

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06628

研究課題名(和文) PINK1-Parkin経路の網羅的プロテオーム解析とミトコンドリア制御の解明

研究課題名(英文) Global proteomic analysis of the PINK1-Parkin pathway and elucidation of mitochondrial regulation

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) 3,300,000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であるセリン/スレオニンキナーゼPINK1とユビキチン連結酵素Parkinが協調して損傷ミトコンドリアをオートファジーによって特異的に除去する分子機構の概要が最近明らかになった。本研究では、免疫沈降-質量分析(IP-MS)法や近接ビオチン標識(BAR)法、ターゲット質量分析(PRM)法などのプロテオーム解析によってPINK1およびParkinとの新たな相互作用因子の同定と定量を行った。そして損傷ミトコンドリアにおいて内膜のプロテアーゼによるPINK1の分解をTIM23がPINK1と相互作用することによって防いでいることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。本研究において複数のプロテオーム解析技術を駆使することにより、PINK1とParkinの新たな相互作用因子を多数同定することができた。そしてPINK1との新たな相互作用因子であるTIM23の損傷ミトコンドリアでの機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have elucidated the molecular mechanism by which the serine/threonine kinase PINK1 and the ubiquitin ligase Parkin, the causative gene products of familial Parkinson's disease, cooperate to selectively remove damaged mitochondria through autophagy. In this study, we have identified and quantified new interacting proteins with PINK1 and Parkin by proteomic analyses such as immunoprecipitation-mass spectrometry (IP-MS) and targeted mass spectrometry (parallel reaction monitoring: PRM). Our results suggest that TIM23 interacts with PINK1 to prevent degradation of PINK1 by inner membrane proteases in damaged mitochondria.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオーム PINK1 Parkin ミトコンドリア パーキンソン病 質量分析 IP-MS AQUA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難治性の神経変性疾患であるパーキンソン病の発症機構を解明し、早期診断法や根本的な治療法を開発することは緊急の課題である。パーキンソン病の発症原因の1つとして、「機能低下したミトコンドリアを選択的に除去して細胞内のミトコンドリアの品質を管理する仕組みの破綻」が有力となっている。近年、研究代表者を含む国内外の多数のグループによる研究により、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)が協調して損傷ミトコンドリアをオートファジーによって特異的に分解するメカニズムの概要が明らかになった。即ち、ミトコンドリアの損傷に伴ってPINK1がミトコンドリア外膜に蓄積して様々なタンパク質と複合体を形成して活性化し、ユビキチンとParkinをリン酸化することによってParkinを損傷ミトコンドリアにリクルートして活性化する。そして損傷ミトコンドリア上に形成されたリン酸化ポリユビキチン鎖をオートファジー受容体が認識し、隔離膜が形成されてリソソームで分解される。しかし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、PINK1とParkinによるマイトファジーの全貌を理解する上で十分な知見が得られていない。本研究では、最先端のプロテオーム解析技術を用いてPINK1-Parkinシグナル経路の構成因子を網羅的に同定し、さらにPINK1とParkinの新たな相互作用因子や下流基質のミトコンドリアでの機能を調べることにした。

### 2. 研究の目的

PINK1 と Parkin が形成するシグナル伝達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、早期診断法や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系を駆使したプロテオーム解析を行い、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾や標的タンパク質との相互作用因子を高感度に同定・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ーム解析技術を導入・改良することにより、PINK1 と Parkin が形成する複合体の構成因子を網羅的に同定する。そしてPINK1-Parkinシグナル伝達経路に關与する新たな因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) GFP と融合した Parkin を安定発現する HeLa 細胞と親株の HeLa 細胞に対し、無処理またはミトコンドリアの膜電位を低下させる脱共役剤で処理した後、低濃度のホルムアルデヒドを添加して Parkin を含む複合体をクロスリンクした。その後 SDS を含む可溶性の高いバッファーで細胞抽出液を調製し、アルパカ由来 GFP 結合 nanobody を固定化したビーズである GFP-Trap 磁気アガロースビーズで免疫沈降した。沈降物をよく洗浄した後、ビーズ上で直接トリプシン消化を行い、消化ペプチドを LC-MS/MS で測定した。

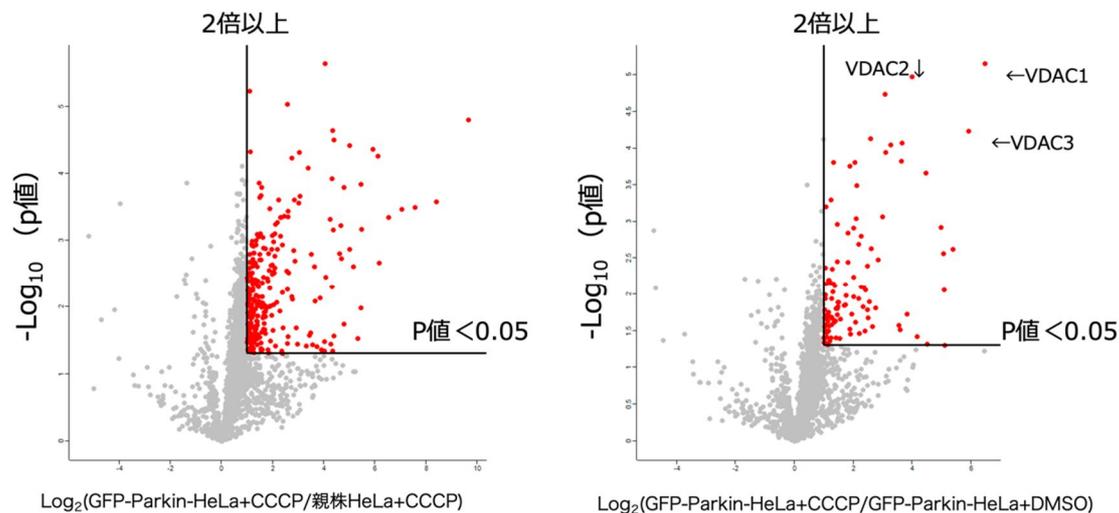


図1. Parkinとの相互作用因子のラベルフリー定量解析

(2) これまでに免疫沈降-質量分析 (IP-MS) 法を改良・最適化することにより、既知のPINK1結合因子であるTOM複合体構成因子だけでなく、TIM複合体構成因子であるTIM23を新たなPINK1結合因子として見出していた。そこでPINK1の免疫沈降物中に含まれるTIM23を絶対定量することを試みた。PINK1およびTIM23由来のトリプシン消化ペプチドに相当する、安定同位体で標識したAQUAペプチドを3本ずつ合成した。脱共役剤で処理した細胞から調製したPINK1の免疫沈降物にこれらのAQUAペプチドを200 fmolずつスパイクしてトリプシン消化後、PRM法を用いたターゲット質量分析による定量解析を行った。

(3) 近接依存性ビオチン標識法の1つであるBAR (biotinylation by antibody recognition)法を用いて、PINK1との相互作用因子を網羅的に同定することを試みた。Flag タグ付き PINK1 を安定発現する HeLa 細胞に対してミトコンドリアの膜電位を消失させるバリノマイシンで処理した後、抗 Flag マウス抗体および HRP 標識抗マウス IgG 抗体とインキュベートした。そしてビオチンフェノールの存在下で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えてビオチン標識を行った。ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで精製し、ビーズ上でトリプシン消化して DDA (data-dependent acquisition)法による質量分析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ラベルフリー定量解析の結果、親株細胞よりもGFP-Parkin発現細胞で有意に増加したタンパク質を291種類、ミトコンドリアの損傷によって増加したタンパク質を110種類同定することができた (図1)。両者に共通する61種類はミトコンドリアの損傷時にParkinと相互作用するタンパク質であると考えられ、それらの細胞内局在についてエンリッチメント解析を行った結果、ミトコンドリアに局在するタンパク質が多く含まれることが判明した (図2)。この中には、ミトコンドリア外膜に局在する電位依存性陰イオンチャンネルタンパク質であるVDACなどが含まれていた。これらの新たなParkinとの相互作用因子がParkinによってユビキチン化されるか、またミトコンドリアの損傷に伴うParkinの活性化や局在変化などにおける役割やミトコンドリアのオートファジーへの影響を今後検討する予定である。このnanobodyを用いた免疫沈降-質量分析による相互作用タンパク質の大規模同定法は他の標的タンパク質にも適用可能な汎用性の高い方法である。

