

# パーキンソン病原因遺伝子産物がミトコンドリアの機能を維持する分子メカニズムの研究

順天堂大学大学院 医学研究科  
神経変性疾患病態治療探索講座  
今居 譲

## 1. はじめに

パーキンソン病は中脳黒質ドーパミン神経が選択的に変性欠落することにより発症するが、その神経変性メカニズムに関しては未解明のままである。現在までに幾つかの遺伝性パーキンソン病原因遺伝子が同定されている。そのうち若年性パーキンソン病原因遺伝子 *PINK1* と *parkin* が、活動状態が低下したミトコンドリアを選択的に除去する「ミトコンドリアの品質管理機構」で働くことを、我々を含む三研究室がショウジョウバエ遺伝学にて示した(1-3)。*parkin* 遺伝子産物 Parkin はユビキチンリガーゼであり(4)、遺伝学的にミトコンドリア局在キナーゼ *PINK1* のシグナルの下位に位置する。すなわち *PINK1*-Parkin 経路がミトコンドリアの機能を維持することにより、神経細胞の生存性が支えられると考えられる(図1)。本研究では、*PINK1* と Parkin がミトコンドリアの機能を制御する分子メカニズム、およびその破綻がドーパミン神経変性を導く病理メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。細胞生物学的解析により、*PINK1* と Parkin は、機能が低下したミトコンドリアをオートファジーによって除去する現象マイトファジーに関与することが報告された(5-9)。細胞質に局在する *PINK1* は、機能低下したミトコンドリアに集積し、そのキナーゼ活性に依存して Parkin をリクルートすることが示されている。しかし我々は *PINK1* が直接 Parkin をリン酸化しないことを観察しており、*PINK1* と Parkin の間を介する分子の存在を想定した。そこで *PINK1* 結合分子の網羅的な同定作業と、試験管内再構成系とショウジョウバエ分子遺伝学とを組み合わせたスクリーニングから、*PINK1*-Parkin 経路の間を介する分子を同定し、*PINK1*-Parkin 経路の異常に起因する病理メカニズムを明らかにすることを試みた。

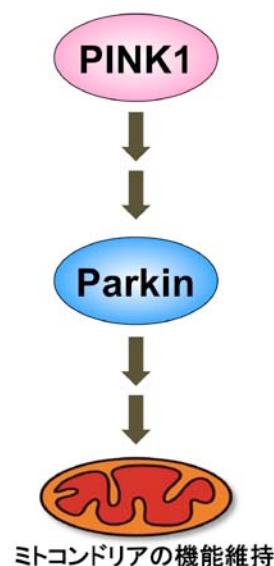


図1. *PINK1*-Parkin シグナル

## 2. 方法

### *PINK1* 結合タンパク質の精製と同定

FLAGタグを付加した *PINK1* タンパク質を発現誘導できる哺乳類培養細胞を作製し、大量浮遊培養を行った。その後、その細胞ライゼートより *PINK1* およびその結合タンパク質を抗FLAG抗体カラムにて精製した。*PINK1* 精製画分に特異的なタンパク質群を分取、質量分析解析により同定した。その結果、約50種の特異的タンパク質が同定された。得られたタンパク質をコードする遺伝子に対して、ショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングを行った。

### *PINK1* 結合タンパク質に対する遺伝学的スクリーニング

ミトコンドリアの機能を制御する *PINK1*-Parkin シグナルは、ショウジョウバエにおいても保存されていると考えられるため、その調節分子もショウジョウバエで保存されている可能性が高いと予想された。そこで、約50種のタンパク質のうちショウジョウバエにおいても保存されている分子を選択し、その遺伝子に変異のあるショウジョウバエ、あるいは遺伝子のノックダウンショウジョウバエを使用し、*PINK1* 変異ショウジョウバエ (*PINK1* ノックダウンおよびノックアウトショウジョウバエ) と掛け合わせを行った。

*PINK1* 変異ショウジョウバエは、羽の姿勢を制御する筋肉ミトコンドリアが変性することから、羽の下垂という可視化表現型を示す(図2)。*PINK1* 結合タンパク質をコードする遺伝子のうち、この表現型を修飾する(抑制あるいは増強する)遺伝子をスクリーニングした。

### 3. 結果 研究成果

スクリーニングの結果、ホスホグリセリン酸ムターゼ5 (*PGAM5*) という遺伝子を単離することに成功した。すなわち *PGAM5* 遺伝子を喪失すると *PINK1* 変異ショウジョウバエの羽の表現型が完全に抑制できることを見いだした。

#### ミトコンドリアタンパク質 *PGAM5*

遺伝子産物 *PGAM5* と *PINK1* の結合は、ヒト細胞およびショウジョウバエ細胞において免疫沈降法にて確認ができた。ホスホグリセリン酸ムターゼファミリーに属する *PGAM5* はミトコンドリアに局在するが、ムターゼ活性に重要なアミノ酸残基が保存されておらず、またその酵素活性もないことが報告されていることから、その機能に関しては不明な点が多い。一方、*PGAM5* がホスファターゼ活性をもつことが最近報告されている(10)。

我々は、まずキナーゼである *PINK1* が *PGAM5* をリン酸化する可能性、および *PGAM5* が *PINK1* を脱リン酸化する可能性を、*in vitro* キナーゼアッセイと phospho-tag ウェスタンブロットで検討した。その結果、いずれの可能性も見いだせなかった。

