

令和元年7月2日現在

機関番号：86102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05281

研究課題名(和文)パーキンソン病におけるmiRNA制御異常の解明

研究課題名(英文)Elucidation of miRNA regulation disorder in Parkinson's disease

研究代表者

黒田 由紀子 (KUROTA, YUKIKO)

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(移行)

研究者番号：70398014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：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。パーキン是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(PARK2)である。我々はPARK2の病態解明を進める中で、細胞内ミトコンドリアおよび核分画においてパーキンと結合した数種類のmicroRNAを同定した。その中でmiR-132のプロセッシングにパーキンが関与していることが示唆された。さらにPARK2患者の皮膚生検により得た線維芽細胞(4名)すべてmiR-132、pre-miR-132の発現は健常対照と比較して明らかな低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PARK2患者(4名)の皮膚生検により得た線維芽細胞において、その発現を健常対照と比較した。その結果、4患者すべてでmiR-132、pre-miR-132の発現は健常対照と比較して明らかな低下が認められた。この結果パーキンがmiR-132のprocessing/generationを促進していること、さらにmiR-132の発現抑制がPARK2の病態の進展に関与していることを強く示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, causative genes for familial Parkinson's disease have been discovered one after another, and it has been attempted to elucidate the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease through its analysis. Parkin is the most frequent cause gene for familial Parkinson's disease (PARK2). We have identified several types of microRNAs bound to parkin in the intracellular mitochondrial and nuclear fractions as we proceeded to elucidate the pathogenesis of PARK2. Among them, it was suggested that parkin is involved in the processing of miR-132. Furthermore, the expression of miR-132 and pre-miR-132 in all fibroblasts (4 patients) obtained by skin biopsy of PARK2 patients showed a clear decrease compared to healthy controls.

研究分野：分子生物学

キーワード：パーキンソン病 miRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 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、黒質の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(PARK2)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)を介してミトコンドリアの品質管理を担っていることが注目されている。一方、我々は、それ以前よりパーキン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ミトコンドリアの biogenesis を促進すること(Hum Mol Genet 15: 883-895, 2006)および神経細胞においてアポトーシスを抑制すること(Biochem Biophys Res Commun 348: 787-793, 2006)を報告した。さらに我々は、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 と命名した。Klokin 1 は Chondroitin Polymerizing Factor (ChPF)の変異体であり、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、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(Kuroda Y et al., Parkin interacts with Klokin 1 for mitochondria import and maintenance of membrane potential. Hum Mol Genet. 21: 991-1003, 2012)。

一方、パーキンは癌抑制遺伝子として機能することが報告されている(Nat Genet. 2010;42:77-82; Oncogene. 2008;27:6002-6011)。またパーキンは代表的な癌抑制遺伝子である p53 と密接に関連しており、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(Proc Natl Acad Sci U S A. 2011,108, 16259-64; Nat Cell Biol. 2009, 11,1370-5)。p53 は増殖抑制作用を有する数種類の microRNA (miRNA)の転写後成熟のプロセッシングを促進することが報告されている(Nature. 2009, 460, 529-533)。以上の知見をふまえて、我々はパーキンが、ある種の miRNA と特異的に関連し、ミトコンドリアおよび核において遺伝子の発現を制御するという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

パーキンソン病は、黒質を中心とした神経細胞の変性を特徴とした緩徐進行性疾患であり、種々の治療にもかかわらず病状は徐々に進行する。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(PARK2)である。我々は PARK2 の病態解明を進める中で、細胞内ミトコンドリアおよび核分画においてパーキンと結合した数種類の microRNA を同定した。さらに、予備的検討の結果、この中の miR-132 のプロセッシングにパーキンが関与していることが示唆された。本研究ではパーキンソン病モデル培養細胞において miR-132 制御異常が認められるか否か、およびこの miRNA が治療ターゲットとなり得るか否かに焦点をあてて検討する。

