

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08635

研究課題名(和文) パーキンソン病原因遺伝子産物PINK1が形成するシグナル系の最先端プロテオミクス

研究課題名(英文) Advanced proteomic analysis of signaling pathways mediated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1

研究代表者

小迫 英尊 (KOSAKO, Hidetaka)

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：10291171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物として、セリン/スレオニンキナーゼPINK1とユビキチン連結酵素Parkinが知られている。近年、PINK1とParkinが協調して損傷ミトコンドリア特異的なオートファジー分解を引き起こすことが明らかになった。本研究では、PINK1の損傷ミトコンドリア上での複合体形成機構やPINK1の下流シグナル伝達経路を明らかにするために、多検体間定量リン酸化プロテオーム解析、および免疫沈降-質量分析による大規模相互作用解析などを行った。そしてPINK1の直接の基質であり、かつPINK1と相互作用するミトコンドリア外膜タンパク質を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物であるPINK1とParkinがオートファジーによってミトコンドリアの品質管理を行う仕組みの概要が最近明らかになったが、従来の細胞生物学や分子生物学を基盤とする研究からは、その全体像を理解する上で十分な知見が得られていなかった。本研究において最先端のプロテオミクス技術を駆使することにより、PINK1が形成する複合体の構成因子とリン酸化する基質を大規模に同定することができた。本研究で開発した技術は他の疾患原因キナーゼにも応用可能であり、汎用性が高い技術である。

研究成果の概要(英文)：The serine/threonine kinase PINK1 and the E3 ubiquitin ligase Parkin are known to be causative gene products of familial Parkinson's disease. Recently, it has been shown that PINK1 and Parkin cooperate to induce autophagic degradation of damaged mitochondria. In this study, we have performed multiplex quantitative phosphoproteomic analysis and large-scale interactome analysis by immunoprecipitation-mass spectrometry to elucidate mechanisms of PINK1 complex formation on damaged mitochondria and signaling pathways downstream of PINK1. As a result, we found a mitochondrial outer membrane protein that is a direct substrate of PINK1 and interacts with PINK1.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：シグナル伝達 プロテオーム PINK1 パーキンソン病 キナーゼ 質量分析 TMT IP-MS

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳黒質のドーパミン産生神経細胞が変性・脱落することを主因とする難治性の中枢神経変性疾患である。国内だけでも15万人以上の患者がいると推定されており、高齢化社会の進行と共に患者数は増え続けている。このためパーキンソン病の発症機構の全体像を明らかにし、早期診断法や根本的な治療法を開発することが強く求められている。研究代表者はこれまでの一連の研究により、家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1 (セリン/スレオニンキナーゼ) と Parkin (ユビキチン連結酵素) が協調してオートファジーによって損傷ミトコンドリアを選択的に分解し、ミトコンドリアの品質管理を担う仕組みを明らかにしてきた(図1)。しかしながらミトコンドリアが正常な際には PINK1 が分解され、ミトコンドリアが損傷を受けると安定化して活性化する過程において、PINK1 がどのようなタンパク質と相互作用するのかは未だ十分に明らかになっていない。また Parkin やユビキチン以外の PINK1 の下流基質の同定も進んでいない。そこで本研究では、ミトコンドリアの機能低下に伴って形成される PINK1 複合体の構成因子と PINK1 の下流シグナル因子を網羅的に同定するために、最先端技術を用いたプロテオミクス解析を行うことにした。

