

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687018

研究課題名(和文)ミトコンドリアの品質管理からパーキンソン病の発症機構に迫る

研究課題名(英文) Collapse of mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin causes Parkinson disease

研究代表者

松田 憲之 (MATSUDA, Noriyuki)

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・副参事研究員

研究者番号：10332272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円、(間接経費) 6,150,000円

研究成果の概要(和文)：Parkinの基質を探索する目的でミトコンドリア膜電位低下時にParkinと結合する因子を検索し、HKIを同定した。HKIはCCCP処理後にユビキチン化されてラダー状に分子量が増加した。またHKIはミトコンドリア上に局在し、Parkinによってユビキチン化されること、患者由来のParkin変異体はHKIをユビキチン化できないことを明らかにした。PINK1が活性化される仕組みについてはPINK1が自己リン酸化をされることを見出して、「PINK1のS228/S402の自己リン酸化を介した質的制御が異常なミトコンドリアの認識に決定的に重要である」ことを証明した。

研究成果の概要(英文)：1) We screened for novel Parkin substrate(s) and identified mitochondrial hexokinase I (HKI) as a candidate. Following a decrease in membrane potential, Parkin ubiquitylation of HKI leads to its proteasomal degradation. Moreover, most disease-relevant mutations of Parkin hinder this event and endogenous HKI is ubiquitylated upon dissipation of mitochondrial membrane potential in genuine-Parkin expressing cells, suggesting its physiological importance. 2) The mechanism underlying the homeostatic control of PINK1 remains unknown. We revealed that PINK1 is autophosphorylated following a decrease in membrane potential and that most disease-relevant mutations hinder this event. We demonstrated that PINK1 autophosphorylation occurs at Ser228 and Ser402, residues that are structurally clustered together. We propose that autophosphorylation of Ser228 and Ser402 in PINK1 is essential for efficient mitochondrial localization of Parkin.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：PINK1 Parkin ミトコンドリア パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで高い罹患率を示す老人性神経変性疾患である。国内には 14 万人を超える患者がいると推測されており、パーキンソン病が発症する仕組みの解明と、その知見を活かした根本的な治療法の確立が強く求められている。しかしながら、その発症機構には未だ不明な点が多く残されている。そこで、本研究では「普段はパーキンソン病の発症を抑えている」PINK1 と Parkin という、2 つの遺伝性劣性パーキンソン病の原因遺伝子産物に着目し、ミトコンドリアの品質管理の破綻という観点からパーキンソン病発症の全貌に迫ることを目指して研究を行った。

2. 研究の目的

遺伝性劣性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1 と Parkin がどのようにして“協調して異常なミトコンドリアを分解除去しているのか”を明らかにする。特に本研究では

1) PINK1 が自己リン酸化を介して制御されている可能性を検討するとともに、

2) Parkin によってユビキチン化される新しい基質の同定を目指す。

そのようにして PINK1/Parkin 依存的なミトコンドリア品質管理系の分子メカニズムを明らかにすることで、パーキンソン病の発症機構の包括的な理解と、将来の治療法確立に向けた基礎的な土台の確立を目指す。

3. 研究の方法

まず Parkin の基質を探索する目的で、ミトコンドリア膜電位低下時に Parkin と結合す

る因子のスクリーニングを行い、産業総合研究所の夏目博士との共同研究により、質量分析装置を用いて候補因子の同定を試みた。また、PINK1 の自己リン酸化を介した活性制御の可能性については、徳島大学の小迫博士との共同研究を通じて、activation loop における候補リン酸化残基の絞り込みや、Phos-tag PAGE を用いて自己リン酸化の意義の検定・リン酸化された PINK1 量の測定・リン酸化部位の同定などを行った。さらに Parkin recruitment における PINK1 自己リン酸化の意味は、立教大学の岡博士との共同研究を通じて、Parkin recruitment assay や GFP-偽基質に対するユビキチン化 assay などで検討した。

4. 研究成果

Parkin の基質を探索する目的でミトコンドリア膜電位低下時に Parkin と結合する因子のスクリーニングを行い、VDAC, Tom70, NME2, CISD1, HK1 を同定した。細胞質因子である NME2 は解析対象から外し、残りを培養細胞において Parkin と共過剰発現し CCCP 処理を行ったところ、VDAC, CISD1, HK1 についてユビキチン化に由来すると思われるラダー状の分子量の増加が観察された。他グループの網羅的解析と比較検討した結果、今まで解析されていなかった HK1 に着目して解析を進めた。その結果、HK1 はミトコンドリア上に局在し、Parkin によってユビキチン化されること、患者由来の Parkin 変異体は HK1 をユビキチン化できないことを明らかにした。申請者はこれら一連の結果から、HK1 が Parkin の新規基質であることを提唱して論文にまとめた (BBRC 2012)、後に PINK1 研究で著名な Mark

Cookson のチームからも類似の内容の論文が報告されて、結論の正しさが証明された(HMG 2014)。PINK1 基質については、まず PINK1 自身がリン酸化をされていること、言い換えると「PINK1 自身が基質である」可能性を見出した。更にこの現象について詳細な解析を行い、Activation loop 中に存在する Ser402 と、構造予測(理研横浜研究所の清水博士との共同研究)と質量分析解析(徳島大学の小迫博士との共同研究)から同定された Ser228 の 2ヶ所が自己リン酸化部位であることを見出した。つまり、「PINK1 の Ser228/Ser402 の自己リン酸化を介した質的制御が異常なミトコンドリアの認識に決定的に重要である」ことを証明し、2012年に論文として Nature Communications 誌に発表した。この仕事は雑誌「細胞工学」の Hot Topic でも取り上げられた。

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)

1) Okatsu, K., Iemura, S-I., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2012)

Mitochondrial hexokinase HK1 is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428 (1), 197-202, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.041 (査読有り)

2) Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., Shiba-Fukushima,

K., Sato, S., Shimizu, H., Fukunaga, Y., Taniguchi, H., Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2012)

PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat. Commun.* 3 : 1016 (10 page), DOI: 10.1038/ncomms2016 (査読有り)

3) 松田憲之 (2012)

遺伝性パーキンソン病関連分子 PINK1 は自己リン酸化を介して「ミトコンドリア異常」シグナルを Parkin に伝達する
細胞工学 Hot Press, 秀潤社 Vol.31, No.12, pp1374-75 (査読無し)

[学会発表](計2件)

1) 松田憲之, 尾勝圭, 岡敏彦, 小迫英尊, 田中啓二:
PINK1 による「ミトコンドリア異常」シグナル: 膜電位の低下は PINK1 の自己リン酸化を介して伝達される

Autophosphorylation of PINK1 upon the dissipation of mitochondrial membrane potential is essential for recruitment of Parkin to damaged mitochondria

第35回日本神経科学大会 in シンポジウム「神経変性機序解明に向けた新たな展開」招待講演・英語(9/21) 2012年9月18日～21日, 名古屋(名古屋国際会議場)

2) 第84回 日本生化学会大会

シンポジウム 2S2a 「ストレスシグナル研究の最前線」

松田憲之, 尾勝圭, 田中啓二

ミトコンドリア異常を伝える PINK1 シグナル (PINK1 as a signal component of damaged mitochondria)

招待講演(9/22) 2011年9月21日～24日,
京都(国立京都国際会館)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

(現在、改訂中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 憲之(MATSUDA, Noriyuki)

公益財団法人東京都医学総研究所・生体分子

先端研究分野・副参事研究員

研究者番号: 10332272

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし