

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440106

研究課題名(和文) PINK1によるミトコンドリアの形態制御と機能調節

研究課題名(英文) PINK1-mediated regulation of mitochondrial morphology and functions

研究代表者

岡 敏彦 (Oka, Toshihiko)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：40263321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは細胞の主要なATP産生の場であり、その機能とダイナミックな形態変化の関連は、近年注目されている。私達は線虫と動物細胞を用いて、ミトコンドリアの品質管理を制御するPINK1がミトコンドリア形態も制御していること、及びネクローシス様の細胞死を引き起こすことを見出した。特に、PINK1による細胞死は既存のメカニズムとは異なる機構で引き起こされており、パーキンソン病におけるドーパミン作動性神経の変性との関連性も興味深い。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria mainly contributes to cellular ATP production, and their morphology dynamically changes, i.e. they continuously divide and fuse each other. How mitochondrial morphology relates to their functions is watched with interest. Using nematode and mammalian cell lines, we indicated that PINK1, a key factor for mitochondrial quality control, controls mitochondrial morphology in nematode and demonstrated that PINK1 activation induces necrosis-like cell death in mammalian cell lines. In particular, it is of interest in the relationship between PINK1-mediated cell death and loss of dopaminergic neurons in patients with Parkinson's disease.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア PINK1 Parkin

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは ATP 産生場として古くから知られるオルガネラであるが、最近ではアポトーシスやウイルス感染応答のプラットフォームとして脚光を浴びている。また、ミトコンドリアは細胞内で融合と分裂を繰り返し、そのダイナミックな形態変化は、ミトコンドリア機能と密接に関連している。

私達は線虫の体壁筋ミトコンドリアの形態を生きたまま観察する系を用い、ミトコンドリアタンパク質遺伝子 719 個を網羅的にノックダウンすることで、ミトコンドリアの形態形成関連因子を同定し、その機能解析を進めてきた。そのスクリーニングの中で、RNAi による発現抑制に伴いミトコンドリアが断片化する遺伝子の一つとして、ミトコンドリアに局在する唯一のタンパク質リン酸化酵素をコードする *pink-1* を同定した。また最近では共同研究により、ヒト HeLa 細胞を用いて PINK1 の活性化に必要な自己リン酸化サイトを報告した。本研究では線虫と動物細胞を用いて、下記の 3 つの PINK1 タンパク質が司るミトコンドリアの形態と機能に着目して、その分子メカニズムを解析した。

## 2. 研究の目的

(1) 線虫 PINK-1 によるミトコンドリア形態制御機構: ヒト PINK1 タンパク質は遺伝性パーキン病の原因遺伝子として、もう一つの遺伝性パーキン病原因遺伝子 *PARK2*(Parkin) と共に障害を受けたミトコンドリアの排除に働く(ミトコンドリア品質管理機構)。線虫の RNAi スクリーニングで *pink-1* 遺伝子発現抑制がミトコンドリア断片化を引き起こすが、線虫 Parkin 相同遺伝子 *pdr-1* の発現抑制ではミトコンドリア形態に変化は見られなかった。そこで、PDR-1/Parkin 以外のリン酸化酵素 PINK-1 の新たな基質を検索し、ミトコンドリア形態との関連を検証する。

(2) PINK1/Parkin を介した新たな細胞死: 私達は、Parkin 安定発現 HeLa 細胞に脱共役剤 CCCP を長時間処理することで、90% の細胞が細胞死を起こすことを見出した。内在性 Parkin を発現しない通常の HeLa 細胞に同様の CCCP 処理を行っても、細胞死は全く認められないため、この細胞死は Parkin 依存性であった。さらに、カスパーゼ阻害剤 *z-VAD-fmk* で阻害されず、細胞膜の破壊などの形態的特徴からネクローシスだと結論付けた。同様の細胞死は活性化型 PINK1 によっても引き起こせるため、この細胞死が PINK1/Parkin を介した新たな細胞死であると推察された。そこで、PINK1/Parkin による細胞死の制御機構を解析した。

