

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14708

研究課題名(和文) マイトファジーにおけるParkinの基質選択性とオルガネラ間膜蛋白質輸送の解析

研究課題名(英文) Substrate specificity of Parkin and the membrane protein communication between organelles.

研究代表者

小谷野 史香 (KOYANO, Fumika)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：50747681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1) Parkinのユビキチン化基質に対する特異性が低いことを明らかにした。また、MITOLがミトコンドリア上に「種火」となるユビキチンを付加しておくことで、ミトコンドリアが損傷した際にParkinの移行を加速させることを明らかにした。
(2) マイトファジー刺激に応答して、MITOLがミトコンドリアからペルオキシソームに移行することを見出し、その分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1) Parkinの損傷ミトコンドリアへの移行と活性化を、他のミトコンドリアE3が制御していることを初めて明らかにした。
(2) これまで、Parkinは低品質なミトコンドリアの外膜蛋白質をユビキチン化して分解を誘導することが主な機能として知られていたが、本研究から、Parkinの新たな機能が明らかとなった。今後、ペルオキシソームに移行した後に発揮されるべきMITOLの役割を明らかにするとともに、ユビキチン化修飾によって局在が変化する膜蛋白質の解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：(1) We showed that artificial mitochondria-targeted proteins (GFP and MBP) are ubiquitinated by Parkin, suggesting that Parkin has low substrate specificity. Moreover, recruitment and activation of Parkin are retarded following the silencing of MITOL. We propose a model in which protein ubiquitylation by MITOL promotes the initial step in Parkin recruitment and activation.

(2) We found that the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MITOL translocates from impaired mitochondria to peroxisomes following mitophagy stimulation. This unusual redistribution is mediated by peroxins (peroxisomal biogenesis factors) and requires the E3 activity of Parkin, which ubiquitylates MITOL at K268, essential for p97/VCP-dependent mitochondrial extraction of MITOL.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患であるパーキンソン病とミトコンドリア機能障害との関連性は、古くから知られている。例えば、パーキンソン病患者でミトコンドリアの呼吸鎖不全 (ATP レベルの低下) が観察されており、一方で、ミトコンドリア呼吸鎖の阻害薬の曝露によりパーキンソン病様の症状が引き起こされることが報告されている。ATP 合成や 酸化、カルシウム貯蔵など多彩な機能をもつミトコンドリアは、傷害されると活性酸素種 (ROS) の主な発生源となるため、速やかに排除される必要がある。特に、神経細胞は細胞分裂によってストレスを回避することができないので、ミトコンドリアストレスに対して脆弱であると言える。

われわれは“細胞内の損傷ミトコンドリアを選択的に除去する分子メカニズム”を明らかにしてきた。すなわち、膜電位の低下したミトコンドリアの外膜に PINK1 が蓄積し、Parkin が複数のミトコンドリア蛋白質をユビキチン化する。その結果、不良ミトコンドリアはプロテアソームやオートファジー経路によって選択的に除去される。この機構は、癌細胞由来の培養細胞だけでなく初代培養神経細胞においても機能する (Koyano et al. Genes Cells, 2013)。この過程において、PINK1 が Parkin をリン酸化することが重要であるが、2014 年にわれわれは、PINK1 がユビキチンのリン酸化キナーゼであることを同定し、リン酸化ユビキチンによって Parkin が活性化されることを見出した (Koyano et al. Nature, 2014)。すなわち、リン酸化ユビキチンが Parkin を介するミトコンドリア選択的分解 (マイトファジー) を誘導するシグナルの本質であることを突き止めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、損傷ミトコンドリアを選択的に除去する機構であるマイトファジーに注目し、その過程における Parkin の基質選択性および Parkin と協調して機能すると考えられるミトコンドリア局在型ユビキチンリガーゼ (E3) の生理的意義を明らかにすることである。また、ミトコンドリア損傷時にオルガネラ間で生じるミトコンドリア外膜蛋白質のダイナミックな動態変化についても研究を行い、これまでに報告の無い新奇なオルガネラ間クロストークを提案したい。

3. 研究の方法

(1) Parkin の基質選択性とミトコンドリア局在型 E3 の寄与

Parkin のユビキチン化基質として様々な蛋白質が報告されてきた。また、Parkin 依存的なユビキチン化基質の網羅的探索も行われ、非常に多くの蛋白質が報告されている (Sarraf et al. Nature, 2013)。一方、それら基質蛋白質に共通したモチーフはみられず、Parkin が厳格な基質特異性を有するかどうかは明らかではない。そこで、Parkin の基質特異性の有無と認識機構を詳細に検討するために、細胞内には本来存在しない外来蛋白質をミトコンドリアに局在化させたうえで、Parkin がそれを基質として認識するかどうかを検討する。ユビキチンが共有結合するアミノ酸としてリジンを含む外来蛋白質をミトコンドリアに局在化させるために、外膜蛋白質である Tom20 のミトコンドリア移行配列を外来蛋白質と融合させたプラスミドを細胞に発現させ、Parkin が基質として認識してユビキチン化するか評価する。また、他のオルガネラ局在性蛋白質をミトコンドリアに標的化して、Parkin によるユビキチン化を受けるかどうかを検証する。これらのミトコンドリア標的化蛋白質が、膜電位低下及び Parkin 依存的にユビキチン化されれば、Parkin はミトコンドリア外膜に存在する、表面にリジンを露出した蛋白質を

ユビキチン化基質として認識し、基質選択性は限りなく低いことが示唆される。Parkin は E3 としての基質選択性が低い代わりに、活性化機構が厳密に制御されていると結論付けることができる。

一方、ミトコンドリア E3 として MITOL, MuL1, RNF185, Huwe1 が知られているので、これらをノックダウンして Parkin の損傷ミトコンドリアへの移行が阻害されるか否かを調べる。

(2) マイトファジーにおけるミトコンドリア外膜蛋白質の異所局在性

(1)の問いに関する先行研究において、マイトファジーの誘導でミトコンドリア外膜からペルオキシソームに移行する蛋白質として MITOL を同定した。そこで、MITOL がペルオキシソームに移行するために必要な領域を欠失変異体から特定し、アミノ酸配列の特徴を参考にしながら、局在化に重要なアミノ酸の候補を他のアミノ酸に置換する。並行して、MITOL が移行する現象は Parkin 依存性を示すことから、MITOL もしくは相互作用因子のユビキチン化が関与する可能性が考えられる。そこで、MITOL のユビキチン化不能変異体を作製して、局在化が進行するかどうか免疫染色法を用いて調べる。相互作用因子の関与が示唆される結果が得られた場合には、MITOL を免疫沈降にて回収した産物を用いて、マスペクトロメトリー解析によって同定を目指す。

多くのペルオキシソーム局在性膜蛋白質は PEX19 と複合体を形成し、PEX3 を膜上の受容体として組み込まれるクラス I 経路を介して輸送される。一方、クラス II 経路により PEX19 依存的に PEX16 に標的化されるペルオキシソーム局在性膜蛋白質も知られている。MITOL がどの経路を利用してペルオキシソームに組み込まれるか理解するために、各 PEX の遺伝子をノックダウンしたうえで MITOL がペルオキシソームに局在化するかどうかを検討する。

MITOL のペルオキシソーム局在を定量的に評価するために、ミトコンドリアとペルオキシソームを超遠心分離により分画するか、もしくはペルオキシソームを免疫沈降にて回収し、ウェスタンブロット法にて解析する。

マイトファジー誘導下で変動するミトコンドリアおよびペルオキシソーム関連蛋白質を SILAC 法にて網羅的に探索する。さらに、その結果から得られた因子の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) Parkin の基質選択性とミトコンドリア局在型 E3 の寄与

細胞内には本来存在しない GFP や MBP をミトコンドリアに標的化すると、Parkin はこれらを基質として認識し、ユビキチン化することが分かった。したがって、Parkin の基質選択性は非常に低いことが示唆された。また、siRNA をもちいて複数のミトコンドリア E3 をノックダウンすると、損傷ミトコンドリアへの Parkin の移行および活性化が遅延することを見出した。これらの結果から、Parkin が損傷ミトコンドリアに効率的に移行するためには、MITOL によるミトコンドリアへのユビキチン付加および PINK1 によるリン酸化が必要であると考えられる。PINK1 と Parkin による positive feedback loop を介したミトコンドリア上のユビキチンシグナルの増幅が、特異的な損傷ミトコンドリアの排除には重要であるので、Parkin の基質選択性が低いという特徴は「短時間で大量のミトコンドリアタンパク質をユビキチン化する」という点で有利であると考えられる (Koyano et al, JBC. 2019)。

(2) マイトファジーにおけるミトコンドリア外膜蛋白質の異所局在性

MITOL の局在変化は PINK1 と Parkin の E3 活性に完全に依存した。具体的には、Parkin によって MITOL の K268 がユビキチン化を受けると、AAA+ ATPase family の一員である p97/VCP 依存

的にミトコンドリア外膜から引き抜かれ、ペルオキシソーム形成因子(Peroxin)の助けを借りてペルオキシソームに輸送されることを明らかにした。これらの結果を総合して、マイトファジー刺激によるユビキチン化修飾が MITOL の局在を制御するという新たなメカニズムを明らかにした(Koyano et al, EMBO Rep. 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koyano Fumika, Yamano Koji, Kosako Hidetaka, Tanaka Keiji, Matsuda Noriyuki	4. 巻 294
2. 論文標題 Parkin recruitment to impaired mitochondria for nonselective ubiquitylation is facilitated by MITOL	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10300 ~ 10314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koyano Fumika, Yamano Koji, Kosako Hidetaka, Kimura Yoko, Kimura Mayumi, Fujiki Yukio, Tanaka Keiji, Matsuda Noriyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Parkin mediated ubiquitylation redistributes MITOL/March5 from mitochondria to peroxisomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201947728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小谷野史香
2. 発表標題 MITOL/March5 moves to peroxisomes in mitophagy
3. 学会等名 オルガネラ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷野史香
2. 発表標題 Parkinは損傷ミトコンドリアの選択的除去を仲介しMITOL/March5をペルオキシソームに移行させる
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷野史香
2. 発表標題 Parkinが初期損傷ミトコンドリアに移行するメカニズム
3. 学会等名 ミトコンドリアサイエンスワークショップ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷野 史香
2. 発表標題 Parkin with low substrate specificity facilitates labeling of damaged mitochondria for elimination
3. 学会等名 YoungMito2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小谷野史香、松田憲之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 別冊・医学のあゆみ ISSN 0039-2359	

1. 著者名 小谷野史香、松田憲之	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 -
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

プロジェクト研究の紹介
<http://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/to-pro20.html>
ユビキチンがミトコンドリア - ペルオキシソーム間輸送シグナルとして機能する
<http://www.igakuken.or.jp/topics/2019/1010.html>
ユビキチンシステムの異常と疾患
<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/ubiquitin.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------