

論文審査の結果の要旨

氏名 尾勝 圭

PINK1 (タンパク質リン酸化酵素) と Parkin (ユビキチン連結酵素) は遺伝性劣性パーキンソン病の原因遺伝子産物であり、本論文はミトコンドリア品質管理における両酵素の役割を解明したものである。本論文は、下記 10 項目の実験結果から構成されている。

「PINK1 はミトコンドリア膜電位の低下時に自己リン酸化する」

脱共役薬 (CCCP) 処理により膜電位の低下した不良ミトコンドリアにおいて、PINK1 は内膜での分解を免れて外膜に蓄積する。その際に PINK1 がリン酸化を受けていることが見出され、キナーゼ活性の欠損した変異体の実験から自己リン酸化であると推定された。また、全ての内在性 PINK1 がリン酸化状態であることも示された。

「活性化ループ内の Ser402 変異は自己リン酸化を減弱する」

PINK1 の自己リン酸化部位を特定するため、活性化ループに存在する三つセリンに網羅的にアラニン変異が導入された。その結果、S402A 変異体で明瞭なバンド消失が観察された。一方で依然としてリン酸化バンドが残存することから、S402 以外のリン酸化部位の存在が示唆された。

「Ser228 はリン酸化部位である」

LC-MS/MS を用いて他のリン酸化部位が探索された。その結果、PINK1 の Ser228 がリン酸化されていることが示された。そして S228A/S402A 二重変異体でリン酸化バンドが完全に消失したことから、この二カ所で自己リン酸化されていることが示唆された。

「Ser228 と Ser402 のリン酸化は Parkin の標的化を制御する」

これらリン酸化が Parkin の局在に与える影響が検討された。PINK1 S228A/S402A 変異体では Parkin の局在変化が観察されず、S228D/S402D 変異体は野生型と同程度に Parkin を不良ミトコンドリアに局在化させることが観察されたので、PINK1 の二つの部位の自己リン酸化は Parkin の局在変化に重要であることが示された。

「PINK1 は不良ミトコンドリア上で 850 kDa の複合体を形成する」

ミトコンドリア膜電位低下時の PINK1 の動態を調べるために Blue Native (BN)-PAGE 解析が行われた結果、ミトコンドリアの膜電位が低下すると、PINK1 が 850 kDa の複合体を形成することが示された。

「PINK1 複合体には TOM 複合体と二分子の PINK1 が含まれる」

Native antibody mobility shift アッセイによって PINK1 複合体の構成因子が探索されて、この 850 kDa 複合体には外膜トランスロケータ (TOM) 複合体の構成因子が含まれていることが判明した。加えて、二種類の異なる蛍光タンパク質を融合した PINK1 を用いた解析から、PINK1 複合体には少なくとも二分子の PINK1 が含まれることが示された。

「PINK1 複合体にはリン酸化型 PINK1 が含まれる」

リン酸化と PINK1 複合体の関連を調べるために、BN-PAGE 後に Phostag PAGE が行なわれた結果、この複合体内の PINK1 は全てがリン酸化状態にあることが明らかにされた。

「患者由来の PINK1 変異によって複合体形成に異常が生じる」

若年発症の遺伝性パーキンソン病患者由来の PINK1 変異体を用いて、複合体形成と疾患との関連が検討された。多くの場合で複合体が減弱または消失していた。

「PINK1 は分子間でリン酸化反応を行なう」

変異体 PINK1 と野生型 PINK1 を共発現することで、分子間リン酸化反応の可能性が検討された。その結果、PINK1 の自己リン酸化反応は分子内反応でなく分子間リン酸化反応であることが示唆された。

「患者由来の変異体 PINK1 で Parkin の不良ミトコンドリアへの移行が低下する」

若年発症のパーキンソン病患者由来の変異体 PINK1 と GFP-Parkin を導入した細胞のミトコンドリア膜電位を低下させると、Parkin の局在化が有意に減弱または消失することが示された。即ち PINK1 の複合体形成とリン酸化の異常が Parkin 依存的なミトコンドリア品質管理機構の破綻に繋がることを示唆された。

以上の結果から、膜電位が低下した不良ミトコンドリアにおいて、PINK1 が外膜に蓄積すると分子間反応により二カ所で自己リン酸化して活性化型に転換すること、そして活性化型 PINK1 は Parkin を不良ミトコンドリアにリクルートし、外膜をユビキチン化修飾し、それがシグナルとなって不良ミトコンドリアがオートファジーで除去されると考えられた。この機能不全は、不良ミトコンドリアの蓄積を介してパーキンソン病の発症に繋がると考察された。

なお、本論の研究成果は論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。