

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860721

研究課題名(和文)パーキンソン病発症に関わるParkinのE3としての新たな役割の解明

研究課題名(英文)New role of Parkin as a E3 in the causal mechanism of Parkinson's disease

研究代表者

久住 友紀 (Kujuro, Yuki)

慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)

研究者番号：60398625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Parkinはユビキチンを標的タンパク質に付加するRING-In-between-RING型E3であり、PINK1と協調して不良ミトコンドリアの処理において重要な役割を果たしている。本研究では、ParkinはE2を介して不良タンパク質をユビキチン化するだけでなく、実はHECT型E3と同様に、Parkin自体がC431でユビキチン-チオエステル中間体を形成することが明らかとなった。更にParkinやPINK1に疾患由来変異を加えると中間体形成を認めないことから、中間体形成はパーキンソン病発症のメカニズムに関わっていることが示唆された。中間体形成はParkin S65のリン酸化にも依存的であった。

研究成果の概要(英文)：Parkin is categorized as RING-IBR-RING (RBR) type E3 and cooperates with PINK1 in clearance of damaged mitochondria. Here we show that similar to the ubiquitin-cascading reaction of HECT type E3s, Parkin also forms ubiquitin-ester adduct at the position of conserved cysteine (Cys431). Ubiquitin-ester formation is observed when mitochondrial membrane potential is decreased, and this intermediate formation is essential for substrate ubiquitylation. Knockout of PINK1 and expression of pathogenic PINK1 mutants blocked the ubiquitin-ester formation, suggesting that PINK1 is essential for this step. Moreover, disease-relevant mutations of Parkin inhibit the ubiquitin-ester linkage formation. Importantly, Ala mutation at Parkin Ser65, a PINK1-mediated phosphorylation site abolishes ubiquitin-ester formation, whereas phosphorylation-mimic Ser-to-Asp/Glu change at the site partially enabled Parkin to form ubiquitin-ester intermediate irrespective of Parkin phosphorylation.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：Parkin パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は国内だけでも 15 万人を超える患者がいるとされており、高齢化社会が進むにつれてますます患者数は増え続けると予想され、根本的治療法の確立が強く求められている。PD は大別すると家族型と孤発型に分類される。家族型は孤発型に比較すると、患者数ははるかに少ないものの、特定の遺伝子異常に由来することから病気の発症機構の解明には有力である。従来より、申請者所属のグループは遺伝性若年性 PD の原因となる Parkin と PINK1 に着目し、その機能を解析することにより、PD の発症機構に迫ろうと研究を進めてきた。Parkin (PARK2 の原因遺伝子) はユビキチンを標的タンパク質に付加する RING-In-between-RING (RBR) ファミリーに属するユビキチンリガーゼ (E3) であり、PINK1 (PARK6 の原因遺伝子) はミトコンドリア移行配列を有するセリン/スレオニンキナーゼである。2010 年所属グループは、Parkin や PINK1 が不良ミトコンドリアの処理 (ミトコンドリアの品質管理) において中心的な役割を果たしていることを発見した。具体的には、PINK1 は膜電位を指標にミトコンドリアの品質をモニターしているが、膜電位の低下した不良ミトコンドリア上に特異的に蓄積することで Parkin を呼び寄せ、その結果 Parkin が不良ミトコンドリアをユビキチンで標識し、結果としてミトコンドリアは除去されることを明らかにした (J Cell Biol., 189, 2010)。更に近年、膜電位の低下に伴って PINK1 の Ser228 と Ser402 が自己リン酸化されることが Parkin のリクルートに必須であることも報告した (Nature Commun., 3, 2012)。これら申請者所属グループの発見および海外からの多数の報告により、“家族性劣性 PD は、ミトコンドリアに対する品質管理の破綻で発症する”ということが定説となりつつある。

2. 研究の目的

Parkin は PINK1 と協調して不良ミトコンドリアの処理において中心的な役割を果たしている。近年 HHARI という Parkin と同ファミリー (RING-In-between-RING) に属する E3 は、本来は HECT 型 E3 の特徴である Ub-チオエステル中間体を形成することが報告されたが、Parkin に関しては不明であった。本研究は Parkin のチオエステル形成の有無を検証するとともにチオエステル形成が PD 発症のメカニズムにどう関与してくるか、また、新規知見を応用したモデルマウスの作成を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン (Ub)-チオエステル中間体は不安

定であることから、まず Parkin 遺伝子のチオエステルを形成すると予想される部位 (RBR の RING2 domain の sequence alignment より予測されている) を変換 (C431S) することにより Ub-0-エステル中間体として観察できるように plasmid を作成した。そして Parkin のチオエステル形成の有無につき、当研究室従来の実験系を用いて検証した。Parkin C431S 導入 Hela 細胞、primary neuron を CCCP という脱共役剤で処理後 (ミトコンドリア膜電位を低下させる既存の方法)、sample につき Parkin 抗体にて WB を行うという手法を用いた。

