

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07878

研究課題名（和文）遺伝性パーキンソン病におけるドーパミン神経特異的ミトコンドリア機能障害の分子機構

研究課題名（英文）Mitochondrial dysfunction by loss of CHCHD8

研究代表者

天羽 拓 (Aino, Taku)

防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授

研究者番号：40453922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではパーキンソン病分子病態に関する知見を得るため、パーキンソン病原因遺伝子産物CHCHD2の関連因子として同定したCHCHD8の解析を行った。CHCHD8欠損ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yは、顕著な呼吸鎖複合体IV活性低下が認められた。またミトコンドリア銅含有量の低下などから、CHCHD8はMTCO1サブユニットのCu<sub>B</sub>中心へCuを搬入する過程に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病の発症機序は十分に解明されていないが、ミトコンドリア機能障害が重要なファクターであると考えられている。パーキンソン病原因遺伝子産物とミトコンドリア機能障害との関係の一端を明らかにした本研究の成果は、パーキンソン病の病態解明およびミトコンドリアを標的にした新規治療薬開発への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial dysfunction is a hallmark of Parkinson's disease. To gain insight into the molecular pathogenesis of Parkinson's disease, we analyzed CHCHD8, which has been identified as a factor associated with the Parkinson's disease causative gene product CHCHD2. CHCHD8-deficient human neuroblastoma SH-SY5Y showed significantly reduced respiratory chain complex IV activity. Based on decreased mitochondrial copper content and other factors, it was suggested that CHCHD8 is involved in the process of Cu delivery to the Cu<sub>B</sub> center of the MTCO1 subunit.

研究分野：生化学

キーワード：ミトコンドリア パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は主に **50~60** 代で発症し、非運動症状(嗅覚低下・睡眠障害・自律神経障害)および運動症状(静止時振戦、無動、筋固縮、姿勢反射障害など)を呈する進行性の神経変性疾患である。この運動症状を呈する原因として中脳黒質のドパミン神経細胞変性が有力視されているが、なぜドパミン神経細胞が特に脆弱なのか不明である。ドパミン神経細胞の変性は、第 **1** の要因である加齢に加え遺伝的素因や環境有害物質など多因子が関与していると考えられているが、ミトコンドリア機能障害が主原因ではないかという説が有力である。そのきっかけは **1980** 年代初めに南カリフォルニアで発生した **MPTP** によってドパミン神経細胞死を伴うパーキンソン病様症状を呈するという症例報告 (**Science, 1983**) である。その後、**MPTP** やロテノンなどのミトコンドリア毒によるパーキンソン病モデル動物が次々に樹立され、またパーキンソン病患者の剖検脳黒質においてミトコンドリア機能低下が報告された。さらに **1997** 年以降遺伝性パーキンソン病の存在が明らかにされ、原因遺伝子産物の機能解析によりミトコンドリア機能不全や異常ミトコンドリア除去機構 (マイトファジー) がパーキンソン病発症機序に関与していることが報告された (**J Cell Biol 183:795, 2008** など)。

我々は **2015** 年、常染色体優性遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子 (**PARK22**) として **coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2)** を単離した (**Lancet Neurol, 2015**)。CHCHD2 はミトコンドリア移行配列を持ち、膜間腔に局在していた。CHCHD2 の解析の過程で、関連因子として酵母の複合体 **IV** 会合因子 **COA4** のホモログ **CHCHD8** を同定した。CHCHD8 欠損は、CHCHD2 と同様にドパミン神経前駆細胞であるヒト神経芽細胞腫 **SH-SY5Y** 特異的にミトコンドリア機能障害を引き起こした。パーキンソン病は中脳黒質のドパミン神経細胞変性が原因とされており、**CHCHD2-CHCHD8** の機能を明らかにすることがパーキンソン病発症機序の解明に繋がると考えられた。

## 2. 研究の目的

ヒト神経芽細胞腫における **CHCHD8** 欠損によるミトコンドリア障害の分子機構を解析することで、**CHCHD8** の機能および **CHCHD2** との関連を明らかにする。また、パーキンソン病ゲノムバンクで **CHCHD8** 遺伝子変異スクリーニングを行い、遺伝性パーキンソン病との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ミトコンドリアの単離、解析

**CHCHD8** 欠損細胞は **CRISPR/Cas9** 法により作製した。培養した細胞を **Dounce Homogenizer** で破碎し、遠心分画によりミトコンドリアを単離した。単離したミトコンドリアを用いて、酸素消費量(クラーク型酸素電極)や呼吸鎖複合体の酵素活性(分光光度計)などを測定した。呼吸鎖複合体の酵素活性は、クエン酸回路の鍵酵素であるクエン酸合成酵素の活性も同時に測定し、規格化した。また、ミトコンドリアを **DDM** または **digitonin** で可溶化して **Blue Native PAGE**、もしくは **RIPA buffer** に溶かして **SDS-PAGE** で分離し、**Western Blotting** に供した。含有金属量は、**ICP-MS** を用いて測定した。さらにレンチウイルスベクターを用いて、レスキュー実験を行った。

### (2) CHCHD8 遺伝子変異スクリーニング

順天堂大学パーキンソン病ゲノムバンクから、既知原因遺伝子には変異のない遺伝性パーキンソン病症例(約 **450**)を対象に **CHCHD8** 遺伝子のタンパク質コード領域を含む **Exon 2** を **PCR** 法で増幅し、サンガー法で変異解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) CHCHD8 欠損ミトコンドリア

**CHCHD8** 欠損ミトコンドリアは、野生型と比べて酸素消費量が低下していた。そこで、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I ~ IV の酵素活性を測定した(図1)。**CHCHD8** 欠損により、複合体 IV の酵素活性が顕著に低下しており、**CHCHD8** が複合体 IV に重要な因子であることが判明した。一方で複合体 III は、**CHCHD8** 欠損により少し活性が上昇した。その原因として、複合体 IV の会合中間体が複合体 III(および複合体 I)との超複合体構造の安定化に寄与しているためだと推測された。また、このことから **CHCHD8** が複合体 IV の会合の初期ではなく、比較的后期の過程に関与していることが考えられた。しかしながら、**Blue Native PAGE** の解析では、極端な複合体 IV 会合中間体の蓄積は認められず、**CHCHD8** が複合体 IV の会合の過程でどこに関与しているのかまでは判明しなかった(図2)。また、レンチウイルスベクターを用いたレスキュー実験を実施したところ、複合体 IV の回復が認められた(図3)。

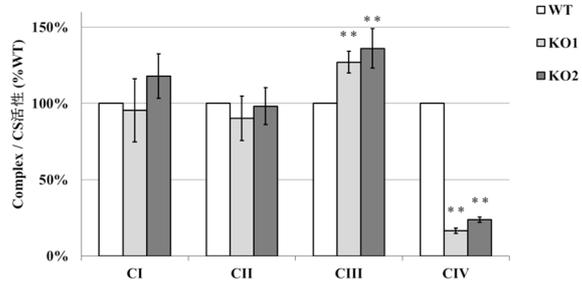


図1 呼吸鎖複合体酵素活性

また、このことから **CHCHD8** が複合体 IV の会合の初期ではなく、比較的后期の過程に関与していることが考えられた。しかしながら、**Blue Native PAGE** の解析では、極端な複合体 IV 会合中間体の蓄積は認められず、**CHCHD8** が複合体 IV の会合の過程でどこに関与しているのかまでは判明しなかった(図2)。また、レンチウイルスベクターを用いたレスキュー実験を実施したところ、複合体 IV の回復が認められた(図3)。

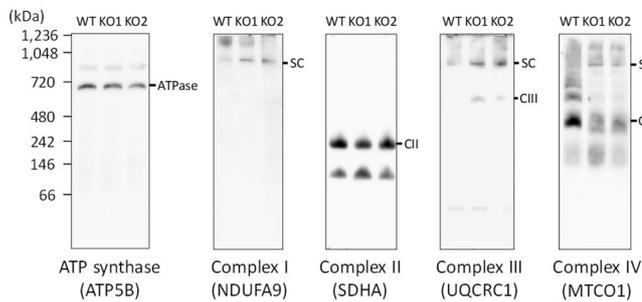


図2 **Blue Native PAGE**  
(0.5% DDM)

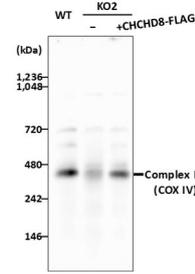


図3 レスキュー実験  
(1.0% digitonin)

さらに単離ミトコンドリアの含有金属量を測定したところ、**CHCHD8** 欠損細胞で **Cu** が有意に低下していた(図4)。呼吸鎖複合体 IV には、**Cu** (**Cu<sub>A</sub>** と **Cu<sub>B</sub>** 中心) と **Fe** (**heme a** と **a<sub>3</sub>**) が含まれており、電子伝達に重要な役割を担っている。これまでに複合体 IV の会合の過程で **Cu** を搬入する会合因子が幾つか報告されており、これらのタンパク質を **Western blotting** で解析した(図5)。**CHCHD8** 欠損細胞では **COX11** および **COX19** が顕著に減少していたことから、**CHCHD8** は **MTCO1** サブユニットの **Cu<sub>B</sub>** 中心へ **Cu** を搬入する過程に関与していると考えられた。

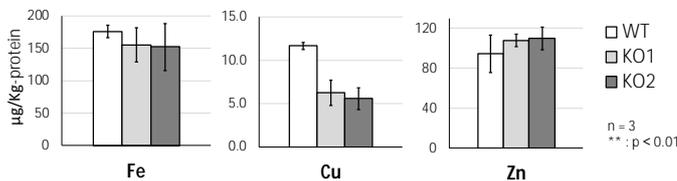


図4 単離ミトコンドリアの含有金属量

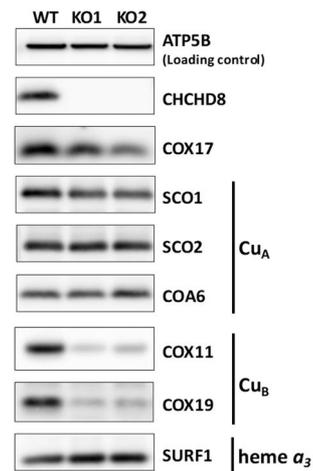


図5 **Cu** 搬入に関わる  
複合体 IV 会合因子

## (2) CHCHD8 遺伝子変異スクリーニング

今回調べた日本人の遺伝性パーキンソン病患者 (約 450 症例) の **CHCHD8** 遺伝子のタンパク質コード領域は、全てが野生型と同じ配列であり、多型すら認められなかった (図 6)。このような遺伝子は珍しく、**CHCHD8** が非常に重要な役割を担っていると考えられた。

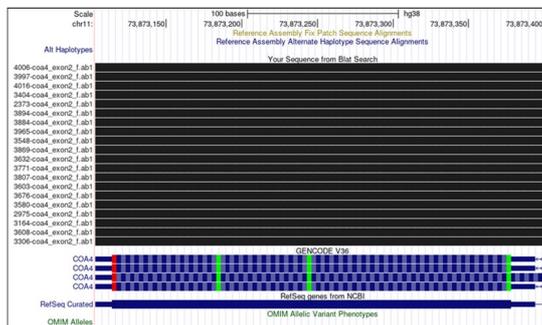


図 6 **CHCHD8** 遺伝子変異解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tokuyama T, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S	4. 巻 25
2. 論文標題 Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drp1 regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104582 ~ 104582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamo Hikaru, Oyama Genko, Nishioka Kenya, Funayama Manabu, Hattori Nobutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Deep Brain Stimulation for a Patient with Familial Parkinson's Disease Harboring CHCHD2 p.T61I	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Movement Disorders Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 407 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mdc3.13428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Vollstedt EJ, Schaaque S, Lohmann K, Padmanabhan S, Brice A, Lesage S, Tesson C, Vidailhet M, Wurster I, Hentati F, Mirelman A, Giladi N, Marder K, Waters C, Fahn S, Kasten M, Bruggemann N, Borsche M, Foroud T, Tolosa E, Garrido A, Annesi G, Gagliardi M, Bozi M, Stefanis L, Ferreira JJ, Nishioka K, Funayama M, et. al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Embracing Monogenic Parkinson's Disease: The MJFF Global Genetic PD Cohort	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 286 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takekiyo Takahiro, Yamada Natsuki, Amo Taku, Asano Atsushi, Yoshimura Yukihiro	4. 巻 360
2. 論文標題 Triiodide ion-induced inhibition of amyloid aggregate formation: A case study of $\alpha$ -synuclein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 119446 ~ 119446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molliq.2022.119446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takekiyo Takahiro, Yamada Natsuki, Amo Taku, Nakazawa Chikako T., Asano Atushi, Ichimura Tohru, Kato Minoru, Yoshimura Yukihiro	4. 巻 369
2. 論文標題 Dissolution of amyloid aggregates by direct addition of alkali halides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 120849 ~ 120849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molliq.2022.120849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amo Taku, Oji Yutaka, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 34
2. 論文標題 Metabolomic analysis data of MPP+-exposed SH-SY5Y cells using CE-TOFMS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 106707 ~ 106707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2020.106707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shigeto, Noda Sachiko, Torii Satoru, Amo Taku, Ikeda Aya, Funayama Manabu, Yamaguchi Junji, Fukuda Takahiro, Kondo Hiromi, Tada Norihiro, Arakawa Satoko, Watanabe Masahiko, Uchiyama Yasuo, Shimizu Shigeomi, Hattori Nobutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 443 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sotome Rina, Hirasawa Akira, Kikusato Motoi, Amo Taku, Furukawa Kyohei, Kuriyagawa Anna, Watanabe Kouichi, Collin Anne, Shirakawa Hitoshi, Hirakawa Ryota, Tanitaka Yuta, Takahashi Hideki, Wu Guoyao, Nochi Tomonori, Shimmura Tsuyoshi, Warden Craig H., Toyomizu Masaaki	4. 巻 53
2. 論文標題 In vivo emergence of beige-like fat in chickens as physiological adaptation to cold environments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 381 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-021-02953-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takekiyo Takahiro, Yamada Natsuki, Nakazawa Chikako T., Amo Taku, Asano Atsushi, Yoshimura Yukihiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Formation of synuclein aggregates in aqueous ethylammonium nitrate solutions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biopolymers	6. 最初と最後の頁 e23352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bip.23352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takekiyo Takahiro, Yamada Natsuki, Amo Taku, Yoshimura Yukihiro	4. 巻 759
2. 論文標題 Effects of ethylammonium halides on helix formation of proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 13790 ~ 13790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cpllett.2020.137970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 A. Ikeda, M. Funayama, M. Yoshida, Y. Li, T. Inoshita, K. Shiba-Fukushima, H. Meng, T. Amo, I. Aiba, Y. Saito, N. Atsuta, R. Nakamura, G. Tohnai, J. Sone, Y. Izumi, R. Kaji, M. Morita, A. Taniguchi, K. Nishioka, Y. Imai, G. Sobue, N. Hattori, JaCALS
2. 発表標題 Characterization of CHCHD2 variants linked to amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taku Amo, Yuga Hikage
2. 発表標題 Loss of CHCHD8 (COA4) caused mitochondrial respiratory Complex IV deficiency
3. 学会等名 Euromit 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天羽 拓, 日景 勇賀
2. 発表標題 CHCHD8 (COA4) はミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの銅中心形成に関わる会合因子である
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天羽拓、日景勇賀
2. 発表標題 CHCHD8 (COA4) 欠損によるミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの機能不全
3. 学会等名 第21回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日景 勇賀, 永沼 陸, 古本 菜々子, 船山 学, 服部 信孝, 天羽 拓
2. 発表標題 SH-SY5YにおけるCHCHD8欠損によるミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの機能不全
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日景 勇賀, 永沼 陸, 古本 菜々子, 船山 学, 服部 信孝, 天羽 拓
2. 発表標題 SH-SY5YにおけるCHCHD8欠損によるミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの機能不全
3. 学会等名 第20回 日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日景 勇賀, 永沼 陸, 古本 菜々子, 山田 雅巳, 天羽 拓
2. 発表標題 CHCHD8 (COA4) 欠損によるミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの機能不全
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日景 勇賀, 永沼 陸, 古本 菜々子, 天羽 拓
2. 発表標題 ヒト神経芽細胞腫SH-SY5YにおけるCHCHD8 (COA4) 欠損によるミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの機能不全
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会 特別オンラインシンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	船山 学  (Funayama Manabu)  (70468578)	順天堂大学・医学部・先任准教授   (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------