

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461280

研究課題名(和文)パーキンソン病原因遺伝子産物によるミトコンドリア維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of mitochondrial maintenance by Parkinson's disease gene products

研究代表者

柴 佳保里 (SHIBA, Kahori)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30468582

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)：パーキンソン病原因遺伝子産物であるParkinとPINK1はミトコンドリアの機能維持に関与する。PINK1はParkinをリン酸化することで活性化し、膜電位の低下した不良ミトコンドリアを選択的に除去することが明らかになっている。本研究課題では、PINK1とParkinが分解シグナルであるリン酸化ポリユビキチン鎖を増幅する役割があることを明らかにした。また、患者由来iPSドパミン神経細胞においてこのシステムが破綻していることを示し、発症機構に関与することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The Parkinson's disease gene products PINK1 and Parkin are involved in the maintenance of mitochondrial functions. It has been demonstrated that PINK1 activates Parkin through its phosphorylation, which leads to selective removal of damaged mitochondria. This study uncovered that PINK1 and Parkin have a role to amplify the phospho-ubiquitin chains on the damaged mitochondria as their degradation signal. Moreover, the amplification system of the phospho-ubiquitin signal was compromised in dopaminergic neurons derived for patient's iPS cells, which strongly suggests that the dysfunction of this system is involved in PD pathogenesis.

研究分野：神経学

キーワード：Parkin PINK1 パーキンソン病 マイトファジー

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 (Parkinson's Disease: PD) はアルツハイマー病に次いで罹患率の高い神経変性疾患である。PD は中脳黒質ドパミン神経細胞の変性による運動障害を主徴とするが、その病態機序は明らかになっていない。

研究代表者は原因遺伝子産物の機能解析から PD 発症機構の解明を目指している。1998 年、当研究室において若年性劣性遺伝性 PD の原因遺伝子産物として Parkin を同定し、ユビキチン連結酵素 (E3 リガーゼ) であることを明らかにした。その後、長い間、Parkin の本質的な役割は不明であったが、ショウジョウバエの遺伝学的解析から、別の原因遺伝子産物である PINK1 (キナーゼ) と相互作用すること、また、両遺伝子産物がミトコンドリアの機能維持に関与することが報告された。さらに、哺乳類培養細胞を用いた研究から、PINK1 と Parkin は膜電位が低下した不良ミトコンドリアを選択的にオートファジー (マイトファジー) 経路で分解することが明らかになった。すなわち、PINK1 と Parkin はミトコンドリアの品質管理役として機能している。

研究代表者は、その分子メカニズムの一端としてミトコンドリアの膜電位が低下すると PINK1 が Parkin の 65 番目のセリン残基をリン酸化し、Parkin の E3 リガーゼ活性を活性化することを報告した。また、ショウジョウバエを用いた遺伝学的相互作用の解析から、PINK1-Parkin 経路の活性化において、さらなる新規分子の存在も示唆していた。一方で、PINK1 のキナーゼ基質の探索も行っており、複数の候補因子を同定していた。

2. 研究の目的

本研究では、PINK1-Parkin 経路マイトファジーに関与する新規分子を同定しその役割を解明すること、PINK1 のリン酸化基質候補の中でマイトファジーに関与する分子を決定すること、さらにヒトドパミン神経細胞においてのこれらの関与の検証を目的とした。

3. 研究の方法

PINK1 基質探索のために PINK1 ノックアウトマウス線維芽細胞に野生型 PINK1、またキナーゼ喪失型 PINK1 を安定発現する細胞を樹立した。これらの細胞にミトコンドリア脱共役剤である CCCP を 3 時間処理後、リン酸化タンパク質の精製を行い、質量分析法により野生型でより多く検出されるタンパク質を同定した。*In vitro* キナーゼアッセイは、 γ -³²P-ATP を用いてリン酸化反応を行い、SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、オートラジオグラフィにより検出した。細胞内局在においては免疫染色法において可視化した。タンパク質発現量は、ウエス

タンブロット法において検出した。ショウジョウバエは、目的の遺伝子を挿入したベクターを作製し、トランスジェニックハエを作出した。

4. 研究成果

(1) PINK1 新規基質ユビキチンの同定
PINK1-Parkin 経路に関与する新規分子を同定するために PINK1 キナーゼ基質のスクリーニングを行い、PINK1 が活性化状態で、300 倍以上リン酸化修飾される分子としてユビキチンを同定した。一方、その他の候補分子は、高々数倍レベルのリン酸化であり、内在性レベルでのリン酸化は検出できなかった。*In vitro* キナーゼアッセイを行った結果、PINK1 はモノユビキチンおよびポリユビキチン (鎖) の 65 番目のセリン残基を直接リン酸化することを明らかにした。

(2) Parkin に対するユビキチンの役割
PINK1-Parkin 経路が活性化すると Parkin はミトコンドリア外膜タンパク質をユビキチン化する。これらのポリユビキチン鎖の PINK1 によるリン酸化修飾が Parkin のミトコンドリア移行、及び E3 リガーゼ活性に影響するかどうかを検討した。その結果、65 番目のセリン残基をアラニンに置換したリン酸化できないポリユビキチン鎖をミトコンドリア上に発現させると (ミトコンドリア移行シグナルに 4 つユビキチンを連ねたコンストラクトを発現させると)、野生型と比較して Parkin のミトコンドリアの移行効率は低下した。一方、模擬リン酸化体のユビキチン鎖においては、野生型と同様であった。また、ミトコンドリア移行シグナルに Parkin のリガーゼ活性中心を結合させたコンストラクトを細胞内に発現させ、ミトコンドリア上に Parkin 活性依存的に形成するユビキチン鎖を発現させると、ミトコンドリアに移行できない Parkin の病変変異体や E3 リガーゼ不活性型においてもミトコンドリアに移行することを確認した。

また、Parkin のミトコンドリアへの局在化がユビキチン鎖との結合によるものかどうかを検討したが、Parkin はポリユビキチン鎖と結合することを示し、野生型と比較するとリン酸化ポリユビキチン鎖との結合能は劇的に高まることを確認した。これらの結果から、ミトコンドリア上のリン酸化ポリユビキチン鎖は Parkin と結合することでミトコンドリアに局在化させる役割を持つことが明らかになった。

次に、リン酸化ユビキチン鎖が Parkin の E3 活性に影響するかどうかを検討した。GFP-Parkin を培養細胞内に発現させると Parkin は E3 活性依存的に GFP を偽基質として認識し、ユビキチン化する。そこで、GFP-Parkin とミトコンドリア上に野生型、非リン酸化型、及び模擬リン酸化ユビキチ

ン鎖を発現させた結果、野生型と模擬リン酸化ユビキチン鎖でのみ GFP はユビキチン化された。一方で、非リン酸化ユビキチン鎖では、GFP のユビキチン化は検出されなかった。これらの結果から、リン酸化ユビキチン鎖は Parkin の E3 活性を活性化することが明らかになった。

以上のことから、Parkin が形成したユビキチン鎖を PINK1 がリン酸化し、これらのリン酸化ユビキチン鎖はさらなる Parkin のミトコンドリアへの局在化を促進する。局在化した Parkin は PINK1 によってリン酸化され、Parkin の E3 活性は活性化される。その結果、効率よくリン酸化ユビキチン鎖を増幅するポジティブフォワードループが形成され、速やかに不良ミトコンドリアを分解する。これらの機構において PINK1 と Parkin は主要な役割を担っていることが示唆された(図 1) (Shiba-Fukushima K, *PLoS Genet.* 10: e1004861, 2014)。