(2) 中間体形成の有無につき精製 Parkin 蛋白を用いた in vitro 再構成系の実験でも確認した。更に Parkin や PINK1 の疾患関連変異体における中間体形成の有無、Parkin、PINK1 のリン酸化と中間体形成についても関連性を明らかにした。

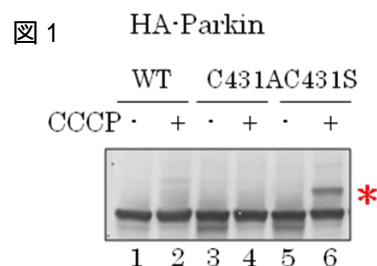
HA parkin および C431S 変異体を発現した Hela 細胞を CCCP 処理し、1 時間後、3 時間後のサンプルをそれぞれ HA および Tom20 (ミトコンドリアマーカー) で染色することにより、C431S のミトコンドリアへの移行率も検証した。

(3) E2 には多種類あるが、どの種類の E2 が Parkin のいずれの domain で結合するかは異論のあるところである。どの種類の E2 が Parkin のどの domain で結合するかを明らかにすべく、HA-Parkin および FLAG で標識した多種類の E2 を共発現し、HA で IP し、FLAG で WB を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアが障害されると、Parkin C431S はユビキチン-エステル複合体を形成する

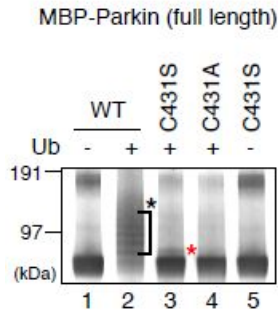
Hela 細胞を CCCP 処理後、C431S mutant では Parkin のバンドの上に新たなバンドを認め、C431S における Parkin の Ub-0-エステル形成が示唆された (C431A はエステル deficient mutant) (図 1)。同様の現象は primary neuron でも確認されている。



大腸菌を用いて MBP 結合 Parkin タンパク、

あるいはその C431 変異体タンパクを精製し、*in vitro* 反応系を用いて Parkin のユビキチン化反応を再現したところ、同様の現象が確認された(図 2)。

図 2



(2) Parkin のユビキチン-エステル複合体形成は Parkin や PINK1 の患者由来変異によって阻害される

Parkin C431S にそれぞれ 3 種類の患者由来変異(K211N : ミトコンドリアへの移行が阻害、C352G : ミトコンドリアでの Ub 化が阻害、T415N : E3 活性欠損)を入れると、Ub-0-エステル形成が認められなかった(図 3)。

PINK1 欠損 MEF では、Ub-0-エステル形成を認めない。同 MEF に wt PINK1 を発現させると Ub-0-エステル形成を認めることから、PINK1 は Parkin の Ub-0-エステル形成には必須であることが示唆された。PINK1 の患者由来変異体を PINK1 欠損 MEF に発現させると C92F 以外では Ub-0-エステル形成が阻害された(図 4)。

以上より、Parkin の Ub-エステル形成は Parkin や PINK1 の患者由来変異により阻害されることが明らかとなり、中間体形成は PD 発症のメカニズムに関わっていることが示唆された。

図 3

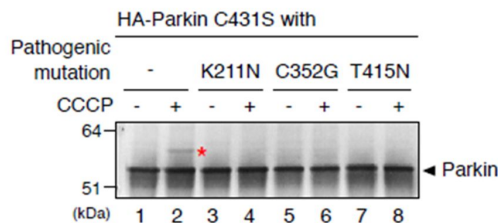
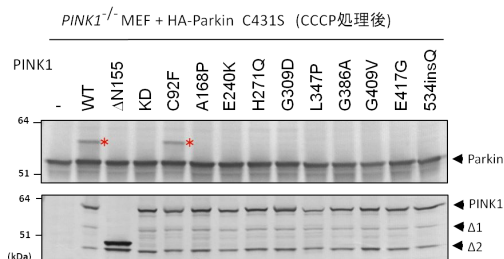


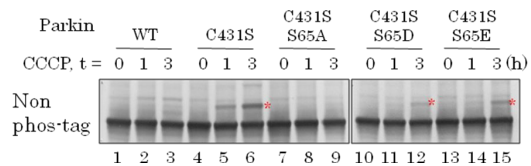
図 4



(3) Parkin および PINK1 のリン酸化はユビキチン-エステル複合体の形成に重要である

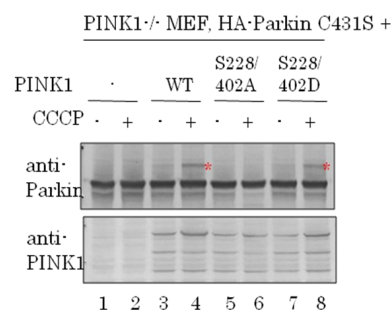
所属研究室が発見した、ミトコンドリア膜電位の低下に関連する Parkin のリン酸化(S65)に関して Ub-0-エステル形成との関連を検証した。S65A/C431S mutant では Ub-0-エステル形成を認めないものの、S65D/C431S および S65E/C431S mutant では Ub-0-エステル形成を認めたことから、中間体形成は Parkin の S65 リン酸化依存的事であることが明らかとなった(S65A: phosphorylation deficient、S65D、S65E: phosphorylation mimic)(図 5)。

図 5



更に、所属研究室が報告した PINK1 の CCCP 依存的なリン酸化 (S228/402) に関して、Ub-0-エステル形成との関連を検証した。S228/402A では Ub-0-エステル形成を認めないのに対し、S228/402D では Ub-0-エステル形成を認めたことから、中間体形成は PINK1 S228/402A のリン酸化依存的事であることが明らかとなった(S228/402A: phosphorylation deficient、S228/402D: phosphorylation mimic)(図 6)。

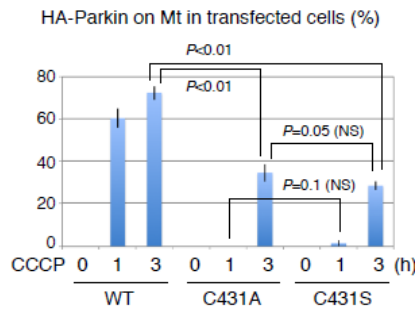
図 6



(4) Parkin C431S はミトコンドリア移行率が低下する

wt Parkin が CCCP 処理にてミトコンドリアに移行するのに対し、Parkin C431S は CCCP 処理 1hr 後はほぼ細胞質内に局在しており、3hr 後も約 25%程度しかミトコンドリアへの移行が見られなかった(図 7)。さらにミトコンドリアへの移行不全によるものか、基質である Mitofusin の Ub 化も認めなかった。

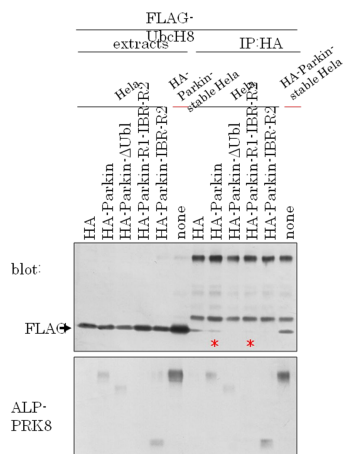
図 7



(5)UbcH8 はRING1 domain でParkin に結合する

次に、Parkin の E3 活性獲得のメカニズムの全貌を明らかにすべく、どの種類の E2 が Parkin のどの domain で結合するかを明らかにした。HA-Parkin および FLAG で標識した多種類の E2 を共発現し、HA で IP し、FLAG で WB を行ったところ、UbcH8 が RING domain で Parkin に結合することが明らかとなった (図 8)。さらに、Parkin と UbcH8 の結合は Parkin W403A 変異 (結晶構造的に RING1 domain を覆い隠している repressor element of Parkin という領域) を導入することにより強まることも判明した。今後は Parkin の E2 結合に関する結果に関して、何回か追試していく予定である。

図 8



報告者は、今回の知見に関して、論文でも報告しており (JBC, 288, 2013)、時を同じくして競うようにして次々に海外からも同様の報告があった。その後、Parkin の結晶構造の全貌が明らかにされているが (Science, 340, 2013)、C431 が E3 活性獲得において重要であることをサポートするものであった。これらの研究を契機として Parkin の研究分野はさらに飛躍を続けている。今後は今回の知見をもとにモデルマウスの作成を検討しており、in vivo の現象に発展させていく予定である。

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 1 件)

(1)
Iguchi M, Kujuro Y, Okatsu K, Koyano F, Kosako H, Kimura M, Suzuki N, Uchiyama S, Tanaka K, Matsuda N. Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. Journal of Biological Chemistry, 査読有, 288, 2013: 22019-32.

doi: 10.1074/jbc.M113.467530

[学会発表] (計 3 件)

(1)
Yuki Kujuro, Masahiro Iguchi, Kei Okatsu, Fumika Koyano, Norihiro Suzuki, Keiji Tanaka, Noriyuki Matsuda. Parkin forms ubiquitin-thioester to become catalytically active. DynaMito, 2013 年 10 月 28 日 ~ 2013 年 11 月 1 日. Okinawa Zampamisaki Royal Hotel 沖縄県中頭郡読谷村

(2)
Yuki Kujuro, Noriyuki Matsuda, Masahiro Iguchi, Kei Okatsu, Fumika Koyano, Keiji Tanaka, Norihiro Suzuki. Parkin exerts its E3 activity through ubiquitin-ester formation. The 35th Naito Conference. 2013 年 7 月 9 日 ~ 2013 年 7 月 12 日. CHATERAISE Gateaux Kingdom Sapporo 北海道札幌市

(3)
久住呂友紀、井口正寛、尾勝圭、小谷野史香、木村まゆみ、鈴木則宏、田中啓二、松田憲之. Parkin 遺伝子はチオエステル中間体を形成する. 第 54 回日本神経学会総会, 2013 年 5 月 29 日 ~ 2013 年 6 月 1 日、東京国際フォーラム 東京都千代田区

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久住呂 友紀 (Kujuro Yuki)

慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)

研究者番号：60398625