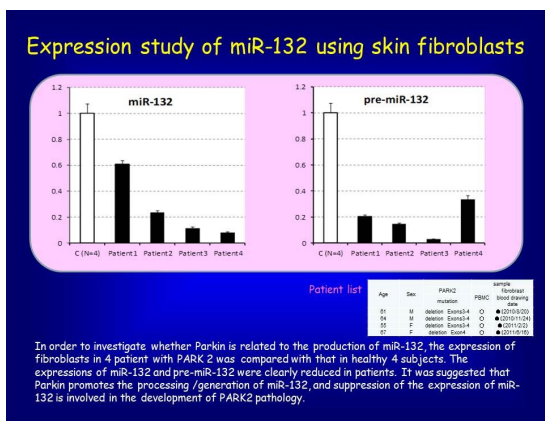
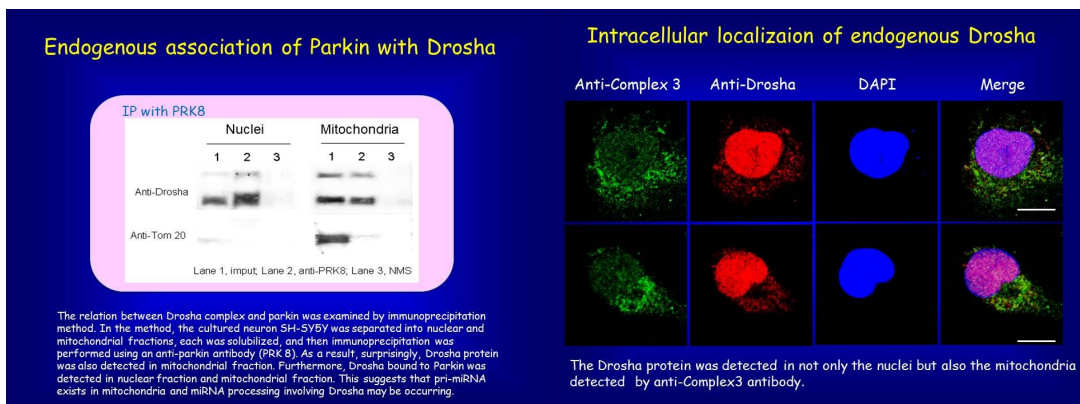
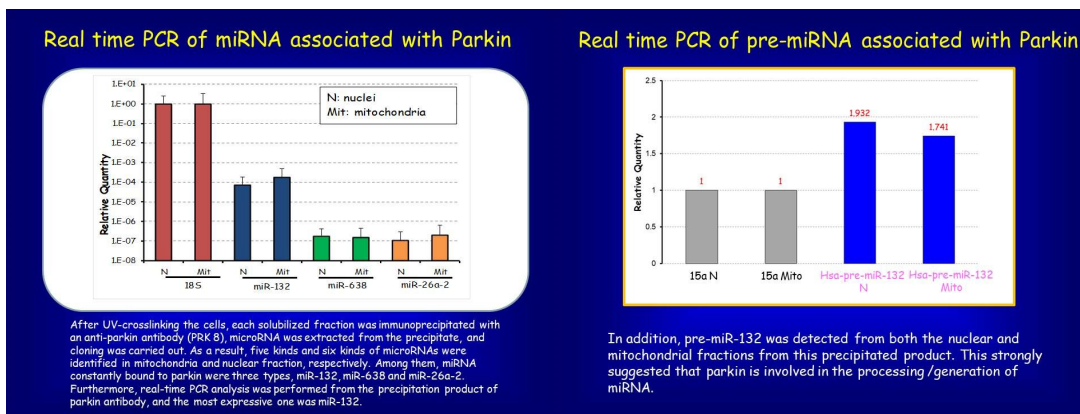
### 3. 研究の方法

本研究は「miR-132 がパーキン蛋白と特異的に機能連関しており、パーキン遺伝子欠損症および孤発性パーキンソン病の治療ターゲットとなりうるか否か」という課題を解明するために計画された。我々は予備的検討結果から、核およびミトコンドリアにおいてパーキンは Drosha と結合していること、もっとも強い関連を示す miRNA は miR-132 であること、パーキン遺伝子欠損症(PARK2)患者皮膚由来の fibroblast では miR-132 の産生が低下していることを見出した。本研究ではこれを受けて、miR-132 がパーキン蛋白と特異的に機能連関していること、miR-132 の産生抑制がドーパミン作動性神経細胞において、核およびミトコンドリア遺伝子の転写に影響があるか否か、および miR-132 の産生抑制が PARK2 の病態を悪化させる因子となっているのか否かを多角的側面から明らかにする。具体的には、我々は Drosha 複合体パーキンとの関連を免疫沈降法で検討するため、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。また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 のクローニングを CLIP 法により探索した。我々はさらに、miR-132 の産生にパーキンと関連しているか否かを検証するため、PARK2 患者(4名)の皮膚生検により得た線維芽細胞(なお、このサンプルは、本研究が徳島病院倫理委員会で承認されたのちに、患者の文書同意を得てから採取されたものである)において、その発現を健常対照と比較した。

### 4. 研究成果

抗パーキン抗体(PRK8)を用いて免疫沈降を行った。その結果、驚くべきことに、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。また

細胞を UV-クロス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、クローニングを行った。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。



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- 1) Y Maki(Kuroda), A Takahashi, R Kaji, T Mitsui Gene analysis of familial Parkinson's disease in Tokushima National Hospital of 2018-2019. J Tokus Natl Hosp. 2019;10:9-12 ( 査読有 )
- 2) Takeuchi T, Harada M, Mitsui T. Choreic movement in striatal infarction: Involvement in cortico-striatonigral disconnection. Neurol Clin Pract. 2018; 8(2):169-170. ( 査読有 )
- 3) Maki(Kuroda) Y, Takahashi A, Nagahama K, Kaji R, Mitsui T. Gene analysis of familial Parkinson's disease in Tokushima National Hospital of 2016-2017. J Tokushima Natl Hosp. 2018; 9:14-17. ( 査読有 )

4) Mitsui T, Yoda K, Harada M. Monochorea in chronic cerebral hypoperfusion with dopaminergic transmission disruption. Acta Neurol Belg. 2018; 10.1007/s13760-018-0921-0. ( 査読有 )

5) Fujimoto M, Nagahama K, Kuroda Y. The experiment procedure for a study assistant: Pitfalls of experimental kits J Tokushima Natl Hosp. 2017; 8:25-28. ( 査読有 )

6) Kawarai T, Tajima A, Kuroda Y, Mitsui T(10 番目) et al.. A homozygous mutation of VWA3B causes cerebellar ataxia with intellectual disability. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016 87:656-662. ( 査読有 )

7) Sakai W, Mitsui T (13 番目). Late-onset myasthenia gravis is predisposed to become generalized in the elderly. eNeurologicalSci. 2016; 2: 17-20. ( 査読有 )

8) Kuroda Y, Fujimoto M, Nagahama K, Kaji R, Mitsui T. Responsible region of Parkin for mitochondrial targeting. J Tokushima Natl Hosp. 2016; 7: 35-38. ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 11 件 )

1) 牧 由紀子 Parkin and O-GlcNAc modification 第 59 回日本神経学会学術大会 2018

2) 牧 由紀子 Kloklin 1 遺伝子の同部位に点変異を認めた 2 症例 第 72 回 国立病院総合医学会 2018

3) 長浜 佳代 牧 由紀子 FRET を用いた核タンパクの糖鎖修飾の解析 第 72 回 国立病院総合医学会 2018

4) 牧 由紀子 Parkin is associated with miRNA processing XX World Congress of Neurology 2017

5) 牧 由紀子 タンパク質の O-GlcNAc 糖鎖修飾の可視化方法の検討 第 71 回国立病院総合医学会 2017

6) 高橋 愛海 牧 由紀子 徳島病院における家族性パーキンソン病患者の遺伝子解析 第 71 回国立病院総合医学会 2017

7) 長浜 佳代 牧 由紀子 研究補助員としての基礎研究に関する実験手技の習得 第 71 回 国立病院総合医学会 2017

8) 牧 由紀子 Regulation of Parkin/ChPF expression 第 57 回日本神経学会学術大会 2016

9) 三ツ井 貴夫 牧 由紀子 Parkin is involved in miR 132 processing 第 57 回日本神経学会学術大会 2016

10) 牧 由紀子 徳島病院におけるパーキンおよびパーキン関連遺伝子 ( Kloklin 1 ) の遺伝子解析 第 70 回国立病院総合医学会 2016

11) 藤本 美希 牧 由紀子 研究補助者からみた実験手技: キットの落とし穴 第 70 回国立病院総合医学会 2016

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：三ツ井 貴夫

ローマ字氏名：Takao Mitsui

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構徳島病院（臨床研究部）

部局名：臨床研究部

職名：臨床研究部長

研究者番号（8桁）：80294726

### (2)連携協力者

研究協力者氏名：梶 龍児

ローマ字氏名：Ryuji Kaji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。