

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293070

研究課題名(和文) ミトコンドリア病としてのパーキンソン病の共通発症機序の解明

研究課題名(英文) A study on the common pathogenesis of Parkinson's disease as a mitochondrial disease

研究代表者

今居 譲 (Imai, Yuzuru)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授

研究者番号：30321730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：若年性パーキンソン病原因遺伝子PINK1とParkinは、協働してミトコンドリアの品質管理に関与することが示唆されていた。一方、新規に同定された晩発性パーキンソン病原因遺伝子CHCHD2は、機能未知のミトコンドリアタンパク質であった。本研究では、ショウジョウバエモデル、iPS細胞、哺乳類培養細胞を組み合わせ、PINK1-Parkinシグナル分子機構の解明と、CHCHD2の機能解析、PINK1-ParkinシグナルとCHCHD2との分子関係の解明を進めた。

研究成果の概要(英文)：The genes for autosomal recessive early-onset Parkinson's disease, Parkin and PINK1 have been suggested to regulate mitochondrial quality control while the autosomal dominant late-onset Parkinson's disease gene, CHCHD2, encodes a mitochondrial protein with unknown functions. In this study, we examined the molecular mechanism of the PINK1-Parkin signaling, the molecular functions of CHCHD2 and the relationship between the PINK1-Parkin signaling and CHCHD2 using Drosophila models, iPS cells and mammalian cultured cells.

研究分野：神経科学

キーワード：ミトコンドリア ドーパミン神経 iPS細胞 リン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)の発症機序の研究は、臨床症状を再現するミトコンドリア毒素にはじまり、ミトコンドリア機能の低下現象がドーパミン神経の変性の主因の一つとして長らく考えられてきた。その後、遺伝性PD原因遺伝子群の同定とその機能研究から、ミトコンドリアの恒常性維持に若年発症型のPD原因遺伝子ParkinとPINK1が関与することが明らかとなった。ParkinとPINK1がPD病態解明の鍵因子であることが明らかになりつつあったが、それらのシグナル伝達を制御する分子機構に関しては十分解明が進んでいなかった。

そのような背景のなか、我々の研究グループはPD家系の全ゲノム関連解析によって新規のPD原因遺伝子CHCHD2の同定に成功していた¹。CHCHD2はミトコンドリアタンパク質をコードする。我々はCHCHD2がミトコンドリアの機能維持に重要であり、ショウジョウバエにおいて*parkin*、*PINK1*と遺伝的相互作用を示すことを観察していた。この観察から、PD発症原因におけるミトコンドリアの重要性およびPD原因遺伝子による共通の変性機序の存在を想定した。

これらの予備的観察から、CHCHD2が具体的にPINK1-Parkinシグナルへどのように関与しているのか、ユビキタスな発現を示すこれら遺伝子の変異がなぜ選択的にドーパミン神経変性を導くのかという2つの点がPDの病態解明にとって未解決な重要課題であった。

2. 研究の目的

研究目的は2つ設定した。

(1) PINK1-Parkinシグナル構成因子の同定およびCHCHD2とPINK1-Parkinシグナルとの関係の解明

PINK1がParkinを制御する分子メカニズムには、PINK1によるParkinのリン酸化のみでは不十分なため、未同定の制御分子が関与すると考えられた。この制御分子を同定し、さらに既知PD原因遺伝子との関連を解明する。また、PINK1、Parkin遺伝子欠損ショウジョウバエにおいて内在性のCHCHD2の発現レベルが上昇していることを観察しており、CHCHD2がPINK1-Parkinシグナル伝達に直接関与するのがあるいは補完的に相互作用しているのか、ミトコンドリア恒常性維持においてのその作用点はどこか、という課題を分子遺伝学的、分子細胞生物学的に明らかにする。

(2) ミトコンドリアの異常によりドーパミン神経が特異的に変性する分子基盤の解明

PINK1、Parkinモデルショウジョウバエの解析から、これら遺伝子が組織特異的な役割を持つことが示唆された。すなわち、筋肉組織においては*PINK1*欠失によるミトコンドリア変性を*parkin*の過剰発現が完全に抑制するが、ドーパミン神経においては部分的にし

か抑制しない。またヒトにおいて、PINK1、Parkin活性の喪失は、ドーパミン神経の選択的な脱落を示すが、その他の組織では顕著な変性は見られない。その背景となる分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

2012年にParkinのユビキチン様領域のSer65がPINK1によりリン酸化されることを見出していた²。しかし、リン酸化変異型Parkinを過剰発現した培養細胞において、マイトファジーへの影響は軽微であったため、*in vivo*においてリン酸化の意義を明らかにすることとした。PINK1でリン酸化される部位の変異体(リン酸化模倣体および非リン酸化体)のトランスジェニックハエを作製し、ミトコンドリアへ及ぼす影響、ドーパミン神経の生存性に及ぼす影響を解析した。

CHCHD2に関しては、CHCHD2ノックアウトハエ、ノックアウトマウス細胞の作製と、これらに野生型および病変変異体を再導入したハエ、細胞を作製し、ミトコンドリア機能に及ぼす影響を解析した。

ドーパミン神経が選択的に変性する分子基盤の理解のために、iPS細胞からドーパミン神経、非ドーパミン神経を分化させ、PINK1-Parkinシグナルに関与する分子の挙動を観察した。

4. 研究成果

Parkinのリン酸化模倣体トランスジェニックハエのミトコンドリアは高度に断片化し、Parkinの基質であるMitofusinやMiroの分解が進んでいた。これは、PINK1によるParkinのリン酸化がParkinのユビキチンリガーゼを活性化していることを示していた。さらにドーパミン神経において、Parkinのリン酸化模倣体は、神経軸索ミトコンドリアの輸送を阻止し、神経細胞体にミトコンドリアが凝集することが明らかとなった。Parkinのリン酸化模倣体の過剰発現はドーパミン神経細胞死を引き起こしたことから、PINK1-Parkinの過剰な活性化は組織に障害を与えることが示唆された。一方、ショウジョウバエにおいて、内在性のPINK1活性の有無でParkinのリン酸化模倣体が組織障害を導く度合いが異なることから、PINK1はParkin以外にリン酸化基質をもち、これがParkinのユビキチンリガーゼ活性を活性化することが示唆された。本成果は、PLoS Geneticsに発表した³。

上述の観察から、未知のPINK1リン酸化基質の存在が考えられ、それを同定することとした。野生型PINK1およびキナーゼ不活性型PINK1をPINK1ノックアウト細胞に再導入しミトコンドリア膜電位低下処理後、リン酸化質量分析により野生型PINK1でのみリン酸化が亢進する分子を同定した。並行して、ミ

トコンドリア膜電位低下処理有り無しの状態
で野生型 PINK1 を発現する細胞のライゼート
を調製し、同様にリン酸化質量分析を実施し
た。これら2通りの条件で、ともに PINK1 が
活性化した状態でのみリン酸化が増えるタン
パク質として、ユビキチンを同定した。詳細
には、Parkin のユビキチン様領域のリン酸
化部位に相当するユビキチンの Ser65 がリン
酸化されることが明らかとなった。

さらに、ユビキチンのリン酸化の発見から
Parkin が Lys63 にリンクするリン酸化ユビ
キチン鎖に高い親和性を持つことが明らかと
なった。この観察から、図1のような PINK1
と Parkin によるリン酸化ユビキチン鎖増幅
機構が考えられた。すなわち、ミトコンド
リア膜電位が低下すると、PINK1 がミトコンド

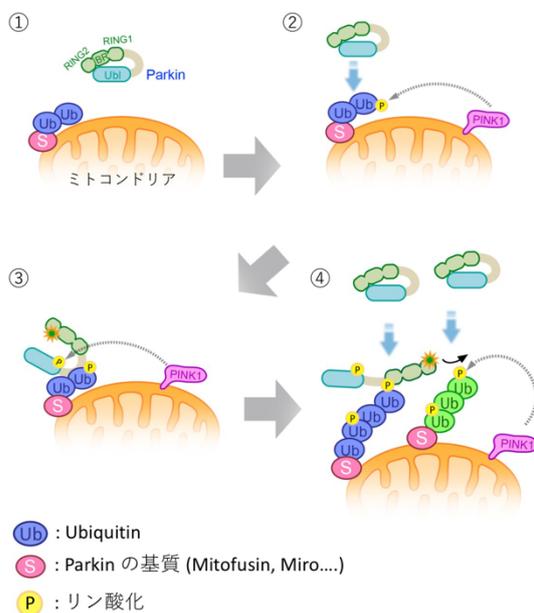


図 1. PINK1, Parkin によるリン酸化ポリユビキチン鎖増幅と活性化のループ

(1) Parkin は、N 末端側にユビキチン様領域 (Ubl)、C 末端側に RING1-IBR-RING2 と呼ばれるシステイン残基に富んだ領域をもつ。ユビキチンリガーゼの活性中心は、RING2 にある。Parkin は細胞質にて不活性化状態で存在する。(2) ミトコンドリア膜電位の低下により、PINK1 が蓄積・活性化し、ユビキチンをリン酸化する。リン酸化されたユビキチンは Parkin と結合し、Parkin の折り畳み構造を緩める。(3) 構造が緩められた Parkin の Ubl がリン酸化され、構造が完全に開き、活性中心が露出した活性型となる。(4) 活性化した Parkin は、ミトコンドリア外膜タンパク質をユビキチン化し、PINK1 がリン酸化をすることにより、リン酸化ユビキチン鎖の速やかな増幅と Parkin 活性化のループ(2-4)が形成される。

リア上にあるユビキチン化された外膜タンパク質をリン酸化する。次に Parkin はリン酸

化されたユビキチン鎖に結合することにより、ミトコンドリアへ局在化 (移行) し、さらにユビキチンリガーゼが活性化し、外膜タンパク質のユビキチン化を進める。このユビキチン鎖をさらに PINK1 がリン酸化し、Parkin の移行と活性化を進める、という活性化ループを形成する (図 1)。本成果は、PLoS Genetics に発表した⁴。

次に、ユビキチンのリン酸化がヒト脳やドーパミン神経においても検出されるかどうかを解析した。ヒト剖検脳においては、一部の孤発性 PD 症例において中脳黒質のドーパミン神経でリン酸化ユビキチンシグナルが認められた。また iPS 細胞から分化させたドーパミン神経において、ミトコンドリア膜電位低下処理を施すと、非ドーパミン神経に比べ高いリン酸化ユビキチンシグナルが観察された。このことは、ドーパミン神経では PINK1-Parkin シグナル活性が高いことを示しており、PD における組織選択性を説明する鍵となると考えられた。さらに、PINK1、

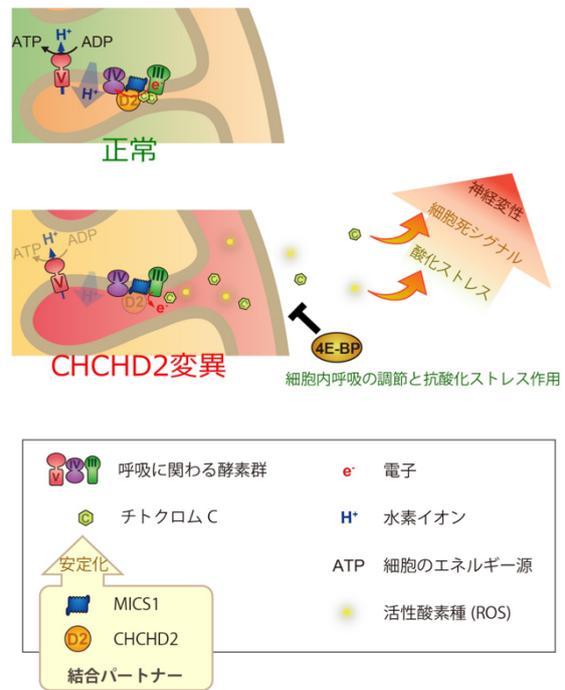


図 2 CHCHD2 の役割とその喪失による神経細胞死の機序

(上) 正常なミトコンドリアの酸素呼吸では、水素イオンの濃度勾配を利用して ATP が合成される。チトクロム C は、水素イオンの濃度勾配をつくる際に発生する電子が外に漏れないようにする。CHCHD2 とその結合分子 MICS1 は、チトクロム C をクリステ内に保持する。

(下) CHCHD2 変異では、CHCHD2 がないとクリステ構造が崩壊しチトクロム C と電子がミトコンドリア外部に流出する。漏れ出した電子は酸化ストレスの原因となり、チトクロム C は細胞死シグナルを活性化する。抗酸化ストレス分子 4E-BP は CHCHD2 変異によるミトコンドリアの変性を抑制する。

Parkinに変異をもつ iPS 細胞から分化させたドーパミン神経では、膜電位低下処理で起こるミトコンドリアの神経軸索輸送の停止が障害されていることが分かった。これは、ショウジョウバエでみられる観察と同様であり⁵、PINK1-Parkin シグナルはハエからヒトまで高度に保存されていること、ショウジョウバエが PD モデルとして有用なことを示していた。本成果は、*Human Molecular Genetics* に発表した⁶。

CHCHD2 ノックアウトハエでは、加齢とともにミトコンドリアクリステ構造の崩壊が見られた。さらに、慢性的な酸化ストレス状態であることが、酸化ストレスマーカー、脂質やタンパク質の酸化度から明らかとなった。CHCHD2 の結合タンパク質を探索し、さらにハエで遺伝的相互作用を示す分子として MICS1 を同定した。MICS1 は CHCHD2 とともに電子伝達体チトクロム C の安定化に関与した。CHCHD2 がミトコンドリアから失われると、チトクロム C が不安定化し、呼吸鎖複合体からの電子の漏洩と活性酸素種発生に繋がることが明らかとなった。

次に、CHCHD2 ノックアウトハエでみられるミトコンドリア変性が PINK1, Parkin の活性化で回復するかどうかを試験した。予想とは異なり、PINK1, Parkin の過剰発現は、ミトコンドリアの機能、形態ともに増悪させた。これは、PINK1-Parkin シグナルが CHCHD2 のないミトコンドリアをすべてマイトファジーで排除するためと推察された。また明らかになったそれぞれの分子機能から CHCHD2 と PINK1-Parkin シグナルは直接関連しないことが示唆された。CHCHD2 の解析の成果は、*Nature Communications* に発表した⁷。

PINK1-Parkin シグナルにおける Parkin のリン酸化の重要性、リン酸化ユビキチン鎖による Parkin 活性化メカニズムは、他研究グループからも同時期に同様の報告がなされており、当該分野への貢献は大きかったと評価できる。また CHCHD2 研究においても、遺伝子の同定から機能解析まで進められ、当初掲げた目的は達成できたと考える。CHCHD2 においては、本研究の実施期間内において臨床での新規発見があり、それに基づいて新たな研究を進めている。PINK1-Parkin シグナルの研究は、活性化メカニズムの解明から、創薬への展開を進めており（挑戦的萌芽研究 16K15484）、臨床への貢献を目指している。

<引用文献>

1. Funayama M, *et al.* CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *The Lancet Neurology* **14**, 274-282 (2015).

2. Shiba-Fukushima K, *et al.* PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific reports* **2**, 1002 (2012).
3. Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y. PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in Drosophila. *PLoS genetics* **10**, e1004391 (2014).
4. Shiba-Fukushima K, *et al.* Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering. *PLoS genetics* **10**, e1004861 (2014).
5. Liu S, *et al.* Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS genetics* **8**, e1002537 (2012).
6. Shiba-Fukushima K, *et al.* Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. *Human molecular genetics* **26**, 3172-3185 (2017).
7. Meng H, *et al.* Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nature communications* **8**, 15500 (2017).

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 11 件)

- ① Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Funayama M, Sato S, Hatta T, Natsume T, Umitsu M, Takagi J, Imai Y, Hattori N: Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nat Commun.* 査読有 8, 10.1038/ncomms15500 (2017)
DOI: 10.1038/ncomms15500

- ② Shiba-Fukushima K, Ishikawa K-I, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, Akamatsu W, Okano H, Imai Y, Hattori N: Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 査読有 26: 3172-3185 (2017)
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddx201>
- ③ Imai Y, Kobayashi Y, Inoshita T, Meng H, Arano T, Uemura K, Asano T, Yoshimi K, Zhang C-L, Matsumoto G, Ohtsuka T, Kageyama R, Kiyonari H, Shioi G, Nukina N, Hattori N, and Takahashi R: The Parkinson's disease-associated protein kinase LRRK2 modulates Notch signaling through the endosomal pathway. *PLoS Genet.* 査読有 11(9): e1005503 (2015)
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005503>
- ④ Shiba-Fukushima K, Arano T, Matsumoto G, Inoshita T, Yoshida S, Ishihama Y, Ryu K-K, Nukina N, Hattori N, Imai Y: Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS Genet.* 査読有 10: e1004861 (2014)
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004861>
- ⑤ Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y: PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 査読有 10(6): e1004391 (2014)
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004391>
- [学会発表] (計 43 件)
- ① 今居 讓: パーキンソン病類縁疾患ペリ一症候群ショウジョウバエモデルのシナプスの異常は TDP-43 の減少で軽減される ConBio2017 ワークショップ (シナプス、軸索の変調から神経変性疾患を理解する) (神戸) 2017 年 12 月 7 日
- ② Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Funayama M, Sato S, Imai Y, Hattori N: Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. 第 39 回日本分子生物学会

年会 シンポジウム 横浜、2016 年 12 月 1 日

- ③ Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Hattori N, Imai Y: Mutations of a mitochondrial protein CHCHD2 in *Drosophila* lead to Parkinson's disease-like phenotypes. Cell Symposia, Multifaceted Mitochondria, Chicago, July 19-21, 2015
- ④ 柴 佳保里, 今居 讓, 服部信孝: PINK1-Parkin シグナルによるミトコンドリアの品質管理機構 ワークショップ フォスタグ技術による神経科学へのアプローチ ~タンパク質リン酸化研究の新潮流~ 第 38 回日本分子生物学会年会 (BMB2015) 神戸、2015 年 12 月 3 日
- ⑤ 今居 讓: "Mitochondrial quality control by the gene products of early-onset Parkinson's disease" 第 37 回日本神経科学大会 シンポジウム (蛋白質・オルガネラ品質管理病としてのパーキンソン病) (横浜) 2014 年 9 月

[図書] (計 14 件)

- ① 今居 讓, 柴佳保里, 服部信孝: 「遺伝子から探るパーキンソン病病態へのミトコンドリアの関与」医学のあゆみ 第260巻 1号 85-91 (2017)
- ② 今居 讓: 「ミトコンドリア機能障害とパーキンソン病」日本臨牀 第75巻 1号. 28-35, (2017)
- ③ 今居 讓: エコ実験 Returns 「もちつもたれつ! 試料をリクエストしよう」実験医学 第33巻 13号: 2143-2146 (2015)
- ④ 今居 讓: 「ショウジョウバエを用いた遺伝性パーキンソン病の発症機序の研究」Aging & Health、第23巻1号: 38-41 (2014)
- ⑤ 今居 讓, 柴佳保里, 服部信孝: Current Topics「PINK1 と Parkin が紡ぐリン酸化ポリユビキチンの鎖が、Parkin をミトコンドリアへと局在化させる」実験医学 第33巻 6号: 940-943 (2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：パーキン活性化剤のスクリーニング法
発明者：今居 讓、服部 信孝、福嶋佳保
里、荒野 拓
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2016-016997
取得年月日：平成 28 年 2 月 1 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/laboparkinsons_disease/

プレスリリース

「パーキンソン病の病態を表す鍵となる分子をヒトで検出」読売新聞 (YOMIURI ONLINE)、他 27 メディア 2017 年 6 月 2 日掲載

「パーキンソン病原因遺伝子の異常による神経活動低下の仕組みを解明」読売新聞 (YOMIURI ONLINE)、他 29 メディア 2017 年 5 月 26 日掲載

「晩発性パーキンソン病で神経変性がゆっくり進行するメカニズムを解明」朝日新聞 デジタル&m、他 17 メディア 2015 年 9 月 11 日掲載

「パーキンソン病の 2 つの原因遺伝子が神経保護をする仕組みを解明 ～不良ミトコンドリアを効率よく除去するメカニズムが明らかに～」順天堂大学 2014 年 12 月

「パーキンソン病の 2 つの原因遺伝子の関係についての新たな知見 ～発症に関わる新規分子メカニズム～」順天堂大学 2014 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今居 讓 (IMAI, Yuzuru)

順天堂大学・医学研究科・先任准教授

研究者番号：30321730

(3) 連携研究者

柴-福嶋 佳保里 (SHIBA, Kahori)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30468582

井下 強 (INOSHITA, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：20601206

服部 信孝 (HATTORI, Nobutaka)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80218510

(4) 研究協力者

孟 紅蕊 (MENG, Hongrui)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号：90736498

荒野 拓 (ARANO, Taku)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号：80750091

石濱 泰 (ISHIHAMA Yasushi)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30439244