

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82723

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790903

研究課題名(和文)パーキンソン病遺伝子PINK1の分解酵素PARLによるミトコンドリア品質管理

研究課題名(英文)Mitochondrial dysfunction in familial Parkinson's disease.

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・応用科学群・助教)

研究者番号：40453922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア機能低下は孤発性および家族性パーキンソン病の特徴の一つである。本研究では、家族性パーキンソン病原因遺伝子PINK1欠損によるミトコンドリア機能低下の詳細な解析を行った。その結果、呼吸鎖複合体のComplex I活性低下などを明らかにした。一方、新たなパーキンソン病原因遺伝子としてCHCHD2が報告された。本研究では、CHCHD2遺伝子産物がミトコンドリア膜間腔に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dysfunction is a hallmark of both idiopathic and familial Parkinson's disease (PD). In this study, detailed analysis of mitochondrial dysfunction caused by loss of PINK1 revealed both of mitochondrial Complex I and III deficiencies. Recently, CHCHD2 was identified as a novel causative gene in mendelian forms of Parkinson's disease. In this study, it was shown that CHCHD2 was localized in mitochondrial intermembrane space.

研究分野：生化学

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

(1) 古くからミトコンドリアの機能低下がパーキンソン病発症の一因と考えられている。家族性パーキンソン病原因遺伝子産物の一つである PINK1 は、parkin と共に膜電位の低下したミトコンドリアを選択的に分解するミトファジーに参与していることが明らかになりつつあった。当初我々は、PINK1 欠損によるミトコンドリア膜電位の低下は、プロトンリークの増加ではなく呼吸鎖機能の低下によるものであること明らかにしていた。

(2) 一方、本研究期間中に共同研究先のグループが新規の家族性パーキンソン病原因遺伝子として CHCHD2 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2) を同定した。一次構造や文献情報などからミトコンドリア機能との関連が予測されたので、本研究では研究対象を新規原因遺伝子の CHCHD2 にシフトした。

2. 研究の目的

(1) PINK1 欠損による呼吸鎖機能低下の詳細を解析することで、パーキンソン病の病態および発症機序の一端を明らかにする。

(2) 新規パーキンソン病原因遺伝子の産物 CHCHD2 とミトコンドリア機能との関連を調べ、細胞内における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PINK1 欠損マウス胚性線維芽細胞 (PINK1^{-/-} MEFs) およびそのコントロール細胞 (PINK1^{+/+} MEFs) のミトコンドリア呼吸鎖の各複合体酵素活性を分光学的手法により測定した。さらに各複合体のタンパク量を Blue Native PAGE により解析した。

(2) CHCHD2 の発現量が比較的多かったヒト神経芽細胞腫 SN-K-SH の細胞分画を行い、Western blotting 法により CHCHD2 の細胞内局在を調べた。さらに単離したミトコンドリアをトリプシン処理し、CHCHD2 のミトコンドリア内局在を調べた。

4. 研究成果

(1) PINK1 欠損による呼吸鎖機能低下に関して以下に記載する事項を明らかにした。

ミトコンドリア呼吸鎖の各複合体酵素活性測定により、PINK1 欠損細胞において Complex I と Complex III の活性が顕著に低下していたことがわかった (図 1)。

Blue Native PAGE により、PINK1 欠損細胞において特に Complex I と Complex III のタンパク量が低下していたことが判明した (図 2)。

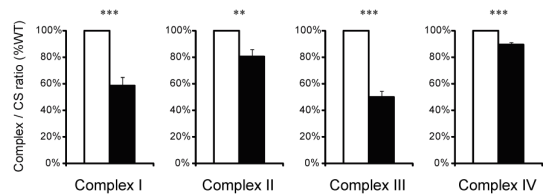


図 1 呼吸鎖複合体の酵素活性 (PINK1^{+/+} MEFs, PINK1^{-/-} MEFs)

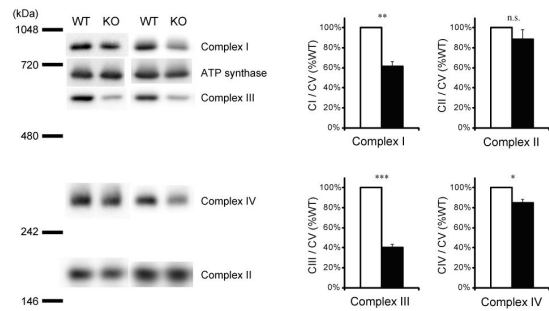


図 2 呼吸鎖複合体のタンパク量 (PINK1^{+/+} MEFs, PINK1^{-/-} MEFs)

(2) CHCHD2 の細胞内局在に関して以下に記載する事項を明らかにした。

SN-K-SH 細胞分画により、CHCHD2 は主にミトコンドリア画分に局在していた (図 3)。

SN-K-SH 細胞より単離したミトコンドリアをトリプシン処理することで、CHCHD2 がミトコンドリアの外膜と内膜の間、つまり膜間腔に局在していることが判明した (図 4)。

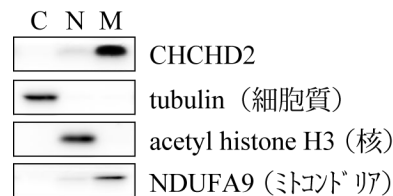


図 3 CHCHD2 の細胞内局在 (C: 細胞質画分, N: 核画分, M: ミトコンドリア画分)

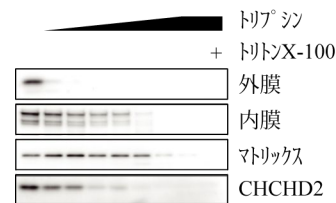


図 4 CHCHD2 のミトコンドリア内局在 (単離ミトコンドリアのトリプシン処理)

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)

- (1) Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. CHCH2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol.* 14: 274-282 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70266-2.
- (2) Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, Hattori N. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. *Neurosci. Lett.* 580: 37-40 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2014.07.045.
- (3) Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsuki Y, Ishido S, Kudo Y, McBride HM, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. MITOL Regulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts via Mitofusin2. *Mol. Cell* 51: 20-34 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.04.023.

〔学会発表〕(計13件)

- (1) 栗谷川あんな, 喜久里基, 白川仁, 天羽拓, 豊水正昭. 寒冷曝露下の鶏における骨格筋 FNDC5/Irisin 発現と脂肪組織 avUCP 発現の連関. 第119回日本畜産学会大会(平成27年3月27~30日)宇都宮大学峰キャンパス(栃木県)
- (2) 船山学, 大江賢治, 天羽拓, 古屋徳彦, 山口隼司, 斉木臣二, 李元哲, 大垣光太郎, 安藤真矢, 吉野浩代, 富山弘幸, 西岡健弥, 長谷川一子, 齋木英資, 佐竹涉, 茂柳薫, 佐々木良元, 小久保康昌, 葛原茂樹, 戸田達史, 水野美邦, 内山安男, 大野欽司, 服部信孝. 常染色体優性遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子単離. 第49回日本運動障害研究会(平成27年1月17日)大日本住友製薬(株)東京本社(東京都)
- (3) 天羽拓, 宮本哲也, 上村尚美, 浅野弘匡, 麻生定光, 太田成男. 抗がん剤感受性を悪化させるミトコンドリアDNAのD-loop領域変異. 第37回日本分子生物

学会年会(平成26年11月25~27日)
パシフィコ横浜(神奈川県)

- (4) 天羽拓, 宮本哲也, 上村尚美, 浅野弘匡, 麻生定光, 太田成男. 抗がん剤感受性を悪化させるミトコンドリアDNAのD-loop領域変異. 第87回日本生化学会大会(平成26年10月15~18日)京都国際会館(京都府)
- (5) Amo T, Miyamoto T, Kamimura N, Asoh S, Ohta S. A somatic mutation of mitochondrial DNA confers resistance against an anti-cancer drug. 9th International Meeting on Mitochondrial Pathology (Euromit 2014)(平成26年6月15~19日)Tampere, Finland.
- (6) 河村美巴子, 斉木臣二, 古屋徳彦, 今道洋子, 天羽拓, 矢野浩二郎, 服部信孝. PINK1, parkin 過剰発現による細胞保護的な mitophagy の亢進が apoptosis を誘導する. 第55回日本神経学会学術大会(平成26年5月21~24日)福岡国際会議場(福岡県)
- (7) 田邊拓也, 喜久里基, 天羽拓, 豊水正昭. ピロロキノリンキノン(PQQ)の添加が単離鶏ミトコンドリアの呼吸機能に及ぼす影響. 第118回日本畜産学会大会(平成26年3月26~29日)つくば国際会議場(茨城県)
- (8) Amo T, Miyamoto T, Kamimura N, Asoh S, Ohta S. A somatic mutation of mitochondrial DNA confers resistance against an anti-cancer drug. International Symposium on Mitochondria 2013(平成25年11月6~7日)Tokyo, Japan.
- (9) Amo T, Sawayama T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Ichimura T, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria(平成25年10月28日~11月1日)Okinawa, Japan.
- (10) 河村美巴子, 斉木臣二, 古屋徳彦, 今道洋子, 天羽拓, 矢野浩二郎, 服部信孝. PINK1/parkin 過剰発現による mitophagy と apoptosis の誘導作用について. 第54回日本神経学会学術大会(平成25年5月29日~6月1日)東京国際フォーラム(東京都)

- (11) Kawamura M, Saiki S, Furuya N, Imamichi Y, Amo T, Yano K, Hattori N. Excess of PINK1/parkin-mediated mitophagy induces apoptosis via various caspases activation. 6th International Symposium on Autophagy (平成 24 年 10 月 28 日~11 月 1 日) Okinawa, Japan.
- (12) 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. European Bioenergetics Conference 2012 (平成 24 年 9 月 15~20 日) Freiburg, Germany.
- (13) 天羽拓. 家族性パーキンソン病原因遺伝子 PINK1 欠損によるミトコンドリア膜電位低下はプロトンリークではなく呼吸鎖機能低下のためである. 認知症研究を知る若手研究者の集まり (主催: 日本認知症学会) (平成 24 年 8 月 18~19 日) あいち健康プラザ (愛知県)

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