

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32620  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26860219  
研究課題名(和文) 生体神経組織のマイトファジーイメージング法の樹立とその応用  
  
研究課題名(英文) Establishment of mitophagy imaging method  
  
研究代表者  
井下 強 (Inoshita, Tsuyoshi)  
  
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  
  
研究者番号：20601206  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患パーキンソン病(PD)の原因遺伝子PINK1, Parkinの神経における機能をショウジョウバエモデルにより解析した。組織染色、生体イメージングにより神経細胞におけるミトコンドリア形態や神経活動におけるPINK1, Parkinの機能を解析したところ、Parkinの過剰な活性によりミトコンドリアの形態異常が生じ、Parkinの活性化異常によりドーパミン神経の神経活動が低下し、細胞死が誘導された。この結果から、神経機能・生存におけるPINK1, Parkinを介したミトコンドリア機能制御の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Neural function of Parkinson's disease causative genes, PINK1 and Parkin were analyzed by using Drosophila model. Molecular genetical methods, immunostaining and live imaging showed that abnormal activity of Parkin affect accumulation of mitochondria in dopamine neurons. Neural activity were decreased by up-/down-regulation of Parkin activity and neural cell death were occurred. These results suggested that PINK1, Parkin mediated mitochondria clearance mechanisms is important for neural activity and viability.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 神経科学 シナプス小胞 Vps35

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化が進む本邦では、加齢により発症リスクが増すパーキンソン病(以下 PD)の発症機序解明が強く求められている。既に遺伝性 PD 家系から、20 個以上の原因遺伝子が同定されており、その機能解析が進められている。原因遺伝子には、ミトコンドリア機能維持や細胞内小胞輸送に関わるものが多く含まれている。ミトコンドリア機能維持や小胞輸送機構は、多様な組織・細胞に共通した機構であるが、パーキンソン病の主徴は、中脳黒質ドーパミン神経特異的な変性・脱落であるため、神経特異的な生理機能における PD 遺伝子の機能解析が求められている。

PD 原因遺伝子 PINK1 や Parkin は、共にミトコンドリア機能維持に重要な働きを持つ。加齢や環境要因、遺伝子変異などでミトコンドリアの機能低下やミトコンドリアストレスがかかると、活性酸素が生じ、異常ミトコンドリアが生じる。PINK1, Parkin は異常ミトコンドリアを除去する機構・マイトファジーを制御していることから、PINK1, Parkin の異常によりマイトファジーが正確に行われなくなり、細胞の機能異常や細胞死が誘導されると考えられる。しかし、マイトファジーの研究の多くは、培養細胞を用いて行われており、神経細胞におけるミトコンドリア機能維持機構に関する知見は乏しい。また、ミトコンドリア機能は、神経活動においても重要であると考えられているが、PINK1, Parkin の異常と神経機能の異常の関連は、詳細には解明されていない。

また、ミトコンドリアの機能維持には、物質輸送機構も重要であり、PD 遺伝子 LRRK2 や Vps35 と PINK1, Parkin の遺伝的相関も報告されていることから、小胞輸送における PINK1, Parkin の機能解析も PD 病態機序の理解には重要となる。

組織・細胞特異的な機能解析には、生体を用いた実験が重要になることから、近年の PD 研究においては、任意の遺伝子発現制御が比較的容易で、世代時間や寿命の短さから加齢依存的な表現型の解析が短時間で可能なショウジョウバエモデルの利用が広がっている。そこで、本研究では、ショウジョウバエモデルを利用し、神経機能におけるミトコンドリア機能や小胞輸送における PD 原因遺伝子、PINK1, Parkin の機能解析を進めた。

### 2. 研究の目的

PINK1, Parkin 欠失ハエや発現抑制ハエを用いて、神経細胞におけるミトコンドリアの異常と神経活動の異常を解析することで、神経における PINK1, Parkin を介したミトコンドリア機能制御機構とそれに関連した神経機能の解明を試みた。

(1) ドーパミン神経におけるミトコンドリアの機能制御における PINK1, Parkin の機能解明。PINK1 による Parkin の活性化が異常ミトコンドリア除去機構に重要と考えら

れている。そこで、Parkin の不活性化型や活性化型を発現させ、ドーパミン神経におけるミトコンドリア機能を解析する。PINK1 や Parkin の欠失がミトコンドリア形態異常を起こすことは既に報告されているため、ドーパミン神経におけるミトコンドリア形態観察から、PINK1, Parkin の神経細胞ミトコンドリア機能制御への関与を解析する。

(2) PINK1, Parkin を介した神経活動制御機構の解明。神経活動には ATP が必要である。また、カルシウム濃度の変化が神経活動制御において重要であるが、ミトコンドリアは、細胞内カルシウム濃度制御も担っていることから、PINK1, Parkin の異常が神経活動の異常を誘導することが容易に推察できる。そこで、生体内の神経活動を可視化・数値化する手法を樹立し、神経生理的な PINK1, Parkin の機能を解析する。

### 3. 研究の方法

PINK1, Parkin の欠失ハエや発現調節(発現抑制・過剰発現)ハエは、既に作製されており、利用可能であったため、それらのハエを組み合わせ、任意の細胞で発現調節や活性制御を行った。

(1) ミトコンドリアの形態観察のため、蛍光タンパク質 GFP をミトコンドリアに局在させ、共焦点顕微鏡を利用することで、ドーパミン神経のミトコンドリア形態を観察した。分子遺伝学的手法によりドーパミン神経特異的に任意の遺伝子を発現可能な TH-Gal4 ハエと Parkin の不活性化型 Parkin SA 又は、活性型 Parkin SE、野生型 Parkin WT のいずれかを発現可能な UAS-Parkin SA, SE, WT ハエを交配させることで、ドーパミン神経だけで Parkin SA, SE, WT の発現誘導が可能である。内在性の Parkin を持つハエや Parkin 欠失ハエのドーパミン神経に Parkin SA, SE, WT とミトコンドリアに局在する GFP(mito-GFP)を発現させ、ドーパミン神経に対する免疫染色と組み合わせでドーパミン神経におけるミトコンドリア形態を観察した。

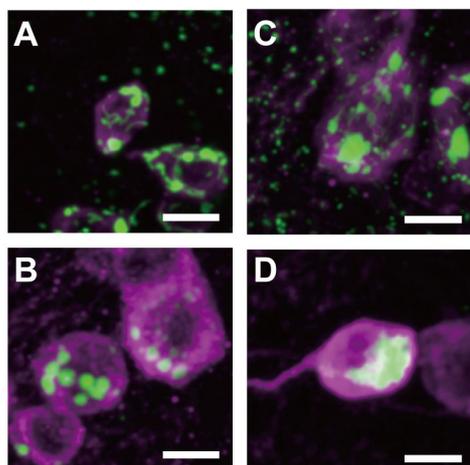
(2) PINK1, Parkin の発現調節が神経機能に与える影響を調べるため、シナプス分泌依存的に蛍光強度変化を生じる VMAT-pHluorin を利用し、神経分泌能を解析した。VMAT-pHluorin は、神経活動による神経伝達物質の分泌時に蛍光強度が上昇する。神経細胞は、自発的に活動しているため、VMAT-pHluorin をドーパミン神経で発現させ、解剖した脳の蛍光強度変化を計測することで自発的な神経活動を数値化できる。VMAT-pHluorin と Parkin SA, SE, WT のいずれかを共発現させ、蛍光強度を計測することで、Parkin の活性化と神経活動の相関を解析した。

(3) 神経活動を詳細に調べるため、幼虫神経筋接合部からの電気生理学的記録設備の樹立を試みた。ショウジョウバエでは、神経筋接合部に電極を刺し、運動神経の軸索に電気刺激を与えることで、神経活動を電気生理学

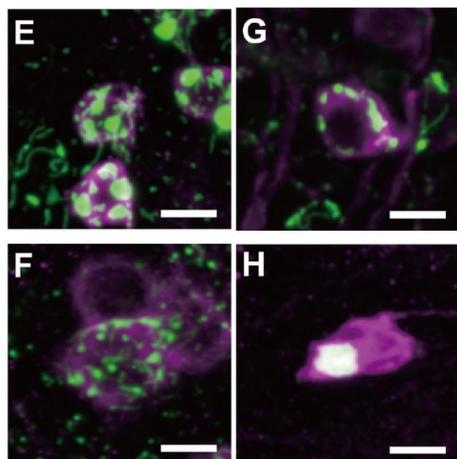
的に記録可能である。刺激条件を任意に制御することで、神経活動を担うシナプス小胞の動態を詳細に解析可能である。そこで、電気生理学的記録を可能とするため、機器の設置と、詳細な解析のための刺激条件の決定を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 内在性の PINK1 と Parkin がある状態でドーパミン神経 (図マゼンタ) 特異的に Parkin WT (図 B), SA (図 C), SE (図 D) を発現させるとコントロール (図 A) では、細いチューブ状のミトコンドリアが観察できたが、WT, SE 発現ハエではチューブ状のミトコンドリアが消失していた。特に、SE 発現ハエでは大きなミトコンドリアの凝集が生じており、ミトコンドリアの分割機構が正常に働いていないと考えられる。一方、SA 発現ハエはコントロールと違いは無いことから、活性のある Parkin の増加がミトコンドリアの異常を誘導していると考えられた。



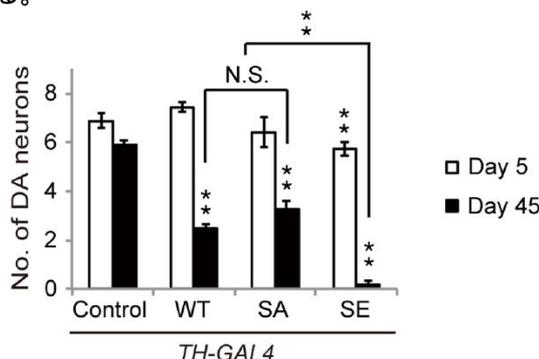
そこで、PINK1 欠失ハエ (PINK1<sup>-/-</sup>) を使い、内在性や Parkin WT が活性を持たない状態でミトコンドリアを観察したところ、WT (図 F), SA (図 G) はコントロール (図 E) と同様のチューブ状のミトコンドリアが観察できたが、SE (図 H) では大きな凝集ミトコンドリアが観察された。



以上の結果から、ドーパミン神経においても、PINK1 が Parkin の活性を制御しており、過剰な活性化がミトコンドリアの異常を誘導す

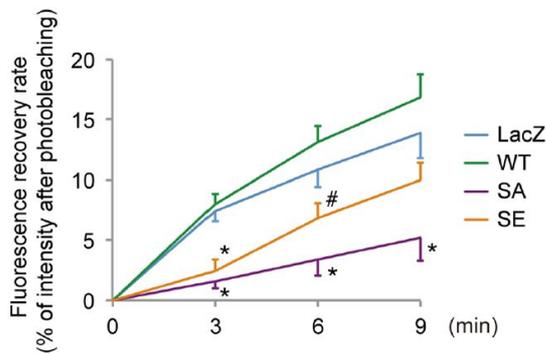
ることが示唆された。異常ミトコンドリアの除去には、異常ミトコンドリアを正常ミトコンドリアから切り離す機構が重要であるが、Parkin の活性異常は、こうした異常ミトコンドリア切り離しの異常を起こすと考えられる。また、細胞体の周囲には、軸索や樹状突起内のミトコンドリアが存在するが、Parkin が過剰な活性を持っているハエでは、軸索や樹状突起のミトコンドリアが観察できなかったことから、ミトコンドリアをシナプス終末に送る軸索輸送に異常が生じている可能性も考えられる。

さらに、ドーパミン神経の数を調べた結果 (下図) 5日齢では Parkin の活性が異なっても細胞数に差は無かったが、45日齢では、Parkin の過剰な活性を持つハエでは、有意なドーパミン神経の減少が見られた。興味深いことに、Parkin SA の発現では、ミトコンドリア形態には異常が生じていなかったが、細胞死は誘導されており、活性を持たない Parkin が存在することが、ドーパミン神経の生存に有害であることが示された。PINK1 や Parkin の病原性変異では PINK1 や Parkin が機能を喪失していると考えられるため、Parkin SA 発現ハエで起きたドーパミン神経細胞死が誘導されている可能性が考えられる。

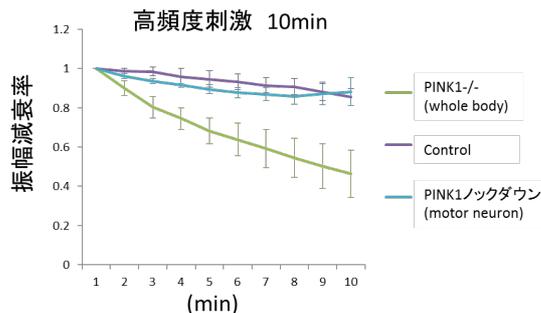


(2) 次いで、ドーパミン神経の神経活動に対する Parkin の活性が与える影響を解析した。ドーパミン神経で VMAT-pHluorin と Parkin SA, SE, WT を発現させたところ、SE 発現ハエでは、VMAT-pHluorin の発現量が減少していた。VMAT-pHluorin はシナプス小胞に局在する蛍光タンパク質であるため、その減少はシナプス小胞が減少している可能性を示している。さらに、自発的神経活動を計測するため、高出力のレーザーにより一時的に蛍光を消失させ、その後の蛍光回復率からシナプス分泌能を計測したところ (下図)、SE, SA 発現ハエのシナプス分泌能は有意に低下していた。この結果は、Parkin の活性が過剰でも不活性状態でも神経活動を低下させることを示している。

以上の結果から、PINK1, Parkin による正常な Parkin の活性化制御が、ミトコンドリアの形態制御に重要であり、かつ神経機能制御や生存にも重要であることが明らかになった。



(3) 幼虫神経筋接合部からの神経活動記録装置の設置と記録法の樹立。PINK1, Parkin が、ドーパミン神経のミトコンドリア機能維持に重要であることが上記の実験から示され、さらに神経活動にも影響することが明らかになったことから、より詳細な神経活動解析法の利用が求められた。そこで、幼虫神経筋接合部からの電気生理学的神経活動記録に必要な機器の設置を行い、刺激条件を検討した。PINK1 欠失ハエの幼虫神経筋接合部では、自発的神経活動や電気刺激に対する応答には異常がなく、高頻度刺激に対する応答低下が報告されている。そこで、PINK1 欠失ハエ (PINK1<sup>-/-</sup>) に高頻度刺激を行ったところ有意な神経活動の低下が生じていた(下図)。しかし、運動神経特異的に PINK1 のノックダウンを行っても、十分な振幅低下は生じていなかった。このことから、PINK1 欠失ハエにおける振幅低下は、受容側である筋肉の機能異常が原因の可能性が高い。今後は、PINK1 で見られる神経活動異常の原因部位の特定とその異常を Parkin の活性化やミトコンドリアの機能回復により回復できるかを調べ、ミトコンドリア機能異常と神経機能異常を繋ぐ機構における PINK1, Parkin の機能解析を進めていく。



本研究から、生体における PINK1, Parkin の活性とミトコンドリア機能、神経機能の関連が明らかになった。興味深いことに、活性を持たない Parkin SA の発現は、ミトコンドリア形態には異常を生じていなかったが、神経機能や生存には有害であり、ミトコンドリア形態以外の神経特異的な機能において、PINK1, Parkin を介在した制御機構がある可能性を示唆している。また、ミトコンドリア機能異常と神経分泌能の相関を示した点でも PD 患者の生体内で起きている現象の理解に貢献すると考えられる。また、本研究で用いた神経機能の解析法は、他の PD 遺伝子の

機能解析においても応用可能であり、PD 研究に幅広く寄与すると考えられる。今後は、より神経特異的な機能に注目し、PD 関連遺伝子の機能解析を進めていく予定である。

#### 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 6 件)

1. Tsuyoshi Inoshita, Taku Arano, Yuka Hosaka, Hongrui Meng, Yujiro Umezaki, Sakiko Kosugi, Takako Morimoto, Masato Koike, Hui-Yun Chang, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori, **Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in *Drosophila***. Human Molecular Genetics, in press. 2017, DOI: 10.1093/hmg/ddx179.
2. Tsuyoshi Inoshita, Yuzuru Imai: Regulation of vesicular trafficking by Parkinson's disease-associated genes. **AIMS Molecular Science**. 2: 461-475. 2015, DOI: 10.3934/molsci.2015.4.461.
3. Yuzuru Imai, Yoshito Kobayashi, Tsuyoshi Inoshita, Hongrui Meng, Taku Arano, Kengo Uemura, Takeshi Asano, Kenji Yoshimi, Chang-Liang Zhang, Gen Matsumoto, Toshiyuki Ohtsuka, Ryoichiro Kageyama, Hiroshi Kiyonari, Ryosuke Takahashi: The Parkinson's disease-associated protein kinase LRRK2 modulates Notch signaling through the endosomal pathway. **PLoS Genetics**. 11: e1005503, 2015, Sep. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005503.
4. Kahori Shiba-Fukushima, Taku Arano, Gen Matsumoto, Tsuyoshi Inoshita, Shigeharu Yoshida, Yasushi Ishihama, Kwon-Yul Ryu, Nobuyuki Nukina, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai: Phosphorylation of Mitochondrial

Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. **PLoS Genetics**. 10: e1004861, 2014, Dec. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004861.

5. Kahori Shiba-Fukushima, Tsuyoshi Inoshita, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai: Lysine 63-linked polyubiquitination is dispensable for Parkin-mediated mitophagy. **Journal of Biological Chemistry**. 289:33131-6, 2014, Nov. DOI: 10.1074/jbc.C114.580944.

[学会発表](計 5 件)

1. 井下 強、荒野 拓、穂坂 有加、孟 紅蕊、梅崎 勇次郎、小杉 紗紀子、森本 高子、小池 正人、Hui-Yun Chang、今居 讓、服部 信孝: **パーキンソン病原因遺伝子の一部は、シナプス小胞動態を制御する**。第 39 回分子生物学会年会、2016, 12 月・ポスター、横浜
2. Tsuyoshi Inoshita, Yuka Hosaka, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori, **Synaptic vesicle dynamics are regulated by Parkinson's disease-associated proteins Vps35 and LRRK2**. 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016, 5 月・口頭発表、京都
3. Tsuyoshi Inoshita, Changxu Cui, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori, **Synaptic vesicle dynamics are regulated by a subset of Parkinson's disease genes**. 第 39 回日本神経科学大会、2016, 7 月・口頭発表、横浜
4. Tsuyoshi Inoshita, Yuka Hosaka, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori: **Parkinson's disease-associated proteins Vps35 and LRRK2 regulate synaptic vesicle dynamics**. 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015, 7 月、新潟
5. 井下 強、穂坂 有加、梅崎 勇次郎、服部 信孝、今居 讓: **パーキンソン**

**病原因遺伝子産物 Vps35 と LRRK2 は、小胞輸送と神経分泌を制御する**。第 37 回日本分子生物学会年会, 2014, 11 月、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井下 強 (INOSHITA, Tsuyoshi)

順天堂大学医学研究科・助教

研究者番号: 20601206