

論文審査の結果の要旨

氏名 小谷野 史香

PINK1 (蛋白質リン酸化酵素)と Parkin (E3:ユビキチン連結酵素)は遺伝性劣性パーキンソン病(PD)の原因遺伝子産物である。本論文は初代培養神経細胞を用いてミトコンドリア(Mt) 品質管理における両酵素の役割を解明すると共に、長年謎であった PINK1 による Parkin の活性化制御機構を明らかにしたものである。本論文は下記 8 項目の実験結果から構成されている。

1. マウス初代培養神経細胞において PINK1 と Parkin は Mt 膜電位低下依存的にリン酸化される

PINK1 と Parkin による Mt 品質管理機構は、主に非神経系の樹立培養細胞を用いて明らかにされてきた。しかし、生体に近い神経細胞を用いた検証が必須であることから、マウス初代培養神経細胞において脱共役剤である CCCP 処理後に PINK1 と Parkin がリン酸化されることを Phos-tag PAGE で確認した。

2. 神経細胞において Parkin は膜電位が低下した Mt に移行し E3 としての活性を示す

単離した神経細胞にレンチウイルスを介して GFP-Parkin を遺伝子導入した上で、CCCP 処理を行うと、Parkin は Mt に移行し自身に融合された GFP (擬基質) のユビキチン(Ub) 化が検出された。

3. PD 患者でみられる変異をもつ Parkin は膜電位の低下した Mt への移行能や E3 活性が減弱・欠失している

Parkin 変異体の局在変化と E3 活性を免疫染色法、Western Blot 法により解析した結果、神経細胞においても膜電位の低下した Mt への移行能や E3 活性が減弱・欠失していることが明らかになった。

4. 神経細胞において Parkin は Ub との中間体を形成し Mt 外膜蛋白質を Ub 化する

Parkin の活性中心である Cys431 を Ser に置換した変異体を作製することで、Mt 膜電位低下依存的に活性中心を介した Parkin-Ub 中間体(チオエステル結合)が神経細胞で形成されることを確認した。また、Mitofusin2 を始めとする Mt 外膜蛋白質は CCCP 依存的な Ub 化(イソペプチド結合)パターンを示した。

5. Mt の膜電位が低下すると Ub の Ser65 がリン酸化修飾される

Parkin の E3 機能の活性化には PINK1 依存的なリン酸化が必要である。しかし、リン酸化を模倣する変異だけでは Parkin は活性化せず、その完全活性化には依然として PINK1 を必要とする。そこで未知の PINK1 基質を探索した結果、Parkin と同様に Ub の Ser65 が Mt 膜電位低下依存的にリン酸化されることを LC-MS/MS 及び変異体解析により明らかにした。

6. Ub は PINK1 によってリン酸化される

単離 Mt から回収した PINK1 免疫沈降産物は Ub を *in vitro* でリン酸化したことから、Ub は PINK1 の基質であることを初めて明らかにした。

7. Mt 膜電位が低下すると内在性 Ub の約 0.05 %がリン酸化される

MS を用いた絶対定量法により、Mt の膜電位が消失すると約 0.05% の内在性 Ub がリン酸化されることが判明した。非常に微量と捉えられるかもしれないが、Ub は多面的機能をもつため PINK/Parkin 経路に費やされる量としては十分だと考えられる。

8. Ub リン酸化模倣変異体は Parkin リン酸化模倣変異体を活性化する

リン酸化 Ub が Parkin の活性化に寄与する可能性を検証した結果、Ub リン酸化模倣変異体は Parkin リン酸化模倣変異体を *in cell*、*in vitro* で活性化することが明らかとなった。また、Ub の C 末端 Gly に依存せずに両者が作用することから、イソペプチド結合が必要でなく Ub と Parkin 間で生じるアロステリックな反応により Parkin が活性化することが示唆された。Ub と Parkin との結合は、共免疫沈降では検出不能であったことから弱い相互作用をしていると考えられた為、Fluoppi assay を用いて生細胞中で Ub と Parkin の相互作用を検出した。

以上の結果から、神経細胞で PINK1 と Parkin が協調して Mt の品質を管理する役割を担うことを明らかにした。加えて、翻訳後修飾因子である Ub が PINK1 によりリン酸化され、リン酸化 Ub は Parkin の活性化に必須であることを証明した。PINK1 の自己リン酸化と Parkin の PINK1 依存的なリン酸化が Parkin の活性化に重要であることは明らかになっていたが、PINK1 と Parkin の両者を結びつける因子は不明であった。本研究により、このミッシングリンクを明らかにしリン酸化 Ub は遺伝性 PD の発症を抑えるために働くことが示唆された。

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。

以上 2000 字