

研 究 報 告 書

「ミトコンドリア恒常性維持機構の解明からパーキンソン病の本質に迫る」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研 究 者: 松田憲之

1. 研究のねらい

パーキンソン病は難治性の神経変性疾患である。対症療法としてのドパミン補充治療が効果を上げているがパーキンソン病を完治できるわけではなく、発症原因の解明と根本的な治療法の開発が望まれている。病理学や薬理学の知見から、1990 年代にはミトコンドリアの機能低下がパーキンソン病の発症に関係することが示唆されていた。しかしながら具体的な分子機構 - パーキンソン病患者で異常なミトコンドリアが蓄積する理由や、逆にパーキンソン病の発症を防止するために正常細胞で異常ミトコンドリアを除去する防御機構の詳細 - は永く不明であった。

パーキンソン病には遺伝性のもものと孤発性/非遺伝性のもものが存在する。両者の病態は完全には一致しないが、病因には共通項があると考えられる。そして遺伝性のパーキンソン病は発症原因が特定の遺伝子変異に由来するので、遺伝子の機能解析から病気の発症メカニズムに迫ることが可能だという優位点がある。DJ-1, PINK1(プロテインキナーゼ), Parkin(ユビキチン連結酵素・E3) はいずれも劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物であり、通常時に病気の発症を抑える役割を担っている。私は 2010 年から 2014 年にかけて、PINK1 や Parkin がミトコンドリアの品質管理を担っていることを示唆する予備的な実験結果を得ていた。そこで本研究助成期間に、ミトコンドリアの品質管理を切り口に DJ-1, PINK1, Parkin の分子機能をさらに解明することで、孤発性も含めたパーキンソン病の発症機構に迫ることを試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

主な研究成果として以下が挙げられる。(1) 損傷ミトコンドリアに Parkin が速やかに移行することは 2008 年には報告されていたが、その分子機構は不明であった。我々は助成期間中に、損傷ミトコンドリアに存在する Parkin 受容体の実体がリン酸化ユビキチン鎖であることを解明した(JCB 誌に発表、主な研究成果リスト1)。(2) PINK1 が正常ミトコンドリアにおいて膜電位依存的に分解される仕組みは 2013 年に解明されたが、膜電位を失っても PINK1 が細胞質に遊離せずに損傷ミトコンドリアに留まる仕組みは不明であった。我々は助成期間中に PINK1 が異常ミトコンドリアの外膜に局在化する仕組みを解明した(JCS 誌に発表、主な研究成果リスト2)。(3) 我々はリン酸化ユビキチンが Parkin 活性化因子であることを 2014 年に明らかにしたが、両者の結合様式や、活性化に至る仕組みは不明であった。助成期間中に我々は Parkin とリン酸化ユビキチンの結合領域を解明し、in silico simulation からリン酸化ユビキチンが Parkin を活性化する仕組みの仮説を提唱した(JBC 誌に発表、主な研究成果リスト3)。(4) DJ-1 はミトコンドリア機能維持に関係することが示唆されているが、その役割には諸説あり、まだコンセンサスが得られていない。助成期間中に我々は DJ-1 が解糖系の悪性副産物

であるアルデヒドの一種：メチルグリオキサル(MGO)と生体低分子化合物の反応産物(MGO-CoA や MGO-beta アラニン)を加水分解して解毒する活性を有することを明らかにした(Scientific Reports 誌に発表、主な研究成果リスト4)。

(2) 詳細

・研究テーマ(1):ミトコンドリア上の Parkin 受容体の実体解明

損傷ミトコンドリアに Parkin を移行させる“受容体”の実体解明を試みた。これまでも「Parkin 受容体を同定した」とする複数の論文が報告されていたが、いずれも実験結果との矛盾があり、私はその結論に懐疑的であった。

細胞内でユビキチンは単体(モノユビキチン)としてだけではなく、複数の分子が連なったユビキチン鎖としても存在する。リン酸化ユビキチンがリン酸化 Parkin を活性化するという我々の先行研究(Koyano ら、2014, Nature) から両者の相互作用が示唆されるが、単体のリン酸化ユビキチンと Parkin の結合は非常に弱かった。そこで、リン酸化ユビキチン鎖が Parkin と結合する可能性を検証した。