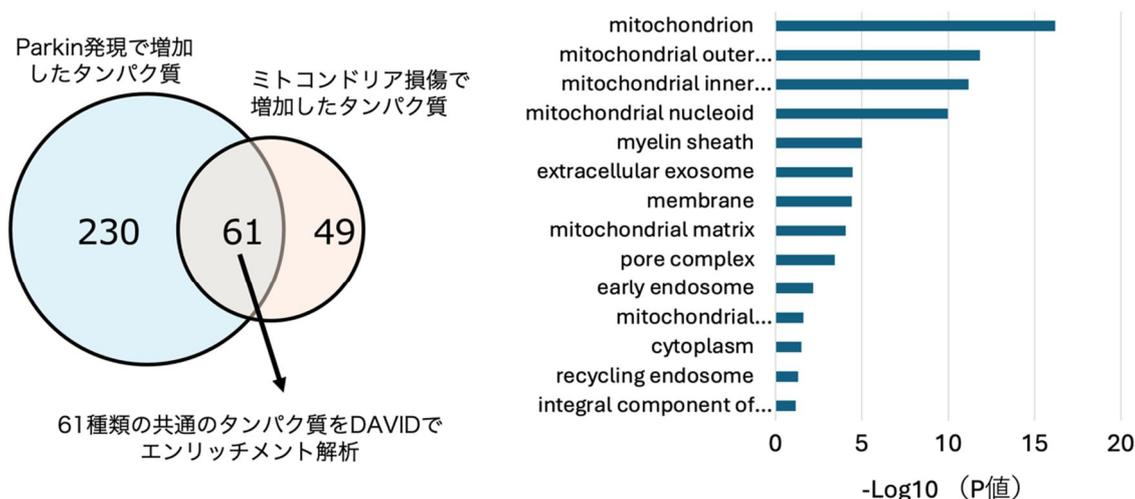


図2. ミトコンドリア損傷時のParkin相互作用因子のエンリッチメント解析

(2) AQUAペプチドとPRM法によって絶対定量することにより、PINK1の約1/5量のTIM23がPINK1と共免疫沈降していることが明らかになった。これにより、損傷ミトコンドリアにおいてTIM23はPINK1と相互作用することによってミトコンドリア内膜に局在するプロテアーゼによるPINK1の分解を防ぐ役割を担っているというモデルを支持することができた。本研究によって質量分析計を用いた絶対定量法を確立できたため、他の微量なタンパク質に対する絶対定量も可能になったと考えられる。

(3) ラベルフリー定量解析の結果、1754種類のタンパク質が定量された。この中でバリノマイシン処理で有意に増加するタンパク質にはPINK1自身だけでなく、TOM20やTIM23などが含まれていたため、BAR法は有用であると考えられた (図3)。本研究ではFlagタグ付きPINK1を安定発現するHeLa細胞に対してBAR法を実施したが、BAR法では特異性の高い抗体があれば内在性タンパク質に対しても適応可能であるため、今後は内在性PINK1や他の内在性タンパク質に対してもBAR法による相互作用タンパク質の同定を行う予定である。

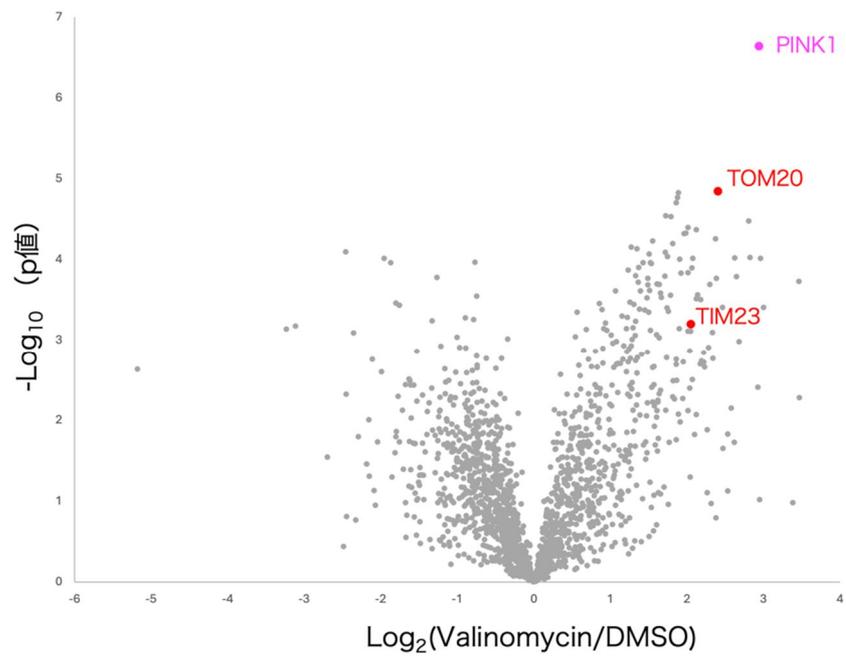


図3. BAR法によるPINK1との相互作用因子のラベルフリー定量解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Noguchi Yuki, Onodera Yasuhito, Miyamoto Tatsuo, Maruoka Masahiro, Kosako Hidetaka, Suzuki Jun	4. 巻 4
2. 論文標題 In vivo CRISPR screening directly targeting testicular cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Genomics	6. 最初と最後の頁 100510 ~ 100510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xgen.2024.100510	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 Sasaki Taeko, Kushida Yasuharu, Norizuki Takuya, Kosako Hidetaka, Sato Ken, Sato Miyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 ALLO-1- and IKKE-1-dependent positive feedback mechanism promotes the initiation of paternal mitochondrial autophagy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1460 ~ 1460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-45863-2	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 Yamada Kohdai, Shioya Ryouhei, Nishino Kohei, Furihata Hirotake, Hijikata Atsushi, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Shirai Tsuyoshi, Kosako Hidetaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Proximity extracellular protein-protein interaction analysis of EGFR using AirID-conjugated fragment of antigen binding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 8301 ~ 8301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-43931-7	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 Akabane Shiori, Watanabe Kiyona, Kosako Hidetaka, Yamashita Shun-ichi, Nishino Kohei, Kato Masahiro, Sekine Shiori, Kanki Tomotake, Matsuda Noriyuki, Endo Toshiya, Oka Toshihiko	4. 巻 42
2. 論文標題 TIM23 facilitates PINK1 activation by safeguarding against OMA1-mediated degradation in damaged mitochondria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112454 ~ 112454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112454	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 該当する

1. 著者名 Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Okazaki Hi-mi, Shimizu Kenji, Maeda Takeo K., Ikubo Jun, Yoshikawa Harunori, Maenaka Katsumi, Ishimaru Naozumi, Kosako Hidetaka, Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 55
2. 論文標題 Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 912 ~ 924.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2022.03.013	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 Yamazaki Hiroya, Takagi Masatoshi, Kosako Hidetaka, Hirano Tatsuya, Yoshimura Shige H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Cell cycle-specific phase separation regulated by protein charge blockiness	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 625 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2022.03.013	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 Nishino Kohei, Yoshikawa Harunori, Motani Kou, Kosako Hidetaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Optimized Workflow for Enrichment and Identification of Biotinylated Peptides Using Tamavidin 2-REV for BioID and Cell Surface Proteomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 2094 ~ 2103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-022-00903-1	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 Kou, Saito-Tarashima Noriko, Nishino Kohei, Yamauchi Shunya, Minakawa Noriaki, Kosako Hidetaka	4. 巻 41
2. 論文標題 The Golgi-resident protein ACBD3 concentrates STING at ER-Golgi contact sites to drive export from the ER	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell 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) 10.1021/acs.jproteome.2c00130	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 Horii Yuma, Matsuda Shoichi, Toyota Chikashi, Morinaga Takumi, Nakaya Takeo, Tsuchiya Soken, Ohmuraya Masaki, Hironaka Takanori, Yoshiki Ryo, Kasai Kotaro, Yamauchi Yuto, Takizawa Noburo, Nagasaka Akiomi, Tanaka Akira, Kosako Hidetaka, Nakaya Michio	4. 巻 14
2. 論文標題 VGLL3 is a mechanosensitive protein that promotes cardiac fibrosis through liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1016/j.celrep.2022.111868	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 Yoshikawa Harunori, Nishino Kohei, Kosako Hidetaka	4. 巻 258
2. 論文標題 Identification and validation of new ERK substrates by phosphoproteomic technologies including Phos-tag SDS-PAGE	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 104543 ~ 104543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36189-6	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 Miyake Masato, Sobajima Mitsuaki, Kurahashi Kiyoe, Shigenaga Akira, Denda Masaya, Otaka Akira, Saio Tomohide, Sakane Naoki, Kosako Hidetaka, Oyadomari Seiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of an endoplasmic reticulum proteostasis modulator that enhances insulin production in pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	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) 10.1016/j.jprot.2022.104543	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 Yamanaka Satoshi, Horiuchi Yuto, Matsuoka Saya, Kido Kohki, Nishino Kohei, Maeno Mayaka, Shibata Norio, Kosako Hidetaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 A proximity biotinylation-based approach to identify protein-E3 ligase interactions induced by PROTACs and molecular glues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 183 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2022.01.002	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 Maruoka Masahiro, Zhang Panpan, Mori Hiromi, Imanishi Eiichi, Packwood Daniel M., Harada Hiroshi, Kosako Hidetaka, Suzuki Jun	4. 巻 81
2. 論文標題 Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1397 ~ 1410.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27818-z	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 Kou, Kosako Hidetaka	4. 巻 295
2. 論文標題 BioID screening of biotinylation sites using the avidin-like protein Tamavidin 2-REV identifies global interactors of stimulator of interferon genes (STING)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11174 ~ 11183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmolcel.2021.02.025	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 Kojima Waka, Yamano Koji, Kosako Hidetaka, Imai Kenichiro, Kikuchi Reika, Tanaka Keiji, Matsuda Noriyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Mammalian BCAS3 and C16orf70 associate with the phagophore assembly site in response to selective and non-selective autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014323	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小迫 英尊
2. 発表標題 先端プロテオーム解析技術を用いた生体内蛋白質間相互作用の大規模解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosako Hidetaka
2. 発表標題 Global interactome analysis in living cells using advanced proteomic technologies
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

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連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

〔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

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		
米国	ピッツバーグ大学		