

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650042

研究課題名(和文)パーキンソン病を予防するミトコンドリア品質管理の試験管内再構成

研究課題名(英文)In vitro reconstitution of Parkin-mediated mitochondria quality control

研究代表者

松田 憲之(MATSUDA, Noriyuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副参事研究員

研究者番号：10332272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者(松田憲之)は「ParkinとPINK1がユビキチン化を介してミトコンドリア品質を管理する仕組みの一端を、精製タンパク質を用いて生化学的に試験管内再構成する」ことを研究テーマとして、挑戦的萌芽研究に採択された。そこで、光架橋性アミノ酸BPAを用いて、リン酸化ユビキチンとParkinの結合様式の解明を試みた。

リン酸化Parkinやリン酸化ユビキチンの狙った部位にBPAを導入し、部位特異的な架橋によって相互作用マップを作成し、さらにin silicoモデリングと組み合わせることによって、既知の不活性型Parkinとリン酸化ユビキチンの構造から、両者の新しい複合体モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：Parkin, a gene product mutated in familial Parkinsonism, is essential for elimination of damaged mitochondria. Recent progress has revealed that phosphorylation of both Parkin and ubiquitin by PINK1 are crucial for their function. However, the mechanism by which phosphorylated ubiquitin associates with and activates Parkin remains largely unknown.

Here, we analyze interactions between phosphorylated forms of both Parkin and ubiquitin at a spatial resolution of the amino acid residue by site-specific photo-crosslinking. We reveal that IBR domain along with RING1 domain of Parkin preferentially binds to ubiquitin in a phosphorylation-dependent manner. Furthermore, the Fluoppi assay showed that pathogenic mutations in these domains blocked interactions with phosphomimetic ubiquitin in mammalian cells.

Thus molecular modeling based on the site-specific photo-crosslinking interaction map combined with mass spectrometry reveals that a novel binding mechanism between Parkin and ubiquitin.

研究分野：生物学

キーワード：PINK1 Parkin ユビキチン ミトコンドリア パーキンソン病

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(以下、PD と略記)は国内に 15 万人近い患者がいるにもかかわらず、未だに発症メカニズムが完全に解明されていない疾患である。PINK1 と Parkin は遺伝性劣性 PD の原因遺伝子産物であり、機能喪失によって病気が発症することから、普段は PD の発症を防ぐ役割を担っている。PINK1 はミトコンドリア移行配列を有するプロテインキナーゼ、Parkin は基質にユビキチンという低分子量の蛋白質を共有結合させる酵素(ユビキチンリガーゼ)である。2010-2013 年に、我々は「PINK1 と Parkin が協調して異常ミトコンドリア上の基質をユビキチン化しており、その品質管理機構が破綻すると、異常ミトコンドリアの蓄積や ROS の過剰産生によって PD が発症する」という概略を明らかにした。

このように PINK1 と Parkin の機能の概略は明らかになりつつあるが、未だに解明されていない点も多く、例えば PINK1 の触媒するリン酸化ユビキチンと Parkin の相互作用ひとつとっても、十分な理解は進んでいなかった。

### 2. 研究の目的

PINK1 と Parkin の機能の全体像を理解する上で、両者の分子機構には解明されていない点が多く存在する。上述のように、PINK1 の触媒するリン酸化ユビキチンと Parkin の相互作用でさえも、理解が進んでいなかった。その問題に挑むために、(新たな役者を探索する意味もあって)質量分析装置を用いて Parkin のユビキチン化する基質を網羅的に解析したり、ショウジョウバエの遺伝学的な解析(PINK1/Parkin 変異体のエンハンサー・サプレッサーのスクリーニング)によって PINK1 や Parkin の制御因子を同定する試みなどは、世界中の研究室で行われている。

一方で、私は他の研究室とは異なるアプ

ローチとして、試験管内 *in vitro* の系や *semi vitro* の系で PINK1/Parkin によるミトコンドリア品質管理システムの一部を再構築し、この現象を生化学的に理解することを目指した。

### 3. 研究の方法

最小限の要素を用いて、試験管内 *in vitro* や *semi vitro* の系で PINK1 や Parkin によるミトコンドリア品質管理の一部を再構築する。我々は既に精製 PINK1・精製 Parkin・ユビキチン・E1・E2 などの必須因子を有しているので、これらの精製タンパク質を用いて、ミトコンドリア品質管理の一部を再構成する。

再構成系の最も危険な落とし穴は「*vivo* を反映しない artifact に陥ること」であるが、再構成系に添加する Parkin を野生型から患者由来変異体に置き換えた時に、再構成系が停止するかどうかを調べることで、再構成系が *vivo* を反映していない artifact に陥る危険性を常に回避することができる。

### 4. 研究成果

助成対象者(松田憲之)は、平 26 年-平 27 年に“パーキンソン病を予防するミトコンドリア品質管理の試験管内再構成”という課題名で、「Parkin と PINK1 がユビキチン化を介してミトコンドリア品質を管理・維持する仕組みの一部を、生化学的に試験管内で再構成する」ことを研究主題として、挑戦的萌芽研究に採択された。

助成期間(平 26-27 年)中に、私は S ランク論文を 2 報(Nature (2014)、JCB (2015))、A ランク論文を 2 報(JCS (2015)、JBC (2015))、責任著者として発表した。その中から、挑戦的萌芽研究と関連の深い生化学的再構成の結果に関して、以下に研究の概要を述べる。

我々が試みたのは、リン酸化ユビキチンと Parkin の結合様式の解明である。研究手法としては、光架橋性アミノ酸 BPA を用いた生化学的な解析を選択した。つまり、リン酸化 Parkin やリン酸化ユビキチンの狙ったアミノ酸部位に BPA を導入し、部位特異的な架橋によって相互作用マップを作成し、さらに *in silico* モデリングと組み合わせることによって、既知の(=不活性型の) Parkin とリン酸化ユビキチンの構造から複合体モデルを構築することを目指した。

まず、BPA を Parkin の様々な部位に導入し、リン酸化ユビキチンとの結合に重要なアミノ酸のマッピングを行なった結果、RING1 ドメイン中の alpha-ヘリックス (310-330 アミノ酸周辺) を取り囲む領域、及び RING1-IBR 境界領域が重要であることが示された。ユビキチンに BPA を導入する実験の結果からは、I44 を取り囲む領域が結合領域の近傍に位置することが解った。より直接的な証拠を得るために、BPA を導入したリン酸化ユビキチン(あるいはリン酸化模倣ユビキチン)で架橋される Parkin のペプチドを質量分析装置で決定したところ、やはり RING1 ドメイン中の alpha-ヘリックス (310-330 アミノ酸周辺) や RING1-IBR 境界領域付近のペプチドが同定され、静的な複合様式の情報を得た。

動力学を考慮した *in silico* 分子モデル構築から、Parkin の RING1 ドメイン中の alpha-ヘリックスとユビキチン I44 周辺の疎水領域が結合した状態で、Parkin の K151/H302 を主とする正電荷に富んだ領域とユビキチンのリン酸化 S65 が結合する可能性が示唆された。最終的に、その結合が Parkin の構造を大きく変化させるという複合体の構造モデルを提唱した。

実際に相互作用に重要と思われるアミノ酸に変異を導入すると、*in cell* でリン酸化模倣 Parkin とリン酸化模倣ユビキチンの結

合や、Parkin の異常ミトコンドリアへの移行が阻害されることから、このモデルの妥当性が証明された。

本成果は、Yamano K., 他著者 4 名, Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015) *J Biol Chem.* 290 (42): 25199-25211 として、助成期間中に論文として報告した。なお、下記〔雑誌論文〕に示したように、助成期間中に他にも 3 報の論文(計 4 本の論文)を報告している。

#### 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)

1) Yamano K., 他著者 4 名, Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015) Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation. *J Biol Chem.* 290 (42): 25199-25211, doi: 10.1074/jbc.M115.671446. (査読有り)

2) Okatsu, K., 他著者 4 名, Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *Journal of Cell Biology*, 209 (1): 111-128, doi:10.1083/jcb.201410050. (査読有り)

3) Okatsu K, Kimura M, Oka T, Tanaka K, and Matsuda, N. (2015) Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of Cell Science*, 128(5): 964-78, doi:10.1242/jcs.161000. (査読有り)

4) Koyano F, 他著者 13 名, Tanaka, K., and Matsuda, N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature.* 510 (7503): 162-166, doi:10.1038/nature13392. (査読有り)

〔学会発表〕(計 13 件)

1) Noriyuki Matsuda, Relationship between mitochondrial quality control and Parkinson's disease (パーキンソン病を防止するミトコンドリア品質管理と分解)

2015 年 12/1-4, in English Symposium, 2S2, BMB2015, 神戸国際会議場、兵庫県神戸市、シンポジウム招待講演(英語)

2) Noriyuki Matsuda, Phosphorylated ubiquitin, an unanticipated factor in the PINK1-Parkin-ubiquitin cascade.

October 1-2, 2015, 10th Annual Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium (GEO-PD), Roppongi Academyhills, Minato-KU, Tokyo, 国際シンポジウム招待講演(英語)

3) 松田憲之, パーキンソン病発症を予防する、PINK1・Parkin・リン酸化ユビキチンによるミトコンドリア品質管理機構

2015 年 9/26, 27, 8th Symphony, メトロポリタンエドモントホテル、東京都千代田区、招待講演(日本語)

4) Noriyuki Matsuda, How PINK1- and Parkin-catalyzed ubiquitylation prevents Parkinson's disease.

2015 年 7/28-7/31 第 38 回日本神経科学大会シンポジウム S06p-2 Cutting-edge research of Parkinson's disease、神戸国際会議場、兵庫県神戸市、シンポジウム招待講演(英語発表)

5) 松田憲之, 尾勝圭, 小谷野史香, 田中啓二 PINK1 が異常ミトコンドリアの外膜上に特異的に局在化する仕組み

2015 年 6/30 - 7/2, シンポジウム S13 「ミトコンドリアが魅せる新境地-拡大を続けるミトコンドリアワールド- (The Frontiers in Mitochondria World)」第 67 回日本細胞生物学

会大会シンポジウム, タワーホール船堀, 東京都江戸川区, シンポジウム招待講演(日本語)

6) Noriyuki Matsuda, "Molecular mechanism of PINK1-Parkin pathway to suppress Parkinson's disease"

22 May, 2015, Neuroscience Fronteir Symposium "Molecular mechanisms of Parkinson's disease; what do we know and where are we headed?"第 56 回日本神経学会学術大会 朱鷺メッセ、ホテル日航新潟、新潟県新潟市、シンポジウム招待講演(英語)

7) Noriyuki Matsuda, Molecular mechanisms underlying PINK1 and Parkin localization on damaged mitochondria.

4 - 9 May, 2015, "Mitochondrial quality control and neurodegenerative diseases" symposium held at the Fondation des Treilles, Nice, France, 国際シンポジウム招待講演(英語)

8) 松田憲之, ミトコンドリアの品質管理という視点から見たパーキンソン病.

2015 年 3 月 21 日 - 23 日, 第 92 回日本生理学会大会(第 120 回日本解剖学会総会・全国術集会との合同大会)シンポジウム 神戸国際会議場、兵庫県神戸市、招待講演(英語)

9) Noriyuki Matsuda, "PINK1 kinase phosphorylates Ubiquitin for Parkin activation and mitochondrial quality control".

November 10, 2014, 1st International Meeting for New Aspects of the Ubiquitin Research Kyoto, International Institute for Advanced Studies, Kidukawa-shi, Kyoto, 招待講演(英語)

10) 松田憲之, 膜電位を指標に用いるミトコンドリアの品質管理.

開催日：2014年10月25日（土曜）基礎老化学会・ミトコンドリア学会 合同セミナー  
東海大学高輪キャンパス、東京都港区、招待講演（日本語）

11) 松田憲之、リン酸化ユビキチン：新たな「ミトコンドリア異常」伝達シグナル。

2014年10月15日（水）～18日（土）第87回日本生化学会大会、シンポジウム 2S06a「ユビキチン・ワールド：分子の鎖が織りなす多彩な生命機能」、国立京都国際会館、京都府京都市、招待講演（日本語）

12) 松田憲之、ミトコンドリア浄化機構の破綻がもたらす神経変性。

2014年9月26日（金曜）10:15-15:00、筋萎縮性側索硬化症（ALS）新規治療法開発をめざした病態解明 平26年度ワークショップ、都市センターホテル、東京都千代田区、招待講演（日本語）

13) Noriyuki Matsuda, *Identification of the Genuine Substrate of PINK1 that Activates Parkin.*

February 18-23, 2014, Keystone Symposium, Mitochondrial Dynamics and Physiology (Q5), Santa Fe Community Convention Center, Santa Fe, New Mexico, USA, 招待講演（英語）

〔図書〕（計0件）  
なし

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）  
なし

取得状況（計0件）  
なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>  
（現在、改訂中）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 憲之 (MATSUDA, Noriyuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副参事研究員

研究者番号：10332272

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし