

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3月31日現在

機関番号：82723

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790841

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ミトコンドリア・ミトファジー機能異常の解明

研究課題名（英文） The role of mitochondrial dysfunction and mitophagy in the cellular model of familial Parkinson's disease.

研究代表者

天羽 拓 (AMO TAKU)

防衛大学校・応用科学群・助教

研究者番号：40453922

研究成果の概要（和文）：家族性パーキンソン病原因遺伝子の一つである PINK1 遺伝子欠損マウス胎仔由来線維芽細胞では、ミトコンドリア機能に異常があり、ミトコンドリア膜電位が野生型と比較して低下していた。Modular Kinetic Analysis によりミトコンドリア機能を定量化することで、膜電位低下の原因がプロトンリークによるものではなく呼吸鎖機能の低下によるものであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In PINK1-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs), mitochondrial membrane potential and cellular ATP levels were decreased compared with those in littermate wild-type MEFs. However, mitochondrial proton leak, which reduces membrane potential in the absence of ATP synthesis, was not altered by loss of PINK1. Instead, activity of the respiratory chain, which produces the membrane potential by oxidizing substrates using oxygen, declined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	900,000	0	900,000
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：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：パーキンソン病・ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

孤発性パーキンソン病は、100-120 人/10 万人の高い頻度を示す神経変性疾患であり、疾患の進行抑制を含む根本的な治療法は存在しない。人口の高齢化に伴いその患者数は増加し、発症機序の解明や治療法の開発が強

く求められている。家族性パーキンソン病原因遺伝子の中でも parkin と PINK1 が、ミトコンドリア機能不全やミトファジーに関与していることが指摘されていた。

2. 研究の目的

本研究では、家族性パーキンソン病原因遺伝子の一つである PINK1 遺伝子欠損マウスより得たマウス胎仔由来線維芽細胞 (MEFs) をパーキンソン病モデル細胞とし、この細胞のミトコンドリア機能・ミトファジー調節機能を解析し、病態との関連を検討、その意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PINK1 欠損細胞 (PINK1 $-/-$ MEFs) とそのコントロール細胞 (PINK1 $+/+$ MEFs) のミトコンドリア機能を細胞レベル (細胞増殖、ATP レベル、ミトコンドリア膜電位の定量など) および単離ミトコンドリアを用いて (Modular Kinetic Analysis、活性酸素発生量など) 詳細に評価した。

4. 研究成果

細胞のエネルギー獲得を解糖系ではなくミトコンドリアの酸化的リン酸化に依存した条件で細胞を培養すると、PINK1 欠損細胞で顕著な生育阻害が認められた (図1)。また、PINK1 欠損細胞ではコントロール細胞に比べ、細胞の ATP 量が有意に少なく、ミトコンドリア膜電位も低いことから、PINK1 欠損によりミトコンドリア機能が低下していることが明らかとなった。

さらに詳細な解析を実施するために、細胞からミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア酸化的リン酸化反応の全体の動態を解析する手法である Modular Kinetic Analysis を実施した。酸化的リン酸化反応を3つのモジュール (基質酸化、プロトンリーク、ATP 合成) に分け、各モジュールの動態を酸素消費と膜電位を同時に測定することで定量した (図2)。その結果、PINK1 欠損によるミトコンドリア膜電位の低下は、ATP 合成を伴わないで膜電位を消費するプロトンリークにはよらず、膜電位をつくり出す呼吸鎖機能 (基質酸化のモジュール) の低下によるものであることが明らかとなった。

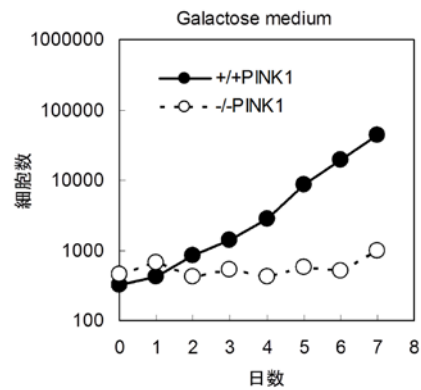
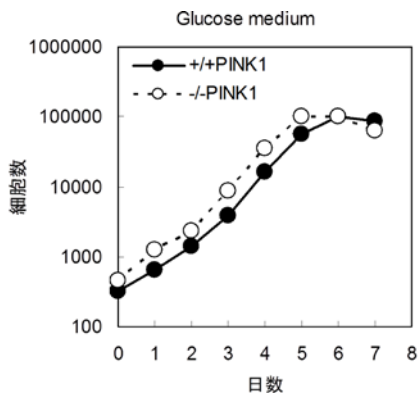


図1 酸化的リン酸化依存性なガラクトース培地において PINK1 欠損細胞の顕著な生育阻害が認められた。

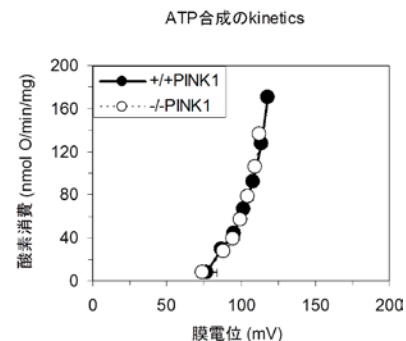
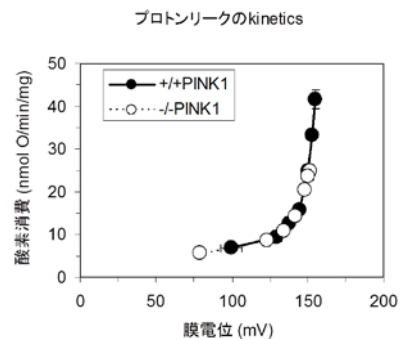
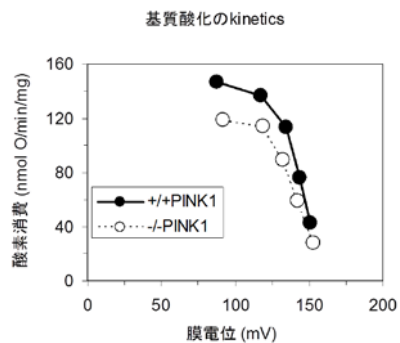


図2 ミトコンドリア酸化的リン酸化反応の3つのモジュールのうち基質酸化にのみ変化が認められた。

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6件)

- ① Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Nakashima-Kamimura N, Wolf AM, Amo T, Ohta S, Katsumata Y, Fukuda K, Ishiwata K, Suematsu M, Adachi T. Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific mitochondrial proteins of the electron transport chain. *Circulation Research* 109:396-406 (2011) 査読有
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243097
- ② Toyomizu M, Kikusato M, Kawabata Y, Azad MA, Inui E, Amo T. Meat-type chickens have a higher efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation than laying-type chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 159:75-81 (2011) 査読有
DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.01.020
- ③ Chihara N, Amo T, Tokunaga A, Yuzuriha R, Wolf AM, Asoh S, Suzuki H, Uchida E, Ohta S. Mitochondrial DNA alterations in colorectal cancer cell lines. *Journal of Nippon Medical School* 78:13-21 (2011) 査読有
DOI: 10.1272/jnms.78.13
- ④ 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. *Neurobiology of Disease* 41:111-118 (2011) 査読有
DOI: 10.1016/j.nbd.2010.08.027
- ⑤ Azad MA, Kikusato M, Sudo S, Amo T, Toyomizu M. Time course of ROS production in skeletal muscle

mitochondria from chronic heat-exposed broiler chicken.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology 157:266-271 (2010) 査読有
DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.07.011

- ⑥ Kikusato M, Ramsey JJ, Amo T, Toyomizu M. Application of modular kinetic analysis to mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of birds exposed to acute heat stress. *FEBS Letters* 584:3143-3148 (2010) 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2010.05.057

[学会発表] (計8件)

- ① Amo T, Sato S, Saiki S, Kikusato M, Kawabata Y, Toyomizu M, Gautier C, Shen J, Ohta S, Hattori N, Brand MD. Modular kinetic analysis as a powerful tool for investigation of mitochondrial bioenergetics.
第5回アジア酸化ストレス学会年会・第8回アジアミトコンドリア学会年会・第11回日本ミトコンドリア学会年会 合同大会 (2011年9月2日) 鹿児島市民文化ホール (鹿児島県)
- ② 佐藤栄人、天羽拓、斉木臣二、Wolf AM、豊水正昭、Gautier CA、Shen J、太田成男、服部信孝。
PINK1 ノックアウト MEF のミトコンドリア機能解析。
第52回日本神経学会学術大会 (2011年5月18日) 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ③ 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.
The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine and the 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine. (2010年12月16日) Fukuoka International Congress Center

- ④ 天羽拓、佐藤栄人、斉木臣二、Wolf AM、豊水正昭、Gautier CA、Shen J、太田成男、服部信孝。
Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects.
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010 年 12 月 7-8 日) 神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ⑤ 豊水正昭、喜久里基、川端雄亮、Azad MAK、乾恵理子、天羽拓
肉用鶏のミトコンドリア酸化的リン酸化効率は産卵鶏より良い
日本家禽学会 2010 年度秋季大会 (2010 年 9 月 15 日) 信州大学農学部 (長野県)
- ⑥ Toyomizu M, Kikusato M, Amo T, Azad MAK.
Mitochondrial energetics and ROS production in chicken skeletal muscle: application of modular kinetic analysis. 3rd EAAP International Symposium of Energy and protein metabolism and nutrition. (2010 年 9 月 6-10 日) Parma, Italy
- ⑦ Shinmura K, Yae K, Tamaki K, Sano M, Katsumata Y, Ishiwata K, Adachi T, Kamimura N, Wolf AM, Amo T, Ohta S. Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating mitochondrial proteins.
第 1 回 Molecular Cardiovascular Conference II. (2010 年 9 月 4 日) キロロ (北海道)
- ⑧ Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Kamimura N, Wolf AM, Amo T, Ohta S. Dose-dependent effects of resveratrol on mitochondrial function and myocardial ischemia/reperfusion injury.
20th World congress of the International Society for Heart Research. (2010 年 5 月 14 日) Kyoto International Conference Center (京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天羽 拓 (AMO TAKU)
防衛大学校・応用科学群・助教
研究者番号：40453922

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし