

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 特定領域研究

研究期間： 2008～2009

課題番号： 20023028

研究課題名（和文） パーキンソン病における神経細胞死の機序解明とその防御

課題名（英文） To elucidate the pathogenesis of Parkinson' s disease and to develop a new
therapy for the 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

研究成果の概要（和文）：劣性遺伝性パーキンソン病の遺伝子産物 parkin, はミトコンドリア膜電位が低下するとミトコンドリア外膜に集積し、その集積は PINK1 の存在が必須であった。また膵β細胞を用いた検討では第1相のインスリン分泌の低下が観察された。また Park9 の遺伝子産物 ATP13A2 の局在検討では正常型はリソソームの外膜に局在するが変異型では小胞体に局在した。この局在の変化が loss-of-function 効果を誘導すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Parkin and PINK1 has revealed that ubiquitylation and mitochondrial integrity are key factors in disease pathogenesis. In this study, we show that PINK1 is rapidly and constitutively degraded under steady-state conditions in a mitochondrial membrane potential-dependent manner and that a loss in mitochondrial membrane potential stabilizes PINK1 mitochondrial accumulation. Furthermore, PINK1 recruits Parkin from the cytoplasm to mitochondria with low membrane potential to initiate the autophagic degradation of damaged mitochondria. In addition, we analyzed the secretion system of insulin using beta-cells originated from parkin KO mice. We identified selective impairments of phase I of insulin secretion system. This finding could be available for elucidating the pathogenesis of neuronal cell death. Moreover, we analyzed the alteration of cellular localization of both wild and mutant types of ATP13A2 that is a causative gene for Park9. The wild type localized on the outer membrane of lysosome. In contrast, the mutants located in the endoplasmic reticulum. The difference of localization could induce the loss-of-function effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	19,400,000		19,400,000
2009 年度	19,600,000		19,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	39,000,000		39,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳の病態解明

キーワード： Parkin・PINK1・CCCP・ミトコンドリア・Mitophagy・品質管理

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景
 パーキンソン病の多くは遺伝歴のない孤発型が殆どを占め、遺伝性パーキンソン病 (FPD) は 5-10%内外と言われている。一方でここ 10 数年の間に単一遺伝子異常で発症する遺伝性パーキンソン病 (FPD) の存在が明らかにされ孤発型においても遺伝的素因の関与が大きいことが分かってきた。臨床的にも通常の PD と何ら区別がつかないことが報告されており、むしろ単一遺伝子異常に伴う PD の病態解明は黒質変性共通のメカニズム解明の重要なヒントを秘めている可能性が高い。更に黒質変性の分子基盤を明らかにすることは他の神経変性疾患の病態究明に繋がることと予想され、極めて重要な意義がある。我々のグループは世界で初めて劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるパーキンソン遺伝子を同定・単離した。更にわが国の遺伝性パーキンソン病スクリーニングの

2. 研究の目的

FPD の原因遺伝子産物の機能解析から黒質神経変性の機序を明確にすることを目的とする。特に劣性遺伝性 PD の原因遺伝子産物 parkin, PINK1 は同じカスケードを形成することが報告されており、その分子基盤を明らかにすることを目的とする。特に両分子はミトコンドリアの機能に関与していることが推定されている。またオートファジーに関与することが予想される Park9 の遺伝子産物 ATP13A2 についても検討する。

3. 研究の方法

1) ミトコンドリア膜電位低下剤である CCCP を用いて parkin, PINK1 の動向を検討した。またオートファジーの有無での違いも検討した。

2) parkin ノックアウトマウスの膵β細胞を用いてインスリン分泌を検討した。

3) Park9 の原因遺伝子 ATP13A2 をノックダウンさせるか病的変異と正常型での局在の変化を検討した。

4. 研究成果

1) ミトコンドリア膜電位低下剤である CCCP により parkin はミトコンドリア外膜に集積した。また parkin のミトコンドリア集積現象は PINK1 が存在していないと起こらなかった。また集積現象後にはミトコンドリアがクリアランスされた。この現象はオートファジーが働かないと観察されなかった。

2) parkin ノックアウトマウスの膵β細胞を用いた検討では syntaxin 依存性である第 1 相のインスリン分泌低下が観察された。この現象は膜直下にセプチンなどの構造蛋白の集積によることが全反射蛍光顕微鏡による検討で明らかにされた。

3) ATP13A2 は正常型はリソソームの外膜に局在するが、変異型では小胞体に局在して細

胞死が誘導されることが分かった。現在、ATP13A2 ノックアウトマウスを作成中であり、in vitro と in vivo での違いの有無などを検討する予定である。

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 10 件)

1. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Sato F, Hatano T, Eguchi H, Hattori N. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett.* 2010 Mar 19;584(6):1073-9. Epub 2010 Feb 12.
2. Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Mizuno Y, Kubo S, Toda T, & Hattori N. Mutation analysis for DJ-1 in sporadic and familial parkinsonism: Screening strategy in parkinsonism. *Neurosci Lett* 2009;455:159-161.
3. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, & Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009 ;41:1303-1307.
4. Sasaki K, Shimura H, Itaya M, Tanaka R, Mori H, Mizuno Y, Kosik KS, Tanaka S, & Hattori N.

- Excitatory amino acid transporter 2 associates with phosphorylated tau and is localized in neurofibrillary tangles of tauopathic brains. *FEBS Lett.* 2009;583:2194-200.
5. Fukae J, Sato S, Shiba K, Sato K, Mori H, Sharp PA, Mizuno Y, & Hattori N. Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 2009; 583: 521-525.
 6. Shiba K, Arai T, Sato S, Kubo S, Ohba Y, Mizuno Y, & Hattori N. Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383:331-335.
 7. Ning Y, Kanai K, Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Sato S, Asahina M, Kuwabara S, Takeda A, Hattori T, Mizuno Y, Hattori N. PARK9-linked parkinsonism in Eastern Asia: Mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. *Neurology* 2008;70:1491-1493.
 8. Kumazawa R, Tomiyama H, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Yoshino H, Yokochi F, Fukusako T, Takehisa Y, Kashihara K, Kondo T, Elibol B, Bostantjopoulou S, Toda T, Takahashi H, Yoshii F, Mizuno Y, Hattori N. Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2008; 65:802-808.

[学会発表] (計 10 件)

1. Hattori N Plenary Session III "Young onset PD". the 2nd Asian Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress2009 年 2 月 16 日 New Delhi

[図書] (計 3 件)

1. 服部 信孝 いきなり名医！パーキンソン病 Q&A. 日本医事新報社 145. 2009

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

岩井 一宏、坂田 真一、服部 信孝
パーキンソン病モデルマウス及びその作製方法並びに該マウスを用いたパーキンソン病治療薬のスクリーニング方法及び評価方法
特願 2009-69122
平成 21 年 3 月 19 日

PCT 出願 (国際特許)

岩井 一宏、坂田 真一、服部 信孝
パーキンソン病モデルマウス及びその作製方法並びに該マウスを用いたパーキンソン病治療薬のスクリーニング方法及び評価方法
PCT/JP2010/54691 平成 22 年 3 月 18 日

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・神経学・教授
研究者番号：80218510

(2) 研究分担者

佐藤 栄人 (SATO SHIGETO)
順天堂大学・医学部・神経学・准教授
研究者番号：00445537

下 泰司 (SHIOMO YASHUSHI)
順天堂大学・医学部・神経学・准教授
研究者番号：70286714

波田野 琢 (HATANO TAKU)
順天堂大学・医学部・神経学・助教
研究者番号：60338390

船山 学 (FUNAYAMA MANABU)

順天堂大学・医学部・神経学・助教
研究者番号：70468578