

論文の内容の要旨

論文題目

パーキンソン病の原因遺伝子産物 Parkin が異常ミトコンドリアによって活性化される仕組み

氏 名 小谷野 史香

<研究の背景>

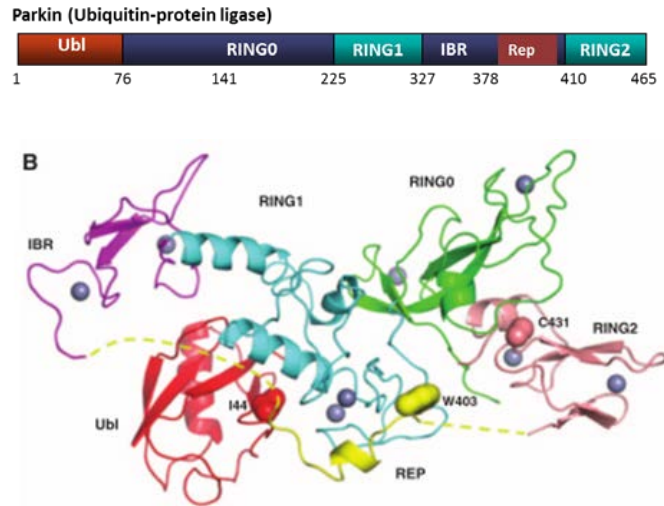
世界で約 400 万人が罹患するパーキンソン病は、根本的な治療法の開発が強く望まれている難治性の神経変性疾患である。家族性と孤発性に大別され、10 % 程度が常染色体優性・劣性遺伝様式をもった家族性パーキンソン病であると見込まれている。常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子産物である Parkin は、細胞内で標的蛋白質にユビキチンを付加する酵素:ユビキチンリガーゼ (E3) であり、同様に若年性に発症する常染色体劣性遺伝性パーキンソン病 *PARK6* の遺伝子産物 PINK1 は、セリン・スレオニンキナーゼである。

申請者の所属するグループを含む複数の研究グループから、Parkin と PINK1 が膜電位を喪失したミトコンドリアを“異常”と認識し、選択的に細胞から排除することで、細胞内におけるミトコンドリアの恒常性維持に寄与していることが示された。具体的には、ミトコンドリアの膜電位が低下すると、PINK1 が外膜上に蓄積するようになり、2量体化と自己リン酸化を経て活性化型に変換される^{*1,2}。すると、PINK1 依存的に Parkin の 65 番目の Ser 残基 (Ser65) がリン酸化されるとともに、活性中心である Cys431 上にユビキチン-エステル中間体が形成される。さらに Parkin は PINK1 の蓄積した外膜へ移行して活性型の E3 に変換され、最終的にミトコンドリア外膜上の蛋白質にユビキチンを付加することで、ミトコンドリアを分解に導く^{*3,4}。

<従来の研究の問題点と、申請者が明らかにしたこと>

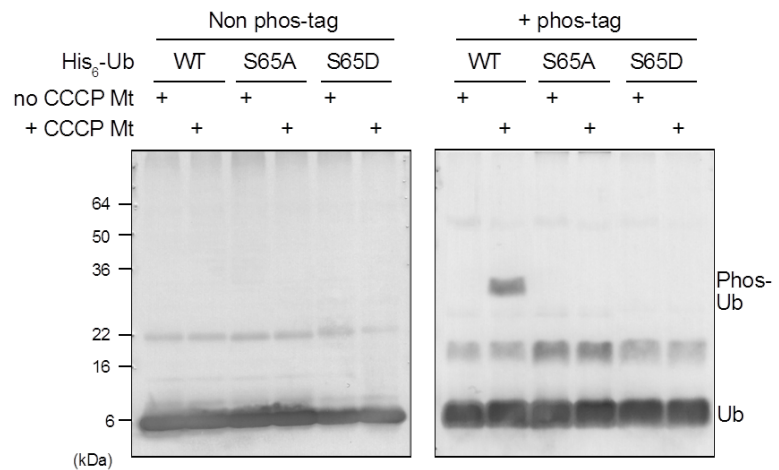
(1) 上述の知見の多くは、HeLa に代表される不死化培養細胞を用いて蓄積されてきた。しかしながら、パーキンソン病の表現型が出現する神経細胞で、PINK1 と Parkin によるミトコンドリアの品質管理経路が機能しているか否かについては、研究が進んでいなかった。そこで申請者はより生理的な条件に近いマウス初代培養神経細胞を用いた実験系を確立し、不死化培養細胞で確認されていた Parkin が機能する為の一連のプロセス、即ち“Ser65 のリン酸化、Cys431 上のユビキチン-エステル中間体の形成、ミトコンドリアへの移行、及び活性型 E3 への転換」が、マウス初代培養神経細胞においても観察されることを確認した。さらに、パーキンソン病の原因となる変異をもつ Parkin は、初代培養神経細胞中でも E3 活性と異常ミトコンドリアへの移行能が減弱していることを確認した^{*5}。

(2) Parkin は、N 末端側から Ubl (ubiquitin-like)、RING0、RING1、IBR、Rep (repressor element of parkin)、RING2 ドメインをもつ、RING/HECT hybrid 型 E3 である。最近、X 線結晶構造解析により、不活性化型 Parkin の立体構造が報告された(右図)。結晶構造からは、Rep ドメインが E2 と RING1 ドメインとの結合を妨げ、RING0 ドメインが RING2 ドメイン中の Cys431 とユビキチンのチオエステル結合を阻害することが示唆された。前ページに記載したように、Parkin が活性化型に変換される為には PINK1 依存的に Parkin の Ser65 がリン酸化されることが重要である。仮に PINK1 の下流で起こるイベントが Parkin Ser65 のリン酸化だけであれば、リン酸化模倣変異によって PINK1 の機能がバイパスされることが期待されるが、実際には Parkin の Ser65 リン酸化模倣変異体の活性化には、依然として PINK1 が必須である。この結果は、PINK1 による Parkin Ser65 のリン酸化だけで PINK1 の機能を説明するのは困難であること、即ち、Parkin 以外にも重要な PINK1 基質が存在することを示唆している。



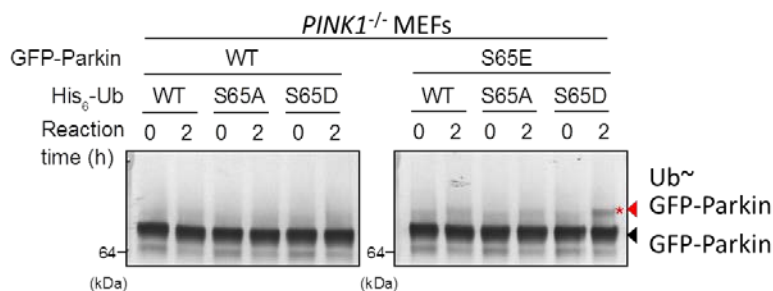
Trempe et al., Science. 2013;340(6139):1451-5.

そこで、本研究では新しい PINK1 基質の探索を行い、ユビキチンが PINK1 の新奇基質であることを明らかにした。*in vitro* 及び *in cells* において、ユビキチンの Ser65 が PINK1 によってリン酸化されることを LC-MS/MS 解析及び変異体解析により確認した(右図)。さらに、Ser65 がリン酸化された内在性ユビキチンが、



PINK1 の存在する細胞においてミトコンドリアの膜電位低下時にのみ検出されることを確認した。

注目すべきことに、ユビキチンのリン酸化模倣変異体を細胞内で発現させると、Parkin のリン酸化模倣変異体を PINK1 非依存的に活性化することができる(下図)。この際に、リン酸化ユビキチンの C-末端の double Glycine モチーフは必要ではないことから、リン酸化ユビキチンは、その conjugation とは独立に Parkin を活性化することが示された。



さらに、ユビキチンと Parkin との相互作用様式の解析から、Ser65 リン酸化 Parkin と Ser65 リン酸化ユビキチンは結合できること、リン酸化ユビキチンが Parkin の活性中心である Cys431 に対する自己抑制を解除すること、が示唆された。一連の実験結果から、申請者は「PINK1 による Parkin とユビキチンのリン酸化が Parkin を完全に活性型の E3 に変換するために必要十分なプロセスであり、リン酸化ユビキチンは Parkin 活性化因子である」という仮説を提唱した。

<まとめ>

ユビキチンは、蛋白質の翻訳後修飾因子として細胞内シグナル伝達や蛋白質分解を始めとする数多くの蛋白質の機能と運命を調節することが知られているが、今回の研究により、そのユビキチン自体が修飾を受け、さらには Parkin の E3 としての機能を活性化することを明らかにした^{*6}。

【参考論文】

^{*1} Okatsu K, (他 7 名), **Koyano F**, (他 9 名), Tanaka K, Matsuda N.

PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria.

Nat Commun. 2012;3:1016

^{*2} Okatsu K, Uno M, **Koyano F**, (他 3 名), Tanaka K, Matsuda N.

A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment.

J Biol Chem. 2013 288(51):36372-84.

^{*3} Iguchi M, Kujuro Y, Okatsu K, **Koyano F**, (他 4 名), Tanaka K, Matsuda N.

Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation.

J Biol Chem. 2013;288(30):22019-32.

^{*4} Okatsu K, Iemura S-I, **Koyano F**, (他 3 名), Tanaka K, Matsuda N.

Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase.

Biochem Biophys Res Commun. 2012;428(1):197-202.

*⁵ **Koyano F**, Okatsu K, Ishigaki S, Fujioka Y, Kimura M, Sobue G, Tanaka K, Matsuda N.

The principal PINK1 and Parkin cellular events triggered in response to dissipation of mitochondrial membrane potential occur in primary neurons.

Genes Cells. 2013,(8):672-81.

*⁶ **Fumika Koyano**, (他 13 名), Keiji Tanaka and Noriyuki Matsuda

Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate Parkin

Nature. 2014, 510, 162–166