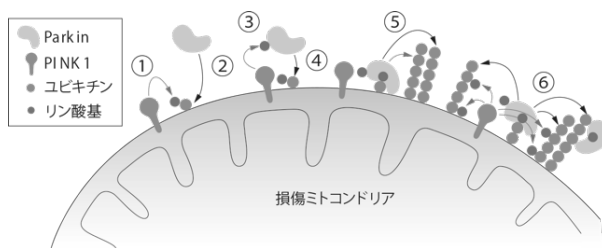


図 1. PINK1 と Parkin によるリン酸化ユビキチン鎖の増幅機構

- ①PINK1 がユビキチンをリン酸化する。
- ②Parkin がミトコンドリア上のリン酸化ユビキチンに結合する。
- ③PINK1 が Parkin をリン酸化する。
- ④Parkin のミトコンドリアへの親和性が増加する。
- ⑤Parkin が活性化され、さらにミトコンドリア外膜タンパク質をユビキチン化する。
- ⑥PINK1 と Parkin は協働してリン酸化ユビキチン鎖を増幅する。

(3) リン酸化ユビキチン鎖の生理学的意義次に、ショウジョウバエを用いてリン酸化ユビキチン鎖の生理学的意義を検証した。そのため、ミトコンドリアに野生型、模擬リン酸化、非リン酸化ユビキチン鎖を発現するショウジョウバエを作製し、PINK1 ノックアウトショウジョウバエと掛け合わせ、次世代の表現型を観察した。PINK1 ノックアウトショウジョウバエでは飛翔筋のミトコンドリアが変性するが、模擬リン酸化ユビキチン鎖を発現させるとミトコンドリアの変性は改善した。一方、野生型、及び非リン酸化ユビキチン鎖を発現させた個体では、ミトコンドリア変性は改善されなかった。また、クライミングアッセイにおいて運動機能を測定した結果、模擬リン酸化ユビキチン鎖を発現させると改善効果が確認された。これらの結果はリン酸化ユビキチン

鎖が内在性 Parkin を活性化することでミトコンドリア機能を改善したことが予想される。以上のことから、リン酸化ユビキチンの生理学的意義は Parkin の活性化を促進するためであることが示唆された(図 2)。

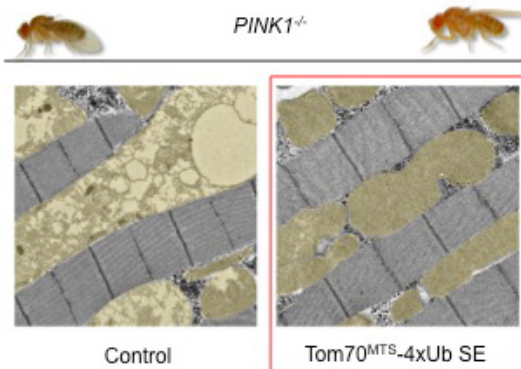


図 2. (左)PINK1 ノックアウトショウジョウバエの飛翔筋ではミトコンドリアは変性している。(右)模擬リン酸化ユビキチン鎖を発現させるとその変性は改善された。

(4) ドパミン神経細胞における

PINK1-Parkin の役割

最後に、PINK1 と Parkin 患者由来の iPS 細胞をドパミン神経細胞に分化誘導し、PINK1-Parkin 経路マイトファジーに対する影響を検討した。その結果、両遺伝子変異患者由来の細胞では、ミトコンドリア膜電位低下時においてもミトコンドリア上にリン酸化ユビキチンは検出されず、外膜タンパク質の分解も見られなかった。これらの結果は、PINK1 と Parkin にリンクした患者のドパミン神経細胞において、不良ミトコンドリアの除去が不能であることを示唆している。

ミトコンドリア外膜タンパク質 Miro1、Miro2(以降、2つを Miro と記載)は、Parkin の基質であり、ミトコンドリア輸送を正に制御する分子であり、その働きにより神経軸索内のミトコンドリア輸送が促進される。一方、PINK1-Parkin シグナルは、Miro を分解することにより、不良ミトコンドリアが神経終末に運ばれないよう、品質管理をしていると考えられる。

このコンテキストにおいて、PINK1、Parkin 患者由来の神経細胞を用いてミトコンドリア膜電位低下時のミトコンドリア局在を確認した。結果、健常者ドパミン神経細胞では神経軸索内のミトコンドリアはほとんど検出されなかったが、PINK1、Parkin 患者由来の神経細胞においては野生型と比較して軸索内でのミトコンドリアシグナルが多く検出された。これらの結果は、PINK1、Parkin 患者由来のドパミン神経細胞において、不良ミトコンドリアの軸索輸送阻害が

機能していないことを示唆していた
(Shiba-Fukushima K, *Hum Mol Genet.*
26: 3172-3185, 2017)。

まとめ

本研究において、PINK1によるParkinとユビキチン(鎖)のリン酸化は、不良ミトコンドリアの目印となるリン酸化ユビキチン鎖を効率よく増幅し、不良ミトコンドリアの神経軸索輸送を止め速やかに分解する品質管理機構に関与する分子であることを明らかにした。また、このミトコンドリア品質管理機構の破綻がPD発症メカニズムである可能性を示唆した。

今後、生体内におけるPINK1-Parkinシグナルの意義の検証と、これら分子メカニズムに基づく分子標的治療薬の開発への貢献を目指したい。

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 4 件)

①Shiba-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>

②Shiba-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>

This article is featured in a mini review: A Polyubiquitin Chain Reaction: Parkin Recruitment to Damaged Mitochondria. *PLoS Genet.* 11: e1004952 (2015)

③Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y: Lysine 63-linked polyubiquitination is dispensable for Parkin-mediated mitophagy. *J Biol. Chem.* 査読有 289(48): 33131-33136 (2014) doi: 10.1074/jbc.C114.580944

④Shiba-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 8 件)

① 柴 佳保里、井下 強、青木 裕子、石濱 泰、今居 讓、服部信孝: PINK1-Parkinシグナル伝達に関与する新規分子の解析
ConBio2017 神戸、2017年12月6日

② Shiba-Fukushima K, Ishikawa K-I, Takanashi M, Akamatsu W, Imai Y, Hattori N: Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. 第39回日本分子生物学会年会 ポスター 横浜、2016年11月30日

③ Shiba-Fukushima K, Ishikawa K-I, Takanashi M, Akamatsu W, Imai Y, Hattori N: *In vivo* evidence for the involvement of phospho-ubiquitin signal. 第39回日本神経学会学術大会ポスター 横浜、2016年7月22日

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 Shiba-Fukushima K, Arano T, Matsumoto G, Inoshita T, Yoshida S, Ishihama Y, Ryu K-K, Nukina N, Imai Y, Hattori N: Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. 第56回日本神経学会学術大会 口演 新潟、2015年5月23日

⑥ Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y: Lysine 63-linked polyubiquitination is dispensable for Parkin-mediated mitophagy. 第37回日本神経科学大会 横浜 2014年9月11日

⑦ Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N: PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin: an initial step of mitophagy 平成26年

度 新学術領域研究「マトリョーシカ型進化原理」班会議 神戸、2014年7月11日

- ⑧ 柴佳保里、井下 強、梅崎 勇次郎、今居 譲、服部 信孝：PINK1-Parkin ミトコンドリア品質管理機構に関与する分子の探索。第55回日本神経学会学術大会 ポスター 福岡、2014年5月23日

〔図書〕（計 3件）

- ① 服部信孝、今居 譲、柴佳保里、：「劣性遺伝性若年性パーキンソン病（AR-JP）の臨床、病理、分子遺伝学」実験医学増刊 認知症 第35巻12号 21-26（2017）6ページ
- ② 今居 譲、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）7ページ
- ③ 今居 譲、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）4ページ

〔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：今居譲、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

柴佳保里（SHIBA, Kahori）

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30468582

(3) 連携研究者

今居 譲（IMAI, Yuzuru）

順天堂大学・医学研究科・先任准教授

研究者番号：30321730

井下 強（INOSHITA, Tsuyoshi）

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：20601206

(4) 研究協力者

服部 信孝（HATTORI, Nobutaka）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80218510

赤松 和土（AKAMATSU, Wado）

順天堂大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：60338184