

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 25 年 8 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2012

課題番号：23890206

研究課題名（和文） パーキンソン病原因遺伝子産物がミトコンドリアの品質管理を行う分子基盤の解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism underlying PINK1-mediated mitochondrial maintenance

研究代表者

金尾 智子 (KANA O TOMOKO)

順天堂大学大学院・医学系研究科・研究員

研究者番号：00614083

研究成果の概要（和文）：近年我々が報告した PGAM5 の結合因子の質量分析による網羅的解析とショウジョウバエを用いた *in vivo* スクリーニングを組み合わせ、PINK1-Parkin の機能に關与する因子の探索を行った。その結果、PINK1 欠失ショウジョウバエの表現型を修飾する結合因子として Target of rapamycin complex 2 (TORC2) の構成因子である Rictor の同定に成功した。しかしながら、培養細胞において Rictor は PINK1 のリン酸化基質である証拠は得られなかった。次に PINK1 新規リン酸化基質探索のため、PINK1 ノックアウト細胞を用いた比較リン酸化プロテオミクス解析を行い、Parkin のユビキチン様ドメインの 65 番目のセリン残基がミトコンドリア膜電位低下時かつ PINK1 依存的にリン酸化修飾されることを示した。この Parkin のリン酸化修飾は、Parkin のユビキチンリガーゼ活性の活性化に必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have reported that PGAM5 acts between PINK1 and Parkin. To understand the molecular roles of PGAM5 in the PINK1-Parkin pathway further, we searched for PGAM5-binding proteins using mass spectrometric analysis and screened genes encoding these binding proteins using *Drosophila* PINK1 models. We found that Rictor modulates the phenotypes caused by PINK1 inactivation in *Drosophila*. However, PINK1 did not modify the phosphorylation status of Rictor in cultured cells, suggesting that Rictor is not a direct substrate of PINK1. To isolate physiological substrates of PINK1, we performed phospho-proteomics analysis and subsequent *in vitro* kinase assay using normal and PINK1 mutant cells. We then found that Ser65 in the ubiquitin-like domain (Ubl) of Parkin is phosphorylated in a PINK1-dependent manner upon depolarization of mitochondrial membrane potential. We further showed that the phosphorylation of Parkin is required for the activation of its ubiquitin-ligase activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：研究活動スタート支援

科研費の分科・細目：医歯薬学・医科学一般

キーワード：パーキンソン病、PINK1、Parkin、PGAM5、神経変性

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳黒質ドーパミン神

経が選択的に変性欠落することにより発症するが、その神経変性のメカニズムに関しては未解明のままである。現在までに幾つかの遺伝性パーキンソン病原因遺伝子が同定され、そのうち若年性パーキンソン病原因遺伝子 *PINK1* と *parkin* がミトコンドリアの機能維持に必須の働きを持つことがショウジョウバエ遺伝学により示されている。

parkin 遺伝子産物 Parkin は細胞質局在ユビキチンリガーゼであり (Imai, J Biol Chem 2000)、ミトコンドリア局在キナーゼ PINK1 のシグナルの下流に位置することが示唆されている (Clark, Nature 2006; Park, Nature 2006; Yang, PNAS 2006)。その後哺乳類やショウジョウバエ培養細胞において、Parkin は PINK1 依存的に膜電位の低下したミトコンドリアにリクルートされ、機能不全のミトコンドリアのオートファジー (マイトファジー) に関与することが報告されている (Narendra, PLoS Biol. 2010; Geisler, Nat. Cell Biol. 2010; Matsuda, J Cell Biol. 2010)。以上の報告から、PINK1-Parkin 経路は全容が未知である「ミトコンドリアの品質管理」を担っていると考えられる。すなわち PINK1-Parkin 経路がミトコンドリアの機能を維持することにより、神経細胞の生存性が支えられると推察される。

我々は PINK1 が直接 Parkin のユビキチンリガーゼ活性を制御しないことを観察しており、PINK1 と Parkin の間を介する分子の存在を想定した。そこで PINK1 結合分子の網羅的な同定作業と、その後の試験管内再構成系およびショウジョウバエ分子遺伝学を組み合わせたスクリーニングから、PINK1-Parkin 経路の間を介する分子 PGAM5 を同定した (Imai, Kanao, PLoS Genet 2010)。

2. 研究の目的

パーキンソン病原因遺伝子産物である PINK1 と Parkin がミトコンドリアの機能を制御する分子メカニズムおよび、その破綻が神経変性を導く病理メカニズムを明らかにすることを目的とする。

PINK1 と Parkin は、それぞれキナーゼとユビキチンリガーゼ活性をもち、協調して損傷を受けたミトコンドリアを選択的に除去する「ミトコンドリアの品質管理」に関与することが示唆されている。しかし、PINK1 と Parkin のみではすべての事象を説明できず、未同定の分子と制御メカニズムがあると考えられる。本研究では、我々が以前同定した新規分子 PGAM5 を中心に、ミトコンドリアの品質管理に関わる分子群とそのメカニズムを細胞レベル・個体レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PGAM5 結合因子の生化学的同定

FLAG タグを付与した PGAM5 を安定的に強制発現するヒト培養細胞からライゼートを作製し、抗 FLAG カラムにて大量精製を行った。精製画分を一次元 PAGE で展開し銀染色を行った。対照群と比較して増加しているバンドを PGAM5 に結合するタンパク質群として切り出し、液体クロマトグラフィー質量分析により網羅的に同定した。得られた候補因子は培養細胞に過剰発現させ免疫沈降法で結合特異性を確認した。

(2) 遺伝学的スクリーニング

迅速かつハイスループットな研究を行うため、ショウジョウバエの可視化表現型を用いた *in vivo* スクリーニングを研究の早い段階で行った。複眼に候補因子を発現させたハエに PINK1、Parkin、PGAM5 を共発現させた (あるいは欠失させた) ハエを各々掛け合わせることで、複眼に変化が見られる因子のスクリーニングを行った。PINK1 欠失ショウジョウバエはミトコンドリア機能維持することが出来ず羽の下垂を引き起こす。PINK1 に関与する因子かどうかを、さらに羽の姿勢異常を指標にスクリーニングを行った。

(3) *in vitro* アッセイ

PINK1 が候補因子を直接リン酸化するか確認するために、 $[^{32}\text{P}]$ リン酸で代謝ラベリングもしくは γ - ^{32}P ATP を用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行った。

$[^{32}\text{P}]$ リン酸で代謝ラベリング: リン酸を含まない培養液で培養したヒト神経芽細胞を、 $[^{32}\text{P}]$ リン酸を含む培養液にて3時間代謝ラベリングした。細胞からライゼートを作製、免疫沈降した後、ウェスタンブロット法およびオートラジオグラフィーにて解析を行った。

γ - ^{32}P ATP を用いた *in vitro* キナーゼアッセイ: GST タグもしくは MBP タグを付与したタンパク質を BL21 に発現させ大量精製を行い、PINK1 が候補因子をリン酸化修飾するかキナーゼアッセイを行った。

4. 研究成果

PINK1-Parkin を介する PGAM5 分子メカニズムを解明すべく質量分析による PGAM5 の結合因子の同定から行った。さらに候補因子の絞り込みを行うためショウジョウバエ複眼による *in vivo* スクリーニングを行った。その結果、Target of rapamycin (TOR) と PINK1、Parkin、PGAM5 に遺伝的相互作用があることがわかった。TOR 構成因子が PINK1 の基質になる可能性が考えられたため、さらにショウジョウバエの羽の姿勢異常を指標としたスクリーニングを行った。その結果、PINK1 による表現型を修飾する因子として TOR 複合体 2 (TORC2) の構成因子である Rictor を同定した。

次に $[^{32}\text{P}]$ リン酸で代謝ラベリングにより、

PINK1がRictorを直接リン酸化するか検討した。PINK1はミトコンドリアの膜電位低下時に活性化することが報告されている。ヒト神経芽腫由来のSH-SY5Y細胞を ^{32}P リン酸で代謝ラベリングした後PINK1を活性化させた細胞からライゼートを作製し、抗Rictor抗体で免疫沈降し、オートラジオグラフィを行った。その結果、PINK1活性依存的なRictorのリン酸化レベルに変化はなかったため、RictorはPINK1のリン酸化基質ではないと考えられた(図1)。

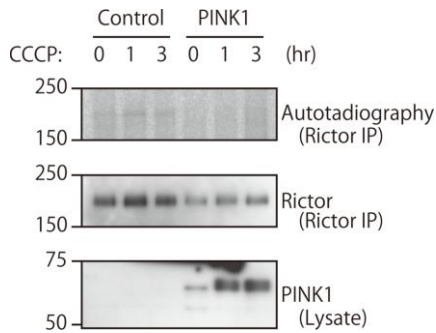


図1 ^{32}P リン酸代謝ラベリング PINK1を過剰発現させたSH-SY5Yを ^{32}P リン酸で培養しPINK1をCCCP処理で活性化させた。Rictorで免疫沈降後ウエスタンブロットを行った。

次にPINK1がTORC2活性化を介してAKTのリン酸化レベルを増強する報告があることから、PINK1を活性化したときのAKTリン酸化レベルを調べた。詳細には、HeLa細胞、SH-SY5Y細胞、またはマウス胎児線維芽細胞のライゼートから抗Rictor抗体で免疫沈降したものに、リン酸化基質としてAKTを加えキナーゼアッセイを行った。その結果、TORC2活性化に依存してリン酸化されるAKT S473のリン酸化レベルはPINK1欠失細胞またはPINK1活性化細胞において変化は見られなかった。

しかしながら、ヒト培養細胞にPGAM5を過剰発現(あるいはRNAi法により発現抑制)させてPhos-tag PAGE法で解析した結果、Rictorのリン酸化レベルに変化がみられた。そのため、TORC2-AKT以外の未知の経路でRictorがパーキンソン病病態に関わっている可能性が考えられる。現在、他の候補因子の解析を行っている。

次にPINK1の新規リン酸化基質を見出すべく新たに質量分析による網羅的解析を行った。以前行ったPINK1結合因子による網羅的解析で見出したPGAM5はPINK1リン酸化基質ではなかった。その理由としてPINK1とリン酸化基質との結合能が一時的だったため結合分子として同定することが難しかったためと考えられる。そこでリン酸化タンパク質-金属親和性カラムを用いてリン酸化タンパク質を濃縮した後、質量分析を行うリン酸化プロテオミクス解析を行うこととした。さら

にリン酸化基質を同定できなかった原因として試料がPINK1不活性状態の細胞から作製されたことが挙げられる。そのためPINK1+/+、PINK1-/-マウス由来線維芽細胞にミトコンドリア膜電位低下させPINK1活性化した細胞も加えて比較解析を行った。その結果、Parkinのエピキチン様ドメインの65番目のセリン残基(Ser65)がミトコンドリア膜電位低下時かつPINK1依存的にリン酸化修飾されることが明らかとなった。

次にPINK1が直接Parkin Ser65をリン酸化しているか γ - ^{32}P ATPを用いた*in vitro*キナーゼアッセイにより検討した。ほ乳類PINK1は*in vitro*においてキナーゼ活性を失ってしまうため、活性化が保持されることが近年報告された*Tribolium castaneum*のオルソログであるTcPINK1を使用した。基質としてMBP-Parkin野生型およびSer65をアラニンに変換したリン酸化できない変異体を作製し精製した。*in vitro*キナーゼアッセイの結果、TcPINK1はParkin野生型をリン酸化するがParkin Ser65アラニン変異体をリン酸化しなかったことから、PINK1はParkin Ser65を直接リン酸化していることを証明した(図2)。Parkin Ser65リン酸化の細胞レベル、個体レベルの解析は現在進行中である。

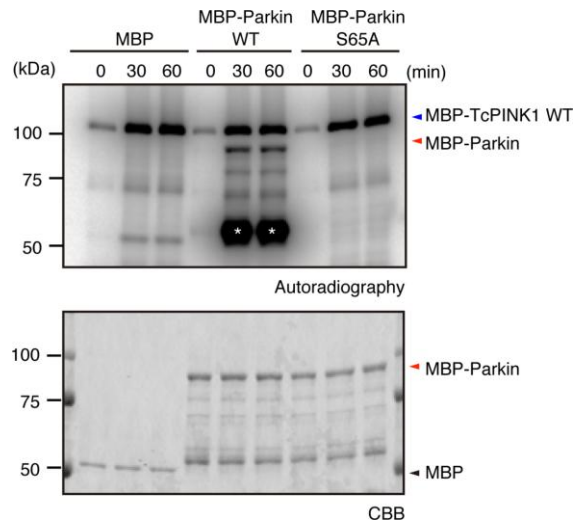


図2 PINK1を用いた*in vitro*キナーゼアッセイ

Maltose-binding protein(MBP)融合*T. castaneum* PINK1とMBP-human full-length Parkin WTあるいはMBP Parkin S65Aを30°Cで反応させた。アスタリスクはMBP-Parkinの分解産物である。PINK1がSer65のみをリン酸化している。

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3件)

- ① Wu Z, Sawada T, Shiba K, Liu S, Kanao T, Takahashi R, Hattori N, Imai Y, Lu B. Tricornered/NDR kinase signaling mediates PINK1-directed mitochondrial quality control and tissue maintenance. *Genes & Development* 2013, 27, 157-162.
doi: 10.1101/gad.203406. (査読有)
- ② Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific Reports* 2012, 2, 1002.
doi: 10.1038/srep01002. (査読有)
- ③ Liu S, Sawada T, Lee S, Yu W, Silverio G, Alapat P, Millan I, Shen A, Saxton W, Kanao T, Takahashi R, Hattori N, Imai Y, Lu B. *PLoS Genetics* 2012, 8, e1002537.
doi: 10.1371/journal.pgen.1002537. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金尾 智子 (KANA O TOMOKO)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号：614083