

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657072

研究課題名(和文) 出芽酵母を用いたParkin-PINK1誘導型ミトファジーの分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of Parkin-PINK1 triggered mitophagy by using budding yeast

研究代表者

遠藤 斗志也(Endo, Toshiya)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70152014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物では異常ミトコンドリアをミトファジーで選択的に除去する仕組みがあり、哺乳動物ではパーキンソン病の原因遺伝子産物のParkin とPINK1がこの仕組みに関わる。Parkin-PINK1が存在しない出芽酵母細胞内で、PINK1をミトコンドリア外膜に人為的に局在化させたところ、サイトソルに発現させたParkinはPINK1のキナーゼ活性依存的にミトコンドリア外膜にリクルートされ、動物細胞と同様に、リン酸化、ユビキチン化をされた。したがって、Parkin-PINK1を人為的に発現させた出芽酵母はParkin-PINK1系の機能解析を行うことができるよい実験系になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, aberrant mitochondria are selectively removed by a process called mitophagy, and PINK1 and Parkin, causative gene products for Parkinsonism, mediate this process in mammalian cells while yeast cells lack the Parkin-PINK1 system. Here we expressed Parkin and a PINK1 fusion protein that is artificially targeted to the mitochondrial outer membrane in yeast cells. Parkin expressed in the cytosol was recruited to the mitochondrial outer membrane by PINK1 in a manner that depends on the kinase activity of PINK1. The recruited Parkin was further phosphorylated and ubiquitinated like the case for mammalian cells. The yeast cells with artificially expressed Parkin-PINK1 can thus offer a useful tool to analyze the functions of the Parkin-PINK1 system.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：酵母 ミトコンドリア パーキンソン病 PINK1 Parkin

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物の細胞内で、エネルギー産生、Ca²⁺濃度調節、アミノ酸や脂質の合成、アポトーシス等を担う、必須オルガネラである。ミトコンドリア内のタンパク質やDNAは常に活性酸素による損傷の危険にさらされており、損傷したタンパク質はミトコンドリア内の品質管理システムにより除去される。一方、DNAの損傷等による修復不能な異常ミトコンドリアについては、これを丸ごと選択的オートファジー(マイトファジー)で除去する仕組みがあることが分かってきた。この仕組みは哺乳類では神経細胞において特に重要で、パーキンソン病の原因遺伝子産物 Parkin と PINK1 が関わる。PINK1 は正常ミトコンドリアでは内膜に局在し、膜間部で膜電位依存的に分解される。異常ミトコンドリアでは PINK1 は内膜ではなく外膜に留まって分解を免れ、サイトゾルの Parkin を外膜に集める。PINK1 はキナーゼ、Parkin は E3 ユビキチンリガーゼとして働き、リン酸化とユビキチン付加を介して、外膜タンパク質のプロテアソームによる分解が起こり、続いてミトコンドリアの選択的マイトファジーが起こると考えられている。出芽酵母でもマイトファジーは起こるが、Parkin も PINK1 も存在しない。われわれは予備的実験から、哺乳動物 Parkin-GFP を出芽酵母内で発現すると、Parkin-GFP はサイトゾル全体に分布するが、ミトコンドリア外膜局在型 PINK1 (Om45-PINK1) を Parkin-GFP と共発現すると、Parkin-GFP はドット様の局在を示すようになること、共発現株ではミトコンドリアが凝集し、Parkin-GFP の一部は凝集したミトコンドリア上に局在すること、さらに Parkin-GFP と Om45-PINK1 の共発現によって、酵母細胞の呼吸培地での増殖が阻害されることを見出した。以上の結果は、出芽酵母には Parkin-PINK1 は存在しないが、哺乳類の Parkin-PINK1 によるマイトファジー誘導系の一部が重複しており、Parkin-PINK1 の発現により、マイトファジー誘導系が不完全に動いてミトコンドリアの凝集や増殖阻害が起こった可能性を示す。

2. 研究の目的

出芽酵母には Parkin, PINK1 が存在しないので、哺乳動物 Parkin, PINK1 を人為的に発現させる。このとき PINK1 を恒常的にミトコンドリア外膜に局在させるために、われわれが新規外膜局在化経路の基質として見出した Om45 との融合タンパク質を利用する。出芽酵母で、PINK1, Parkin の系がどこまで働くかを哺乳動物細胞の場合と比較しつつ検討することで、PINK1 による Parkin のミトコンドリアへのリクルート、PINK1 によるリン酸化、自己ユビキチン化等に必要最小限のシステム因子のセットを同定する。

3. 研究の方法

PINK1 を安定にミトコンドリア外膜に局在させるために、Om45 との融合タンパク質 (Om45-PINK1) を酵母細胞内で発現する。Om45-PINK1 およびキナーゼ不活性型の PINK1 融合タンパク質、Om45-PINK1(KD) と Parkin を共発現し、Parkin のミトコンドリアへの局在、リン酸化、ユビキチン化、細胞の生育を調べる。

4. 研究成果

GPD プロモーターまたはガラクトースによる発現誘導型プロモーター (GALI プロモーター) を用いて、酵母細胞内で Om45-PINK1 の発現を誘導できる株を作製した。Om45 は外膜を通過して膜間部側から外膜に挿入されるが、Om45-PINK1 は Om45-DHFR と同様、PINK1 部分のフォールディングのため外膜を通過できず、ラテラルにミトコンドリア外膜に組み込まれ、外膜に安定に局在した。

