

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25640013

研究課題名(和文)FKBP38によるミトコンドリア品質管理とパーキンソン病との関連

研究課題名(英文)Association between mitochondrial quality control and Parkinson's disease by FKBP38

研究代表者

白根 道子(Shirane, Michiko)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：90398082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：Shhシグナルは、初期発生において重要な役割を担っており、その活性化過程では細胞センサーである一次繊毛内の輸送が関係する。最近、一次繊毛におけるShhとオートファジー、および繊毛病との関連が報告された。一方、マイトファジーは損傷ミトコンドリアを消去する機構で、パーキンソン病発症との関係が示唆されているが、われわれはFKBP38がShhを抑制すること、マイトファジーと関連しミトコンドリア品質管理に関与していることを解明した。そしてFKBP38結合分子としてANKMY2を新たに同定した。本研究では、それらの分子の機能解析を通じて、ミトコンドリア品質管理におけるShhの関与と制御機構を検討した。

研究成果の概要(英文)：Shh signaling pathway is conserved among animals and has pivotal roles in embryonic development, in the maintenance of adult stem cells, and in cancer. FKBP38 has been shown to act in a cell-autonomous manner to prevent inappropriate activation of the Shh pathway. It has remained unclear, however, how FKBP38 suppresses Shh signaling.

With the use of a proteomics approach to the discovery of proteins that regulate Shh signaling in association with FKBP38, we have now identified ANKMY2 as a molecule that interacts with FKBP38. Depletion or overexpression of ANKMY2 resulted in down- and up-regulation of Shh signaling, respectively, in mouse embryonic fibroblasts. Furthermore, combined depletion of both FKBP38 and ANKMY2 attenuated Shh signaling in these cells, suggesting that ANKMY2 acts downstream of FKBP38 to activate the Shh signaling pathway. Our findings thus indicate that the FKBP38-ANKMY2 axis plays a key role in regulation of Shh signaling in vivo.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳科学・基盤・社会脳科学

キーワード：病態脳科学

1. 研究開始当初の背景

FKBP38は、ミトコンドリア膜に局在する膜タンパク質で、Bcl-2をミトコンドリアにリクルートしアポトーシス抑制に働いている[Shirane, *Nature Cell Biol.*, (2003)]。またFKBP38欠損マウスを作製し、FKBP38がSonic hedgehog (Shh)を抑制し、神経管の腹側化を抑制すること、神経管閉鎖不全、神経細胞構築異常を呈し、アポトーシス亢進により生直後死となることを解明した[Shirane, *Genes Cells*, (2008)]。Shhシグナルは一次繊毛内輸送により活性制御されている[Chen, *Cell*, (2007)]。われわれはFKBP38結合タンパク質を探索し、新規タンパク質プロテオームを発見し、細胞内輸送制御の機構を明らかにした[Shirane, *Science*, (2006)]。また、プロテオームが細胞内膜の構造制御に関与しており、その不全が神経変性疾患の病態と関連することを明らかにした[Hashimoto, (submitted)]。さらにFKBP38結合タンパク質として、一次繊毛(Primary cilia)においてcGMP産生酵素Guanylate cyclaseの輸送制御に関与するANKMY2を同定した。よってFKBP38によるShhの制御にANKMY2が関与しており、それが一次繊毛内の輸送機構と関係していることが予想された。一方、マイトファジーは損傷ミトコンドリアをオートファジーにより消去する機構で、パーキンソン病発症と関係する。われわれは、マイトファジー誘導時にFKBP38が損傷ミトコンドリアから小胞体に移動し、ミトコンドリア品質管理に寄与していることを明らかにした[Saita, *Nature Commun.*, (2013)]。また最近、一次繊毛におけるShhとオートファジー、および繊毛病との関連が報告された[Pampliega, *Nature*, (2013); Tang, *Nature*, (2013)]。一方FKBP38によるShh抑制の詳細な機構は未だ不明のままであった。

Shhシグナルは、多細胞体の初期発生過程や組織構築での細胞間相互作用において重要な役割を担っている。神経管においてShhは脊索から分泌され、腹側化を誘導し背側化を抑制する。そしてShhシグナルの異常は神経管閉鎖不全を呈する。Shhが受容体Patched (Ptch)に結合すると、Smoothed (Smo)やSuFuなどを介してGli3等の転写誘導に繋がる。またShhシグナルの活性化過程では、一次繊毛内の輸送が関係することが明らかにされつつある。Shhシグナルの下流でSmoやSuFuやGli3が一次繊毛に移動し、一次繊毛内輸送の過程で活性調節を受け、核内転写に反映される。すなわち一次繊毛内で、Shhシグナルのオン・オフ反応が起きる。近年、繊毛関連因子の異常が原因で発症する疾病(繊毛病, Ciliopathy)の報告が増えており関心が高まっている。しかしその複雑さゆえ、一次繊毛の生理機能や分子機構については不明な点が多く残されている。

本研究の斬新な点は、これまで関係性が知られていなかった「Shhシグナル制御」と「ミトコンドリア品質管理機構」および「パーキンソン病発症との関連」を結びつける点である。マイトファジーはパーキンソン病との関連が示唆されているが、実際には未だ疾患との関係の証明には至っていない。またなぜドーパミンニューロン特異的に脆弱なのかという説明もついていない。本研究は、それらの疑問点に取り組み、パーキンソン病の新たな病態機構の解明に迫るというチャレンジ性を有している。

2. 研究の目的

Shhシグナルは、初期発生において重要な役割を担っており、その活性化過程では細胞センサーである一次繊毛内の輸送が関係する。最近、一次繊毛におけるShhとオートファジー、および繊毛病との関連が報告された。一方、マイトファジーは損傷ミトコンドリアをオートファジーにより消去する機構で、パーキンソン病発症との関係が示唆されているが、われわれはFKBP38がShhを抑制すること、マイトファジーと関連し、ミトコンドリア品質管理に関与していることを解明した。そしてFKBP38結合分子として一次繊毛内輸送に関連するANKMY2を新たに同定した。本研究では、それらの分子の機能解析を通じて、ミトコンドリア品質管理におけるShhの関与と制御機構、一次繊毛の機能、およびパーキンソン病発症との関連を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、ミトコンドリア品質管理におけるShhシグナルの関与と制御機構、一次繊毛の機能、およびそのパーキンソン病発症との関連を明らかにすることを旨とし、以下の実験を行う。

- (1) Shh抑制タンパク質FKBP38とANKMY2の相互作用の生化学的解析
- (2) FKBP38によるミトコンドリア品質管理(マイトファジー応答)機構の解析
- (3) Shhシグナル制御におけるFKBP38とANKMY2との遺伝学的関係の解析
- (4) Shh活性化に関与する一次繊毛内輸送におけるFKBP38とANKMY2の関与の解析
- (5) ドーパミンニューロン特異的FKBP38・ANKMY2-floxマウスの作製
- (6) Shhシグナルによるミトコンドリア品質管理機構とパーキンソン病との関連の解析

4. 研究成果

- (1) Shh抑制タンパク質FKBP38とANKMY2の相互作用の生化学的解析
タグ付加FKBP38 cDNAを神経特異的プロモ-

ター (prion promoter) の下流に繋ぎ、マウスに導入して、神経特異的 FKBP38 トランスジェニックマウスを作製した。その脳抽出物よりタグのプルダウンにより FKBP38 複合体を精製し、質量分析にて結合タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、ANKMY2 (ZMYND20) が同定された。ANKMY2 は Ankyrin repeat ドメインと MYND ドメインとを有する ZMYND ファミリータンパク質のひとつである (別名 ZMYND20)。ANKMY2 の FKBP38 結合部位は MYND ドメインで、FKBP38 の ANKMY2 結合部位は N 末端側の Glu-rich 部位であることがわかった。ANKMY2 は、一次繊毛 (Primary cilia) において cGMP 産生酵素である Guanylate cyclase の輸送制御に関与している。cGMP はリン酸化酵素 PKG を活性化する。一方で Shh シグナルも、一次繊毛内での輸送を介して活性制御されているため、FKBP38 による Shh シグナルの抑制作用に ANKMY2 および一次繊毛内輸送と関係していることが予想された。

(2) FKBP38 によるミトコンドリア品質管理 (マイトファジー応答) 機構の解析

ミトコンドリアは ATP 供給の過程で活性酸素を大量に産生するため、損傷を受けた際には細胞に大きな障害を与える。FKBP38 は、ミトコンドリア依存的アポトーシス抑制分子であるため、ミトコンドリア品質管理機構として注目されているマイトファジーとの関連を調べた。実験系として Parkin を恒常的に発現させた細胞を作製し、CCCP というミトコンドリア損傷薬剤を添加してマイトファジーを人工的に誘導した。その際、ミトコンドリアの消去に伴いほとんどのミトコンドリアタンパク質は分解除去されたが、意外なことに FKBP38 は Bcl-2 と共にミトコンドリアから小胞体に局在変化し分解から逃れるという興味深い結果を得た。その機構を調べたところ、FKBP38 の膜貫通ドメイン近傍に局在変化を決定するシグナル配列を見いだした。そしてミトコンドリア損傷時に FKBP38 が局在変化することにより、細胞のアポトーシス耐性能とミトコンドリア回復能が増強された。よって FKBP38 はミトコンドリア品質管理にポジティブに働いていることが明らかとなった。

(3) Shh シグナル制御における FKBP38 と ANKMY2 との遺伝学的関係の解析

FKBP38 は Shh シグナル抑制作用を有するが、その分子機構は不明である。ANKMY2 は、一次繊毛での輸送に関与しているという点で Shh シグナルと共通している。そこで FKBP38 や ANKMY2 のノックダウンやドミナントネガティブ変異体 (ANKMY2 の MYND ドメイン、FKBP38 の Glu-rich 部位の欠損変異体) を細胞に導入し、Shh 添加時の下流のシグナルの変化を解析した。

(4) Shh 活性化に関与する一次繊毛内輸送における FKBP38 と ANKMY2 の関与の解析

Shh のシグナルにより Smo が Shh 受容体 Ptch1 から解離して一次繊毛に移動し、SuFu, Gli2/3 が一次繊毛に移動し、その後核移行する。一方 ANKMY2 は Guanylate cyclase の一次繊毛での輸送制御と cGMP 産生および PKG 活性化に関与している。そこで FKBP38 や ANKMY2 のノックダウンやドミナントネガティブ変異体を細胞に導入し、Shh 添加時の下流分子の変化を解析した。一次繊毛内を移動する Shh 下流分子の Smo, SuFu, Gli2/3 や、ANKMY2 下流分子の Guanylate cyclase, cGMP, PKG などの細胞内、および一次繊毛内の局在異常や量的変化を解析する。同時に Shh シグナルの下流では PKA が、ANKMY2 の下流では PKG が活性変化するため、これらキナーゼによる FKBP38 と ANKMY2 のリン酸化についても検討した。

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 5 件)

- ① Identification and characterization of a neuron-specific isoform of protrudin.
Ohnishi, T., *Shirane, M., Hashimoto, Y., Saita, S., and Nakayama, K. I.
(*Co-first and corresponding author)
Genes Cells, 2014, 19: 97-111
- ② Mitochondria: FKBP38 and mitochondrial degradation.
*Shirane-Kitsuji, M. and Nakayama, K. I.
(*Corresponding author)
Int. J. Bioc. Cell Biol., 2014, 51: 19-22
- ③ Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia.
Hashimoto, Y., * Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S. Ohnishi, T., and Nakayama, K. I.
(*Co-first and corresponding author)
J. Biol. Chem., 2014, in press
- ④ マイトファジーにおける選択的タンパク質脱出の発見と機構解析
細田将太郎、*白根道子、中山敬一
(*Corresponding author)
細胞工学 (2013) 32: 582-583

- ⑤ ミトコンドリア品質管理機構と神経機能制御
白根道子
「生化学」ミニレビュー (2014) in press

[学会発表] (計 2 件)

- ④ Shirane, M., Saita, S., and Nakayama, KI.
Escape of proteins from mitochondria upon mitophagy
International Symposium on Mitochondria 2013 (2013. 11) Tokyo

- ② Shirane, M.
Regulatory mechanism and function of neuronal endomembrane system
US-Japan Brain Research Collaborative Program, Current Trends and Future Direction of Synaptic Plasticity Research (2013. 7) Seattle, USA

[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

URL:

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白根 道子 (SHIRANE, Michiko)
九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：90398082

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：