

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670374

研究課題名(和文)ミトコンドリア品質管理に関連した分泌型microRNAの探索と機能解析

研究課題名(英文) Search and functional analysis of secreted microRNA associated with mitochondrial quality control

研究代表者

三ツ井 貴夫 (Mitsui, Takao)

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・その他

研究者番号：80294726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はパーキン蛋白がミトコンドリア遺伝子の転写を促進することを報告した。我々はパーキンがミトコンドリアに関連したmiRNAのプロセッシングに関与しているとの仮説を立てた。本研究では我々はパーキンのmiRNAプロセッシングにおける役割を検討した。我々は、細胞の核およびミトコンドリア分画において、パーキンがDrosha蛋白と結合していることを見出した。この結果は核およびミトコンドリアにおいてDrosha複合体の関与したmiRNAプロセッシングにパーキンが関与していることを示唆する。我々はパーキンが両分画において、miR132およびpre-miR132と結合していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the Parkin protein to promote transcription of mitochondrial genes. We hypothesized that Parkin is involved in the processing of miRNA associated with the mitochondria. In the present study, we investigated the role of Parkin in miRNA processing. We found that parkin is bonded to Drosha protein in the nuclear and mitochondrial fractions of cultured cells. This result suggests that Parkin to the involved miRNA processing via the Drosha complex in the nuclei and mitochondria. We have found that Parkin is bonded to miR132 and pre-miR132 in both fractions.

研究分野：免疫細胞学 神経内科学

キーワード：パーキン miRNA

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、ある種のストレスを受けた際には、オートファジー機構により分解されることで品質管理をうけている。近年、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。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、ユビキチン・プロテオソーム系タンパク分解システムにおいてはユビキチン・リガーゼ(E3)として作用することが知られている。

一方、我々はパーキン蛋白がミトコンドリアに存在し、E3活性とは無関係にミトコンドリア遺伝子の転写・機能を促進することを報告した(Hum Mol Genet 15: 883-895, 2006)。また我々は、パーキンの一部は新規ミトコンドリア蛋白であるKlokin 1によりミトコンドリアに運搬されることを報告した(Hum Mol Genet. 21: 991-1003, 2012)。また、パーキンは癌抑制遺伝子であるp53遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を調節していること、その作用はパーキンのE3とは無関係であること、p53は増殖抑制作用を有する特定のmicroRNAの成熟過程を促進することが報告されている(Nature. 2009, 460, 529-533)。microRNAは細胞内に存在する18-25塩基長のnon-coding RNA(ncRNA)であり、細胞内の遺伝子サイレンシング機能を有している。分泌型microRNAはエキソソームに封入されたmicroRNAが細胞外に放出されたもので、生体内では体液中を循環する。以上の知見をうけて我々はパーキンがミトコンドリアに関連したmicroRNAのプロセッシングに関与しているとの仮説を立て、研究を行っている。本研究はミトファジーやアポトーシスの際におこる分子メカニズムを、分泌型microRNAに焦点をあてこれを明らかにする。

2. 研究の目的

オートファジーは有害ストレスに対しておこる細胞の防御反応である。近年、ミトコンドリアのオートファジー(ミトファジー)において

はパーキンが中心な働きをすることで、ミトコンドリアの品質管理が行われていることが注目されている。我々は従来からパーキンとミトコンドリアの関連に関する研究を行っており、パーキンがアポトーシス機能を有することや、最近にはパーキンがミトコンドリアにおいてmicroRNAと結合していることを見出した。これらの知見をうけて、本研究ではミトファジーやアポトーシスの際におこる分子メカニズムを、microRNAに焦点をあて、細胞傷害性のストレス環境、とくにミトファジーやアポトーシスの際におこる細胞内microRNAおよび分泌型microRNAの反応性変化ならびに細胞内カスケードに対する影響を探索する。さらに、ミトファジーについてはパーキンの関与がmicroRNAにどのような影響を与えているのかについて検討する。

3. 研究の方法

本研究では、ミトファジーやアポトーシスの際にmicroRNAの細胞内分布がどのように変化するのか、さらに分泌型microRNAが変化するか否かをmicroRNAアレイを用いて検討する。材料としては神経系培養細胞であるSH-SY5Yを用い、ミトファジーはCCCP処理により、アポトーシスに関してはロテノンならびにH₂O₂を使用して誘導する。さらに、分泌型microRNAに関してはクロニングによりそれを同定する。またミトファジーに関しては、パーキンの存在がそれらにどのような影響を与えているのか否かを、パーキンKOマウスMEF、PARK2患者皮膚fibroblast細胞を用いて、野生型との比較の中で明らかにする。さらに孤発性パーキンソン病、PARK2を含む家族性パーキンソン病患者の血漿や脳脊髄液において同様のmicroRNAが病態と関与しているか否かをmicroRNAアレイおよびRT-PCRを用い、健康者と比較することで検討する。

