

論文の内容の要旨

論文題目 ミトコンドリア品質管理におけるパーキンソン病の原因遺伝子産物 PINK1 と Parkin の解析

氏 名 尾勝 圭

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) は高い罹患率を示す神経変性疾患として知られている。*PINK1* (*PTEN-induced putative kinase 1*) や *PARKIN* などの PD の原因遺伝子が同定されているが、それらの遺伝子産物の細胞内における動態や変異による異常動態は完全には明らかにされていない。本研究では、若年性で発症する常染色体劣性遺伝性 PD の原因遺伝子産物 PINK1 と Parkin の分子動態と変異による異常を明らかにした。

Parkin はユビキチン連結酵素 (E3)、PINK1 はミトコンドリア局在型蛋白質キナーゼとして知られている。当研究室では 2000 年に Parkin が E3 であることを明らかにした。その後、Parkin とミトコンドリアの関係に注目が集まっている。これまでに学位申請者を含む多数の研究グループは“PINK1 と Parkin が協調して不良ミトコンドリアを分解に導く”ことを明らかにした。ミトコンドリアは細胞内でミトコンドリア内膜を隔てる電位差 (膜電位) を利用してエネルギー産生を行なうなど多くの重要な役割を担っている。その品質を保つために絶えず分裂と融合を繰り返し、著しく品質 (膜電位) の低下したミトコンドリアは再融合能が低下し、最終的に排除される。このようなミトコンドリア品質管理機構は神経細胞のような非分裂細胞では特に重要であると考えられる。一方で、ミトコンドリアと PD との関連も古くから知られている。ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害作用がある MPTP (合成麻薬の不純物) や Rotenone (農薬の成分) などが PD を引き起こす薬剤として報告されている。さらに、*PARKIN* や *PINK1* が欠損したモデル生物では異常なミトコンドリアが生じるなどの知見も報告されている。しかしミトコンドリアの機能異常と PINK1 の接点は最近まで不明であったが、学位申請者を含む研究グループらにより明かされつつある。その一つが PINK1 の「量」による制御である。PINK1 はミトコンドリア輸送シグナルを有する蛋白質であり、膜電位を利用して内膜へ運ばれて切断及び分解に導かれる。これに対して、膜電位の低下はミトコンドリア内膜の輸送を停止させ、PINK1 の外膜への蓄積を引き起こす。この PINK1 の蓄積が細胞質の Parkin を不良ミトコンドリアへ局在化させる。不良ミトコンドリアに局在化した Parkin は不活性型から活性型へ転換して、不良ミトコンドリア上の複数の蛋白質 (HK1, VDAC, Tom70, MitoNEET など) を基質としてユビキチン化を引き起こす。このユビキチンが目印となり、ユビキチン認識タンパク質である p62 や p97/VCP がミトコンドリアへ集積して、最終的に不良ミトコンドリアのプロテアソームやオートファジーによる分解や不良ミトコンドリア自体の隔離を制御する。本研究では、PINK1 の動態 (リン酸化と複合体形成) を解析することで、蓄積した PINK1 の「質」による制御を明らかにした。

・ PINK1 はミトコンドリア膜電位の低下によりリン酸化される

PINK1 は切断・分解とそれらの回避による量的な制御を受けており、過剰量の PINK1 は Parkin を正常なミトコンドリアへ局在化させる。一方でその効率は悪く、量以外の制御が示唆されていた。ミトコンドリア膜電位低下を引き起こす種々の薬剤処理により、蓄積した PINK1 が高分子量側にシフトすることを観察した。そしてこのバンドのシフトはキナーゼ活性のない変異体で観察されないことから自己リン酸化による変化であると考えた。この仮説を確かめるために Phos-tag を用いたリン酸基アフィニティーゲル電気泳動を行なうと、より明瞭なシフトバンドとして観察することができ、期待通りにリン酸化であることが示唆された。ミトコンドリア膜電位の低下により蓄積した内在性 PINK1 のほぼ全てがリン酸化状態にあることから、このリン酸化修飾の重要性が示唆された。