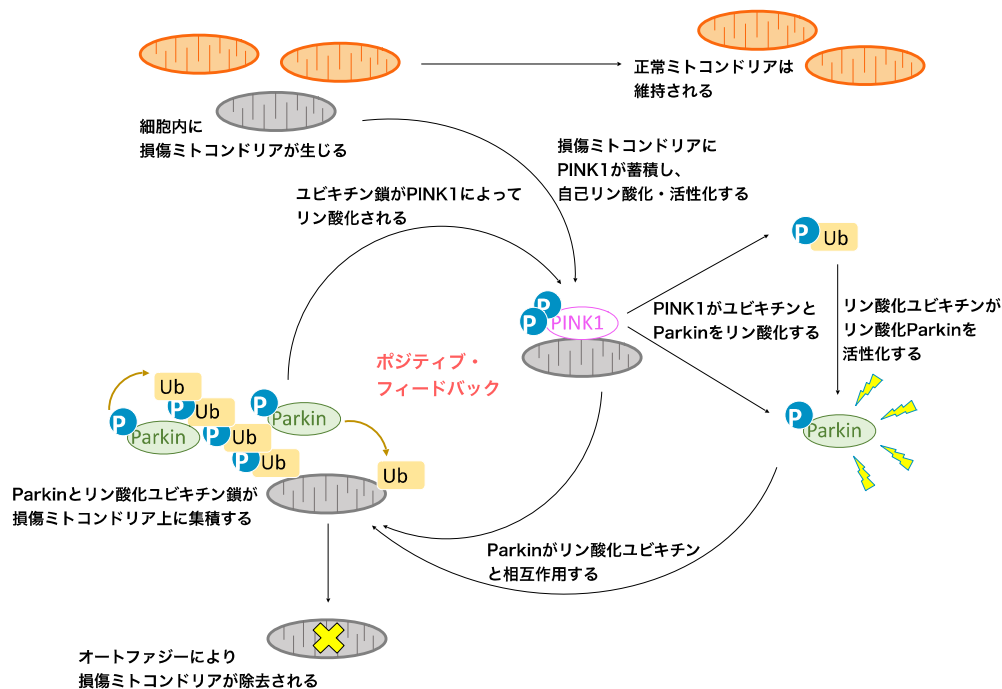


図1. PINK1とParkinによるミトコンドリアの品質管理機構

2. 研究の目的

ミトコンドリア局在キナーゼである PINK1 が形成するシグナルネットワークの全体像を明らかにすることは、パーキンソン病の発症機構を解明し、根本的な治療法を開発する上で重要である。これまでに研究代表者は高性能質量分析計を駆使したプロテオミクス解析を行い、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾を高感度に同定・定量する方法を確立してきた。本研究では最先端のプロテオミクス技術を導入・改良することにより、PINK1 が形成する複合体の構成因子と活性化した PINK1 がリン酸化する下流基質を網羅的に同定する。そして PINK1 シグナル伝達系に関与する新たな鍵分子のミトコンドリアにおける役割を種々の生化学・細胞生物学的解析によって明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) PINK1 の下流基質を網羅的に同定するために、PINK1 を安定発現する HeLa 細胞および親株の HeLa 細胞に対し、無処理または脱共役剤 CCCP で処理してから抽出液を調製した。まず研究代表者のグループが開発した IMAC と 2D-DIGE を組み合わせた方法により (Kosako et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009)、既知の PINK1 基質であるユビキチンが PINK1 活性依存的にリン

酸化されることを確認した。次に抽出液からタンパク質を抽出し、トリプシン消化後にペプチドを10種類のTMT (tandem mass tag) 試薬で標識した。標識ペプチドを混合後、Fe-NTAを用いたIMACによってリン酸化ペプチドを精製し、さらに塩基性条件での逆相分画を行ってからLC-MS/MS解析を行った。

(2) PINK1との相互作用因子を網羅的に同定するために、磁気ビーズを用いた免疫沈降、ビーズ上酵素消化、LC-MS/MS測定、ラベルフリー定量解析のシステムを構築した。そして3×Flagタグ付きPINK1を安定発現するHeLa細胞および親株のHeLa細胞に対し、無処理または脱共役剤CCCPで処理してから抽出液を調製し、抗Flag抗体を固定化した磁気ビーズを用いた免疫沈降-質量分析 (IP-MS) を行った。

4. 研究成果

(1) TMT 標識による多検体間定量リン酸化プロテオーム解析の結果、約2万2千種類のリン酸化ペプチドの同定と定量に成功し、既知のPINK1基質であるユビキチンやPINK1自身と共に、Rabファミリータンパク質やミトコンドリア外膜タンパク質などを新たなPINK1基質の候補として見出した(図2)。さらにこのRabファミリータンパク質が細胞内でPINK1によってリン酸化されることをPhos-tagウェスタンブロット法によって確認した。

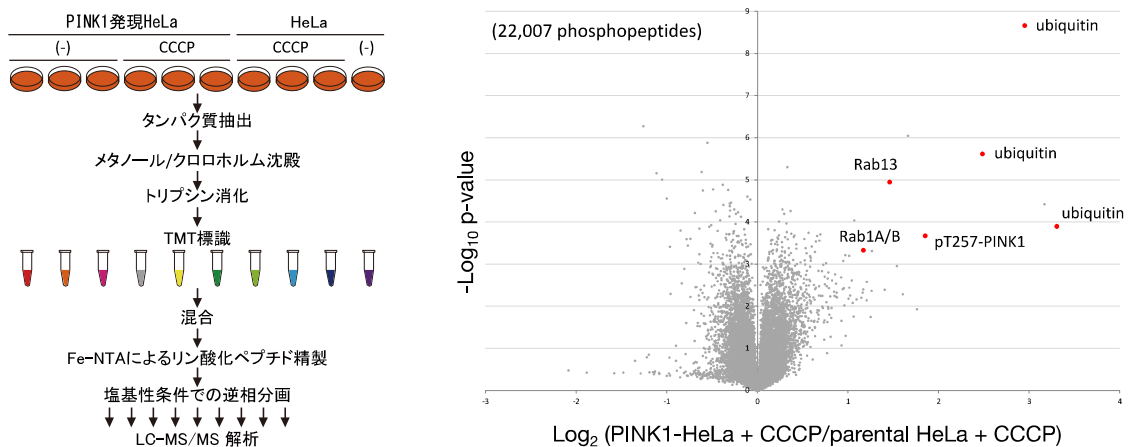


図2. TMT標識による多検体間定量リン酸化プロテオーム解析法とPINK1基質の探索

(2) 免疫沈降-質量分析 (IP-MS) 法により、PINK1と相互作用する因子を網羅的に同定することを試みた結果、1,053種類のタンパク質の同定と定量に成功し、PINK1自身やTom複合体構成因子などと共に、キナーゼシャペロンであるCdc37や様々なミトコンドリアタンパク質を新たなPINK1との相互作用因子の候補として見出した(図3)。さらに一部の因子については、免疫沈降物のウェスタンブロットによってPINK1と相互作用することを確認した。この中には上記の多検体間

定量リン酸化プロテオーム解析によって同定したPINK1基質候補とオーバーラップするものがあつた。そこで本因子とPINK1を細胞内に共発現させることにより、両者が相互作用することと本因子がPINK1依存的にリン酸化されることを再確認した。このタンパク質を大腸菌で発現・精製し、*in vitro*キナーゼアッセイを行うことにより、大腸菌から精製した昆虫PINK1が直接リン酸化し得ることを明らかにした。

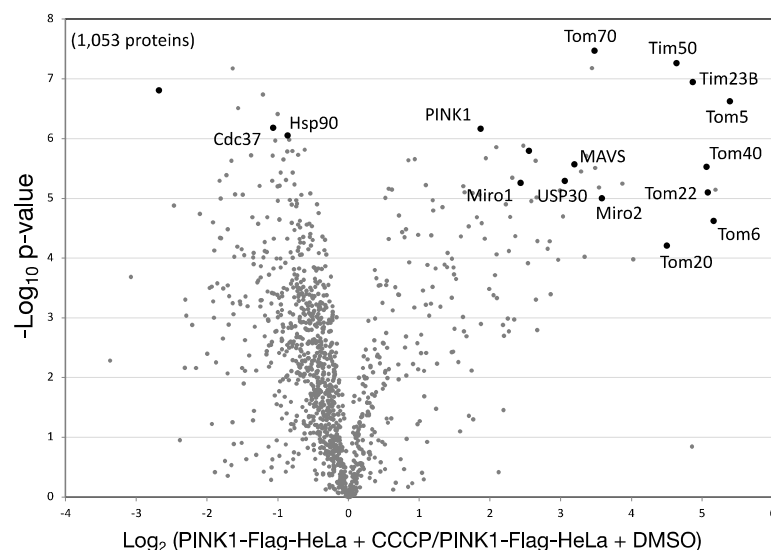


図3. IP-MS(免疫沈降-質量分析)法によるPINK1結合タンパク質の探索

(3) PINK1によって活性化した Parkinがミトコンドリアに局在するユビキチン連結酵素である MITOL をユビキチン化することを見出し、質量分析によって MITOL の C 末端付近のリジン残基がユビキチン化部位であることを示した。このユビキチン化部位をアラニンまたはアルギニンに置換した変異体を用いて解析することにより、Parkin が MITOL をユビキチン化することによって MITOL をミトコンドリアからペルオキシソームへ移行させることを明らかにした。

(4) 本研究により、ミトコンドリアの損傷に依存して PINK1 と相互作用し、かつ PINK1 によって直接リン酸化される新たな基質タンパク質を同定することができた。このタンパク質はミトコンドリア外膜に局在し、ミトコンドリア特異的なオートファジーやアポトーシスと関連することが報告されており、PINK1/Parkin シグナルにおいて何らかの役割を果たしている可能性がある。このタンパク質とミトコンドリア機能やパーキンソン病などとの関連について、生化学・細胞生物学的な検討を今後進める予定である。なお、本研究で開発した下流リン酸化タンパク質の大規模な定量解析法や相互作用因子の網羅的な探索法は他のシグナル伝達因子にも適用可能な汎用性の高い方法である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Koshiba Takumi, Kosako Hidetaka	4. 巻 167
2. 論文標題 Mass spectrometry-based methods for analysing the mitochondrial interactome in mammalian cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 225-231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koyano Fumika, Yamano Koji, Kosako Hidetaka, Kimura Yoko, Kimura Mayumi, Fujiki Yukio, Tanaka Keiji, Matsuda Noriyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Parkin mediated ubiquitylation redistributes MITOL/March5 from mitochondria to peroxisomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201947728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koyano Fumika, Yamano Koji, Kosako Hidetaka, Tanaka Keiji, Matsuda Noriyuki	4. 巻 294
2. 論文標題 Parkin recruitment to impaired mitochondria for nonselective ubiquitylation is facilitated by MITOL	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10300-10314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.006302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Motani K, Kosako H	4. 巻 1867
2. 論文標題 Phosphoproteomic identification and functional characterization of protein kinase substrates by 2D-DIGE and Phos-tag PAGE	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2018.06.002	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 Motani K, Kosako H	4. 巻 293
2. 論文標題 Activation of stimulator of interferon genes (STING) induces ADAM17-mediated shedding of the immune semaphorin SEMA4D	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 7717-7726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 M. Sato, K. Sato, K. Tomura, H. Kosako and K. Sato	4. 巻 20
2. 論文標題 The autophagy receptor ALLO-1 and the IKKE-1 kinase control clearance of paternal mitochondria in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 81-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-017-0008-9	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 小迫英尊, 茂谷康	4. 巻 61
2. 論文標題 Phos-tagなどのリン酸化プロテオミクス技術による疾患原因キナーゼの機能解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/electroph.61.53	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7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小迫 英尊
2. 発表標題 最先端プロテオミクス技術を用いた疾患に関与するシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kou Motani and Hidetaka Kosako
2. 発表標題 BioID-Based Screening of Biotinylation Sites Globally Identifies STING Interactors
3. 学会等名 Keystone Symposia "Proteomics and its Application to Translational and Precision Medicine" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤美由紀、佐藤健、小迫英尊
2. 発表標題 線虫遺伝学Xプロテオミクスのコラボ：父性オルガネラオートファジー制御機構の解明を目指して
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidetaka Kosako
2. 発表標題 Global identification and functional characterization of protein kinase substrates using various phosphoproteomic technologies
3. 学会等名 MSP2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小迫英尊
2. 発表標題 疾患に關与する細胞内情報伝達機構を解明するためのリン酸化プロテオミクス技術
3. 学会等名 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018年合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Kosako, M. Kawano, K. Tanaka and N. Matsuda
2. 発表標題 Quantitative interactome and phosphoproteome analysis identifies novel signaling components of Parkinson's disease-associated kinase PINK1.
3. 学会等名 HUPO 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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
連携研究者	松田 憲之 (MATSUDA Noriyuki) (10332272)	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・プロジェクトリーダー (82609)	

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