

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09765

研究課題名(和文) PINK1-Parkin介在性ミトファジーに関与する新規分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of novel molecules involved in PINK1-Parkin-mediated mitophagy

研究代表者

柴 佳保里 (Shiba, Kahori)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30468582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：若年性パーキンソン病原因遺伝子産物Parkinは、不良ミトコンドリアを排除するミトファジーに関与する。本研究で、Parkinによって形成されるリン酸化ポリユビキチン鎖に結合する分子としてPUBP1を同定しその機能解析を行った。Parkin依存的なミトファジーを誘導すると、PUBP1は細胞質からミトコンドリアに部分的に移行した。一方、PUBP1欠失細胞では、ミトファジーが阻害されることを明らかにした。以上の観察から、PUBP1が、Parkin依存的なミトファジーの促進分子であること、その活性が若年性パーキンソン病発症機序に影響を与える可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性パーキンソン病は単一の遺伝子異常によって発症するため、その機能解析は発症機構の理解の手がかりとなる。若年性パーキンソン病原因遺伝子であるPINK1とParkinは弧発型パーキンソン病のリスク遺伝子でもある。その為、本研究において得られる情報はPINK1-Parkinにリンクするパーキンソン病態だけでなく、弧発型パーキンソン病の理解に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Parkin, the gene product responsible for juvenile Parkinson's disease, is involved in mitophagy to eliminate defective mitochondria. In this study, we identified PUBP1 as a molecule that binds to the phosphorylated polyubiquitin chains formed by Parkin and analyzed its function. When Parkin-dependent mitophagy was induced, PUBP1 was partially translocated from the cytoplasm to the mitochondria. In contrast, mitophagy was inhibited in PUBP1-deficient cells. These observations suggest that PUBP1 is a facilitator of Parkin-dependent mitophagy, and that the activity of PUBP1 may affect the pathogenesis of juvenile Parkinson's disease.

研究分野：神経学

キーワード：Parkin PINK1 mitophagy

## 1. 研究開始当初の背景

若年性遺伝性パーキンソン病原因遺伝子産物である Parkin と PINK1 は、それぞれユビキチン連結酵素及びセリン・スレオニンリン酸化酵素である。ショウジョウバエの遺伝学的相互作用から、Parkin と PINK1 がミトコンドリアの機能維持に関与し、PINK1 の下流に Parkin が位置することが明らかになった。近年、分子機構も明らかになりつつあり、PINK1 と Parkin は後述のようにオートファジーを介した選択的なミトコンドリア分解経路 (マイトファジー) で機能することが報告されている。ミトコンドリア膜電位が低下した不良ミトコンドリアを PINK1 が感知し、ユビキチンと Parkin をリン酸化する。リン酸化ユビキチンと自身のリン酸化修飾によって活性化された Parkin は、ミトコンドリアに局在移行し、ミトコンドリア局在性基質をポリユビキチン化する。さらに、PINK1 がポリユビキチン鎖をリン酸化修飾することで Parkin の局在化が促進され、フィードフォワードループが形成される。ポリユビキチン鎖やリン酸化ポリユビキチン鎖は Parkin だけでなく、オートファジー関連分子群をも局在化し、オートファジー経路で速やかに分解誘導される。我々は PINK1-Parkin 依存的に形成されるリン酸化ポリユビキチン鎖に結合する新規分子を同定することで、詳細な分子機構を解明しようと考えた。そこで、PINK1-Parkin 依存的なリン酸化ポリユビキチン鎖を発現する細胞株を用いて結合因子のスクリーニングを行い、PUBP1 (Poly-Ub Binding Protein1) を同定した。

## 2. 研究の目的

PINK1 と Parkin は、損傷したミトコンドリア上にリン酸化ポリユビキチン鎖のタグ (目印) を形成する。リン酸化ポリユビキチン鎖に結合する新規因子として PUBP1 を同定した。本研究では、PUBP1 が PINK1-Parkin を介したマイトファジーのどのステップで作用するのか明らかにし、若年性パーキンソン病の病態への関与を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

PUBP1 がリン酸化ポリユビキチン鎖に直接結合するかどうかを *in vitro* プルダウン法を用いて検討した。リン酸化ポリユビキチン鎖は、PINK1 をキナーゼ源、ポリユビキチン鎖を基質とした *in vitro* kinase 法において作製した。それぞれのタンパク質局在に関しては、蛍光免疫染色法、ライブイメージングを用いて行った。CRISPR/Cas9 システムを用いて PUBP1 ノックアウト (以下、KO) 細胞を樹立し、そこに Parkin を安定的に発現する細胞株を作製した。この細胞株を用い、バリノマイシン (ミトコンドリア脱共役剤) にてミトコンドリア膜電位を低下させ、マイトファジーを誘導した。マイトファジー誘導前後のミトコンドリア外膜タンパク質群、及びオートファジー関連分子のタンパク質発現量をウエスタンブロット法において解析した。培養細胞内の微細構造は電子顕微鏡を用いて観察を行った。分子間結合に関しては、免疫沈降法を用いた。リン酸化修飾の有無に関しては、phos-tag を用いたウエスタンブロット法で解析した。

## 4. 研究成果

PINK1-Parkin によって形成されるリン酸化ポリユビキチン鎖は、Parkin との親和性を増強させる。そこで、PUBP1 が lysine 48、および lysine 63 にリンクするリン酸化ポリユビキチン鎖、もしくは非リン酸化ポリユビキチン鎖に直接的に結合するかどうかを確認した。その結果、PUBP1 は lysine 63 連結型非リン酸化ポリユビキチン鎖と結合することが明らかになった (図 1)。先行研究において、OPTN などのオートファジーアダプター分子も lysine 63 連結型非リン酸化型ポリユビキチン鎖と親和性が高いことが明らかになっている。PUBP1 も同様のステップで機能している可能性が考えられた。

次に、マイトファジー誘導時、PUBP1 がミトコンドリアに局在移行するかどうかを確認した。定常時、PUBP1 は細胞質に顆粒状に局在するが、マイトファジーを誘導すると、PUBP1 はミトコンドリアと部分的に共局在することを観察した。また、ライブイメージングにより分子の動的な挙動を観察すると、一過性に PUBP1 が Parkin と共局在することが確認できた。

つぎに、PUBP1 が PINK1-Parkin を介するマイトファジーのどのステップに関与するか検討した。具体的には、野生型と PUBP1 KO 細胞において Parkin の基質タンパク質である Mitofusin 1 (Mfn1)、ミトコンドリア局在性タンパク質である TOM20 と TIM23 のマイトファジー時の分解に与える影響を検討した。その結果、Mfn1 とミトコンドリア局在性タンパク質群の分解に大きな影響は見られなかった。これらの結果から、PUBP1 は PINK1-Parkin に必須の因子ではないことが示唆された。

PINK1-Parkin を介したマイトファジーにおいて、ポリユビキチン鎖とオートファジー関連分子との結合は、ミトコンドリアの分解実行の主要なステップである。PINK1-Parkin 経路が活性化されると TANK-binding kinase 1 (TBK1) の 172 番目のセリン残基がリン酸化修飾され、自

身のキナーゼを活性化する。活性化した TBK1 は、オートファジーアダプター分子である p62/SQSTM1、Optineurin (OPTN) をリン酸化修飾し、p62、OPTN のポリユビキチン鎖への親和性を高める。このように、TBK1、p62、OPTN のリン酸化修飾は、ポリユビキチン鎖が形成されたミトコンドリアのオートファジーを介した分解に関与する。これらを踏まえ、これらのオートファジーアダプター分子のリン酸化修飾を指標に PUBP1 の役割を検討した。その結果、PUBP1 非存在下マイトファジーを誘導すると TBK1 と p62、それぞれのリン酸化型タンパク質量が増加していた(図 1)。これらはオートファジーフラックスの低下を示唆しているものと考えられた。マイトファジーを誘導すると、リン酸化 TBK1 は細胞質からミトコンドリアへ顆粒状に局在移行する。次に、リン酸化 TBK1 のミトコンドリアへの局在化に、PUBP1 がどのように影響するのかを確認した。その結果、PUBP1 KO 細胞ではリン酸化 TBK1 シグナル顆粒数が有意に低下した(図 3)。以上から、PUBP1 はオートファジーアダプター分子のリン酸化修飾(活性化)を調節することで、PINK1-Parkin を介したマイトファジーに関与する可能性が示唆された。

オートファジー関連タンパク質である ATG8 ファミリーは、オートファジー活性化時に、ホスファチジルエタノールアミンと結合し、オートファゴソーム膜上に局在する。ATG8 ファミリー分子はアミノ酸配列の相同性にに基づき、LC3 および GABARAP の 2 つのサブファミリーに分類され、オートファゴソームの生合成に必須の因子である。PUBP1 はイノシトールリン脂質膜結合ドメインを持ち、ショウジョウバエの表現型解析から、脂質膜伸張を担うことが示唆されている。そこで、オートファゴソームの形成に PUBP1 も作用している可能性を考え、マイトファジー誘導時のオートファゴソーム膜形成への影響を電子顕微鏡で観察した。しかし、PUBP1 KO 細胞においてオートファゴソームの形態や大きさは野生型と同様であった(図 4)。また、PUBP1 と ATG8 ファミリー(LC3 および GABARAP ファミリー)との結合を確認したが、結合は認められなかった。さらに、一過性に共局在する Parkin との安定的な結合も確認できなかった。これらの結果から、PUBP1 はオートファゴソーム膜形成に関与していない可能性が考えられた。

網羅的な解析から、オートファジーを誘導すると PUBP1 はリン酸化修飾されることが報告されている。PINK1-Parkin マイトファジーは一連のリン酸化シグナリングを介して進行するため、PUBP1 がリン酸化修飾されることで活性化する可能性を想定した。HeLa 細胞および iPS 細胞より分化したドパミン神経(iPS-ドパミン神経)において、マイトファジー誘導時の PUBP1 のリン酸化修飾の有無を確認したが、変化は見られなかった。しかし、健常者由来 iPS-ドパミン神経にて、マイトファジーを長時間誘導すると、PUBP1 が消失することを見出した。マイトファジーによる活性化後、Parkin やオートファジーアダプター分子(OPTN、p62 など)も速やかに分解されることから、PUBP1 も PINK1-Parkin マイトファジーに関与し分解されることが考えられた。

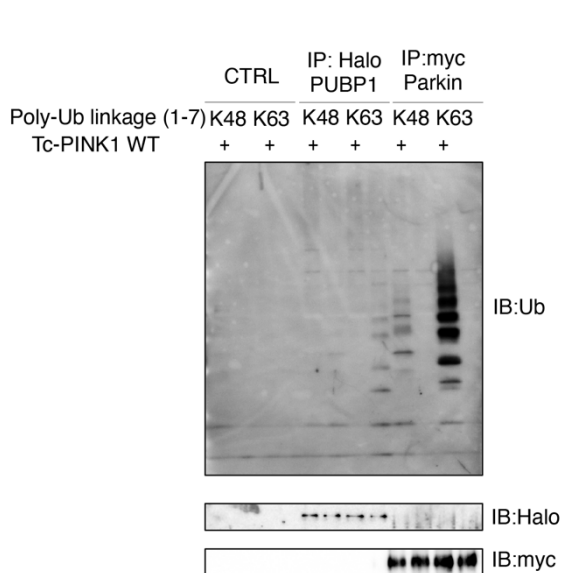


図 1. PUBP1 とリン酸化および非リン酸化ポリユビキチン鎖との結合

in vitro にて lysine 48 (K48)連結型、lysine63(K63)連結型ポリユビキチン鎖(ユビキチン鎖の長さは 1~7)をコクヌストモドキ PINK1(Tc-PINK1)でリン酸化し、免疫沈降した Halo-PUBP1 と Myc-Parkin と混合し Halo-tag ビーズ、anti-Myc でプルダウン(IP)し、共沈降するポリユビキチン鎖を検出した。CTRL, control.

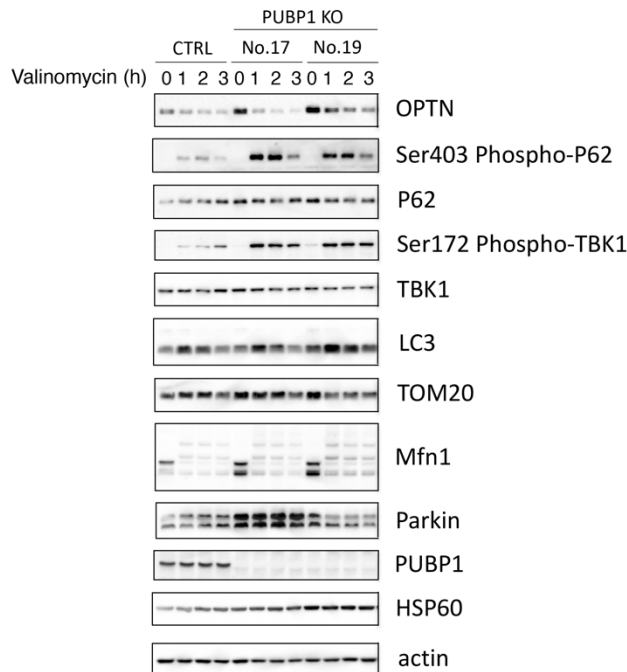


図 2. オートファジー関連因子のリン酸化修飾に与える PUBP1 の影響

マイトファジー誘導後(ミトコンドリア共役剤バリノマイシン処理後)、各々の抗体においてウエスタンブロットを行った。PUBP1 KO 細胞では、リン酸化 TBK1、リン酸化 p62 の発現量が高い。No.17 と No.19 は、PUBP1 KO 細胞の独立した 2 細胞株を示している。

本研究課題をまとめると、PINK1-Parkin 依存的に形成されるリン酸化ポリユビキチン鎖に結合する因子として PUBP1 を同定した。PUBP1 は PINK1-Parkin マイトファジーにおいて、オートファジー関連分子のリン酸化シグナルの調節に機能している可能性が示唆された。PUBP1 は初期エンドソームの融合を促進する分子のエフェクタータンパク質として機能することが示唆されている。今後、融合促進分子との相互作用も含めてマイトファジーにおける PUBP1 の分子機構を解析する予定である。本研究結果は、PINK1、Parkin 変異によるパーキンソン病の発症機構のさらなる理解に貢献するものと考えている。

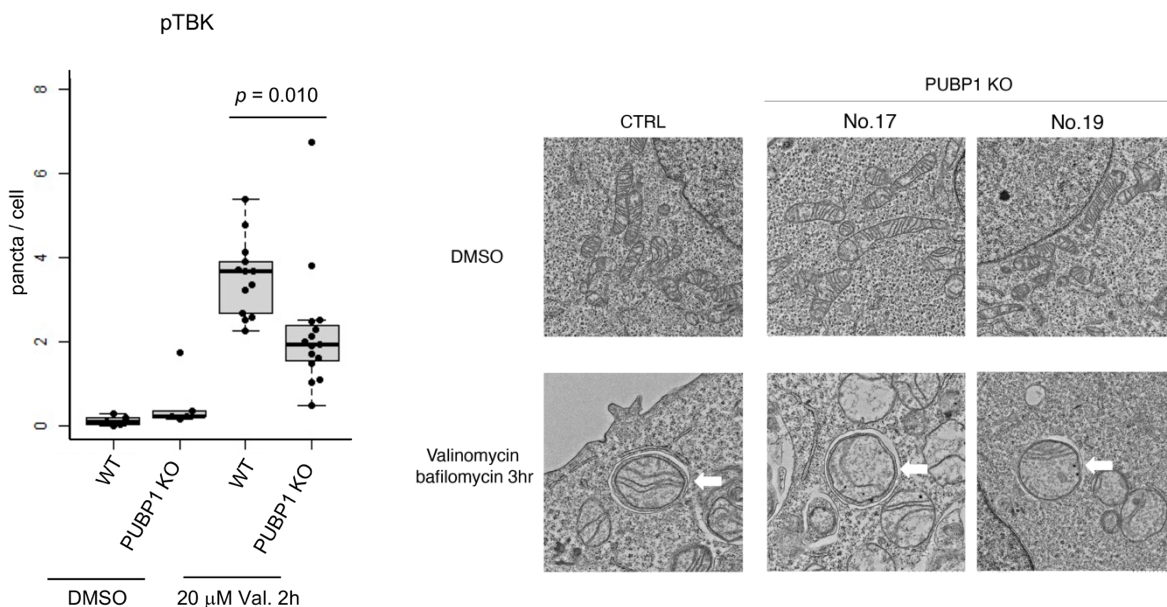


図 3. マイトファジー誘導 2 時間後のリン酸化 TBK1 シグナル顆粒数

マイトファジーを誘導時のリン酸化 TBK1 シグナル数が野生型と比較し PUBP1 KO 細胞で減少する。Val. (バリノマイシン)。DMSO は、バリノマイシンの溶媒コントロール。two-tailed Student t-test。

図 4. マイトファジー誘導時のオートファゴソーム形態

バリノマイシンにてマイトファジー誘導後のオートファゴソームの電子顕微鏡画像。野生型と PUBP1 KO 細胞では同程度の頻度でオートファゴソーム(矢印)が観察された。ここでは、bafilomycin でリソソームの機能を阻害し、ミトコンドリアの分解も止めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Shiba-Fukushima K, Ishikawa KI, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, Akamatsu W, Okano H, Imai Y, Hattori N. | 4. 巻<br>26              |
| 2. 論文標題<br>Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease.                        | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Hum Mol Genet.   | 6. 最初と最後の頁<br>3172-3185 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/hmg/ddx201.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Imai Y, Inoshita T, Meng H, Shiba-Fukushima K, Hara KY, Sawamura N, Hattori N  | 4. 巻<br>2         |
| 2. 論文標題<br>Light-driven activation of mitochondrial proton-motive force improves motor behaviors in a Drosophila model of Parkinson's disease. | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Commun Biol.   | 6. 最初と最後の頁<br>424 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-019-0674-1   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Sano O, Iwata H, Ishikawa K-i, Okano H, Akamatsu W, Imai Y, Hattori N  | 4. 巻<br>23           |
| 2. 論文標題<br>A cell-based high-throughput screening identified two compounds that enhance PINK1-Parkin signaling. | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>iScience  | 6. 最初と最後の頁<br>101048 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.isci.2020.101048   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>柴 佳保里、井下強、今居謙、服部信孝 |
| 2. 発表標題<br>Parkin活性化剤の探索      |
| 3. 学会等名<br>第42回日本神経学会学術大会     |
| 4. 発表年<br>2019年               |

|                          |
|--------------------------|
| 1. 発表者名<br>福嶋佳保里         |
| 2. 発表標題<br>Parkin活性化剤の探索 |
| 3. 学会等名<br>第41回 分子生物学会   |
| 4. 発表年<br>2018年          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>福嶋佳保里                         |
| 2. 発表標題<br>PINK1-Parkinシグナル伝達に関する新規分子の解析 |
| 3. 学会等名<br>第41回 神経科学学会                   |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>柴佳保里、井下強、青木裕子、石濱泰、今居謙、服部信孝    |
| 2. 発表標題<br>PINK1-Parkinシグナル伝達に関する新規分子の解析 |
| 3. 学会等名<br>第40回日本分子生物学会年会                |
| 4. 発表年<br>2017年                          |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|