

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 26 日現在

機関番号：86102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461304

研究課題名(和文) 家族性パーキンソン病におけるmiRNAプロファイル解析と特異的miRNAの探索

研究課題名(英文) Search of miRNA profile analysis and specific miRNA in familial Parkinson's disease

研究代表者

黒田 由紀子 (Yukiko, Kurota)

独立行政法人国立病院機構徳島病院(臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：70398014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：私達はパーキンの機能を研究する中で、パーキンをミトコンドリアへ運搬する未知の蛋白(Klokin1)を同定した。パーキンはミトコンドリア遺伝子のbiogenesisを促進することを見出した。本研究は、パーキンがmiRNAを介してミトコンドリアならびに核遺伝子の転写・複製に関与し得るか否かを検討した。私達はパーキンとDrosha複合体との関連を免疫沈降法で検討した結果、ミトコンドリア分画においてもDrosha蛋白が検出された。またパーキンに結合したDroshaが核およびミトコンドリア分画で検出された。この結果は、ミトコンドリアにおいてもmiRNAプロセッシングが起こっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We are in the course of study the parkin function, to identify the unknown protein that carries Parkin to mitochondria (Klokin1). Parkin has been found to promote the biogenesis of mitochondrial genes. This study, parkin was examined whether may be involved in transcription and replication of mitochondrial and nuclear genes through the miRNA. We result of study of the association between Parkin and Drosha complexes by immunoprecipitation, Drosha protein was also detected in the mitochondrial fraction. Further Drosha bound to Parkin was detected in the nuclear and mitochondrial fractions. This result could have occurred miRNA processing is also in the mitochondria has been suggested.

研究分野：分子細胞学

キーワード：パーキンソン病 miRNA

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ものの、その原因や機序は依然として不明である。一方、近年、家族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。近年は、パーキンがミトコンドリアのオートファジー(ミトファジー)に中心的な働きをすることで、ミトコンドリアの品質管理をになっていることが注目されている。私達は、他施設に先駆けてパーキン蛋白がミトコンドリアと密接な関係にあることを見出した。すなわちパーキンは、増殖期の細胞ではミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア遺伝子の転写因子であるTFAMと協調しておよび神経細胞においてアポトーシスを抑制することミトコンドリアのbiogenesisを促進することを報告した。

私達は、パーキンのミトコンドリア局在に関し、ミトコンドリアへの移行シグナルを持たないパーキンに結合し、ミトコンドリアに運搬する新規蛋白を発見し、これをKlokin 1命名した。Klokin 1はChondroitin Polymerizing Factor (ChPF)の変異体であり、ChPFはもう一つの変異体であるChPF996とともにパーキンを糖化する作用があることが明らかになった。また、Klokin 1/ChPFファミリーはパーキンと同様に抗アポトーシス作用を有していた。さらに、私達は、Klokin 1/ChPFファミリーはパーキンの機能を代償しうること、およびパーキンと同様に抗アポトーシス作用を有するが、その作用はパーキン非依存性であることを報告した。

近年、パーキンは代表的な癌抑制遺伝子であるp53と相互作用を持つことが注目されている。具体的にはp53とパーキンはそれぞれの遺伝子のプロモーター領域に結合することで、お互いの転写・発現を調

節していることが報告されている。またp53は増殖抑制作用を有する数種類のmiRNAの転写後成熟のプロセッシングを促進することが知られている。さらに、p53はミトコンドリアの呼吸機能を制御することも報告されている。さらに、パーキンソン病とmiRNAに関しては、孤発性パーキンソン病の脳ではmiR34b/cの発現が低下し、パーキンとDJ-1の発現が低下していることが報告されている。このことはmiRNAの発現が孤発性ならびに家族性パーキンソン病の病態に関与しうることを示唆するものであり、私達の研究が家族性のみならず孤発性パーキンソン病の病態の解明につながることで強く期待される。

2. 研究の目的

以上の知見をふまえて、私達はパーキンが、miRNAを介してミトコンドリアおよび核の増殖を制御するという仮説を立てた。この仮説は、私達の研究をさらに発展させるものであり、パーキンの発現が細胞の増殖状態により変化すること、ならびにパーキンがミトコンドリアの転写・複製を促進することなどの分子メカニズムを解明することに繋がるものである。本研究では、パーキンがmiRNAを介してミトコンドリアならびに核遺伝子の転写・複製に関与し得るか否かを明らかにすることを第一の目的とし、そのmiRNAの探索を通して、細胞周期、ミトコンドリアのbiogenesis、およびcarcinogenesisに関与するmiRNAを同定することを計画した。

3. 研究の方法

パーキンとDrosha複合体との関連を免疫沈降法で検討した。方法は、培養神経細胞SH-SY5Yを核・ミトコンドリア分画に分離し、おのおのを可溶化したのち、抗パーキン抗体(PRK8)を用いて免疫沈降を行った。

