

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790832

研究課題名（和文）パーキン遺伝子異常による病態と放出機構の関係の検討

研究課題名（英文）Parkin dysfunction results in defective depolarization-induced exocytosis

研究代表者

江口 博人 (EGUCHI HIROTO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20380868

研究成果の概要（和文）：

研究代表者江口は初代膵β細胞や初代培養皮質細胞を用いることで、*parkin* 遺伝子が細胞膜直下の細胞骨格蛋白重合化を調整し、放出機構調整蛋白(syntaxin1)との結合を亢進、放出阻害を行う可能性を示唆した。また、*parkin* 欠損マウスではインスリン分泌の有意な低下を OGTT 検査にて認めた。以上より *parkin* 遺伝子異常は膵β細胞や神経細胞において細胞骨格蛋白の形態異常を引き起こし、分泌障害を来す可能性が考えられた。これによりパーキンソン病の病態解明については治療法の開発が期待される。また、PARK2 患者は糖尿病を合併しやすい可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We reported that Parkin-deficient mice have shown impaired insulin exocytosis and neurotransmission by altered expression of proteins that are involved in the regulation of cytoskeleton polymerization. Interaction of cytoskeleton protein and syntaxin1 was increased in parkin-deficient mice brain. Parkin-deficient mice had impaired insulin exocytosis in OGTT. Parkin may play a role in cytoskeleton polymerization and neurotransmission and insulin exocytosis. Parkin may be associated with an increased risk of diabetes onset.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：パーキン、細胞骨格蛋白、放出機構、糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

*parkin*は現在までに多数の遺伝子変異が報告されており、家族性PDの原因遺伝子の

なかでもっとも多くを占める。また、同遺伝子ヘテロ変異がlate onsetの家族性PDや孤発性PDの発症のrisk factorとなり

うることが報告されており (Klein C et al. *Ann Neurol* 54:416-7, 2003)、parkinの機能は家族性のみならず孤発性PDの病態にも共通している可能性が推定される。parkinはPDの病態の解明に重要な鍵となると考える。Septin, actin等の細胞骨格蛋白は、filamentを形成し細胞膜の区画化、分泌細胞からの放出、神経細胞の軸索、樹状突起の形成や神経終末からの放出に関与する等の報告がある。

研究代表者は parkin と parkin の基質となり放出に関与する細胞骨格蛋白 (septin, actin) について synapse 終末に着目し検討する。

## 2. 研究の目的

パーキンソン病 (PD) は多因子疾患と考えられ病気の本質を絞り込むことは困難である。従って単一遺伝子異常で発症する家族性 PD の病態への approach が重要であり、これは孤発型 PD の病態解明につながる。近年、神経変性疾患の病態と小胞輸送・放出の関連性が報告され、更に予備実験より parkin 欠損マウスは dopamine のみならず insulin 放出にも異常があることが分かっている。本研究課題は insulin と catecholamine 含有小胞の共通性に基づき、insulin 放出機構の理解から dopamine 放出障害の機序に迫り、PD の病態を解明する。

## 3. 研究の方法

1. parkin欠損マウスの初代培養膵β細胞を用いて細胞膜上における分泌小胞の放出過程をTIRFMにて解析した。また、septin5, actinの発現、局在、構造の変化をTIRFM、免疫染色法を用いて検討した。

次にマウスのbrainを用いて、septin5とsynapse終末に存在する他の細胞骨格蛋白、膜蛋白との相互作用を免疫二重染色、免疫沈降法を用いて検討した。

2. parkin欠損マウスの初代培養膵β細胞にparkin遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV-parkin) を用いてparkinを強制発現させ、parkin発現低下による放出、septin5の局在、構造変化がrescueされるか検討した。
3. parkin欠損マウスの初代培養細胞を用いて神経終末におけるseptin, actinの局在を免疫染色にて検討する。
4. parkin欠損マウスのinsulin分泌不全、耐糖能異常を、OGTTを施行し検討する。

## 4. 研究成果

研究代表者江口はMEF細胞、初代膵β細胞において、全反射顕微鏡(以下TIRFM)を用いることで、parkin遺伝子の発現の有無により、細胞膜直下の細胞骨格蛋白であるseptin, actinの重合化を確認した(図1)。

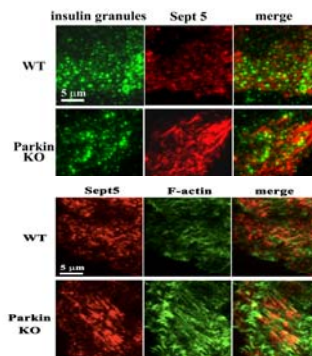


図1 ParkinKO β細胞 septin actin の細胞膜直下集積

また、細胞骨格蛋白は放出機構に重要な蛋白であり、TIRFを用いた解析にてインスリン分泌能の低下を確認した(図2)。

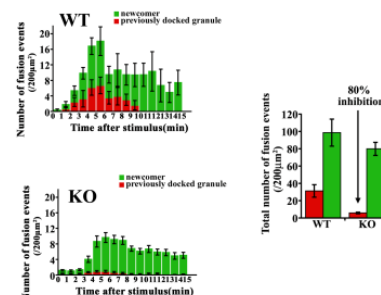


図2. ParkinKO β cell の docked vesicle の放出の阻害

この変化は parkin 欠損 mouse の  $\beta$  細胞に野生型 parkin を再発現させることで回復された。Mouse の brain においては、parkin 遺伝子の発現の有無により放出機構調整蛋白である SNARE 蛋白 (syntaxin1) と septin, actin の結合に有意な差が認められ、放出が阻害されている可能性が示唆された。また、parkin 欠損 mouse の初代培養皮質細胞を用いて神経細胞体や神経突起内の actin の凝集の亢進を認めた(図 3)。

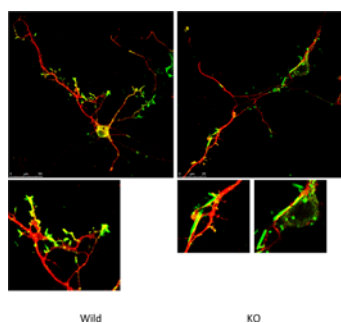


図 3. Actin-cofilin の凝集

OGTT による parkin 欠損マウスの耐糖能、insulin 分泌能を検討したところ、parkin 欠損マウスでは耐糖能の有意な低下が認められた(図 4)。

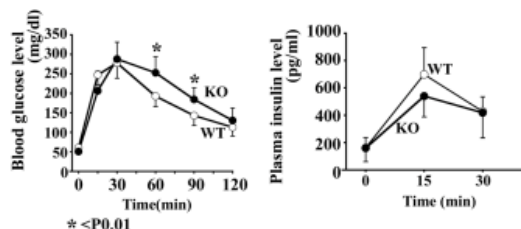


図 4 ParkinKO OGTT

以上より parkin 遺伝子異常は膵臓  $\beta$  細胞や神経細胞において細胞骨格蛋白の形態異常を引き起こし、insulin 分泌不全、神経伝達障害を来すことが考えられた。PARK2 患者は糖尿病を合併しやすい可能性が考えられた。

## 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 3 件)

①Hattori N, Eguchi H, Imaizumi M, Saiki S, Sato S, Nagamatsu S. Rinsho Shinkeigaku. 2011 Nov;51(11):986-7 査読有

②Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S, Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F, Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H, Shen J, Hattori N. Neurobiol Dis. 2011 Sep;43(3):651-62. Epub 2011 May 30. 査読有

③Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Sato F, Hatano T, Eguchi H, Hattori N. FEBS Lett. 2010 Mar 19;584(6):1073-9. Epub 2010 Feb 12. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

①江口 博人、第 52 回神経学会総会、Parkin ノックアウトマウスにおける分泌機構の検討、2011 年 5 月 19 日名古屋国際会議場

②江口 博人、Parkin ノックアウトマウスにおける分泌機構の検討、第 5 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgress、2011 年 10 月 6 日、東京国際フォーラム

③江口 博人、Parkin 遺伝子異常による病態と放出機構の関係の検討、第 51 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江口 博人、Parkin 遺伝子異常による病態と放出機構の関係の検討、第 4 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgress、2010 年 10 月 9 日、京都ホテルオークラ

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口博人(EGUCHI HIROTO)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：20380868