Om45-PINK1 の単独発現自体が酵母の増殖にやや阻害効果を示し、ミトコンドリアの形態異常(凝集)と前駆体の若干の蓄積(おそらくミトコンドリア外膜のトランスロケータ TOM40 複合体の機能阻害が生じている)を引き起こしたが、以上の効果は PINK1 のキナーゼ活性に依存しなかった(キナーゼ活性の欠失変異体 Om45-PINK1(KD)でも同様の効果が観察された)。Om45-PINK1 を発現せずに Parkin を発現すると、Parkin はサイトゾルに一樣に分布した。

次に Om45-PINK1 発現時に Parkin を共発現すると、Parkin はミトコンドリアに局在し、この局在は PINK1 のキナーゼ活性に依存することがわかった。さらにミトコンドリアにリクルートされた Parkin はリン酸化と自己ユビキチン化を受け、これらの修飾は PINK1 のキナーゼ活性に依存した (Om45-PINK1(KD)では Parkin のリン酸化、ユビキチン化が起こらない)。さらに、Parkin の自己ユビキチン化は PINK1 によるユビキチン自身のリン酸化にも依存した(ユビキチン自身のリン酸化部位を変異させると Parkin のユビキチン化が起こらなくなる)。

Om45-PINK1 と Parkin を共発現すると、酵母細胞の増殖は著しく阻害され、この阻害は PINK1 のキナーゼ活性に依存した。しかし前駆体の蓄積やミトコンドリアの凝集は Parkin の共発現の有無により大きく変わらなかった。以上の結果は、哺乳動物における PINK1 による Parkin のミトコンドリアへのリクルート、リン酸化、ユビキチン化がこの二つの因子だけで、かつ PINK1 のリン酸化に依存して酵母細胞でも再現できることを示しており、PINK1 と Parkin の機能を解析する上で有用な系であることが明らかになった。今後、なぜ酵母細胞内では、PINK1 と Parkin がミトコンドリア機能に関連した増殖阻害を引き起こすのか、その過程にはどんな因子が関与するのか等を明らかにしていきたい。

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)

Song J, Tamura Y, Yoshihisa T, Endo T.
A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex.
EMBO Rep. in press (2014) doi: 10.1002/embr.201338142

Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N.
Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin.
Nature, in press (2014) doi: 10.1038/nature13392

〔学会発表〕(計 12 件)

遠藤斗志也
タンパク質と脂質の輸送と合成からみた酵母ミトコンドリアの生合成機構 (招待講演)
第 185 回酵母細胞研究会例会
2013.11.22, 東京

Toshiya Endo

How the cell makes mitochondria: from the viewpoints of transport of proteins and lipids (招待講演)
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria - from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease
2013.10.28-11.1, 沖縄

Jiyao Song, Tohry Yoshihisa, Yasushi Tamura, and Toshiya Endo
Novel pathway for import of yeast OM45 into the mitochondrial intermembrane space.
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria - from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease
2013.10.28-11.1, 沖縄

Toshiya Endo

Transport, assembly, and quality control of mitochondrial proteins in yeast (基調講演)
Yeast 2013 (The 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology)
2013.8.29-9.3, Frankfurt, Germany

Toshiya Endo

How to make mitochondria from proteins and lipids in the cell? (招待講演)
CEF(Cluster of Excellence Frankfurt)/BMLS (Buchmann Institute of Molecular Life Sciences)

Lecture at the Goethe University Frankfurt
2013.8.29, Frankfurt, Germany

Jiyao Song, Tohru Yoshihisa, Yasushi Tamura, Toshiya Endo
OM45 is imported into the mitochondrial intermembrane space via a novel import pathway
第 65 回細胞生物学会大会
2013.6.19-21, 名古屋

Jiyao Song, Tohru Yoshihisa, Yasushi Tamura, and Toshiya Endo
OM45 is imported into the mitochondrial intermembrane space via a novel import pathway
第 77 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
2013.5.25, 名古屋

Toshiya Endo

New perspective on biogenesis of mitochondrial proteins and lipids (招待講演)
2013.4.13-17, Dubrovnik, Croatia

Toshiya Endo

Organelle homeostasis research in Japan (招待講演)
Organelle Homeostasis Research Center: Workshop on Homeostasis Research
2013.3.23, 福岡

Toshiya Endo

New insight into mitochondrial biogenesis
Organelle Homeostasis Research Center: Kick-off Symposium (招待講演)
EMBO Conference: From Structure to Function of Translocation Machines
2013.3.22, 福岡

Toshiya Endo

New perspective on biogenesis of mitochondrial proteins and lipids (招待講演)
第 85 回日本生化学会大会シンポジウム「New Paradigm of Organelle Biology and Physiology」
2012.12.14-16, 福岡

Toshiya Endo

New perspective on import and maintenance of mitochondrial proteins (招待講演)
SFB594 3rd International Symposium Molecular Machines in Protein Folding and Translocation
2012.7.23-25, Munich, Germany

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
遠藤 斗志也 (Toshiya Endo)

研究者番号：70152014

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：