

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790896

研究課題名(和文) 若年性遺伝性パーキンソン病原因遺伝子産物によるミトコンドリアの品質管理機構の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanism of mitochondrial quality control by PINK1-Parkin pathway

研究代表者

柴 佳保里 (Shiba, Kahori)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30468582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PINK1-Parkin経路マイトファジーの初期ステップであるPINK1によるParkinのSer65リン酸化修飾が自己抑制されたParkinのE3の活性化を誘導し、細胞質からミトコンドリアへの局在移行に影響することを明らかにした。また、その活性化に伴いMitofusin 1を含むミトコンドリア外膜タンパク質群のユビキチン化・分解に必要であることを示した。さらに、ショウジョウバエを用いた解析から、生体内においても本リン酸化修飾がミトコンドリアの機能に強く関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Drosophila genetics and cell biological studies have revealed that two Parkinson's disease-associated genes PINK1 and parkin are involved in the mitochondrial maintenance. Parkin is activated and translocated to damaged mitochondria in a PINK1 activity dependent manner. However, it was unclear how PINK1 recruits Parkin to the damaged mitochondria. In this study we found that Parkin is phosphorylated by PINK1 upon reduction of mitochondrial membrane potential, which is required for effective Parkin mitochondrial translocation. Our study also revealed that the biological significance of Parkin phosphorylation using Drosophila expressing wild-type or mutant forms of Parkin (SA, SE). In vivo, we suggested that PINK1 mediated phosphorylation of Parkin boosts its ubiquitin-ligase activity and that constitutive activation of Parkin could damage mitochondria, degrading mitochondrial proteins Mitofusin, Miro and the mitochondrial respiratory complex proteins.

研究分野：神経学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：Parkin PINK1 遺伝性パーキンソン病 ミトコンドリア mitophagy

### 1. 研究開始当初の背景

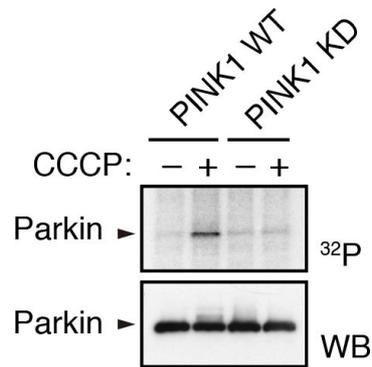
パーキンソン病(Parkinson's Disease: PD)は、本邦においてアルツハイマー病に次いで罹患率の高い神経変性疾患で、社会の超高齢化に伴い患者数の急激な増加が予想される。PDは黒質ドーパミン神経の変性による運動障害を主徴とするが、ドーパミン神経変性の病態機序は未解明であり、PDの病態機序に則した根本的な治療法・予防法の確立が強く求められている。当研究室では遺伝性PDの原因遺伝子として *parkin* を同定し、その遺伝子産物がユビキチンリガーゼであることを明らかにした。その後、ショウジョウバエを用いた研究から、ParkinはPD原因遺伝子産物であり、セリンスレオニンキナーゼである *PINK1* と遺伝学的に相互作用し、ミトコンドリアの機能維持に関与することが報告された。さらに、我々は、哺乳類培養細胞を用いた研究により、*PINK1* と Parkin が膜電位の低下した不良ミトコンドリアをオートファジー系で特異的に除去することを明らかにした(これをマイトファジーという)。すなわち、*PINK1* と Parkin は協働してミトコンドリアの品質管理役として機能していると考えられる。詳細には、不良ミトコンドリアを *PINK1* が感知し活性化すると、*PINK1* の活性依存的に細胞質に局在する Parkin が不良ミトコンドリア上へと移行し、マイトファジー反応を実行する。多くの両疾患型変異体によりこの *PINK1*-Parkin シグナルが阻害されることから、両遺伝子に連鎖するPDの発症機構にマイトファジーの障害が含まれる可能性が強く示唆されている。これらのことから、*PINK1*-Parkin シグナルの分子機構を明らかにすることは、PD発症機構の解明に貢献するものと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、*PINK1*-Parkin シグナルの詳細を理解するため、細胞及び個体レベルの二段階のスクリーニングでマイトファジーの分子機構に関する新規分子を同定し、その分子の役割を解明することを目的とした。

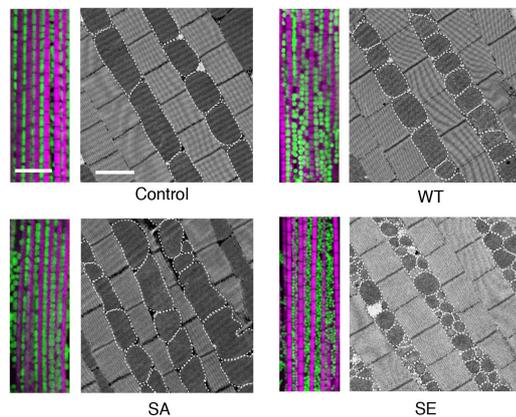
### 3. 研究の方法

*PINK1* 欠失マウス胎児線維芽細胞(MEF: mouse embryonic fibroblast)に野生型 *PINK1* (WT: wild type) またはキナーゼ不活性型(KD: kinase dead)を定常的に発現した細胞株にさらに野生型 Parkin を発現する細胞株を樹立し、スクリーニングの準備を行った。その過程で、Parkin が *PINK1* によりリン酸化されることを見出し、その生理的意義を明らかにすることを優先させた。まず、リン酸化質量分析解析により、*PINK1* により Parkin がリン酸化される部位を同定した。続いて、その領域に存在する複数のリン酸化候補部位を非リン酸化型に変換した Parkin リコンビナントタンパク質を精製し、放射性同位元素を用いた *in vitro* kinase assay 法においてリン