4. 研究成果

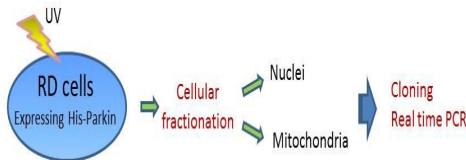
ミトコンドリア分画においてもDrosha蛋白が検出された。さらに、パーキンに結合したDroshaが核分画およびミトコンドリア分画で検出された。この結果は、ミトコンドリアにおいてもpri-miRNAが存在し、Droshaの関与したmiRNAプロセッシングが起こっている可能性を示唆している。さらに、パーキン

は Drosha 複合体に結合し、核のみならずミトコンドリアにおいても、そのプロセッシングを担っている可能性が示唆された。さらに内因性 Drosha の発現を抗 Drosha 抗体を用いて細胞内局在を検討した。

Materials and methods

Identification of Parkin-associated miRNA

Using RD cells that stably expressing His-Parkin, UV cross-linking and immunoprecipitation (CLIP) were carried out. We cloned miRNA which bound to His-Parkin in nuclear and mitochondrial fraction. Furthermore, the expression was assayed using real-time PCR in obtained miRNA and pri-miRNA.



Association of Parkin with Drosha

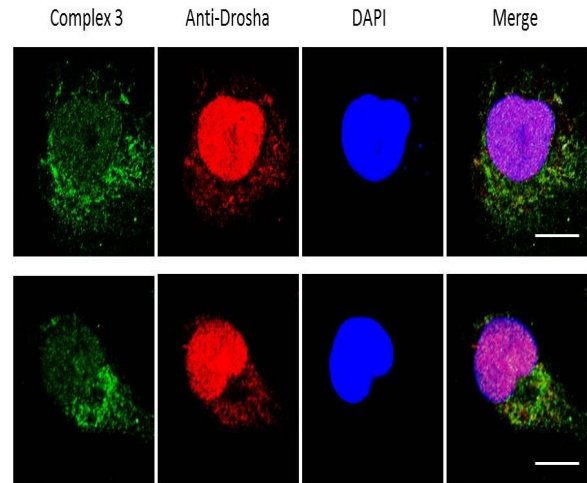
A neuroblastoma cell line SH-SY5Y was separated to nuclei and mitochondria. After solubilization, it was coimmunoprecipitated using anti-Parkin antibody (PRK8) and anti-Drosha antibody.

Intracellular expression of Drosha

Endogenous association of Parkin with Drosha



Intracellular localization of endogenous Drosha



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7件)

1. Kawamura K, Arie Y, Inui T, Mitsui T. Adductor laryngeal exhaling dystonia in progressive supranuclear palsy. *Neurology* (査読有) 2015; 84(5):545.

2. Kawarai T, Tajima A, Kuroda Y, Saji N, Orlacchio A, Terasawa H, Shimizu H, Kita Y, Izumi Y, Mitsui T, Imoto I, Kaji R. A homozygous mutation of VWA3B causes cerebellar ataxia with intellectual disability. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (査読有) 2015 Jul 8. pii: jnnp-2014-309828

3. Kawamura K, Kuroda Y, Sogo M, Fujimoto M, Inui T, Mitsui T. Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. (査読有) 2014; 452(1):181-5.

4. Arie Y, Sawada Y, Kawamura K, Miyake S, Taichi Y, Izumi Y, Kuroda Y, Inui T, Kaji R, Mitsui T. Immediate effect of spinal magnetic stimulation on camptocormia in Parkinson's

disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. (査読有) 2014 85(11):1221-6.

5. Fujimoto M, Kuroda Y, Sogo M, Mitsui T. Luciferase assay technology and the application. J Tokushima Natl Hosp (査読有) 5: 59-61, 2014.

6. Kuroda Y, Fujimoto M, Sogo M, Kawamura K, Mitsui T. Mutation in the gene analysis of parkin and Klok1 in Tokushima National Hospital. J Tokushima Natl Hosp (査読有) 5: 42-45, 2014.

7. Sogo M, Kuroda Y, Fujimoto M, Mitsui T. Recombinant protein purification technology and its usefulness. J Tokushima Natl Hosp (査読有) 5: 24-26, 2014.

[学会発表](計 2 件)

牧 由紀子 Regulation of Parkin/ChPF expression 第 57 回日本神経学会総会 平成 28 年 5 月 21 日 日本・神戸

牧 由紀子 Effect of ChPF on transcription on parkin gene 第 56 回日本神経学会総会 平成 27 年 5 月 22 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

独立行政法人国立病院機構・
徳島病院・臨床研究部・研究員
牧(黒田)由紀子(MAKI YUKIKO)
研究者番号: 70398014

(2) 研究分担者

独立行政法人国立病院機構・
徳島病院・臨床研究部・臨床研
究部長
三ツ井貴夫(MITSUI TAKAO)

研究者番号: 80294726

(3) 連携研究者

徳島大学大学院・臨床神経科
学・教授

梶 龍兒(KAJI RYUJI)

研究者番号: 00214304

(4) 研究協力者

高橋良輔(TAKAHASHI RYOSUKE)

澤田 知世(SAWADA TOMOYO)

藤本 美希(FUJIMOTO MIKI)

十河 正子(SOGO MASAKO)