

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19523

研究課題名(和文)パーキンソン病病態に本質的に関わるParkin基質の探索

研究課題名(英文)Search of essential substrates of Parkin in Parkinsonism

研究代表者

荒野 拓 (Arano, Taku)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：80750091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病原因遺伝子Parkinはユビキチンリガーゼをコードし、ミトコンドリアの品質管理に関与することが知られている。しかし、Parkinの変異によりドーパミン神経が選択的に変性する分子機序は不明である。そこで、ドーパミン神経、グリア特異的にParkin依存的にユビキチン化される分子を、BioUb6-BirAシステムとショウジョウバエを組み合わせて探索をした。さらに、新規に単離されたパーキンソン病原因遺伝子CHCHD2の結合タンパク質の探索を、ヒト培養細胞を用いて実施し、ミトコンドリアマトリクスタンパク質p32を同定した。p32とCHCHD2との結合の生理的意味は、ハエモデルで検討した。

研究成果の概要(英文)：The parkin genes responsible for autosomal recessive early-onset Parkinson's disease, which encodes ubiquitin-ligase, is known to regulate mitochondrial quality control. However, the pathogenesis of selective dopaminergic neuron death caused by Parkin mutations remained unknown. To address this issue, I tried to search dopaminergic neuron-specific or glia-specific ubiquitination substrates of Parkin using the combination of BioUb6-BirA system and Drosophila. Newly identified autosomal dominant late-onset Parkinson's disease gene, CHCHD2, encodes a mitochondrial protein with unknown functions. I tried to determine CHCHD2-binding proteins from human cultured cells and isolated a mitochondrial matrix protein p32. The biological significance of CHCHD2-p32 interaction was assessed using Drosophila models.

研究分野：分子生物学

キーワード：Parkin ドーパミン神経 ミトコンドリア CHCHD2 ユビキチン パーキンソン病 ショウジョウバエ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

Parkin 変異にリンクする若年性パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質ドーパミン神経および脳幹青斑核のノルアドレナリン神経の選択的な脱落が特徴である。グリオーシスなどの炎症は観察されないと報告されている。すなわち *Parkin* 変異による PD は、純粋にドーパミン神経の生存性に関わるシグナル経路の異常により発症に至ると考えられる。遺伝子産物 *Parkin* はユビキチンリガーゼであり、別の若年性 PD 原因遺伝子産物である PINK1 と協働し、損傷したミトコンドリア上のタンパク質をユビキチン化する¹。その後ユビキチン化ミトコンドリアは、オートファジーで選択的に除去されることが示されている。このイベントはミトコンドリア選択的なオートファジーとして、特にマイトファジーと呼ばれている。しかし、マイトファジーの研究やマイトファジーに関わる *Parkin* 基質の同定は、強力なミトコンドリア脱共役剤で非神経培養細胞を処理して行われている^{2, 3}。つまり、ドーパミン神経とは構造的、性質的に全く異なる培養株化細胞で *Parkin* を活性化しているため、生体内での動態を反映できているか、ドーパミン神経の生存性に重要な現象をみているかは疑問であった。この問題を克服するには、ドーパミン神経で *Parkin* の生理的基質を明らかにすることが重要である。

モノアミン酸化酵素 MAO-A、MAO-B はミトコンドリア外膜に局在し、*Parkin* 過剰発現培養細胞においてユビキチン化修飾が行われるタンパク質の一つとして同定されている^{2, 3}。MAO-B はドーパミンの不活性化を担っており、中脳黒質では主にグリア細胞に発現している。一方、MAO-A はノルアドレナリン、セロトニンの代謝に関わり、青斑核でその活性が高い。MAO-A、MAO-B はモノアミンの酸化の過程で過酸化水素を生じることから、酸化ストレスの原因となる可能性が指摘されている。つまり、*Parkin* にリンクする PD におけるドーパミン神経、ノルアドレナリン神経特異的な病態との関連が予測された。

