

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19037

研究課題名(和文)リン酸化ユビキチンとミトコンドリア機能障害に着目したパーキンソン病発症機構の解析

研究課題名(英文) Phosphorylated ubiquitin is critical for mitochondrial quality assurance to inhibit onset of Parkinson's disease.

研究代表者

小谷野 史香 (KOYANO, Fumika)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：50747681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 作製済の高感度抗リン酸化ユビキチン抗体で免疫染色を行った。健常脳と比較してパーキンソン病患者脳では複数の部位において有意にリン酸化ユビキチンが蓄積しているかどうかについて、解析を進行中である。  
(2) 行動解析および病理学的解析を通じて、ヒトパーキンソン病様の症状を呈するかどうか検討するために、POLGA遺伝子に変異をもつmutator/PARKINノックアウトマウスを作出した。年齢依存的に運動協調機能の低下とドパミンニューロンの脱落が生じるかどうかRota-rod 試験と免疫染色法で調査している。

研究成果の概要(英文)：(1) We have examined phosphorylated ubiquitin staining using sporadic autopsy Parkinson's disease (PD) patients' brains to assess the possibility of phosphorylated ubiquitin as a biomarker. If mitochondrial quality was low in sporadic PD patients' brains, phosphorylated ubiquitin would accumulate at mitochondria. Small amount of phosphorylated ubiquitin signal was detected in healthy midbrain with increasing age. However, in PD midbrain, several types of phosphorylated ubiquitin signals were observed in a broad area and the amount of signal was larger than that of healthy control. This strategy may be a useful diagnostic approach for impaired mitochondria-derived phosphorylated ubiquitin accumulation.  
(2) POLGA-mutated PARKIN knockout mice are subjected to behavioral and pathological analysis to assess PD-like phenotype. We are now evaluating whether each mouse group shows decline in motor coordination function and the number of dopaminergic neuron with age.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア リン酸化ユビキチン パーキンソン病



症度を分類したうえで、コントロール群と比較して、リン酸化ユビキチンのシグナルに有意な差が見られるかどうか調べる。

(2) 唯一のミトコンドリア DNA ポリメラーゼである *POLGA* 遺伝子に変異をもつ *mutator/PARKIN* ノックアウトマウスを作出して、行動解析および病理学的解析を通して、ヒトパーキンソン病様の症状を呈するかどうか検討する。

運動機能（協調・バランス）および運動調節機能（運動緩徐）を評価するために、Rota-rod test と pole-test を経時的に行う。心臓、肺、肝臓、脾臓の各臓器重量を測定し、組織標本作製して病理学的解析を行う。さらに、姿勢保持能力や筋固縮、振戦といったヒトパーキンソン病でみられる表現型の観察を並行しておこなうとともに、脳切片を用いて黒質線条体におけるドパミンニューロンの脱落度をコントロール群と比較する。

#### 4. 研究成果

(1) 以前、代表者らのグループは、異常なミトコンドリア上に蓄積した *PINK1* がユビキチンをリン酸化することで *Parkin* を活性化して、細胞から不良なミトコンドリアを選択的に排除する仕組みを明らかにした。リン酸化ユビキチンは、「ミトコンドリアが不良である」ことを意味する重要な細胞内シグナルである。パーキンソン病の発症とミトコンドリア品質の低下が関係することは、以前より示唆されているので、リン酸化ユビキチンは細胞内のミトコンドリア品質の低下を、ひいてはパーキンソン病発症の危険性を示す分子マーカーとなり、パーキンソン病剖検

脳で蓄積している可能性がある。

当研究所脳病理解析室の協力を得ながら、パーキンソン病と診断された剖検脳と健常脳（比較対照群）の切片を用いて、抗リン酸化ユビキチン抗体で免疫染色を行った。最適化した固定法やブロッキング法を行ったうえで、抗リン酸化ユビキチン抗体で染色を行ったところ、パーキンソン病患者脳・脊髄の各部位で、リン酸化ユビキチンの蓄積が認められた。

現在、解析対象となる症例数を増やししながら、診断の際の進行度を示すステージ別に分類して検討している。上記と並行して健常脳と比較して、リン酸化ユビキチンのシグナルに十分な有意な差がみられるかどうか慎重に検証を進めている。今後、パーキンソン病の分子マーカーとしての可能性について、生体サンプルを用いた詳細な解析を実施する必要がある。

(2) Rota-rod test は、マウスやラットのような実験動物の運動機能（協調・バランス）を評価するために開発された試験である。一方で pole-test は、パーキンソン病をはじめとした神経変性疾患のモデルマウスの運動調節機能を評価する系として知られており、pole から下降する時間がかかるほど、黒質線条体経路に障害が現れていることが示唆される。

まず、Rota-rod test および pole-test を開始するにあたり、回転数、時間、試験回数等を最適化した。生後3カ月齢から経時的に計測を進め、解析を行っている。並行して、丸背、姿勢、体重変化、白毛などの加齢の兆候についても観察中である。

マウス脳から回収した細胞抽出液を生化学的な解析に用いるとともに、経時的に脳病理切片を作製して、黒質ドパミンニューロンおよび線条体の神経細胞を免疫染色し、細胞数の自動算出を実施している。mutator/PARKIN KO mice は出産効率が低いので、現在、解析対象個体数を増やしながらか検証を続けている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

### 1. 小谷野史香

A screening mechanism for high-quality mitochondria by phosphorylated ubiquitin  
第89回日本生化学会大会シンポジウム、2016年

### 2. 小谷野史香

不良ミトコンドリアの品質管理を指揮するリン酸化ユビキチン  
Phosphorylated ubiquitin acts as a lighthouse for mitochondrial quality assurance  
第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：パーキンソン病のバイオマーカーおよびその利用  
発明者：松田 憲之

権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2015/053930

出願年月日：2015/2/13

国内外の別：国外

取得状況(計1件)

名称：パーキンソン病のバイオマーカーおよびその利用

発明者：松田 憲之

権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所

種類：特許

番号：特許第5997394号

取得年月日：2016/9/2

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小谷野史香 (KOYANO, Fumika)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：50747681

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし