

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430051

研究課題名(和文) Parkinの新規基質IPASの解析によるパーキンソン病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanism of Parkinson's disease through analysis of IPAS, a novel substrate of Parkin

研究代表者

鳥居 暁 (Torii, Satoru)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト講師

研究者番号：10444001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、IPASがPINK1-Parkin経路によって制御を受けていることが判明した。CCCP依存的にIPASはPINK1によりリン酸化され、それによってIPASとParkinの結合が引き起こされ、ユビキチン化されたIPASが分解されることがわかった。さらにパーキンソン患者組織の解析により、IPASの発現量がこれらの患者の中脳黒質で増加していた。またIPASノックアウトマウスにおいてMPTPによる中脳黒質神経細胞死が緩和された。これらの結果からPINK1とParkinの変異によって制御の破綻が起きた際にIPASが蓄積して神経細胞死を誘発しパーキンソン病発症に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have shown that IPAS is regulated by the PINK1-Parkin pathway. IPAS was phosphorylated by PINK1 in a CCCP-dependent manner, bound to Parkin and eventually degraded. Furthermore, by analysis using tissues from patients of Parkinson's disease, expression of IPAS was increased in substantia nigra in midbrain of these patients. In addition, MPTP-induced neuronal cell death in substantia nigra was decreased in IPAS knockout mice. These results suggest that IPAS accumulation induces neuronal cell death, leading to onset of Parkinson's disease when regulation by PINK1 and Parkin is lost due to mutations.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：IPAS PINK1 Parkin リン酸化

1. 研究開始当初の背景

本研究で研究対象として解析する IPAS (Inhibitory PAS domain protein)は、HIF-1 低酸素応答機構の転写抑制因子として発見された(参考文献 1: Makino *et al.*, (2001) *Nature*, 414:550-554.)。IPAS は核内において HIF-1 $\alpha$  と結合しその転写活性化機能を抑制する HIF-1 ファミリーメンバーの一つとして報告された。IPAS は、HIF-1 $\alpha$  と相互作用することから、その局在は核内のみだと思われていた。ところが、申請者の解析の結果、IPAS は核だけでなくミトコンドリアにおいても局在することがわかった。さらに、免疫沈降法を用いた解析から、IPAS は C 末端側で抗アポトーシス因子 Bcl-x<sub>L</sub> と結合し、その機能を阻害することでアポトーシスを引き起こすという予想外の機能があることが判明した。さらに IPAS の発現誘導には酸化ストレスとその下流における NF-kappaB の活性化が必要であることがわかった。

パーキンソン病は 10 万人当たり約 100 人の発症率を持つ代表的な疾患の一つであり、近年のように平均寿命が延長した社会においては人々の QOL を低下させる重大な要因だと考えられ治療法の開発が急務であると言える。近年、家族性パーキンソン病の原因因子である PINK1 や Parkin の機能の解明が急速に進んできた。PINK1 は通常は分解されているが、膜電位が消失したミトコンドリアで安定化し、自己リン酸化して活性化する。そして PINK1 は Parkin をミトコンドリアに移行させると同時にリン酸化して活性化し、Parkin はミトコンドリア上で PINK1 によってリン酸化された基質を指標にユビキチン化することがわかった(参考文献 2: Okatsu *et al.*, (2012) *Nature communications*, 3:1016. 参考文献 3: Kondapalli *et al.*, (2012) *Open Biology*, 2:120080.)。

申請者が予備実験を行ったところ、IPAS はミトコンドリア脱分極剤である CCCP(カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン) 刺激依存的にリン酸化されると共に、ユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解されることがわかった。さらにマウスを用いた実験でパーキンソン症誘発剤 MPTP(1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン)によってマウスの中脳黒質で IPAS の発現上昇が起こることがわかった。マウス IPAS に対する抗体を用いたところ、特にマウスのドーパミン作動性神経において IPAS は MPTP 依存的に誘導されることがわかった。これらのことから、パーキンソン病において IPAS が発現誘導されると共に、PINK1-Parkin 経路が破綻した場合に分解されず蓄積し、蓄積した IPAS が神経細胞のアポトーシスを引き起こしてパーキンソン病の一因となっていることを提唱し、この研究のさらなる発展を目指して本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の主要な目的は、PINK1-Parkin 経路の新規基質として私が見出したタンパク質 IPAS の解析を行うことにより、パーキンソン病発症メカニズムの解明に繋げることである。IPAS はそもそも低酸素応答因子 HIF の抑制因子として発見されたが、近年の研究でミトコンドリアに局在し Bcl-x<sub>L</sub> と結合してアポトーシスを促進する機能があること、Parkin によってユビキチン化され分解されることを見出した。さらに IPAS が中脳黒質ドーパミン作動性神経細胞においてパーキンソン病誘発剤によって発現誘導されることがわかった。これらの予備実験をふまえて、IPAS と PINK1-Parkin 経路との相互関連性を明らかにすると共に生体組織における挙動を解析し、パーキンソン病発症メカニズムの解明とその治療の促進に繋げることが目的である。

3. 研究の方法

先述の研究目的を達成するため、以下の手法で研究を進めた(図1)。「培養細胞を用いた IPAS の分子細胞生物学的な機能解析」と「パーキンソン病患者組織の解析」「マウスを用いた IPAS の *in vivo* での生理機能の解析」という大きな三つの枠組みに分け、実験を行った。「培養細胞を用いた解析」においては、培養細胞において、PINK1-Parkin 経路による IPAS の翻訳後修飾調節機構を細胞染色、免疫沈降法、FLIM-FRET 法を用いて解析した。「パーキンソン病患者組織の解析」では、ヒトパーキンソン病患者の組織切片を用いて、IPAS の発現と局在に関して解析した。

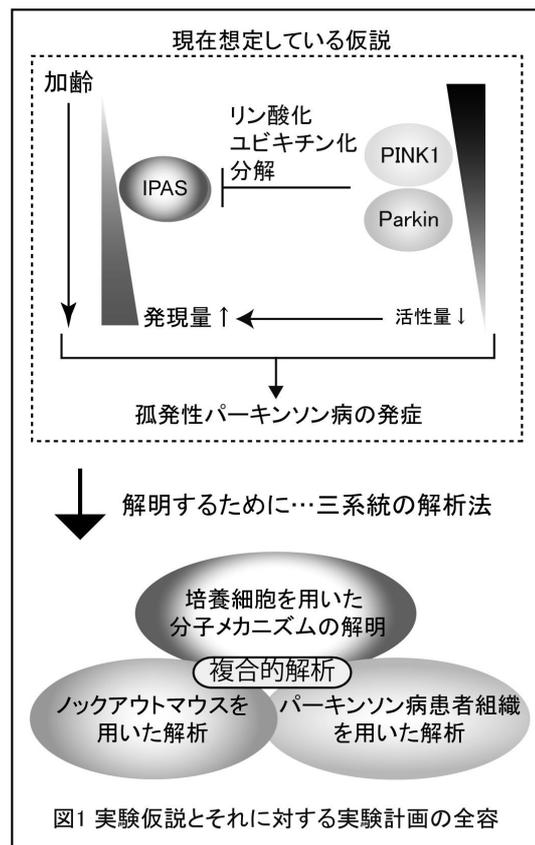


図1 実験仮説とそれに対する実験計画の全容

「マウスを用いた解析」では IPAS ノックアウトマウスと Parkin ノックアウトマウスを用いて、MPTP 投与を行い中脳黒質の細胞死への効果を解析した。

#### 4. 研究成果

まずミトコンドリアの IPAS が CCCP によって活性化された PINK1-Parkin 経路によってどのように制御されるかを解析した。IPAS と Parkin の結合を免疫沈降実験で解析したところ、両者の結合がミトコンドリア脱分極剤である CCCP 依存的に起こることを見出した(図2)。また IPAS は Parkin のユビキチンリガーゼ活性に重要なリング配列の疾患型変異体とは結合が弱まることがわかった。IPAS は CCCP 依存的にポリユビキチン化されるが、その際に Parkin の siRNA を用いるとこのユビキチン化が消失することがわかった(図3)。このことから IPAS は CCCP 依存的に Parkin に結合してユビキチン化されることがわかった。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 無しではユビキチン鎖が消えることから、IPAS がユビキチン化され分解されることがわかった。

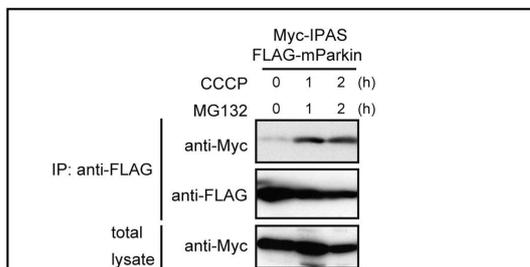


図2 IPASのCCCP依存的なParkinとの結合

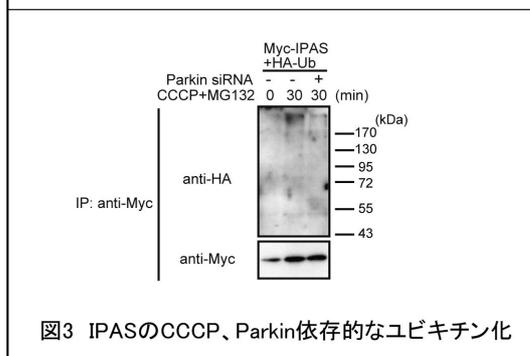


図3 IPASのCCCP、Parkin依存的なユビキチン化

PINK1の基質にも IPAS が入っている可能性を考え、PINK1 と IPAS の相互作用も解析した。その結果、CCCP 依存的に両者が結合することがわかった(図4)。さらに PINK1 による IPAS のリン酸化を、Phos-tag と PINK1 siRNA を用いて解析したところ、IPAS の特に 12 番目のスレオニンが PINK1 依存的にリン酸化されることを見出した(図5)。この 12 番目のスレオニンをアラニンに置換した T12A 変異体を作製したところ、CCCP 投与しても IPAS と Parkin との結合が起きなくなることを見出した(図6)。さらに PINK1 の siRNA によっても IPAS と Parkin との結合が弱まることを見

出した。このことから IPAS は PINK1-Parkin によってリン酸化、ユビキチン化と修飾され制御されて分解されていることがわかった。

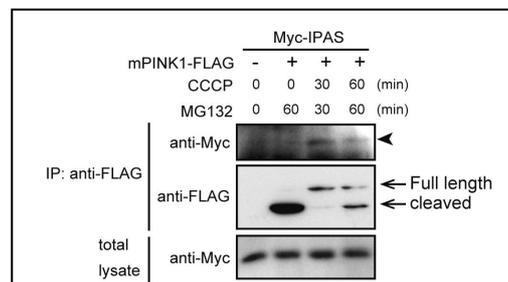


図4 IPASのCCCP依存的なPINK1との結合

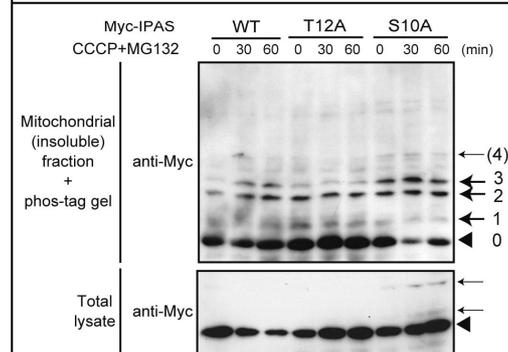


図5 IPASのリン酸化とT12A変異体

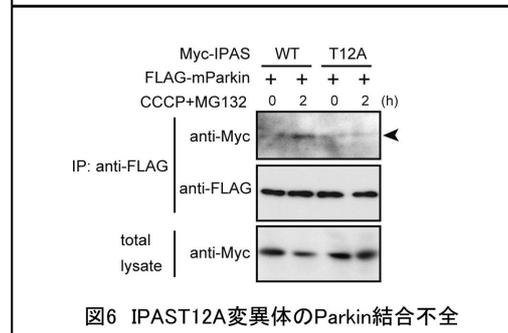


図6 IPAST12A変異体のParkin結合不全

新潟大学脳研究所の協力を得て、複数のパーキンソン病患者組織を含めたヒト脳切片を IPAS の抗体を用いて免疫組織化学で解析した結果、IPAS の発現が強い神経細胞がこの患者特異的に中脳黒質で増加することがわかった(図7)。

IPAS ノックアウトマウスの作製は理化学研究所との共同研究によって完了した。ノックアウトマウスはメンデルの法則に準拠して生まれ成長し胎生致死等は起きなかった。MPTP 投与を上記のマウスに行い、通常マウスと IPAS ノックアウトマウスでの影響の差を中脳黒質ドーパミン作動性神経細胞のマーカであるチロシン水酸化酵素の免疫染色で解析した結果、IPAS ノックアウトマウスでは MPTP による神経細胞の減少が抑えられることがわかった(図8)。

これらの結果からミトコンドリア IPAS が PINK1-Parkin 経路によってリン酸化とユビキチン化を受け高度に制御されて分解されること、さらに PINK1 や Parkin の変異などによってその分解制御の破綻が起きた際にストレスなどによって IPAS が誘導、蓄積

して神経細胞死を誘発しパーキンソン病発症に関与していることが示された。

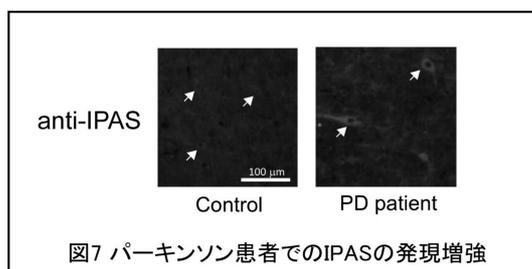


図7 パーキンソン患者でのIPASの発現増強

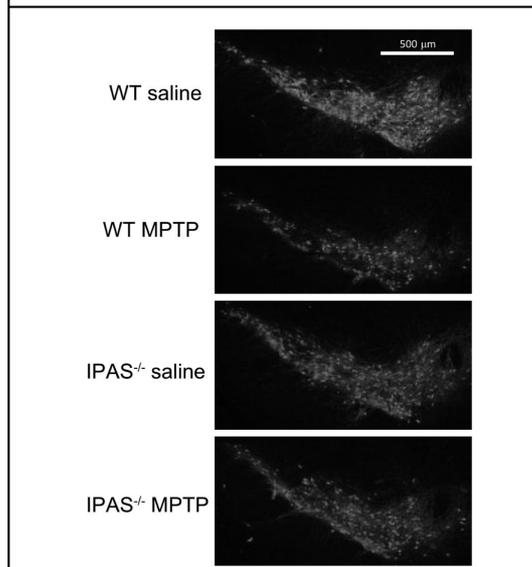


図8 IPASノックアウトマウスでの神経細胞死の緩和

IPAS が種々のストレスによる細胞死において PINK1-Parkin 経路以外のシグナル経路によって修飾されて、機能が変化するかを解析したところ、p38 MAPK 経路の下流においても IPAS がリン酸化され制御されることを見出した。このリン酸化は PINK1 とは逆に IPAS のよるアポトーシス誘導機能を促進することを明らかにした。また、神経保護作用を持つ bHLH 型タンパク質 NXF との関連を解析した結果、両者が相互作用して結果として IPAS による神経細胞死を抑制することを見出した。これらの結果は IPAS による神経細胞死を緩和する新たな方法を示しており、これらの結果をまとめて論文準備中である。

またパーキンソン病において異常タンパク質を分解する別の機構であるオートファジーに注目して、新規分子シグナル機構を解析した結果、Ulk1 の脱リン酸化酵素を見出すことに成功し論文として報告した。

## 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 4 件)

Torii S\*, Yoshida T\*, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. Identification of PPM1D as an essential Ulk1

phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO R.*, 17, 1552-1564 (2016). (査読有) \*: equally contribution

DOI:10.15252/embr.201642565

Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, Shimizu S. Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. *Nature Communications*, 7, 13508 (2016). (査読有)

DOI: 10.1038/ncomms13508.

Torii S\*, Kasai S\*, Suzuki A, Todoroki Y, Yokozawa K, Yasumoto K, Seike N, Kiyonari H, Mukumoto Y, Kakita A, Sogawa K. Involvement of Inhibitory PAS domain protein (IPAS) in neuronal cell death in Parkinson's disease. *Cell Death Discovery*, 1, 15015 (2015).

(査読有) \*: equally contribution

DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.15

Kasai S, Torii S, Kakita A, Sogawa K. Inhibitory PAS domain protein is a substrate of PINK1 and Parkin and mediates cell death in a Parkinson's disease model. *Cell Death and Disease*, 6, e1886 (2015). (査読無) DOI: 10.1038/cddis.2015.243.

[学会発表](計 3 件)

鳥居 暁, DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

鳥居 暁, DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割、第 10 回オートファジー研究会、2016 年 11 月 13 日~11 月 15 日、NASPA ニューオータニ(新潟県南魚沼郡湯沢町)

鳥居 暁, オルタナティブオートファジーのケミカルバイオロジー、第 8 回オートファジー研究会、2014 年 11 月 9 日~11 月 11 日、シャトレゼガトーキングダム サッポロ(北海道札幌市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/molbiol/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥居 暁 (TORII, Satoru)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト講師

研究者番号: 10444001

(3)連携研究者

十川 和博 (SOGAWA, Kazuhiro)  
東北大学・生命科学研究科・教授  
研究者番号：80175421

安元 研一 (YASUMOTO, Kenichi)  
東北大学・生命科学研究科・准教授  
研究者番号：90241629