・ PINK1 の Ser228 と Ser402 が PINK1 の自己リン酸化に重要である

リン酸化部位を同定するにあたり、初めに PINK1 の活性化ループに着目した。多くのキナーゼがこの領域にリン酸化を受けることが知られている。PINK1 の活性化ループ内の Ser402 をリン酸化に影響を与える部位として同定した。さらなるリン酸化部位を探索するために LC-MS/MS と変異体解析を用いた実験を行なった結果、PINK1 の Ser228 をリン酸化部位として同定した。Ser228 は PINK1 の立体構造モデル上で、Ser402 と非常に近い場所に位置することが分かった。

・ PINK1 のリン酸化は Parkin の局在変化に重要である

これらのリン酸化の役割を解析するために、PINK1 の Ser228 と Ser402 をアラニンに置換した変異体(リン酸化部位欠損変異体)、酸性アミノ酸に置換した変異体(疑似リン酸化変異体)を用いて解析を行なった。まず PINK1 の局在と量について検討したが、野生型と変化は見られなかった。次に、これらの変異体 PINK1 を用いてミトコンドリア膜電位低下時の Parkin の局在変化を観察した。その結果、アラニン置換体では Parkin の局在変化は観察されなかったが、酸性アミノ酸置換体では Parkin の局在変化を観察することができた。従って、この二つの部位の PINK1 のリン酸化は Parkin の不良ミトコンドリアへの局在化に必要であることが判明した。

・ 膜電位の低下は PINK1 を 2 分子含む複合体の形成を引き起こす

ミトコンドリア膜電位の低下に伴い蓄積した PINK1 は、Blue native PAGE および Clear native PAGE を用いた天然状態の解析で約 850 KDa の複合体を形成していることが分かった。複合体と抗体を結合させる Native antibody mobility shift (NAMOS)-assay により、この複合体内にはミトコンドリア蛋白質の輸送体である Tom 複合体に加えて PINK1 が 2 分子含まれていることが分かった。また、Blue native PAGE と Phos-tag SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動により、複合体を形成した PINK1 の殆どがリン酸化状態にあることが分かった。

・ 患者由来の変異体 PINK1 は複合体形成とリン酸化に異常が生じている

PD 疾患に関連する多くの PINK1 変異体では、この複合体形成とリン酸化に異常が生じていた。

・PINK1 は分子間でリン酸化反応を行なう

リン酸化を受けない PINK1 変異体の中には複合体を形成するものとしなないものがあるが、複合体を形成できる非リン酸化変異体は、野生型 PINK1 と共存させるとリン酸化された。この結果から、PINK1 のリン酸化は少なくとも分子間で引き起こされる反応が含まれることが明らかになった。また重要なことに、PINK1 の分子間リン酸化と複合体形成が相関していることから、両者が密接に関係している可能性が示唆された。

これまで PINK1 の量的な制御を明らかにしてきたが、本研究により新たに PINK1 の複合体形成とリン酸化による質的な制御が明らかになった(下図)。PINK1 は不良ミトコンドリア上で 2 分子の PINK1 を含む複合体を形成して、分子間でのリン酸化反応を促進する。これらの結果は、PINK1 が多くの細胞表面受容体のように 2 量体を形成して細胞内で情報伝達を行なっている可能性を示唆している。PINK1 の複合体には TOM 複合体も含まれており、この意義や PINK1 との位置関係など構造生物学的な解析が望まれる。

