

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07910

研究課題名(和文)パーキンソン病原因遺伝子産物VPS13Cによるオートファジー制御機構の解明

研究課題名(英文)Autophagy Regulation Mechanism by Parkinson's Disease Causal Gene Product VPS13C

研究代表者

柴 佳保里 (Shiba, Kahori)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30468582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、パーキンソン病の原因遺伝子産物であるVPS13Cのオルソログをノックアウトしたショウジョウバエにおいて、VPS13の生理機能を解析することを目的とした。電気生理学および形態学的解析により、VPS13が神経機能において重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、Vps13は加齢依存的なドパミン神経細胞の生存性およびミトコンドリアの形態において重要であり、抗酸化ストレス応答にも関与していることが示唆された。さらに、VPS13がオートファジーの後期ステップにおいて機能することも示した。本研究の結果は、VPS13に関連するパーキンソン病発症機構の理解に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、VPS13が神経機能において重要な役割を果たすことを生体レベルで明らかにした点にある。また、パーキンソン病のモデル生物としての有用性を確認したことから、今後、遺伝学的相互作用の検討、またVPS13の新たな生理機能やシグナル経路の発見が期待され、将来的な治療法や創薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to analyze the physiological function of VPS13 in *Drosophila* by knocking out the ortholog of VPS13C, the causative gene product of Parkinson's disease. Electrophysiological and morphological analyses revealed that VPS13 plays an important role in neural function. Vps13 is also important in age-dependent dopaminergic neuron viability and mitochondrial morphology, suggesting that Vps13 is also involved in the antioxidant stress response. Furthermore, VPS13 was shown to function in the late steps of autophagy. The results of this study are expected to contribute to our understanding of the mechanisms of Parkinson's disease pathogenesis related to VPS13C.

研究分野：神経学

キーワード：VPS13C パーキンソン病 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

VPS13C (Vacuolar protein sorting-associated protein 13C) 変異によるパーキンソン病 (PD) は、若年からの α -Synuclein (α -Syn) の顕著な蓄積と高度な神経脱落が特徴である。しかし、VPS13C の生理的役割の詳細が不明なため、神経変性の原因および発症機序は理解されていない。オートファジーは細胞内の主要なタンパク質分解経路であり、有害なタンパク質凝集体や損傷ミトコンドリアなどの分解を通して細胞の恒常性維持に寄与している。特に非分裂細胞である神経ではオルガネラの品質管理が生存性に重要であり、オートファジーの機能低下が神経変性疾患の発症機構に関与することが判明しつつある。

VPS13C は新しく同定された PD 原因遺伝子産物である。ヒトでは A~D の 4 つのパラログが存在し、それぞれ異なる神経変性疾患の原因遺伝子として同定されている。ファミリー内で VPS13C は VPS13A と最も高い相同性をもつが、VPS13C は小胞体とリソソームとの接点に局在し、VPS13A は小胞体とミトコンドリアの接点に局在することから、異なる機能を持つことが推定される。また、酵母 VPS13 は単一遺伝子であり、ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) の局在化を介して前胞子膜の伸長を制御すること、酵母 VPS13 に脂質輸送活性、膜融合活性があることが最近示された。Vps13K0 ショウジョウバエの脳組織でユビキチン化タンパク質やオートファジー基質タンパク質である p62 の蓄積が報告され、VPS13 がタンパク質分解経路に関与する可能性が示唆されているが、神経機能についての検証はされていない。

2. 研究の目的

本研究は、パーキンソン病の発症機序を解明するために、ドパミン神経細胞における VPS13C の役割を解析することを目的としている。具体的には、VPS13C が神経細胞のオートファジー経路やミトコンドリア機能に与える影響を明らかにし、VPS13C の機能不全がパーキンソン病の病態形成にどのように関与しているかを解明することを目指す。

3. 研究の方法

本課題では、パーキンソン病モデル動物としてショウジョウバエを用い、組織レベルでの Vps13 の生理機能を解析した。

興奮性接合部電位 (Excitatory Junctional Potential: EJP) の計測: 幼虫神経筋接合部位 (neuromuscular junction: NMJ) の EJP をパッチクランプ法で測定した。**シナプス構造の解析:** NMJ のシナプスボタンとアクティブゾーンをそれぞれのマーカータンパク質の抗体を用いて免疫染色し、その数を計測した。また、シナプス小胞の大きさは、電子顕微鏡で画像取得し、ImageJ を用いて小胞の面積と数を測定した。**ドパミン神経細胞数の評価:** 抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体を用いて、免疫染色によりドパミン神経を可視化し、計測した。**ミトコンドリア形態の観察:** ミトコンドリア局在性 GFP を発現するハエ系統を作成し、全脳を解剖後、蛍光顕微鏡で観察した。**活性酸素種によるストレスアッセイ:** 羽化後 7 日齢のハエにパラコート、または H_2O_2 を添加した 5% ショ糖を与えて飼育し、生存日数を計測した。**クライミングアッセイ:** バイアル内のハエが 18 秒間に 6 cm 以上登攀できた割合を算出した。**タンパク質の発現量解析:** ウェスタンブロット法を用いてタンパク質の発現量を定量した。**オートファゴソームの微細構造観察:** 4 時間絶食させた 3 齢幼虫の脂肪体を固定し、電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) Vps13 の神経機能における役割

Vps13 の神経機能における役割を確認するため、ショウジョウバエの NMJ を用いて機能解析を行った。まず、EJP を計測した結果、野生型と比較して、Vps13 KO ハエにおいて振幅数の増加と、電位の高いシグナルが観測された。これらの結果から、Vps13 KO においてシナプスボタン数やアクティブゾーンの増加が予想された。実際、シナプトボタン数は約 1.4 倍、単位面積当たりのアクティブゾーン数は約 1.1 倍増加していた。Vps13 はオルガネラ間の脂質輸送と膜融合に関与するという報告から、シナプト小胞膜の形成に影響する可能性が考えられた。電子顕微鏡で運動神経シナプスの微細構造を観察した結果、シナプト小胞の数には影響がないものの、シナプト小胞のサイズが肥大化していた。

以上の結果から、ショウジョウバエにおいて Vps13 はシナプト小胞のサイズを制御し、神経活動において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2) Vps13 のドパミン神経細胞における機能

次に、Vps13 がドパミン神経細胞与える影響について解析した。ハエのドパミン神経クラスターである PPL1、PPM1/2、PPM3 の神経細胞数の計測を行ったところ、Vps13 KO ではすべてのクラスターにおいて加齢依存的に減少していることが確認された。酵母 Vps13 はミトコンドリアと他のオルガネラ間との間の膜接触部位に局在し、ミトコンドリア機能を制御することが報告されている。そこで、ドパミン神経細胞のミトコンドリア形態に与える影響を検討した。Vps13 KO ハエにミトコンドリア局在型 GFP(mito-GFP)を発現させ、ミトコンドリアを可視化したところ、Vps13 KO ハエではミトコンドリアが断片化し、その一部が大きく凝集していた。一方で、筋肉のミトコンドリアについては変化が見られなかった。次に、ミトコンドリアの機能を確認するため、全脳 ATP 産生量の測定をしたところ、低下傾向が認められるものの有意な差はなかった。さらに、酸化ストレスに対する感受性を確認するため、活性酸素種を生成する薬剤パラコートや過酸化水素の摂取による寿命測定アッセイを行った。その結果、どちらの薬剤においても、Vps13 KO において寿命の短縮が観察された。最後に、運動能力の指標としてクライミングアッセイを行い、VPS13 の運動能力に及ぼす影響を確認した。羽化後 10 日齢の若年ハエは野生型と同様であったが、20 日齢以降の加齢させたハエでは、Vps13 KO において運動能力の低下が示された。これらの結果から、Vps13 は加齢依存的なドパミン神経細胞の生存性とミトコンドリアの形態に重要であり、抗酸化ストレス応答に機能していることが示唆された。

(3) ドパミン神経における VPS13C の役割

次に、Vps13 KO ハエで見られる表現型に関して、ヒト VPS13A または VPS13C 導入によるレスキューの有無を検証した。ドパミン神経特異的にヒト VPS13A(hVPS13A)、もしくはヒト VPS13C(hVPS13C)を発現させ、上記と同様に PPL1 クラスターのドパミン神経細胞数を計測した。その結果、対照群である LacZ 発現系統ハエと比較して、hVPS13C と dVPS13 発現系統においては野生型と同程度に回復した。一方、hVPS13A 発現系統は回復しなかった。さらに、パーキンソン病病原変異体である 3190 終止発現系統ハエにおいても確認したが、回復しなかった。次に、Vps13 KO で観察されるミトコンドリア形態についても検討した。その結果、hVPS13C 発現系統では比較対照群と同様、ひも状のミトコンドリア形態に回復したが、hVPS13A 発現系統ハエでは形態的な回復は見られなかった。これらの結果から、ドパミン神経機能においては hVPS13A ではなく、hVPS13C が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、ミトコンドリア機能低下が VPS13C に連鎖するパーキンソン病の発症機構に関与する可能性が考えられた。

(4) Vps13 とオートファジー系分解経路と シヌクレイン凝集体への関与

Vps13 の機能不全がオートファジー経路に影響を与えることが報告されている。そこで、Vps13 のオートファジーへの影響を検討した。まず、全脳において、オートファジーの基質で

ある p62 と LC3B の発現量を確認した。その結果、Vps13KO では両タンパク質ともに発現量が増加していることが示され、Vps13 がオートファジー経路に関与していることが示唆された。Vps13 が脂質膜形成に関与することから、オートファゴソームの膜形成に影響する可能性がある。その可能性を検証するため、飢餓ストレスを負荷した 3 齢幼虫のハエ脂肪体を電子顕微鏡で観察した。その結果、オートファゴソーム膜の形態に変化は見られなかったが、電子密度の高いオートファゴソーム（オートリソソーム）が増加していることが明らかになった。これらの結果から、Vps13 はオートファジーの後期ステップに関与する可能性が考えられた。

今後の展望

現在、ショウジョウバエを用いた遺伝学的相互作用の解析により、Vps13 と相互作用する複数のパーキンソン病原因遺伝子を同定している。これらの遺伝子産物と Vps13 との相互作用を解析することで、Vps13 の新たな生理機能を明らかにすると同時に、パーキンソン病の病態解明に貢献することが期待される。