(3) PINK1/Parkin を介したミトコンドリア品質管理の新たな制御機構: PINK1 は Parkin と

共に膜電位の低下した特定のミトコンドリアの排除に働くが、すべての低膜電位ミトコンドリアが排除されるかは不明である。特に、神経細胞の軸索輸送では、高膜電位と低膜電位のミトコンドリアが一つの細胞に共存する。私達は、HeLa 細胞に forskolin を前処理することで CCCP により膜電位を消失させても Parkin が標的化しないことを見出した。Parkin の標的化の抑制は、PKA の触媒サブユニットの過剰発現でも観察されることから、cAMP/PKA を介した新たな PINK1/Parkin の制御経路であると考えられる。そこで、cAMP/PKA によるミトコンドリア品質管理の調節機構を検証した。

## 3. 研究の方法

(1) RNAi feeding ライブラリーを用いて、線虫の特定の遺伝子を発現抑制し、*pink-1* 発現抑制変異体と類似したミトコンドリア形態を示す変異体を蛍光顕微鏡観察により同定する。

(2) 蛍光色素 PI (propidium iodide) を用いて、細胞膜の破壊を指標に細胞死を測定する。その際に、様々な薬剤処理や遺伝子破壊細胞を用いて、細胞死に関わる因子を明らかにする。

(3) forskolin などの薬剤処理した細胞や遺伝子発現を抑制した細胞で、ミトコンドリア膜電位を消失させた後、GFP-Parkin の細胞内局在を蛍光顕微鏡観察により解析する。

## 4. 研究成果

(1) 線虫 PINK-1 によるミトコンドリア形態制御機構: 線虫 *pink-1* 発現抑制では体壁筋細胞のミトコンドリアが断片化し、中程度に膨張する特有の表現形を引き起こす。RNAi feeding ライブラリーを用いて、同様のミトコンドリア形態を誘導する遺伝子を探索した結果、ミトコンドリアの RNaseH をコードする *rnaseh-1.0* 遺伝子を同定した。RNaseH と PINK-1 によるミトコンドリア形態制御との関連性が興味深い。

(2) PINK1/Parkin を介した新たな細胞死: 脱共役剤 CCCP 処理や活性化型 PINK1 の発現による PINK1 の恒常的活性化は、トクロム C の遊離やカスパーゼの活性化などアポトーシス表現形を示さず、細胞膜の破壊を伴うネクローシス様の新たなプログラムされた細胞死であった。この細胞死には、ミトコンドリア膜電位消失とオートファジー活性は不要で、Parkin のユビキチン化活性とプロテソームが必須であった。つまり、PINK1 の恒常的な活性化は、ミトコンドリアの選択的オートファジーとは独立に、プロテソーム依存性の細胞死を引き起こすことが明らかとなった。この新たな細胞死は、パーキンソン病での脳黒質のドーパミン作動性神経の変性との関

連性も興味深い。以上の成果をまとめ、論文として報告した(雑誌論文)。

(3) PINK1/Parkin を介したミトコンドリア品質管理の新たな制御機構: Forskolin 処理や PKA 触媒サブユニットの過剰発現は, PINK1/Parkin を介したミトコンドリア品質管理を強く阻害した。PKA によるリン酸化基質の探索の結果, ミトコンドリアタンパク質複合体 MICOS の 2 つのサブユニット(MIC60, MIC19)を同定した。MIC60 や MIC19 の発現抑制は Parkin のミトコンドリア標的化を抑制した。さらに, MIC60 のリン酸化修飾は Parkin のミトコンドリア標的化を阻害するが, MICOS の主要機能であるクリステ構造形成には影響しなかった。これらの結果より, MIC60/19 がミトコンドリア形態維持とは別に cAMP/PKA 経路を介してミトコンドリア品質管理を負に制御することが明らかになった。以上の本成果をまとめ、論文として報告した(雑誌論文)。

#### 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 5 件)

Akabane, S., K. Matsuzaki, S. I. Yamashita, K. Arai, K. Okatsu, T. Kanki, N. Matsuda and T. Oka, Constitutive activation of PINK1 protein leads to proteasome-mediated and non-apoptotic cell death independently of mitochondrial autophagy. 2016, *J. Biol. Chem.* **291**, 16162-16174. DOI:

10.1074/jbc.M116.714923 (査読有り)

Akabane, S., M. Uno, N. Tani, S. Shimazaki, N. Ebara, H. Kato, H. Kosako, and T. Oka, PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60. 2016, *Mol. Cell* **62**, 371-384. DOI:

10.1016/j.molcel.2016.03.037 (査読有り)

赤羽しおり, 岡 敏彦, 実験医学, PKA は MIC60 のリン酸化を介して PINK1 と Parkin によるミトコンドリア品質管理を制御する, 2016, Vol.34 No.16 2689-2692. (査読なし)

Okatsu, K., M. Kimura, T. Oka, K. Tanaka and N. Matsuda, Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. 2015, *J. Cell Sci.* **128**, 964-978. DOI: 10.1242/jcs.161000 (査読有り)

岡 敏彦, 医学のあゆみ, ミトコンドリア形態異常と疾患, 2015, Vol.254 No.5 447-451. (査読なし)

[学会発表](計 12 件)

岡 敏彦, ミトコンドリア品質管理の cAMP/PKA による制御機構, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 大阪大学蛋白質研究所(大阪府・吹田市), 2017.3.21

岡 敏彦, PKA による MIC60 リン酸化を介したミトコンドリア品質管理の制御機構, 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎新聞文化ホール(長崎県・長崎市), 2017.3.16. 赤羽しおり, 岡 敏彦 他, MIC60 regulates PINK1 activation and Parkin recruitment to damaged mitochondria through the cAMP/PKA signaling pathway, American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016, San Francisco (米国), 2016.12.4

岡 敏彦 他, PINK1 stability and Parkin mitochondrial targeting are regulated by PKA-mediated phosphorylation of MIC60, 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016.12.1

岡 敏彦 他, PINK1 と Parkin によるミトコンドリア品質管理機構は PKA を介した MIC60 のリン酸化により制御されている, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県・つくば市), 2016.11.27 赤羽しおり, 岡 敏彦 他, MIC60 regulates PINK1 activation and Parkin recruitment through cAMP/PKA signaling pathway, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Mitochondrial Dynamics", Steamboat Springs (米国), 2016.4.4

赤羽しおり, 岡 敏彦 他, リン酸化を介した MICOS 複合体による PINK1 の活性化の制御機構, 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市), 2015.12.3

岡 敏彦, PINK1 の活性化とカスパーゼ非依存性の細胞死, 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市), 2015.12.1

赤羽しおり, 岡 敏彦 他, MICOS 複合体による PINK1 のミトコンドリア標的化の制御機構, 第 67 回日本細胞生物学会, タワーホール船堀(東京都・江戸川区), 2015.7.2

松崎航平, 岡 敏彦 他, PINK1/Parkin によるカスパーゼ非依存性細胞死の解析, 第 14 回日本ミトコンドリア学会, 九州大学百年講堂(福岡県・福岡市), 2014.12.3

宇野碧, 岡 敏彦, Parkin のミトコンドリア外膜標的化に関わる MICOS 複合体の解析, 第 14 回日本ミトコンドリア学会, 九州大学百年講堂(福岡県・福岡市), 2014.12.3

岡 敏彦, ミトコンドリア形態とクリステ

構造の形成機構、第 25 回フォーラム・イン・  
ドージン, 熊本キャッスルホテル(熊本県・熊  
本市), 2014.11.14.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www2.rikkyo.ac.jp/web/oka\\_lab/index.html](http://www2.rikkyo.ac.jp/web/oka_lab/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡 敏彦 (OKA, Toshihiko)

立教大学・理学部・教授

研究者番号 : 40263321