**図1. 膜電位低下時 *PINK1* のキナーゼ活性依存的に Parkin はリン酸化修飾される**

*PINK1* 欠失 MEF に野生型 *PINK1*、またはキナーゼ不活性型 *PINK1* を安定的に発現させた細胞を、<sup>32</sup>-P ATP を添加した培地で培養した。CCCP 処理後 Parkin を精製し、SDS-PAGE で分離した後、オートラジオグラフィで可視化した。野生型 *PINK1* が発現し、かつ CCCP 処理したサンプルでのみ Parkin のリン酸化シグナルが検出された。



**図2. ショウジョウバエ飛翔筋のミトコンドリアにおいて、Parkin リン酸化修飾は形態に影響する**

LacZ (Control), Parkin 野生型および変異体 (SA: 非リン酸化体、SE: 模擬リン酸化体) を過剰発現するショウジョウバエの飛翔筋ミトコンドリアを観察した。SA型ではミトコンドリアの形態が不均一になり、SE型では断片化した。白黒写真は透過型電子顕微鏡像。蛍光写真は、緑がミトコンドリア、マゼンダが筋原線維を示す。スケールバー; 10 μm (蛍光写真)、2 μm (電子顕微鏡写真)。

酸化部位を決定した。次に、リン酸化部位変異型 Parkin を定常的に発現させた細胞株も作製し、Parkin リン酸化修飾が及ぼすミトファジーの影響を評価した。具体的には、免疫染色法で Parkin の細胞内局在を検討し、ミトコンドリア外膜タンパク質群の発現量をウエスタンブロット法で定量した。また、Parkin のリン酸化を Phos-tag ウエスタンブロット法で検討した。ショウジョウバエの実験系においては、Parkin(野生型:WT、非リン酸化型:SA、模擬リン酸化型:SE)を過剰発現するショウジョウバエ系統を作製し、野生型または PINK1 欠失ショウジョウバエと掛け合わせ、飛翔筋とドーパミン神経細胞のミトコンドリア形態の観察を行った。さらに、ミトコンドリア機能の指標として ATP アッセイ、運動能力の指標としてクライミングアッセイを行った。

#### 4. 研究成果

PINK1-Parkin シグナルにおける関連分子のスクリーニングを行う過程において、ミトコンドリアの膜電位を低下させると、PINK1 のキナーゼ活性依存的に Parkin のユビキチン様ドメインの 65 番目セリン残基 (Ser65) がリン酸化修飾されることを見出した(図 1)。非リン酸化型変異体 Ser65Ala において、ミトコンドリア膜電位低下時の Parkin のミトコンドリア移行効率とミトコンドリアの外膜分子群の分解効率が共に低下したことから、Parkin の Ser65 リン酸化修飾は、PINK1-Parkin シグナル依存的なミトファジーに関与することが示唆された。そこで、この PINK1 による Parkin の Ser65 リン酸化修飾が、生体内でどのように作用するのかをショウジョウバエを用いて解析した。ショウジョウバエもゲノムに 1 コピーの Parkin 遺伝子を持ち、リン酸化部位は哺乳類同様保存されていた。ショウジョウバエの S2 細胞にて、ハエの Parkin も PINK1 依存的にリン酸化されることを確認し、ハエの Parkin(野生型およびリン酸化部位の変異体)のトランスジェニックショウジョウバエを作製した。Parkin 野生型、及びリン酸化型である Ser65Glu を筋肉のミトコンドリアで過剰発現させると、Parkin 野生型では軽微なミトコンドリアの断片化、Ser65Glu では高度な断片化が認められた。一方、Ser65Ala では、ミトコンドリアの形態が不定形となった(図 2)。これらのことから、Parkin はショウジョウバエにおいて、ミトコンドリアの形態を制御していると考えられた。

次に、PINK1 ノックアウトショウジョウバエに Parkin 過剰発現ショウジョウバエを掛け合わせて、ミトコンドリアにおける表現型を観察した。PINK1 のノックアウトショウジョウバエではミトコンドリアが変性するが、Parkin 野生型、及び Parkin Ser65Ala の過剰発現でその変性が回復した。一方、Parkin Ser65Glu の発現においては、ミトコンドリア

の機能は部分的に回復するものの、PINK1 野生型遺伝的背景での観察同様、形態的には高度に断片化していた。

また、このミトコンドリアの形態変化が Parkin のユビキチンリガーゼ活性に依存するかどうかを確認するため、Parkin のユビキチン化基質の一つである Mitofusin の発現量を指標として測定した。その結果、Parkin 模擬リン酸化型においては Mitofusin の発現レベルが顕著に減少した。一方、Parkin 野生型ではコントロール群と比較し Mitofusin の発現レベルが減少するものの、非リン酸化型においてはその減少が抑制されていた。これらの結果より、生体内において PINK1 を介した Parkin のリン酸化修飾は、Parkin のユビキチンリガーゼ活性を正に調節している可能性が示唆され、その結果ミトコンドリア形態に影響を及ぼしていると考えられた。さらに Parkin のリン酸化が、PINK1 欠失による呼吸鎖複合体 I の機能低下、ATP 産生能の低下、運動機能の低下におよぼす影響を評価した。Parkin 野生型、非リン酸化型はこれらの機能低下を完全に回復させるが、模擬リン酸化体においての回復効果は一過的であった。これらのことから、PINK1 による Parkin の構成的なリン酸化修飾は、むしろミトコンドリア機能障害をもたらすことが明らかとなった。すなわち、Parkin の過剰な E3 リガーゼ活性は、ミトコンドリアの機能を低下させると推測される。細胞内の恒常性を保つためには、適度な Parkin の E3 活性が必要であることが示唆された。

次に、ショウジョウバエ脳のドーパミン神経に Parkin WT, SA, SE を発現させ、ミトコンドリアの形態およびドーパミン神経機能への影響を調べた。Parkin WT の過剰発現は、神経細胞体においてミトコンドリアの断片化、軸索、樹状突起においてミトコンドリアが消失し、Parkin SE の過剰発現は WT の表現型をさらに増強した。その結果、細胞核近傍においてミトコンドリアの顕著な凝集が見られた。一方、Parkin SA の過剰発現はミトコンドリアの形態や分布に影響を与えなかった。重要なことに、PINK1 ノックアウト遺伝的背景では Parkin WT の過剰発現はミトコンドリア形態に影響をほとんど与えなかった。これは、ドーパミン神経においても、内在性の PINK1 が Parkin をリン酸化し、その活性を調節していることを示していた。

本研究では、PINK1-Parkin によるミトファジーの初期ステップである PINK1 による Parkin のリン酸化修飾が自己抑制された Parkin のユビキチンリガーゼの活性化を誘導し、Mitofusin を含むミトコンドリア外膜タンパク質でのユビキチン化・分解に必要であることを明らかにした。また、本リン酸化修飾が、生体内においてもミトコンドリアの機能に強く関与することが示唆された。このことから、PINK1-Parkin シグナルにおける不良ミトコンドリアの排除の分子機構を一部

明らかにした。

## 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)

Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y. PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 査読有り 10(6): e1004391. 2014. doi: 10.1371/journal.pgen.1004391.2014

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 Dev*. 査読有り 27(2): 157-62, 2013

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. *Sci Rep*. 査読有り 2012; 2; 1002, doi:10.1038/srep01002. 2012

[学会発表](計5件)

柴-福嶋 佳保里、井下 強、吉見 建二、服部 信孝、今居 譲: PINK1によるParkinリン酸化の生理的意義、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸

福嶋佳保里、今居 譲、吉田繁治、石濱 泰、金尾智子、佐藤栄人、服部信孝: PINK1依存的なParkinのリン酸化修飾はPINK1/Parkin経路マイトファジーに必要である、第54回日本神経学会学術大会、2013年5月30日、東京

江口博人、今泉美佳、塚口ケネス、福嶋佳保里、佐藤栄人、舩山学、斉木臣二、波田野琢、久保紳一郎、今居 譲、永松信哉、服部信孝: Parkinノックアウトマウスにおける放出機構の検討。第54回日本神経学会学術大会 ポスター 2013年5月30日、東京

Imai Y, Shiba-Fukushima K, Yoshida S, Ishihama Y, Hattori N: PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin: an initial step of mitophagy. 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ「オートファジーによる分解の諸相」、2012年12月11日、福岡

Imai Y, Shiba-Fukushima K, Yoshida S, Ishihama Y, Hattori N: PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin: an initial step of mitophagy. 第35回日本分子生物学会年会、ポスター、2012年12月11日、福岡

[その他]  
ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.juntendo-neurology.com/n-kenkyu-syukai.html>

PINK1によるParkinのリン酸化の発見に関するプレスリリース

<http://www.juntendo.ac.jp/albums/abm.php?f=abm00000830.pdf&n=【医学研究科】研究成果の掲載2.pdf>

「順天堂大学、Parkinリン酸化の阻害が若年性パーキンソン病発症に関与か」日経バイオテク On line 2012年12月19日掲載

Parkinリン酸化の役割をドーパミン神経において解明したことに関するプレスリリース

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/pdf/news10.pdf>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

柴 佳保里 (Shiba, Kahori)

順天堂大学・医学部・博士研究員

研究者番号: 30468582