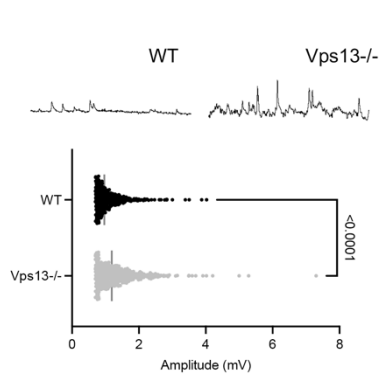


図 1. 野生型と VPS13KO の EJP の比較

上段が実際の波形で、下段は振幅高を数値化したグラフを示している。VPS13KO では有意に振幅が高くなった。

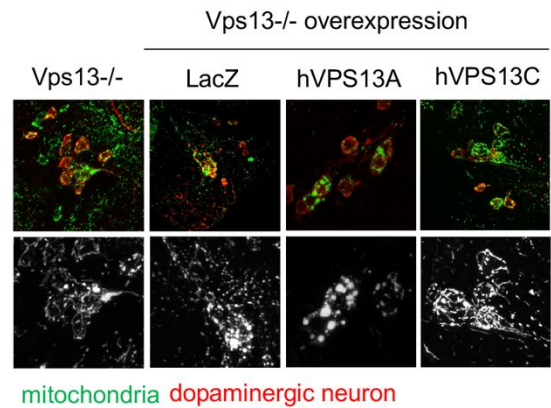


図 2. hVPS13A と hVPS13C 発現によるミトコンドリア形態の比較
VPS13KO ハエでは断片化したミトコンドリア形態が観察されたが、そこに VPS13C を発現させると回復した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Inoshita T, Liu J-Y, Taniguchi D, Ishii R, Shiba-Fukushima K, Hattori N, Imai Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Parkinson disease-associated Leucine-rich repeat kinase regulates UNC-104-dependent axonal transport of Arl8-positive vesicles in Drosophila.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105476.	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 Tezuka T, Taniguchi D, Sano M, Shimada T, Oji Y, Tsunemi T, Ikeda A, Li Y, Yoshino H, Ogata J, Shiba-Fukushima K, Funayama M, Nishioka K, Imai Y, Hattori N.	4. 巻 8
2. 論文標題 Pathophysiological evaluation of the LRRK2 G2385R risk variant for Parkinson's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Parkinsons Dis.	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41531-022-00367-y.	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 Daida K, Shimonaka S, Shiba-Fukushima K, Ogata J, Yoshino H, Okuzumi A, Hatano T, Motoi Y, Hirunagi T, Katsuno M, Shindou H, Funayama M, Nishioka K, Hattori N, Imai Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 -Synuclein V15A variant in familial Parkinson's disease exhibits a weaker lipid-binding property.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mov Disord.	6. 最初と最後の頁 2075-2085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29162.	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 Liu J-Y, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Yoshida K, Ishihama Y, Imai Y, Hattori N.	4. 巻 31
2. 論文標題 Ubiquitination at the lysine 27 residue of the Parkin ubiquitin-like domain is suggestive of a new mechanism of Parkin activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 2623-2638.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddac064.	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 Shiba-Fukushima Kahori、Imai Yuzuru	4. 巻 2322
2. 論文標題 Monitoring PINK1-Parkin Signaling Using from iPS Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 81 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_9	査読の有無 無
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 Daniel J. Klionsky, Amal Kamal Abdel-Aziz, Sara Abdelfatah, Mahmoud Abdellatif, Asghar Abdoli, Steffen Abel, Hagai Abeliovich, Marie H. Abildgaard, Kahori Shiba-Fukushima(1848番目/2299人中)	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	査読の有無 無
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 Kahori Shiba-Fukushima, Tsuyoshi Inoshita, Osamu Sano, Hidehisa Iwata, Kei-ichi Ishikawa, Hideyuki Okano, Wado Akamatsu, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori	4. 巻 23
2. 論文標題 A Cell-Based High-Throughput Screening Identified Two Compounds Enhance PINK1-Parkin signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101048	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 Masayoshi Kano, Masashi Takanashi, Genko Oyama, Asako Yoritaka, Taku Hatano, Kahori Shiba-Fukushima, Makiko Nagai, Kazutoshi Nishiyama, Kazuko Hasegawa, Tsuyoshi Inoshita, Kei-ichi Ishikawa, Wado Akamatsu, Yuzuru Imai, Silvia Bolognin, Jens Christian Schwamborn, Nobutaka Hattori	4. 巻 6
2. 論文標題 Reduced astrocytic reactivity in human brains and midobrain organoids with PRKN mutations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NPJ Parkinsons Disease	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41531-020-00137-8	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 Akihiro Yamaguchi, Kei-ichi Ishikawa, Tsuyoshi Inoshita, Kahori Shiba-Fukushima, Shinji Saiki, Taku Hatano, Akio Mori, Yutaka Oji, Ayami Okuzumi, Yuanzhe Li, Manabu Funayama, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori, Wado Akamatsu	4. 巻 14
2. 論文標題 Identifying therapeutic agents for amelioration of mitochondrial clearance disorder in neurons of familial Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1060-1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.04.011	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 服部信孝、柴-福嶋佳保里	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 224
3. 書名 順天堂大脳神経内科ではこうしている 最新 パーキンソン病診療【電子版付】	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------