まず細胞内や試験管内でユビキチン鎖も PINK1 によってリン酸化されることを示した。次に、このリン酸化ユビキチン鎖が Parkin の局在変化に関与するかどうかを検証するために、ミトコンドリア局在シグナルとタンデムユビキチンを融合(Mt-4Ub)し、PINK1 欠損細胞内で Parkin と共発現を行なった。興味深いことに、Mt-4Ub と Parkin の両者がリン酸化模倣変異を有する時に限り、PINK1 やミトコンドリア膜電位の低下と無関係に、Parkin はミトコンドリアに局在化した。さらに試験管内でリン酸化ユビキチン鎖とリン酸化 Parkin の結合を検証したところ、両者が直接結合することが示された。より生理的なリン酸化ユビキチン鎖(K63 linkage リン酸化ユビキチン鎖)をリソソーム上に形成させた場合にも、Parkin をリソソームに局在化できることが明らかとなった。一連の結果は、リン酸化ユビキチン鎖が永らく謎であった“Parkin 受容体”であることを示している。(研究成果リスト1)

・研究テーマ(2):PINK1 が異常ミトコンドリアの外膜に局在化する仕組みを証明

PINK1 と Parkin が協調して異常なミトコンドリアを細胞内から隔離・除去するプロセスにおいて、最上流のイベントは“PINK1 が膜電位の低下した異常ミトコンドリアの外膜に局在化すること”である。その後に PINK1 が近傍の Parkin とユビキチンの両者をリン酸化し、そこで形成される「リン酸化ユビキチン(鎖)」がミトコンドリア品質管理時の鍵因子として機能する。

正常なミトコンドリアでは PINK1 は膜電位に依存して速やかに分解されており、一方で膜電位が低下すると分解を免れて PINK1 が機能するようになる。膜電位に依存して PINK1 が分解されるメカニズムは NIH の Youle らによって詳細が明らかにされた。しかしながら、分解を免れるだけでは PINK1 はマトリクス/内膜や細胞質に局在化するはずであり、異常なミトコンドリアの外膜に局在化するためには、更なる特別な仕組みを考えなければならない。

我々は PINK1 が異常ミトコンドリアに局在化する仕組みを詳細に解析して、既に提唱されていた仮説とは異なる仕組みで PINK1 が異常ミトコンドリアの外膜に局在化することを示した。まず、PINK1 の N-末端の MTS (matrix targeting sequence) の前に負電荷のアミノ酸を付加して MTS 機能を阻害すると、PINK1 が自己リン酸化されることを発見した。この条件下

で Parkin の移行と活性化(自己ユビキチン化)も誘導できることを見出した。これらの結果は、ミトコンドリアの膜電位低下と無関係に、N-末端 MTS 機能の阻害だけで PINK1 を活性化できること(MTS 機能阻害が PINK1 の活性化に必要な十分条件であること)を示している。

さらに、PINK1 の活性化と、ミトコンドリア外膜局在化に必要な領域を同定する実験から、従来提唱されていた仮想 TMD 領域(94 - 110 a.a.)は PINK1 のミトコンドリア局在に不要であり、この領域を欠いた PINK1 でも膜電位の低下したミトコンドリア外膜への局在化・自己リン酸化・Parkin の移行と活性化が可能であることを示した。

最終的に、PINK1 の MTS 機能が阻害されると、新奇の外膜局在化領域(30 - 94 a.a.)が機能することで、膜電位の低下したミトコンドリア外膜上に PINK1 が局在化することを明らかにした。(研究成果リスト2)

・研究テーマ(3): Parkin とリン酸化ユビキチンの結合領域を解明

リン酸化ユビキチンと Parkin の結合様式の解明を試みた。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、*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した。

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 α -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 α -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。

さらに、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 α -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。(研究成果リスト3)

・研究テーマ(4): DJ-1 の分子機能の解明

DJ-1 は劣性遺伝性 PD の原因遺伝子産物であり、ミトコンドリア機能維持に関与することが報告されているが、DJ-1 の分子機能は未だ謎に包まれている。

意外にも、DJ-1 は PD の原因因子であるにもかかわらず原核生物にホモログが存在し、それらはメチルグリオキサール(MGO)を含む生体内アルデヒドの解毒に関与する。また、MGO は解糖系の悪性副産物でもある。申請者はこの点に着目して研究を進め、MGO のアルデヒド

基と補酵素 A(CoA)のチオール基が反応した MGO-CoA 複合体を DJ-1 が加水分解して正常 CoA と乳酸に変換すること、複数の PD 患者由来の変異がこの活性を阻害することを発見した。Beta-アラニンに関しても同様の結果が得られた。このような“ミトコンドリア機能に必須な Beta-アラニンや CoA をアルデヒド(MGO)障害から守る防御機構の破綻”という観点からの PD の研究は今まで行なわれておらず、新たな PD 発症機構の開拓が期待される。(研究成果リスト4)

さがけ研究期間における研究成果と研究目的の達成状況

さがけ研究助成を得る際に、「DJ-1, PINK1, Parkin の機能解明を切り口にしてミトコンドリアの品質管理からパーキンソン病の発症機構に迫る」ことを目的としたが、上記のように DJ-1, PINK1, Parkin の分子機能の解明が進展したので、その意味では「当初の研究目的をある程度達成した」と考えている。

3. 今後の展開

今後の研究計画としては、1)“Parkin 変異に由来する遺伝性パーキンソン病”病態を再現するモデルマウスの確立、2) PINK1/Parkin が形成したユビキチン鎖が異常ミトコンドリアをオートファジー分解に導く分子機構の解明、3) MGO 以外のアルデヒドの解毒を介して DJ-1 がミトコンドリア品質管理過程で機能する可能性の検討、などを考えている。これらの研究を通じて、「ミトコンドリア品質管理の破綻とパーキンソン病発症の関係」を引き続き明らかにしていきたい。最終的には、ミトコンドリア品質管理の破綻がパーキンソン病の発症を引き起こす仕組みを理解することで、病気の発症メカニズムを解明するとともに、将来の新しい診断法・治療法の開発につなげていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況): 特に問題なく、研究費の執行も適正に行われている。所属研究機関において、検品(発注品の実物チェック)や予算執行状況確認などの日常的な監査もきちんと行われている。

研究目的の達成状況: DJ-1, PINK1, Parkin の機能解明を切り口にしてミトコンドリアの品質管理からパーキンソン病の発症機構に迫ることを助成申請時の目的としたが、研究成果の詳細欄に記したように、DJ-1, PINK1, Parkin の分子機能の解明が助成期間中に進展した。したがって、当初の研究目的をある程度達成したと考えている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む): PINK1, Parkin, DJ-1 はいずれも遺伝性潜性(劣性)パーキンソン病の原因遺伝子産物であるので、普段はパーキンソン病の発症を抑えている。したがって、PINK1/Parkin/DJ-1 の機能解析から得られた知見は、将来的には孤発性のものを含めたパーキンソン病の発症を抑える方法論の手がかりを与えてくれると期待される。もう少し短期的な社会への効果を考えた場合に最も現実的なシナリオは、我々の発見した PINK1 の産物(リン酸化ユビキチン)を「放置すればパーキンソン病の発症に繋がりがねないミトコンドリア損傷のマーカー」とし

て利用し、パーキンソン病の病理解析マーカーや、初期診断における分子マーカーなどとして利用することであろう。しかしながら診断マーカーとして用いるためには、「非侵襲的に脳内リン酸化ユビキチンの量をどうやって患者でモニターするか」という問題を解決する必要がある。血中エクソソームと質量分析を組み合わせた解析などが可能であるかどうか鍵になると思われる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

