

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790627

研究課題名（和文）ParkinによるPINK1安定化機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of PINK1 stabilization molecular mechanism by Parkin

研究代表者

柴 佳保里 (KAHORI SHIBA)

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：30468582

研究成果の概要（和文）：

本研究において、家族性パーキンソン病原因遺伝子産物である Parkin の選択的異常ミトコンドリアへの移行、及び、マイトファジーの誘導に、同原因遺伝子産物である PTEN-induced kinase1; PINK1 が必須であることを見出した。また、PINK1-Parkin 経路マイトファジー分子機構をさらに解明するために、Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone: CCCP によるミトコンドリア膜電位消失時の PINK1 結合因子のスクリーニングを行い、イムノフィリンに属する FK506-binding protein 38; FKBP38 を同定し、ミトコンドリアに局在する FKBP38 のみが PINK1 をタンパクレベルで安定化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we show that PINK1 recruits Parkin from the cytoplasm to mitochondria with low membrane potential to initiate the autophagic degradation of damaged mitochondria. Furthermore, we identified FK506-binding protein 38: FKBP38 as a PINK1 binding protein with mitochondrial uncoupler Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone: CCCP treatment and FKBP38 stabilized PINK1 at the protein level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			0
年度			0
年度			0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：parkin、PINK1

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、主に神経伝達物質であるドーパミンを産生する黒質神経細胞が選択的に変性・脱落することによって、振戦、固縮、動作緩慢、姿勢反射障害等の臨床症状を呈する神経変性疾患である。この疾患は孤発型と家族性に分類されており、前者は環境因子や酸化ストレスが関与していると推定され、後者は遺伝性のものである。いずれも発症機構は不明であり、原因究明は予防及び治療方法の発展に大きく貢献するものと考えられ、社会的に要請されている課題である。家族性疾患は、原因が特定の遺伝子異常に由来することから、これらの遺伝子産物の機能解析は発症機構の解明に有力な手掛かりとなり、根本的な治療法の確立に重要なヒントを与えてくれると考えられる。また、疾患症状が同様であることから FPD 発症機構の解明は、PD 病態解明に多くの情報を提供することが期待される。我々はこのような観点から、FPD 発症分子機構の理解に焦点を絞り研究を行っている。

家族性パーキンソン病原因遺伝子産物である E3 リガーゼとして機能する Parkin とセリンスレオニンキナーゼである PINK1 は、遺伝学的に相互作用することが報告されている。また、我々の研究室では、両遺伝子が直接結合し、Parkin は PINK1 を安定化することを見出した。これらの結果は、Parkin と PINK1 に連鎖するパーキンソン病発症機構が共通であることを示唆している。これらの因子の相互作用を明らかにすることは、病態原因究明に貢献することが予想され、その結果、パーキンソン病の根本的な治療法、治療薬剤開発につながることを期待され

る。

2. 研究の目的

パーキンソン病発症機構において、reactive oxygen species; ROS の産生亢進と呼吸鎖複合体I活性低下によるミトコンドリア機能不全が示唆されてきた。ミトコンドリアは、常時、分裂と融合を繰り返すなかで、異常ミトコンドリアの適切な処理、また、正常ミトコンドリアを再生することで、その機能を維持している。神経のような非分裂細胞においては、その品質管理が生存を維持する上で特に重要であると考えられている。

ごく最近、細胞質に局在する Parkin が CCCP によって膜電位が消失したミトコンドリアに移行し、その結果、マイトファジーを誘導することが報告された。そこで、本研究において CCCP による Parkin ミトコンドリア移行に PINK1 が関与するか、また、PINK1 安定化がこの機構にどのように関与するのか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PINK1 欠失マウス胎児線維芽細胞に、レトロウィルスを用いて Parkin、または PINK1 を導入し、CCCP 添加時の Parkin ミトコンドリア移行、及び、ミトコンドリア分解を免疫染色法において検討した。

(2) PINK1 結合因子 FKBP38 と PINK1 を培養細胞に形質転換し、ウエスタン法にて両因子の発現量を確認した。FKBP38

リコンビナントタンパクを作製し、プルダウン法を用いて PINK1 と直接結合するかどうかを検討した。また、PINK1 の半減期を確認する為にパルスチェイス法を用いた。siRNA 法において内在性 FKBP38 をノックダウンし、内在性 PINK1 発現量を確認した。

4. 研究成果

(1) CCCP 処理による Parkin ミトコンドリア移行に PINK1 が必須であり、その結果、Parkin-PINK1 はマイトファジーを誘導することを明らかにした。つまり、膜電位が低下したミトコンドリアを分解した。これらの結果は、PINK1-Parkin が協働してミトコンドリア品質管理の役割を担っていることを示し、Parkin、及び PINK1 に連鎖する FPD 発症機構の究明に貢献するものと考えられる。

(2) Parkin-PINK1 ミトコンドリア移行に関連する因子を探索するために CCCP 刺激下における PINK1 結合因子のスクリーニングを行い、イムノフィリンに属する FK506-binding protein 38; FKBP38 を同定した。FKBP38 は、PINK1 と直接結合することを示した。また、ミトコンドリアに局在する FKBP38 のみが PINK1 を安定化することを明らかにし、内在性タンパクにおいても同様の結果を得た。これらの結果は、Parkin-PINK1 経路マイトファジーの新規関連分子である可能性が高く、この分子機構をさらに理解する手がかりとなる可能性がある。

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. Shiba K, Arai T, Sato S, Kubo S, Oba Y, Mizuno Y, Hattori N. Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 383(3): 331-5, 2009
2. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Csl Biol*. 査読有 189(2): 211-21, 2010
3. Fukae J, Sato S, Shiba K, Sato K, Mori H, Sharp PA, Mizuno Y, Hattori N. Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 査読有 583(3): 521-5.

[学会発表] (計 1 件)

柴 佳保里、佐藤栄人、斉木臣二、服部信孝、PINK1 結合因子と PINK1 安定化機構の関与、第 50 回日本神経学会総会、平成 21 年 5 月 21 日、仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 佳保里 (SHIBA KAORI)
順天堂大学・大学院医学研究科・博士
研究員
研究者番号：30468582

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし