

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860216

研究課題名(和文) PINK1キナーゼを中心としたミトコンドリア恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mitochondrial homeostasis through PINK1 kinase

研究代表者

村田 等 (Murata, Hitoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：90579096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病原因遺伝子産物PINK1とその制御タンパク質の解析を行った。PINK1の転写レベルでの制御について、抗酸化転写因子NRF2がPINK1の発現制御に関わることを見出した。NRF2は酸化ストレス環境下でPINK1発現を上昇させた。PINK1のタンパク質レベルでの制御について、SARM1、TRAF6によるPINK1のコピキチン化を見出した。ミトコンドリア膜電位低下時にSARM1がTRAF6をPINK1上にリクルートし、Lys63鎖型のコピキチン化を介してPINK1を安定化した。蓄積したPINK1は損傷ミトコンドリアの分解、細胞生存に寄与した。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the mechanism of mitochondrial homeostasis through PINK1 which is one of the causing gene products of Parkinson's disease. In transcriptional regulation, we found that NRF2, an antioxidant transcription factor, regulates PINK1 expression under oxidative stress condition. In post-translational regulation, we found that SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 through lysine 63 chain ubiquitination. Accumulated PINK1 contributes to damaged mitochondrial degradation and cell survival.

研究分野：分子生物学

キーワード：PINK1 ミトコンドリア ストレス SARM1 NRF2

1. 研究開始当初の背景

PINK1 (*PTEN induced putative kinase 1*) はパーキンソン病原因遺伝子の1つで、近年の研究から不要になったミトコンドリアの分解(マイトファジー)に必須の役割を担うことが示されていた。申請者は研究開始当初に *PINK1* の結合・制御タンパク質として *PRDX3*、*BAP31*、*SARM1*、*NRF2* を新規に見出し、*PINK1* がこれらのタンパク質の制御を介してミトコンドリア恒常性維持や細胞生存に寄与する可能性を見出していた。

2. 研究の目的

本研究では *PINK1* の結合・制御タンパク質として見出した *PRDX3*、*BAP31*、*SARM1*、*NRF2* の機能解析を通じて、*PINK1* がミトコンドリアの分解だけでなく、ミトコンドリアの維持、新生にも関与していることを示し、*PINK1* を介したミトコンドリア恒常性維持機構の全体像とそれを介した細胞死抑制機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

解析に用いた細胞はヒト神経芽腫 SH-SY5Y 細胞 (ECACC) とヒト iPS 細胞 (RIKEN Cell Bank) から分化誘導を行った神経細胞を用いた。SH-SY5Y 細胞は DMEM/F12-10% FBS を、神経細胞は Neurobasal medium に 2% B-27、2 mM GlutaMAX を加えた培地を使用し、オルニチン、ラミニンコートを行ったディッシュ上で培養した。

(2) 免疫沈降とウェスタンブロットティング

PINK1 と結合タンパク質の解析は免疫沈降法を用いた。細胞に HA タグを付加した *PINK1* 及び関連遺伝子を発現させた。24~48 時間後に 0.3% CHAPS を含む細胞溶解液を加え細胞を溶かし、HA-アガロースを用いて免疫沈降を行った。その後グリシン溶液を用いて沈降物を回収し、SDS サンプルバッファーを加え、ウェスタンブロットティング用のサンプルとした。

ウェスタンブロットティングはサンプルを SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写を行った。1 次抗体、HRP 標識の 2 次抗体を加え、HRP 基質溶液と反応させ、バンドの検出を行った。

(3) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

PINK1 の転写制御機構を解析するために、ヒトゲノム DNA から *PINK1* プロモーター (3 kbp) を PCR で増幅し、pGL4.14 ルシフェラーゼベクターに組み込み解析に用いた。この pDNA と各種転写因子などをコードする pDNA のトランスフェクションを行い、24~48 時間後に Blightlight Plus を用いてルシフェラーゼの基質発光量の測定を行っ

た。

(4) Real-time PCR

PINK1 などの mRNA 発現量を測定するために Real-time PCR 法を用いた。細胞からトータル RNA を抽出し、ランダムヘキサマーを用いて cDNA の合成を行った。cDNA とターゲット遺伝子プライマーを混合し、Step ONE Plus を用いて mRNA の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) *PRDX3* による *PINK1* 制御機構の解析

PINK1 の結合タンパク質の解析によって、抗酸化に働く Peroxiredoxin 3 (*PRDX3*) を結合タンパク質の 1 つとして見出した。*PRDX* はヒトでは 1 から 6 までであるが、免疫沈降-ウェスタンブロットティング解析で *PRDX3* が *PINK1* に強く結合し、*PRDX4* も弱く *PINK1* に結合することがわかった。ストレス環境下での *PINK1* と *PRDX3* の結合状態を解析したところ、酸化ストレスを加えた場合に *PRDX3* は *PINK1* から解離した。siRNA による *PRDX3*、*PRDX4* の発現抑制を行ったところ、ミトコンドリア膜電位低下時の *PINK1* の蓄積が減少した (図 1)。

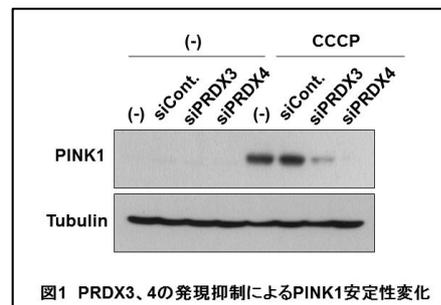
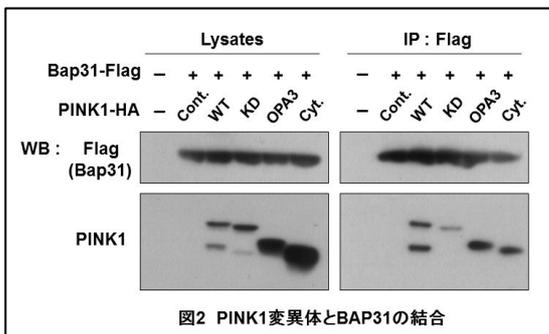


図1 *PRDX3*、*4*の発現抑制による*PINK1*安定性変化

これらの結果から *PRDX3* 及び *PRDX4* はミトコンドリアの状態に応じて *PINK1* の安定性を制御することが示唆されたが、その詳細を解明するために更なる解析が必要である。

(2) *PINK1* と *BAP31* の結合を介したミトコンドリアカルシウム量の調節

3-(2)に示した方法で *BAP31* を *PINK1* の結合タンパク質として見出した。*BAP31* は小胞体に局在するタンパク質で、小胞体からミトコンドリアへのカルシウム流入を制御することが知られている。またその際に *BAP31* と結合することが報告されたミトコンドリアタンパク質 *Fis1* は *PINK1* との結合は確認できなかった。*PINK1* のキナーゼ活性が *BAP31* との結合に及ぼす影響をみるために野生型 (WT) とキナーゼ活性のない *PINK1* 変異体 (KD) と *BAP31* の結合力の比較を行ったところ、WT のほうが KD よりも強く *BAP31* と結合していた。一方ミトコンドリア外膜 (OPA3)、細胞質 (Cyt) に局在するようにした *PINK1* と *BAP31* の結合は WT と同程度であった (図 2)。

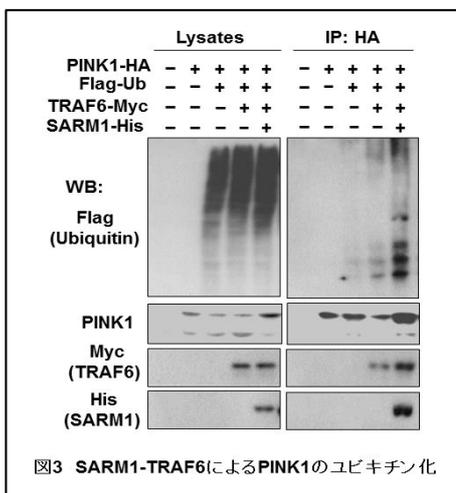


次にBAP31を介したミトコンドリアへのカルシウム流入について検討した。ミトコンドリアのカルシウム量は染色試薬Rhod-2を用いて評価した。ミトコンドリアへのカルシウム流入はBAP31の強制発現によって増加したが、PINK1の共発現によって少し減少した。PINK1がBAP31によって惹き起こされるミトコンドリアへのカルシウム流入を制御する可能性を得た。現在更なる解析を行っており、今後論文としてまとめて発表したいと考えている。

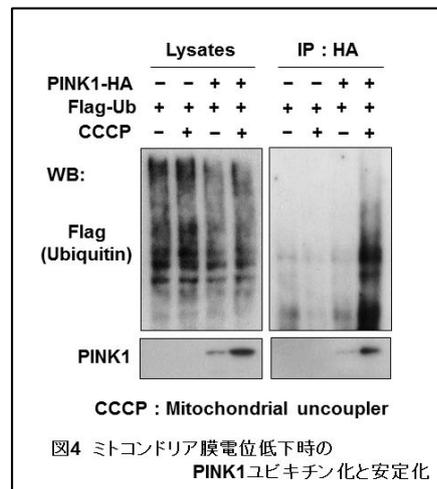
(3) SARM1-TRAF6によるPINK1タンパク質安定化機構とマイトファジー誘導

PINK1の結合タンパク質の1つとして見出したSARM1の解析を行った。SARM1は724アミノ酸からなるタンパク質でミトコンドリア移行シグナル、ARM、SAM、TIRドメインなどを有する。SARM1をドメインごとに分けた解析から、PINK1はSARM1のN末端側(1-106 aa)に結合することがわかった。またその領域にはユビキチンE3リガーの1つであるTRAF6の結合サイトがあり、PINK1、SARM1、TRAF6は複合体を形成し、SARM1はTRAF6をミトコンドリア外膜によびこむ働きをもつことが示唆された。

次にTRAF6がPINK1をユビキチン化する可能性について検討した。ユビキチン、TRAF6の共発現によってPINK1はユビキチン化され、SARM1の追加によってユビキチン化が更に増強され、PINK1のタンパク質量も増加した(図3)。このユビキチン化及



びPINK1タンパク質の蓄積は、これまでに報告のあったミトコンドリア膜電位低下



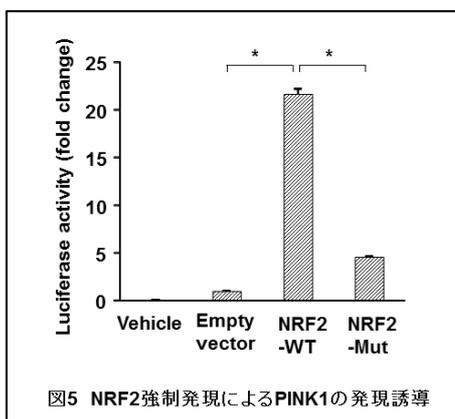
時にも観察された(図4)。TRAF6を介したPINK1のユビキチン化はリジン63を介したユビキチン鎖形成であり、プロテアソーム分解時に認識されるリジン48を介したユビキチン鎖形成とは異なっていた。次にTRAF6を介したPINK1のユビキチン化が損傷ミトコンドリアの分解(マイトファジー)に及ぼす影響を解析した。ミトコンドリアの膜電位が低下し、外膜上へのPINK1蓄積が起こると、別のパーキンソン病原因子遺伝子産物であるParkinがミトコンドリアへリクルートされ、マイトファジーが誘導されることが知られている。SARM1やTRAF6の共発現によってParkinのミトコンドリア移行率は増加し、逆にSARM1やTRAF6の発現を抑制するとParkinのミトコンドリア移行率が減少した。これらの結果からPINK1の新規結合タンパク質として見出したSARM1はミトコンドリア膜電位低下時にTRAF6をPINK1上にリクルートし、Lys63鎖型のユビキチン化を通じてPINK1を安定化し損傷ミトコンドリア分解に寄与していることが判明した。以上の結果をまとめてMol Biol Cell誌(2013)に掲載された。

SARM1のミトコンドリアへの作用に関して、SARM1の強制発現がミトコンドリア呼吸能を抑制し、ATP合成を阻害することを見出した。これに伴いPINK1の蓄積量も変化した。またこの現象にはSARM1のリン酸化が重要であり、リン酸化の制御によってATP合成、神経細胞生存率を改善することを見出したので、特許出願を行った(特願2016-058130)。このSARM1の研究に関して次年度の科学研究費助成に採択されたので、引き続き解析を行いミトコンドリア恒常性維持機構について更に解明していきたい。

(4) NRF2によるPINK1発現制御とミトコンドリア恒常性維持

4-(3)に示した我々の結果や他のグループの報告によって、タンパク質レベルでのPINK1の制御機構については様々なことが明らかになってきた。一方、転写レベルでのPINK1の発現制御機構についてはほとん

どわかっていなかった。パーキンソン病の病態に関わる酸化ストレス環境下での *PINK1* 発現誘導機構について解析するために、様々なストレスを加えた時の *PINK1* 発現を調査した。*PINK1* の mRNA 発現は酸化ストレス (6-OHDA やロテノン曝露) 環境下で増加した。*PINK1* 発現に関与する転写因子を同定するために *PINK1* のプロモーター解析を行ったところ、抗酸化に関わる転写因子である NRF2 の結合配列が *PINK1* プロモーター上に存在することを見出した。*PINK1* プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイで、NRF2 強制発現によって *PINK1* 発現が上昇し、NRF2 の転写活性のない変異体の強制発現やプロモーター上の NRF2 結合配列の欠失や変異によってその発現誘導が減少することを確認した(図5)。



次に内在性の NRF2 による *PINK1* 転写制御について確認するために、いくつかの NRF2 活性化剤 (tBHQ、Sulforaphane、Curcumin など) を用いて解析を行った。これらの NRF2 活性化剤の添加によって *PINK1* の発現は上昇し、siRNA による NRF2 の発現抑制によってその効果は失われた。これらの NRF2 活性化剤による *PINK1* 発現誘導はヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞においても確認された。NRF2 によって発現誘導された *PINK1* は酸化ストレス耐性に重要で、*PINK1* の発現抑制によって NRF2 の細胞死抑制効果は減少した。また NRF2 の発現抑制によってミトコンドリア膜電位低下に伴う *PINK1* の蓄積も減少し、損傷ミトコンドリアの分解 (マイトファジー) も減少した。このように NRF2 は酸化ストレス環境下で *PINK1* の発現誘導を行い、損傷ミトコンドリアの分解、細胞死抑制に寄与することが判明したが、プロモーター配列の解析からミトコンドリア新生に関わる *PGC-1* のプロモーター上にも NRF2 の結合配列が存在した。実際に酸化ストレス曝露によって *PGC-1* の発現は上昇した。これらの結果から、酸化ストレス環境下において NRF2 は *PINK1* の発現誘導を通じて損傷ミトコンドリアの分解、*PGC-1* の発現誘導を通じてミトコンドリア新生に寄与し、ミトコンドリア恒常性維持と細胞死抑制に寄与していると考えられる。

細胞内で損傷を受け分解されるミトコンドリア及び新しく生み出されるミトコンドリアを可視化するために、NRF2 結合配列を含むプロモーター下流に *PINK1* 遺伝子と GFP 遺伝子を組み込んだベクターを作製した。このベクターを発現させ、ミトコンドリアの膜電位を低下させると、ミトコンドリアへの蛍光の集積が確認された。しかし定常状態においても GFP 蛍光が観察され、新しく生まれ来るミトコンドリアとの区別が困難であった。これらのミトコンドリアの可視化のためには更なる改善が必要である。NRF2 による *PINK1* 転写制御およびミトコンドリア恒常性維持に関する結果についてまとめて、*PLoS One* 誌 (2015) に掲載された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 regulates *PINK1* expression under oxidative stress conditions. *PLoS One*, 10(11):e0142438, 2015, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0142438.

Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto KI, Kinoshita R, Futami J, Iwatsuki K, Huh NH. DNAX-activating Protein 10 (DAP10) membrane adaptor associates with receptor for advanced glycation end products (RAGE) and modulates the RAGE-triggered signaling pathway in human keratinocytes. *J Biol. Chem.*, 289(34), 23389-402, 2014, 査読有, doi: 10.1074/jbc.M114.573071

Sakaguchi M, Watanabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IM, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene. *Mol. Biotechnol.*, 56 (7), 621-630, 2014, 査読有, doi: 10.1007/s12033-014-9738-0

Putranto EW, Murata H, Yamamoto KI, Kataoka K, Yamada H, Futami J, Sakaguchi M, Huh NH. Inhibition of RAGE signaling by intracellularly delivered inhibitor peptides using PEI-cationization. *Int. J. Mol. Med.*, 32 (4), 938-944, 2013, 査読有, doi: 10.3892/ijmm.2013.1467

Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH. SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 on depolarized mitochondria. *Mol. Biol. Cell*, 24 (18), 2772-2784, 2013, 査読有, doi: 10.1091/mbc.E13-01-0016

Yamamoto KI, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH. Dock7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol. Rep.*, 29 (3), 1073-1079, 2013, 査読有, doi: 10.3892/ijmm.2013.1467

〔学会発表〕(計7件)

Murata H, Takamatsu H, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 pathway activation as a target to counteract mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. The 9th International conference on complex medical engineering, 岡山コンベンションセンター(岡山県、岡山市) 2015年6月20日

Murata H, Takamatsu H, Huh NH, Sakaguchi M. Regulation of PINK1 expression through the NRF2 transcription factor under mitochondrial stress conditions. Biochemical Society PINK1-Parkin signaling in Parkinson's disease and

beyond, ロンドン(イギリス), 2014年12月2日

村田等、高松仁志、Liu Sulai、許南浩、阪口政清 Transcriptional regulation of PINK1 by NRF2 under mitochondrial stress conditions. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 2014年11月27日

Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH. TRAF6 ubiquitinates and stabilizes PINK1 on the outer membrane of depolarized mitochondria through interaction with SARM1. The American Society for Cell Biology 53th Annual Meeting, ニューオリンズ(アメリカ), 2013年12月17日

村田等、阪口政清、片岡健、許南浩、PINK1のSARM1、TRAF6との複合体形成及びユビキチン化によるミトコンドリア局在制御とマイトファジー誘導、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市) 2013年12月4日

Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH. TRAF6 and SARM1 regulate PINK1 ubiquitination and stabilization on depolarized mitochondria for mitophagy. International symposium on mitochondria 2013、六本木アカデミーヒルズ(東京都、港区) 2013年11月6日

Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH. Regulation of cellular stress response by mitochondrial kinase PINK1. 第86回日本組織培養学会大会(茨城県、つくば市)、2013年5月30日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: リン酸化 SARM1、抗体、SARM1 リン酸化阻害剤、神経変性疾患の予防又は治療薬、

スクリーニング方法、SARM1 改変体及び使用
発明者：村田 等、阪口 政清、木下 理恵、
山本 健一
権利者：国立大学法人岡山大学
種類：特許
番号：特願 2016-058130
出願年月日：2016 年 3 月 23 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

村田 等 (MURATA Hitoshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講
師
研究者番号：90579096