

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15399

研究課題名（和文）原因遺伝子産物の不溶化に着目した新たなパーキンソン病分子病態の解明

研究課題名（英文）Analysis of newly molecular pathogenesis of Parkinson's disease focusing on insolubilization of causal proteins

研究代表者

椎葉 一心 (SHIIBA, ISSHIN)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：30884481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病は進行性に黒質ドパミン神経細胞が変性する疾患で、その結果、黒質・線条体におけるドパミンが減少し神経障害が生じる疾患である。病態の原因として患者脳の黒質・線条体領域でミトコンドリア機能障害やタンパク質の蓄積がみられることが明らかとなっているが、分子病態については未解明な点が多い。そこで本研究では、パーキンソン病の分子病態として、不溶化したパーキンソン病原因遺伝子産物Parkinが蓄積し神経細胞死を誘導する可能性を疑い解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、パーキンソン病の新たな分子病態として、パーキンソン病の原因は不溶性Parkinの蓄積である可能性が示唆されました。また、不溶性Parkinを分解する酵素としてミトコンドリア外膜上に局在するMITOLを同定し、さらに詳細な分解経路も明らかにすることができました。今後、不溶性Parkinの除去を標的とした創薬開発が期待されます。

研究成果の概要（英文）：A pathological feature of Parkinson's disease (PD) is the progressive loss of dopaminergic neurons and decreased dopamine (DA) content in the substantia nigra pars compacta in PD brains. The mechanisms by which parkin, a familial Parkinson's disease gene product, protects the adult human brain from Parkinson's disease remain incompletely unknown. In this study, we especially focused on insoluble Parkin as a critical factor inducing neuronal cell death and its protective machinery.

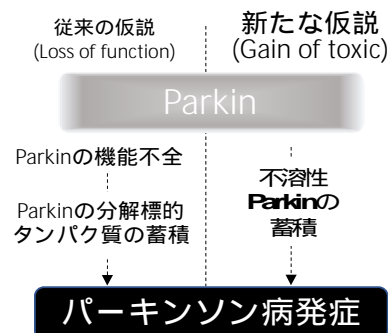
研究分野：生化学

キーワード：パーキンソン病 Parkin ミトコンドリア MITOL

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病原因遺伝子産物である Parkin は様々な基質を認識し分解することで神経細胞の生存を維持していると考えられている。したがって、パーキンソン病の分子病態として、Parkin の機能不全による基質蓄積が病態を進行させるという Parkin の Loss of function 仮説が一般的に受け入れられている。しかし、Parkin 欠損マウス脳では既知の基質の蓄積およびパーキンソン病の病理的特徴が観察されないことや、基質分解機能が正常な Parkin の遺伝子変異が発見されたことなどから前述の仮説が疑問視されている。また、パーキンソン病患者脳では Parkin が高度にリン酸化やニトロシル化の修飾を受けており、Parkin 自体が不溶化し蓄積することも報告されている。多くの神経変性疾患において不溶性タンパク質の蓄積が神経障害の原因であることを考慮すると、Parkin は定常時には基質分解を通して細胞保護的に働くが、老化などによる細胞内の環境変化により一転して不溶化、蓄積し細胞毒性(Gain of toxic)になり得るのではないか、と考えられる【図】。



2. 研究の目的

これまでに、申請者はパーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin が細胞死を誘導すること、その抑制系として Parkin を分解する酵素 MITOL を同定し、分子病態の一端を明らかにしてきた (Shiiba et al., EMBO rep. 2021)。この研究過程において新たに Parkin が高度に凝集、不溶化し細胞死を誘導することを見出した。本研究ではこの点をさらに追求し、Parkin 誘導性細胞死の実態、Parkin 誘導性細胞死の新規抑制経路の2つを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1- Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)の投与により、7日間でパーキンソン病のモデルマウスを作出することができる。この薬剤誘導性パーキンソン病モデルマウスを用い、生体内での不溶性ニトロシル化 Parkin 毒性および MITOL との関連について明らかにするため、下記の A の研究計画について取り組んだ。
- 2- パーキンソン病患者脳ではミトコンドリア呼吸鎖 I の機能障害が観察される。ミトコンドリア呼吸鎖 I の阻害剤である Rotenone を細胞へ添加することでパーキンソン病モデル細胞を作成できることが知られている。そこで薬剤処理によるパーキンソン病モデル細胞を用いて、Parkin 分解酵素 MITOL を軸とし、下記の研究計画 B、C に取り組んだ。

