori N, Saiki S, Imai Y. Regulation by mitophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 53:147-50. 2014 (査読有)
 13. Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy.* 10:631-41. 2014, doi: 10.4161/auto.27785 (査読有)
 14. Li Y, Sekine T, Funayama M, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N. Clinicogenetic study of GBA mutations in patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2014 35:935.e3-8. 2014, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.019. (査読有)
- [学会発表](計7件)
1. 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 西岡健弥, 富山弘幸, 服部信孝. 家族性パーキンソン病におけるGBA遺伝子変異解析、第8回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2014年10月2-4日、京都ホテルオークラ、京都
 2. 森聡生, 王子悠, 奥住文美, 波田野琢, 久保紳一郎, 服部信孝. PLA2G6における

- 細胞内局在の変化および病態の検討、第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2014 年 10 月 2-4 日、京都ホテルオークラ、京都
3. 王子 悠, 森 聡生, 波田野 琢, 久保 紳一郎, 服部 信孝. 変異型グルコシルセラミダーゼの酵素活性への影響と細胞内局在の検討、第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2014 年 10 月 2-4 日、京都ホテルオークラ、京都
 4. 佐藤 栄人, 服部 信孝. パーキンソン病の発症メカニズムと相互関連 遺伝性パーキンソン病とミトコンドリア品質管理の破綻 これまでの展開と今後の課題、第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2014 年 10 月 2-4 日、京都ホテルオークラ、京都
 5. 服部信孝. パーキンソン病発症の分子機序 プロテオミクス研究、第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2014 年 10 月 2-4 日、京都ホテルオークラ、京都
 6. 佐藤栄人、小池正人、船山学、金井数明、新井公人、内山安男、服部信孝.(口演) 遺伝子パーキンソン病 PARK9(ATP13A2)の分子機構とリソソームの障害、第 55 回日本神経学会、2014 年 5 月 21 日~24 日、福岡国際会議場他、福岡市
 7. 江口博人、今泉美佳、塚口ケネス、船山学、西岡健弥、波田野琢、斉木臣二、佐藤栄人、久保紳一郎、今居謙、永松信哉、服部信孝. Parkin ノックアウトマウスにおける細胞骨格蛋白異常による機能障害、第 55 回日本神経学会、2014 年 5 月 21 日~24 日、福岡国際会議場他、福岡市

〔図書〕(計 5 件)

1. 佐藤 栄人, 服部 信孝. 【脳内環境-維持機構と破綻がもたらす疾患研究】(第 1 章) 神経細胞内病態と脳内環境 パーキンソン病における封入体形成のメカニズムと細胞死の関連性について、遺伝子医学 MOOK 26:32-36, 2014
2. 富山弘幸, 服部信孝. 12 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 (PARK8) 変性疾患、錐体外路系疾患・パーキンソニズムを主とする疾患、家族性パーキンソン病 優性遺伝性パーキンソン症候群、別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.27、神経症候群(第 2 版)() - その他の神経疾患を含めて -、pp77-81、2014 年 3 月 20 日、日本臨床社、大阪
3. 西岡健弥, 服部信孝. 6 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 (PARK2) 変性疾患、錐体外路系疾患・パーキンソニズムを主とする疾患、家族性パーキンソン病 優性遺伝性パーキンソン症候群、別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.27、神経症候群(第 2 版)() - その他の神経疾患を含めて -、pp88-92、2014 年 3 月 20 日、日本臨床社、大阪

4. 波田野琢, 服部信孝. 1 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 (PARK6, PARK7, PARK9(Kufor-Rakeb 症候群), PARK10, PARK16) 変性疾患、錐体外路系疾患・パーキンソニズムを主とする疾患、家族性パーキンソン病 優性遺伝性パーキンソン症候群、別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.27、神経症候群(第 2 版)() - その他の神経疾患を含めて -、pp93-98、2014 年 3 月 21 日、日本臨床社、大阪
5. 船山 学, 安藤真矢, 服部信孝. 16 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 (PARK17)、変性疾患、錐体外路系疾患・パーキンソニズムを主とする疾患、家族性パーキンソン病 優性遺伝性パーキンソン症候群、別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.27、神経症候群(第 2 版)() - その他の神経疾患を含めて -、pp82-85、2014 年 3 月 20 日、日本臨床社、大阪

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 信孝 (Hattori, Nobutaka)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 8 0 2 1 8 5 1 0

(2) 研究分担者

佐藤 栄人 (Sato, Shigeto)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 0 0 4 4 5 5 3 7

(3) 連携研究者

()

研究者番号: