

機関番号：32620

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21790853

研究課題名（和文）遺伝性パーキンソン病モデル細胞における Mitophagy の細胞死における役割

研究課題名（英文）Effects of mitophagy on cell death in Parkinson's disease model cells

研究代表者

齊木 臣二 (Saiki Shinji)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：00339996

研究成果の概要（和文）：

遺伝性パーキンソン病原因遺伝子 PINK1 と parkin により誘導されるミトファジーは、両遺伝子の欠損・病変により減弱し、PINK1 のミトコンドリア集積がミトファジーのトリガーとなることを証明した。また PINK1 発現抑制によりミトコンドリア機能が低下するも、活性酸素量は変化しないこと、パーキンソン病治療効果があるカフェインが Akt を抑制しオートファジーを亢進させること、ゾニサミドがオートファジーではなく、アポトーシスを抑制することを証明した。（224字）

研究成果の概要（英文）：

PINK1/parkin-mediated mitophagy is attenuated by loss of each gene expression and pathogenic mutations of the genes and is triggered by PINK1 accumulation on the mitochondrial outer membrane. In PINK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts, mitochondrial function is insufficient, whilst production of the reactive oxygen species is unchanged.

Caffeine, a well-known chemical with PD-onset retardation effects, induces apoptosis via enhancement of autophagy. Zonisamide prevents cell death via suppression of apoptotic pathway and induction of MnSOD expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 生物系 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・神経内科学

キーワード： オートファジー、パーキンソン病、ミトファジー

1. 研究開始当初の背景

2008 年 12 月に、米国 NIH の R. Youle らのグループから遺伝性パーキンソン病（以下 PD）原因遺伝子 parkin とミトファジーとの関連（ミトコンドリア uncoupler である CCCP 添加により脱分極したミトコンドリアに parkin が集積し、ミトファジーが促進されること）が報告されたため、当初の本研究計画では alpha-synuclein とミトファジーとの関連に焦点を当てて研究を進める予定であったが、parkin および PINK1（遺伝性 PD 原因

遺伝子の一つで、parkin との関連が深いとされる）を対象をシフトし、2009 年 1 月より研究を開始した（なお 2009 年 4 月に本研究申請が採択された。）

2. 研究の目的

遺伝性 PD 原因遺伝子（特に PINK1 および parkin）によるミトファジー調節機構を解明し、病態との関連を検討し、その意義を解明すること。および PD 治療効果を持つとされる種々の化合物の、オートファジーを介する効果を検討すること。

3. 研究の方法

種々の培養細胞 (HeLa, SH-SY5Y, PC12D 細胞、Atg7^{-/-}マウス胚性線維芽細胞 (Atg7^{-/-}MEFs) およびそのコントロール細胞 (Atg7^{+/+}MEFs)、parkin^{-/-} MEFs およびそのコントロール細胞 (parkin^{+/+} MEFs)、PINK1^{-/-} MEFs およびそのコントロール細胞 (PINK1^{+/+} MEFs) に、遺伝子導入 (主に野生型および変異型の parkin や PINK1) / 化合物 (ミトコンドリアに作用する CCCP, MPP+, rotenone, マイトマイシンなどや、種々の濃度に調節したカフェイン・ゾニサミド) 添加を行い、観察可能な処置を施した後に、ウェスタンブロッティングや免疫沈降法および蛍光顕微鏡・電子顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡・フローサイトメーターを用いて多面的な評価を行った。

4. 研究成果

(1) Parkin-PINK1 介在性ミトファジーについて以下に記載する事項を明らかにした。

①ミトコンドリア uncoupler である CCCP 投与によって脱分極したミトコンドリアへの parkin 移行に、parkin のリンカードメインが重要であること (野生型および種々の病因変異を持つ parkin を作製し、培養細胞に導入後、CCCP を投与し、各 parkin のミトコンドリアへの移行を観察することにより評価した)。

②脱分極したミトコンドリアへの parkin 移行に野生型 PINK1 が必須であり、多くの変異型 PINK1 では parkin 移行が不十分であり、その後に誘導されるミトファジーも不十分になること。

③PINK1 および parkin が移行した脱分極ミトコンドリアはユビキチン化され、p62 が共局在すること (なお以降の類似した研究では p62 のミトコンドリアへの移行が必須であるとする報告と、そうではないとする報告があり、現時点では一定の見解を見ない)。

④脱分極されていないミトコンドリアでも、PINK1 を強制発現することで、parkin のミトコンドリアへの移行が促進され、ミトファジーが誘導されること (PINK1 および parkin 両蛋白を強制発現したところ、CCCP を添加することなく、parkin がミトコンドリアに移行し、続いてミトファジーが引き起こされ、完全にミトコンドリアが消失する)。

⑤④で述べた現象は、変異型 PINK1 の強制発現では誘導されず、ミトファジーも不十分であること。

(2) PINK1 とミトコンドリア機能について以下に記載する事項を明らかにした。

①PINK1 欠損状態では、ミトコンドリア膜電位の低下、呼吸機能低下および細胞分裂が低下することを、生細胞から抽出したミトコンドリアを呼吸させながら評価する molecular

kinetic assay により証明したこと

②PINK1 欠損状態による細胞分裂能の低下は、ミトコンドリア依存的であることを、ガラクトース培地を用いて証明したこと

③PINK1 欠損状態ではミトコンドリア形態変化 (断片化) が誘導されること。

④PINK1 欠損状態でも、活性酸素の放出は有意に上昇しないこと。

(3) PD 発症予防効果があるとされる化合物とオートファジーとの関連について以下に記載される事項を明らかにした。

①抗てんかん薬でかつ PD の運動症状改善効果があるとされるゾニサミドが、MnSOD の発現を上昇させ、種々の毒性物質に対して抗アポトーシス効果を持つこと。

②高濃度カフェインが直接 Akt のリン酸化を抑制することにより、PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 経路を抑制し (下記図 1-3 を参照)、オートファジーを促進し、細胞保護的ではなく、アポトーシスを導くこと (図 4 参照)。

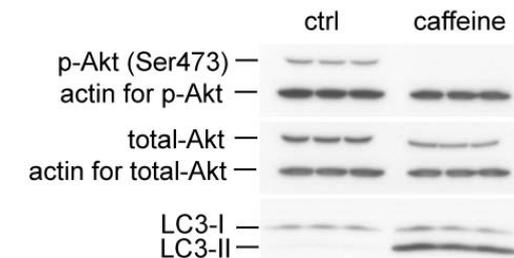


図 1 HeLa 細胞に 10 mM のカフェインを添加し 24 時間後にウェスタンブロッティングを施行した。Akt のリン酸化が著明に抑制され、オートファジーマーカーである LC3-II が顕著に上昇している。

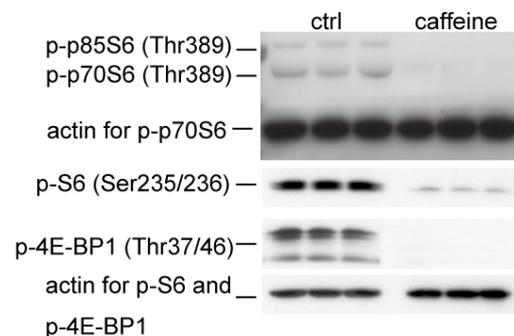


図 2 図 1 と同様の実験後、ウェスタンブロッティングを施行した p70S6、S6、4E-BP1 のリン酸化が著明に抑制されている。

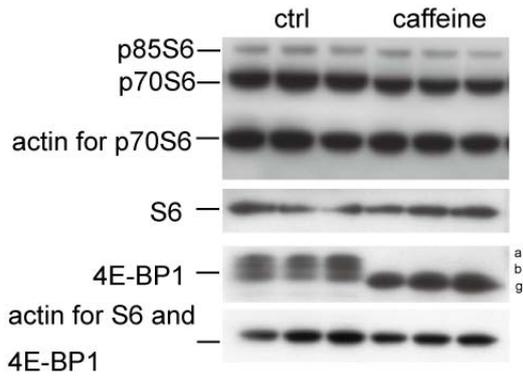


図3 図2の実験で使用した細胞抽出液を使用し、夫々の蛋白の総量を評価したが、どの蛋白量も変化を認めなかった。

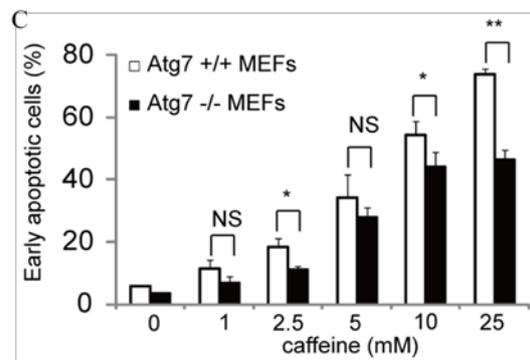


図4 Atg7^{-/-}および+/+MEFに各濃度のカフェインを加え、細胞表面のannexin V発現をFACSを用いて検討した。濃度依存的にearly apoptotic changeを呈する細胞が増加するが、Atg7^{+/+}MEFsにおいてより顕著に同現象が認められる。

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5件)

- ① Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7:176-87 (2011) 査読有
- ② Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of

PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol Dis* 41:111-8 (2011) 査読有

- ③ Kawajiri S, Machida Y, Saiki S, Sato S, Hattori N. Zonisamide reduces cell death in SH-SY5Y cells via an anti-apoptotic effect and by upregulating MnSOD. *Neurosci Lett* 481:88-91 (2010) 査読有
- ④ Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189:211-221 (2010) 査読有
- ⑤ 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* 584:1073-9 (2010) (*Joint first authors) 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 斉木臣二. Autophagic regulation by caffeine and its analogues. オートファジー研究会(2011年1月14日) ヤマハリゾートつま恋
- ② Sumihiro Kawajiri, Shinji Saiki, Shigeto Sato, Shigeru Yanagi, Nobutaka Hattori. Analysis of whether MITOL associates with the PINK1/parkin-mediated mitophagy. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and 10th Conference of Japanese Society for Mitochondrial Research and Medicine (J-mit) (16 Dec 2010) Fukuoka, Japan
- ③ 斉木臣二、河尻澄宏、佐藤栄人、今道洋子、服部信孝. PINK1, parkin, mitochondriaの相互作用の検討 第52回日本神経学会総会(2010年5月20日) 東京国際フォーラム
- ④ 河尻澄宏、斉木臣二、佐藤栄人、波田野琢、里史明、江口博人、服部信孝. 家族性パーキンソン病原因遺伝子PINK1のmitophagy調節機構について 第52回日本神経学会総会(2010年5月20日) 東京国際フォーラム
- ⑤ 斉木臣二、今道洋子、河尻澄宏、服部信孝. Caffeine regulates autophagy via mTOR signaling pathway. 第5回日本

ケミカルバイオロジー学会 (2010 年 5 月 18 日) 慶応義塾大学日吉キャンパス協生館

- ⑥ 河尻澄宏、斉木臣二、佐藤栄人、波田野琢、里史明、江口博人、服部信孝 家族性パーキンソン病原因遺伝子 *PINK1* の mitophagy 調節機構について 第 18 回 カテコールアミン研究会 (2010 年 4 月 24 日) 品川プリンスホテル

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉木 臣二 (Saiki Shinji)
順天堂大学・医学部・助手
研究者番号：00339996

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

服部 信孝 (Hattori Nobutaka)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：80218510

佐藤 栄人 (Sato Shigeto)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00445537

波田野 琢 (Hatano Taku)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：60338390

江口 博人 (Eguchi Hiroto)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：20380868

井本 正哉 (Imoto Masaya)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：60213253

谷田 以誠 (Tanida Isei)
国立感染症研究所主任研究員
研究者番号：30296868

松田 憲之 (Matsuda Noriyuki)
東京都臨床医学総合研究所研究員
研究者番号：10332272

小松 雅明 (Komatsu Masaaki)
東京都臨床医学総合研究所参事研究員
研究者番号：90356254

田中 啓二 (Tanaka Keiji)
東京都臨床医学総合研究所所長代行
研究者番号：10108871

天羽 拓 (Amo Taku)
防衛大学校応用化学群助教
研究者番号：40453922