2. 研究の目的

本研究では、新規に開発されたユビキチン化タンパク質の高感度同定法⁴と時空間特異的に遺伝子発現調節可能なショウジョウバエを組み合わせたドーパミン神経特異的な *Parkin* 基質探索と、同定された基質および既知基質である MAO がドーパミン神経の細胞生存や神経活動にどのように関与するかを、ハエモデル、iPS 細胞を組み合わせる解析し、PD 病態に本質的に関わる分子を明らかにする。

Parkin がハエドーパミン神経、グリア細胞内でユビキチン化する基質を網羅的に探索

し、Probability (確実性) 順にランクづけする。ランクの高いものを抽出し、*Parkin* ハエモデルで基質としての妥当性を確認する。また、並行して MAO ハエホモログを同定する。次にこれら基質がドーパミン神経に及ぼす影響を PINK1、*Parkin* ハエモデルを用いて行動解析、組織化学的解析、神経分泌のイメージング、神経化学的解析により明らかにする。以上の作業から、ドーパミン神経変性に関わるタンパク質の絞り込みを行う。

3. 研究の方法

PINK1 変異ハエでは、*Parkin* が不活性型になっていることが予想され、その基質タンパク質が蓄積していると考えられる。一方、野生型ハエでは、基質タンパク質のユビキチン化が進んでいると予想される。両遺伝子型のハエにおいて、ビオチン化ラベルしたユビキチンをドーパミン神経・グリア特異的に発現させ、安定性同位体元素にて個体ごとラベルする。次に脳を摘出し、アビジン担体でビオチン化ユビキチンを高純度に精製する。その画分にユビキチン化基質が含まれており、定量的質量分析にてドーパミン神経・グリア特異的ユビキチン化タンパク質を検出する (図 1 に概要を示す)。同定分子の蓄積による神経伝達異常を遺伝学的解析 (過剰発現や機能喪失による表現型解析)、行動解析、モノアミン測定、病理学的解析により明らかにする。病態機序に関与する可能性が高い分子は、さらに PD 遺伝子に変異を有する患者

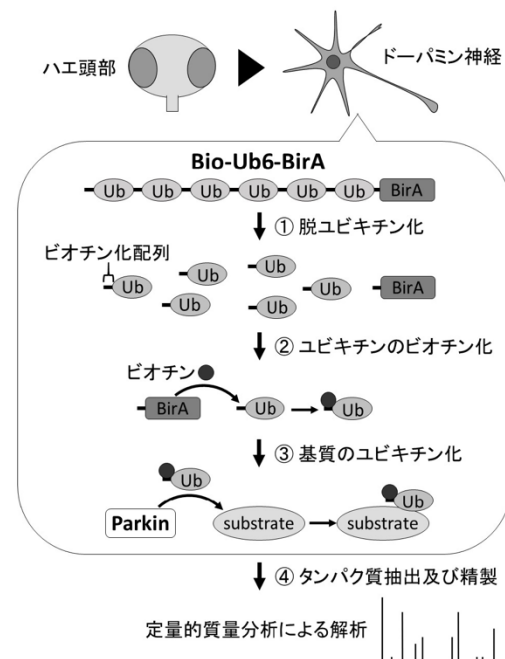


図 1. Bio-Ub₆-BirA システムによる *Parkin* 基質探索の概要

iPS細胞由来のドーパミン神経を用いることにより、疾患への関与を確認する。

並行して、Parkin 基質としてのMAOの生理的意義を、ハエモデルで解析する。具体的には、*Drosophila* MAO 相同候補遺伝子CG5653, CG7460をクローニングし、MAO活性の有無の確認と、遺伝子改変ハエの作製、行動解析、ドーパミン神経生存性への影響を明らかにする。

4. 研究成果

ビオチン化酵素BirAとビオチン化配列を付加されたユビキチンを6つ連結させた人工タンパク質(BioUb₆-BirA)をドーパミン神経に発現させ、アビジン-ビオチン免疫沈降法を用いてユビキチン化タンパク質の濃縮を行った。パイロット実験として、脳全体でBioUb₆を発現させ、ユビキチン化タンパク質の精製を行った(図2)。

次に、ドーパミン神経特異的にBioUb₆-BirAを発現させた野生型とPINK1変異ハエを用いて、ユビキチン化タンパク質を濃縮し、SDS-PAGEで分離したのち、銀染色でタンパク質検出を実施した。100匹分の頭部から検討を始めたが、量的な確保が難しく質量分析で解析できなかった。外来性のParkin遺伝子を導入し、ビオチン付加ユビキチンの回収量を増やす方法を試行している際に、ほぼ同じ実験手法を用いて、Parkinの基質を報告した論文が発表され⁵、計画を中断することとした。

一方、MAOに関しては、まずParkinの基質となるかどうかをヒト神経系細胞SH-SY5Yを用いて検証した。その結果、Parkinの活性化依存的に分解されることを確認できた(図3)。次に、ParkinによるMAOの発現レベルの制御の生理的意義を検討するため、PINK1, Parkinの変異で、神経変性が再現できるハエの系を用いての実験系を計画した。ハエにMAOが存在するかどうかは報告がないため、一次配列の相同性から候補遺伝子CG5653, CG7460に関して、リコンビナントタンパク質を作製し、ドーパミン酸化活性を測定した。しかし、有意な活性が認められず、実験系の構築が困難と判断した。

2つの実験計画が当初の計画通り進まなかったことから、次に新規に同定されたPD原因遺伝子CHCHD2の結合タンパク質をBirAシステムで同定することとした⁶。CHCHD2のC末端側にBirAを付加し、培養細胞に遺伝子導入後、CHCHD2-BirAによりビオチン化されたタンパク質を精製し同定した(図4)。そのうち、従来の免疫沈降法においても、CHCHD2の結合分子として別途同定していたp32が、再現よく結合することを見出し、CHCHD2とp32の分子関係の解析を進めた。

CHCHD2ノックアウトハエは、ミトコンドリア

変性がおこることから、ハエの系を用いて、p32がCHCHD2の発現に及ぼす影響、CHCHD2がp32の発現に及ぼす影響を調べた。しかし、分子レベルでの有意な変化は見られなかった(図5)。次に、遺伝的相互作用解析を実施した。CHCHD2ノックアウトハエは、ミトコンドリア変性が進みATP産生が低下する。これが、p32のノックダウン(p32ノックアウトハエは致死となるため使用できなかった)で増悪するかどうか検討した。しかし、p32の発現抑制はCHCHD2機能喪失によるミトコンドリアATP産生の低下に有意な影響をもたらさなかった(図6)。

CHCHD2やそのホモログCHCHD10とp32との結合は、他研究グループにおいても見出されており^{7, 8}、BirAシステムによるCHCHD2結合タンパク質の同定は成功したと評価される。しかし、CHCHD2はミトコンドリア膜間腔、p32はマトリクスに局在すると考えられており、その会合様式は不明である。今後は、その他のCHCHD2結合分子の同定と機能解析を進めていきたい。

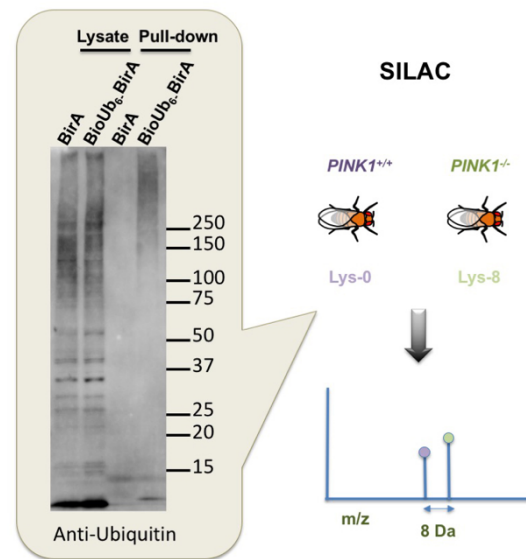


図2. ユビキチン化タンパク質の精製

ハエの脳よりユビキチン化タンパク質の精製を実施し、次にドーパミン神経特異的ユビキチン化タンパク質の探索に進めた。

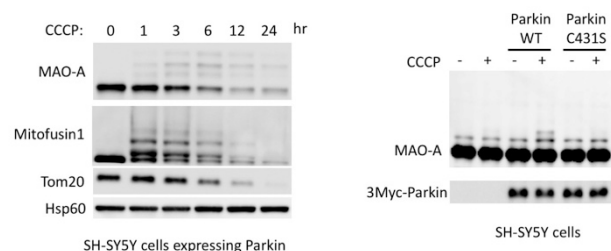


図 3. MAO は Parkin の基質となる

Parkin を過剰発現した SH-SY5Y 細胞において、Parkin の活性依存的に MAO がユビキチン化される。CCCP は、ミトコンドリアの膜電位を低下させ PINK1 を活性化する試薬。Mitofusin1, Tom20 は既知の Parkin 基質。Hsp60 はミトコンドリアマトリクスタンパク質。

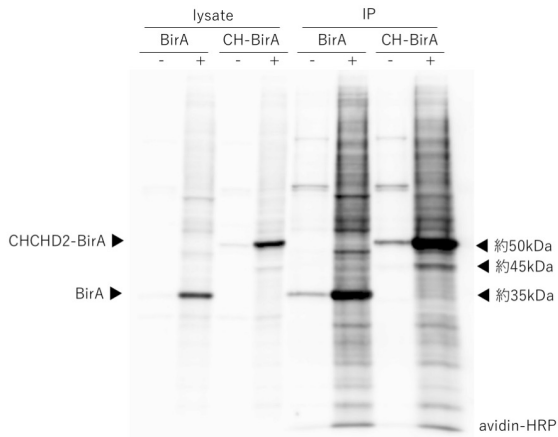


図 4. CHCHD2 結合タンパク質の探索

CHCHD2-BirA によりビオチン化されたタンパク質をアビジン担体で精製した。特異的タンパク質を複数同定することに成功した。

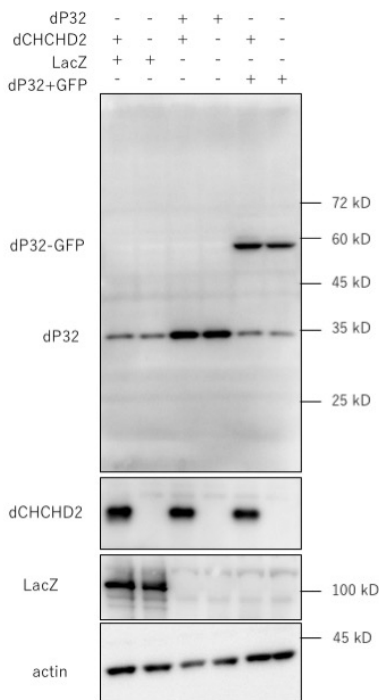


図 5. CHCHD2 と p32 の分子解析

ハエ CHCHD2(dCHCHD2)の野生型(+), ノックアウト(-)に p32 もしくは p32-GFP を導入した。LacZ はコントロール。

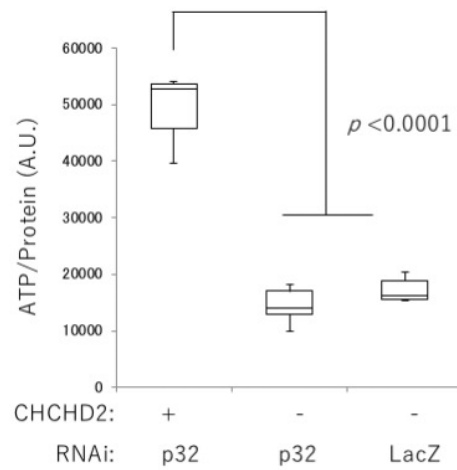


図 6. CHCHD2 と p32 の遺伝的相互作用解析

ハエ CHCHD2 の野生型(+), ノックアウト(-)において、筋肉特異的に p32 もしくは LacZ の RNAi を実施し、ATP 濃度を測定した。p32 の発現阻害は、CHCHD2 ノックアウトハエの ATP 低下に影響を与えなかった。

<引用文献>

- Shiba-Fukushima K, *et al.* Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering. *PLoS genetics* **10**, e1004861 (2014).
- Sarraf SA, *et al.* Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* **496**, 372-376 (2013).
- Ordureau A, *et al.* Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell* **56**, 360-375 (2014).
- Franco M, Seyfried NT, Brand AH, Peng J, Mayor U. A novel strategy to isolate ubiquitin conjugates reveals wide role for ubiquitination during neural development. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**, M110 002188 (2011).
- Martinez A, *et al.* Quantitative proteomic analysis of Parkin

- substrates in *Drosophila* neurons. *Mol Neurodegener* **12**, 29 (2017).
6. Meng H, *et al.* Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nat Commun* **8**, 15500 (2017).
 7. Burstein SR, *et al.* In vitro and in vivo studies of the ALS-FTLD protein CHCHD10 reveal novel mitochondrial topology and protein interactions. *Human molecular genetics* **27**, 160-177 (2018).
 8. Straub IR, *et al.* Loss of CHCHD10-CHCHD2 complexes required for respiration underlies the pathogenicity of a CHCHD10 mutation in ALS. *Human molecular genetics* **27**, 178-189 (2018).

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 2 件)

- ① Hosaka Y, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Cui C, Arano T, Imai Y, Hattori N: Reduced TDP-43 Expression Improves Neuronal Activities in a *Drosophila* Model of Perry Syndrome. *EBioMedicine*. 査読有 21: 218-227 (2017)
doi: 10.1016/j.ebiom.2017.06.002.
- ② Inoshita T, Arano T, Hosaka Y, Meng H, Umezaki Y, Kosugi S, Morimoto T, Koike M, Chang H-Y, Imai Y, Hattori N: Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* 査読有 26: 2933-2948 (2017)
doi: 10.1093/hmg/ddx179.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 井下 強、荒野 拓、穂坂 有加、孟 紅蕊、梅崎 勇次郎、小杉 紗紀子、森本 高子、小池 正人、Chang Hui-Yun、今居 讓、服部 信孝: パーキンソン病原因遺伝子 Vps35 はシナプス小胞再生関連遺伝子と協働して神経伝達を制御する ConBio2017 ワークショップ (神経変性

疾患への分子生物学的アプローチ) 神戸、2017年12月8日

- ② 3. 井下 強、崔 長旭、荒野 拓、穂坂 有加、孟 紅蕊、梅崎 勇次郎、小杉 紗紀子、森本 高子、小池 正人、Chang Hui-Yun、今居 讓、服部 信孝: Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle recycling through the endosomal pathway 第40回日本神経学会学術大会 千葉、2017年7月21日
- ③ 井下 強、荒野 拓、穂坂 有加、孟 紅蕊、梅崎 勇次郎、小杉 紗紀子、森本 高子、小池 正人、Hui-Yun Chang、服部 信孝、今居 讓: パーキンソン病原因遺伝子によるシナプス小胞動態制御. 第39回日本分子生物学会年会 ポスター 横浜、2016年12月2日
- ④ 山下 力、孟紅蕊、井下 強、福嶋佳保里、荒野拓、佐藤栄人、今居 讓、服部信孝: パーキンソン病新規原因遺伝子 CHCHD2 の機能解析. 第57回日本神経学会学術大会 神戸、2016年5月18日

[図書] (計 1 件)

- ① Hattori N, Arano T, Hatano T, Mori A, Imai Y: Mitochondrial-Associated Membranes in Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 997:157-169 (2017)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: パーキン活性化剤のスクリーニング法
発明者: 今居 讓、服部 信孝、福嶋佳保里、荒野 拓
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2016-016997
取得年月日: 平成 28 年 2 月 1 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/laboparkinsons_disease/

プレスリリース

「神経軸索変性による神経機能不全の改善に成功」朝日新聞デジタル&M、他17メディア
2017年6月22日掲載

「パーキンソン病原因遺伝子の異常による神経活動低下の仕組みを解明」読売新聞
(YOMIURI ONLINE)、他 29 メディア 2017
年 5 月 26 日掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒野 拓 (ARANO, Taku)

順天堂大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：80750091