これまでにミトコンドリアに関係する因子（呼吸鎖構成因子や融合の制御因子など）の変異により、脳や心筋などエネルギーの需要の多い器官に異常が生じやすいことが知られている。例えば、CPEO、MERRF、MELAS に代表されるミトコンドリア病やミトコンドリア内膜の融合因子 OPAI の変異が優性視神経萎縮症（Dominant Optic Atrophy type I）の原因遺伝子として、ミトコンドリア内膜の融合因子 Mfn2 の変異がシャルコー・マリー・トゥース病（Charcot-Marie-Tooth disease Type 2A）の原因遺伝子として報告されている。PD も中脳黒質緻密部のドーパミンニューロンの脱落により発症する疾患であると同時に、ミトコンドリアの呼吸鎖複体の阻害剤が PD を引き起こすことも知られており、PINK1/Parkin 依存的なミトコンドリア品質管理機構の破綻に伴う PD の品質の低下がパーキンソン病の発症に関与している可能性は十分に考えられる。本研究により明らかにした PINK1 の蓄積やリン酸化という基礎的な知見は、高感度のリン酸化型 PINK1 抗体の作成などにより不良ミトコンドリアの存在を検証する手段の開発に有用である。今後はヒト PD 患者切片を用いた病理学的な研究等への進展が期待される。

本研究では PINK1 が不良ミトコンドリアを処理するために、複合体形成やリン酸化を伴いながら Parkin を不良ミトコンドリアへ局在化させる質的な制御機構を明らかにした。多くの遺伝性 PD 患者由来の変異体ではこのメカニズムが破綻しているために、PD 発症機構との関連が強く示唆された。さらに本研究で明らかになったミトコンドリアの不良を監視する PINK1 の量と質の制御メカニズムは、細胞の増殖によって不良品を浄化できないニューロンなど非分裂細胞におけるミトコンドリアの恒常性維持の根幹であり、PD のみならず他の多くの神経変性疾患の発症機構解明や予防・治療法の開発へ向けての波及効果が期待される。

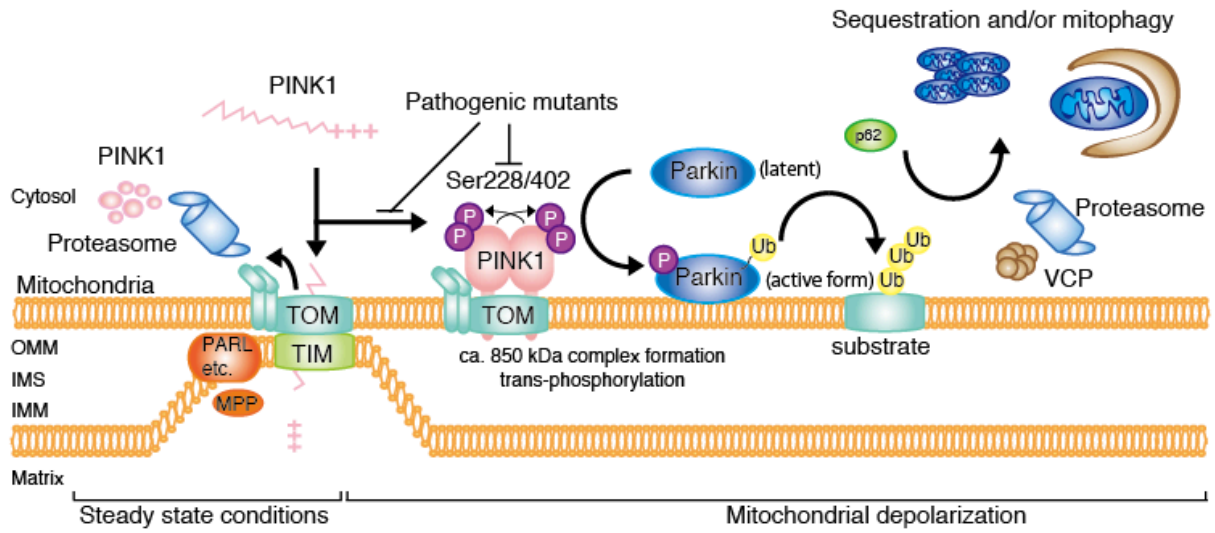


図. 本研究により明らかになった
ミトコンドリア品質管理における PINK1 と Parkin の分子機構