A パーキンソン病モデルマウスにおける不溶性 Parkin の蓄積と毒性

申請者は MPTP 投与によるパーキンソン病モデルマウスでは不溶性 Parkin が蓄積することを見出している。そのため、病態誘導時に不溶性 Parkin がニトロシル化されているか、MITOL のタンパク量の増減が観察できるかなど病変部位の脳切片を作製し免疫染色等で確認する。また、脳特異的 MITOL 欠損マウスを作製し、不溶性 Parkin の蓄積を観察する。

B 新規 Parkin 分解経路の探索

MITOL は E3 ユビキチンリガーゼであり基質にユビキチンを付加しプロテアソーム経路を用いて分解する。以前申請者は MITOL がリン酸化された Parkin に K48 型ユビキチンを付加しプロテアソーム経路で分解することを報告した。現在細胞を用いた実験からパーキンソン病モデル細胞において MITOL がリン酸化ではなく、ニトロシル化不溶性 Parkin をユビキチン化し分解していることを見出している。しかし、不溶性度の高いタンパク質はプロテアソームで分解できないため、不溶性タンパク質分解経路であるアグリソーム経路で Parkin を分解していることが想定された。アグリソーム経路で分解する際は、K63 型ユビキチン修飾が必要である。そのため、MITOL は Parkin の持つ特性(修飾)によって分解経路の選別をしている可能性がある。よって病態条件下におけるユビキチンを介した新たな Parkin 分解経路としてアグリソーム経路に着目し、アグリソーム検出試薬 ProteoStat 等を用いて詳細に検証する。

C 脱ユビキチン化酵素による Parkin 分解経路の選別機序

ユビキチン化はプロテアソームの分解シグナルとして研究が進展し、現在ではユビキチンシグナルの重要性は生命科学全般に深く浸透している。ユビキチンは複数個のユビキチンが連結するように付加され鎖を形成する。現在までに 8 種類のユビキチン鎖の様式が同定され、鎖の種類により基質の運命や機能が異なることが明らかとなってきた。一方で、ユビキチンリガーゼがユビキチンを付加する際、どの種類のユビキチン鎖を付加するか、その選別機序はユビキチンシグナル最大の謎の一つであり未だに明らかとなっていない。MITOL は K48 型と K63 型のユビキチン鎖の 2 種類を基質に付加できる。近年、申請者は近位依存性ピオチン標識(BioID 法)技術を用いて MITOL 近傍のタンパク質を網羅的に解析したところ、脱ユビキチン化酵素(ユビキチン切断酵素)である OTUD4 が候補に上がった。OTUD4 は自身の修飾変化により K63 鎖と K48 鎖のユビキチン鎖を切断し分けているという報告がされている。そのため MITOL による Parkin へのユビキチン付加の選別は OTUD4 によって基底されていると仮説立て、Ubiquitin assay 法を用いて解析を行う。

4. 研究成果

A MPTP 投与によりパーキンソン病モデルマウスを作成し、ニトロシル化検出 kit (Cayman, #10006518)を用い、不溶化しニトロシル化された Parkin 量を野生型マウスと比較した。結果、パーキンソン病モデルマウスでは不溶化したニトロシル化 Parkin が蓄積していた。さらに、MITOL 欠損マウスに MPTP を投与したマウスでは、通常マウスに MPTP を投与した群と比較して、不溶化したニトロシル化 Parkin が多く蓄積しており、病態マーカーである Tyrosine hydroxylase の脱落も顕著に亢進し、病態の増悪が観察された。このことから、パーキンソン病病態下において、MITOL はニトロシル化された不溶性 Parkin を除去し毒性を緩和させている可能性が示唆された。

B Rotenone 刺激時に Parkin に付加されるユビキチン鎖の種類をユビキチン鎖特異的な抗体を用いて解析した。その結果、MITOL は Rotenone 刺激時、不溶化しニトロシル化を受けた Parkin に K48 型ではなく、K63 型のユビキチン鎖を付加していることを見出した。さらに、ubiquitin assay により Rotenone 刺激時に MITOL は Parkin の K220 にユビキチンを付加することを明らかにした。

Parkin 安定発現 MITOL 欠損 HeLa 細胞に Rotenone を添加すると、Parkin 安定発現野生型 HeLa 細胞と比較して、不溶性ニトロシル化 Parkin が蓄積することを見出していた。MITOL は

Parkin に K63 型のユビキチン鎖を付加し、分解制御することから、分解経路として、プロテアソームではなくアグリソーム経路に着目した。そこで、Parkin 安定発現 MITOL 欠損 HeLa 細胞に Rotenone を添加し、アグリソームを特異的に検出する試薬 Proteostat で染色を行った。その結果、Proteostat で強く染色されたことから、MITOL は Rotenone 刺激の際に Parkin をアグリソーム経路で分解している可能性が示唆された。さらに、アグリソーム経路は HDAC6 によって制御されていることが知られている。そこで、HDAC6 の発現を抑制し、Rotenone 刺激を行ったところ、Proteostat 陽性の Parkin が増加した。このことから、不溶性ニトロシル化 Parkin がアグリソーム経路によって分解されることを強く示唆している。

C 申請者は以前の解析で、MITOL はミトコンドリア脱共役剤である CCCP を添加すると、Parkin に K48 型のユビキチン鎖を付加し、プロテアソーム経路で分解することを明らかにした。今回、B の解析で MITOL は Rotenone 刺激の際に別のユビキチン鎖種である K63 型を付加していることが明らかとなった。さらに興味深いことに、CCCP、Rotenone 刺激の際の Parkin へのユビキチン化部位は K220 であり同じである。そこで、刺激に応じた、ユビキチン鎖付加の選別機構があると考え、MITOL の近傍に存在する脱ユビキチン化酵素 OTUD4 に着目し解析をおこなった。OTUD4 はリン酸化されると、K48 型のユビキチン鎖を切断し、リン酸化されていない状態では K63 型のユビキチン鎖を切断することが報告されている。そこでまず、CCCP、Rotenone 刺激時の OTUD4 のリン酸化レベルを解析したところ、未刺激、Rotenone 刺激の際には OTUD4 はほとんどリン酸化されていなかったが、CCCP 刺激の際に、OTUD4 が強くリン酸化されることが明らかになった。OTUD4 は過去に、OTUD4 のリン酸化部位である S202、S204 番目を変異させると K63 型のユビキチン鎖種の切断能力が著しく低下することが報告されている。そこで、S202/204A 変異体を作成し、CCCP 刺激の際のリン酸化レベルを解析したところ、CCCP 刺激依存的なリン酸化が完全に抑制された。このことから、OTUD4 は MITOL-Parkin 経路において、CCCP 刺激の際 OTUD4 がリン酸化され Parkin の K202 番目の K63 型ユビキチン鎖を選択的に切断し、K48 型のユビキチン鎖を優位に付加させ、プロテアソーム経路で分解するという、分解経路の切り替えに必要である可能性が示唆された。

上記の解析結果より、パーキンソン病病態下において、MITOL は不溶性ニトロシル化 Parkin の K220 番目に K63 型のユビキチン鎖を付加しアグリソーム経路を用い分解することで不溶性ニトロシル化 Parkin 毒性を緩和していることが示唆された。今後、より詳細な解析を行い創薬ターゲットとなる分子機構を絞り込む。

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 0件）

1. 著者名 Tokuyama T, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drp1 regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104582 ~ 104582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Naoki, Takahashi Takara, Shiiba Isshin, Nagashima Shun, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 171
2. 論文標題 MITOL regulates phosphatidic acid-binding activity of RMDN3/PTPIP51	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 529 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------