パーキンソン病は難治性の神経変性疾患である。対症療法としてのドパミン補充治療が効果を上げているがパーキンソン病を完治できるわけではなく、発症原因の解明と根本的な治療法の開発が望まれている。本研究課題ではミトコンドリアの品質管理を切り口に DJ-1, PINK1, Parkin の分子機能をさらに解明することで、孤発性も含めたパーキンソン病の発症機構の解明を目指し、損傷ミトコンドリアに存在する Parkin 受容体の実体がリン酸化ユビキチン鎖であること、また、PINK1 が異常ミトコンドリアの外膜に局在化する仕組みや Parkin とリン酸化ユビキチンの結合領域を解明し、in silico simulation からリン酸化ユビキチンが Parkin を活性化する仕組みの仮説を提唱している。この成果は最終的には、ミトコンドリア品質管理の破綻がパーキンソン病の発症に繋がるメカニズムを明らかにするとともに、将来の新しい診断法・治療法の開発への道を拓くことが期待される。

松田憲之研究者は本さきがけ研究の成果が認められ、「ミトコンドリアの品質管理とパーキンソン病」という分野でトップランナーの一人として注目されるようになり、国内学会の招待講演などの機会も増えており、研究者としての飛躍につながったと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Okatsu K, Koyano F, Kimura M, Kosako H, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N.
Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor.
J Cell Biol. 2015 209(1):111–28. doi: 10.1083/jcb.201410050.
2. Okatsu K, Kimura M, Oka T, Tanaka K, Matsuda N.
Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment.
J Cell Sci. 2015 128(5):964–78. doi: 10.1242/jcs.161000.
3. Yamano K, Queliconi BB, Koyano F, Saeki Y, Hirokawa T, Tanaka K, Matsuda N.
Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation.
J Biol Chem. 2015 290(42):25199–211. doi: 10.1074/jbc.M115.671446.
4. Matsuda N, Kimura M, Queliconi BB, Kojima W, Mishima M, Takagi K, Koyano F, Yamano K, Mizushima T, Ito Y, Tanaka K.
Parkinson's disease-related DJ-1 functions in thiol quality control against aldehyde attack in vitro.

Sci Rep. 2017 7(1):12816. doi: 10.1038/s41598-017-13146-0.

5. Matsuda N, Tanaka K.

Cell biology: Tagged tags engage disposal.

Nature. 2015 524(7565):294-5. doi: 10.1038/nature15199.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: 松田憲之, 小谷野史香, 尾勝圭, 呉越, 木村まゆみ, 佐伯泰.

発明の名称: パーキンソン病のバイオマーカーおよびその利用

出 願 人: 公益財団法人東京都医学総合研究所

出 願 日: 2015/2/13

出 願 番 号: 2015-545213

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

5つ程度を記載という制限から、助成期間中の主要な学会発表(6つ)を以下に記載する。全て招待講演である。

1) 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)

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 日から 23 日: 神戸国際会議場

シンポジウム招待講演(英語)

2) 第 38 回日本神経科学大会 神戸

シンポジウム S06p-2

Molecular mechanisms underlying PINK1 and Parkin catalyzed ubiquitylation:

How PINK1- and Parkin-catalyzed ubiquitylation prevents Parkinson's disease

2015 年 7/28-7/31, 神戸国際会議場

シンポジウム招待講演・英語発表

3) BMB2015

Relationship between mitochondrial quality control and Parkinson's disease

English Symposium, 2S2; 2015 年 12/1-4 神戸国際会議場

シンポジウム招待講演(英語)

4) 第 54 回日本生物物理学会年会

シンポジウム 3SFA

How mitochondrial quality control machinery resists a predisposition to Parkinson's disease

2016 年 11 月 27 日, つくば国際会議場

シンポジウム招待講演・英語発表

5) 第 39 回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜

シンポジウム 1AS16

修飾酵素と修飾因子のヒエラルキーを逆転させるリン酸化

2016 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜

シンポジウム招待講演・日本語発表

6) 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017: 第 40 回日本分子生物学会年会・

第 90 回日本生化学会大会 合同大会)

1PW15 損傷ミトコンドリアシグナリングとパーキンソン病

2017 年 12 月 6 日(水) 神戸国際会議場

ワークショップ招待講演・日本語発表