4. 研究成果

ミトコンドリアおよび核分画においてパーキンに結合しているmiRNAのクロニングをCLIP法により探索した。細胞をUV-クロソリンク処理したのち、可溶化したそれぞれの分画に抗パーキン抗体(PRK8)で免疫沈降を行い、沈降物よりmiRNAを抽出し、クロニングを行った。その結果、ミトコンドリア

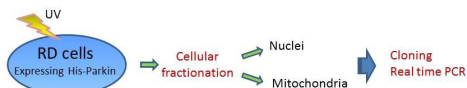
および核分画においてそれぞれ5種類と6種類のmiRNAを同定した。その中で、恒常的にパーキンと結合していたmiRNAはmiR-132, miR-638およびmiR-26a-2の3種類であった。さらにパーキン抗体の沈降産物からreal-time PCR解析を行ったところ、最も発現が強いものはmiR-132であった。さらに、この沈降産物からpre-miR-132が核およびミトコンドリア分画

の両者から検出された。以上の成績は、パーキンが核のみならずミトコンドリアにおいてもmiRNAのprocessing/generationに関与している可能性を示唆するものであった。

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.

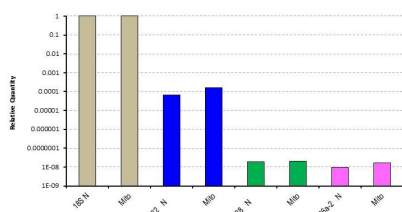


Association of Parkin with Drosha

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.

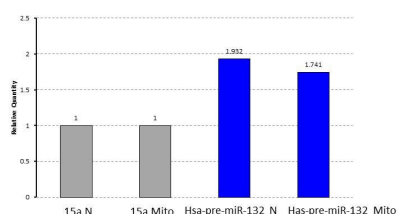
Intracellular expression of Drosha

Real time PCR of miRNA associated with Parkin



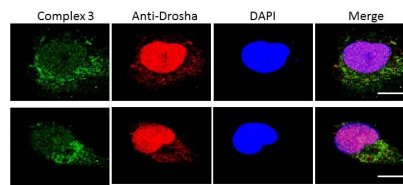
Legend	Target	Sample	Rel. Qty.	SD+	SD-
1	15a	1 RDStable N	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
1	15a	2 RDStable Mito	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
2	hsa-miR-132	1 RDStable N	6.39E-05	4.59E-05	4.59E-05
2	hsa-miR-132	2 RDStable Mito	1.85E-04	1.65E-04	1.65E-04
3	hsa-miR-638	1 RDStable N	1.89E-06	1.99E-06	1.99E-06
3	hsa-miR-638	2 RDStable Mito	2.99E-06	2.99E-06	2.99E-06
4	hsa-miR-26a-2	1 RDStable N	9.81E-09	9.81E-09	9.81E-09
4	hsa-miR-26a-2	2 RDStable Mito	1.68E-08	1.68E-08	1.68E-08

Real time PCR of pre-miRNA associated with Parkin

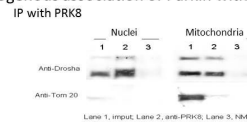


Legend	Target	Sample	Rel. Qty.	SD+	SD-
1	15a	1 RDStable N	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
1	15a	2 RDStable Mito	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
2	hsa-pre-miR-132	1 RDStable N	1.93E+00	1.93E+00	1.93E+00
2	hsa-pre-miR-132	2 RDStable Mito	1.74E+00	1.74E+00	1.74E+00

Intracellular localization of endogenous Drosha



Endogenous association of Parkin with Drosha



Results

The Drosha protein was detected in not only the nuclear fraction but also the mitochondrial fraction. Furthermore, Drosha which bound to Parkin was detected in both fraction.

We identified miR132, miR638, miR26a-2 by cloning of miRNA. In Particular, miR132 and pri-miR132 were detected in mitochondria and nuclei.

Conclusions

The generation and processing of miRNA might occur in the mitochondria

Parkin seems to be involved in the processing of miR132 in the mitochondria and nuclei.

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, Ariei 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. Arii 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 Kloklin 1 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1件)

三ツ井 貴夫 Parkin is involved in miR132 processing
第57回日本神経学会総会 平成28年5月21日 日本・神戸

[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・臨床研究部長

三ツ井貴夫(MITSUI TAKAO)

研究者番号：80294726

(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・研究員
牧(黒田)由紀子(MAKI YUKIKO)
研究者番号：70398014

独立行政法人国立病院機構・
東京都病院・臨床研究部・臨床研究部長
川村和之(KAWAMURA KAZUYUKI)
研究者番号：10450959

(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)
藤本 美希(FUJIMOTO MIKI)
十河 正子(SOGO MASAKO)