#### *PGAM5* と *PINK1* の遺伝的相互作用

次に *PGAM5* が *PINK1* 変異ショウジョウバエに及ぼす影響を詳細に検討した。ショウジョウバエは、*PINK1* 遺伝子の喪失により筋肉のミトコンドリアの変性の他に、加齢に伴うドーパミン神経の変性、運動機能の低下、寿命の短縮などが見られる。*PGAM5* 遺伝子を *PINK1* 変異ショウジョウバエから除くことにこれらの表現型の改善が認められた。一方、*PGAM5* を過剰に発現すると *PINK1* の表現型は増悪した。以上の結果から、遺伝学的に *PGAM5* は *PINK1* の下位であることが示唆された。

#### *PGAM5* と *parkin* の遺伝的相互作用

遺伝学的に *parkin* は *PINK1* の下位に位置することが示唆されている。そこで、我々は *PGAM5* と *parkin* の遺伝学的な位置関係を解析した。*parkin* 変異ショウジョウバエは、*PINK1* 変異ショウジョウバエで観察される表現型と類似した表現型を示す。すなわち筋肉のミトコンドリアの変性、運動機能の低下、寿命の短縮などが見られる。*PGAM5* 遺伝子を除去することにより、これらの表現型への影響を検討した結果、いずれにおいても改善が認められなかった。一方、*PGAM5* を過剰に発現すると *parkin* の表現型は増悪した。以上の結果より、*PGAM5* は、*parkin* の上位遺伝子であるか、あるいは *PINK1* の下流でかつ別の支流で働く遺伝子であることが示唆された(図3)(11)。

### 4. 考察 まとめ

#### *PGAM5* の役割と今後の展望

パーキンソン病関連遺伝子産物 *PINK1* 結合分子の生化学的な同定とショウジョウバエ遺伝学を組み合わせる新しい研究アプローチにより、遺伝性若年性パーキンソン病に関与すると考えられる新規遺伝子 *PGAM5* を同定することに成功した。

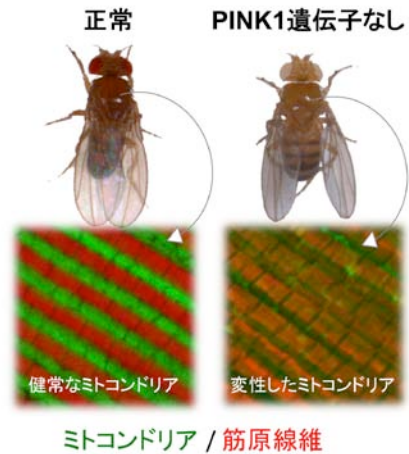


図2. *PINK1* 変異ショウジョウバエの可視化表現型

ショウジョウバエにおいて *PINK1* 遺伝子の機能が失われると、羽を制御する筋肉のミトコンドリアの変性(下)が起こり、羽が下垂する(上)。Parkin 遺伝子のノックアウトショウジョウバエも同じ表現型を示す。

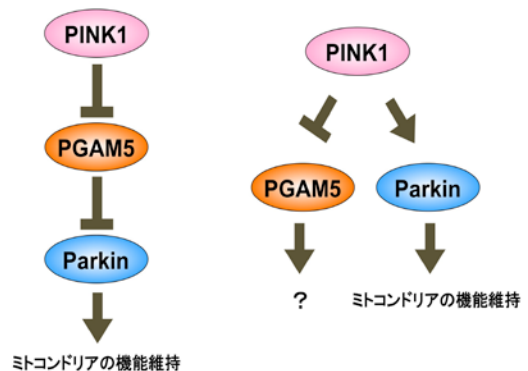


図3. 遺伝学的解析から考えられる *PGAM5* の役割(作業仮説)。

左、 *PINK1* 遺伝子と Parkin 遺伝子の間に位置し、Parkin の活性を抑制する。  
右、 *PINK1* 遺伝子の下流に位置し、Parkin とは独立に働く。*PGAM5* はミトコンドリアの機能を調節していると考えられるが、その詳細の解明は今後の課題である。

ショウジョウバエを用いた詳細な遺伝学的解析において PGAM5 の機能を抑制することにより、PINK1 変異に起因するミトコンドリアの変性およびそれに付随する表現型（筋肉、ドーパミン神経の変性、寿命・運動機能の低下）が改善することが明らかになった。この結果は、PGAM5 が PINK1 シグナルの下流にあるということを示唆している。しかし分子レベルの解析において PGAM5 は PINK1 のリン酸化基質にならないことから、PINK1 と Parkin の間にはさらに未同定の分子が存在することが示唆され、未同定の分子の同定および PGAM5 を含めた PINK1-Parkin シグナル伝達の詳細を明らかにするために、さらなる解析を継続する予定である。

#### 謝辞および付記

本研究は、東北大学加齢医学研究所の金尾智子博士研究員、京都大学高橋良輔教授のグループ、東京大学一条秀憲教授、武田弘資准教授らのグループ、スタンフォード大学 Lu 准教授および慶應義塾大学森脇康博助教との共同研究として行われました。また、研究の遂行に多大な援助を頂きましたアステラス病態代謝研究会関係者の皆様に感謝申し上げます。本研究の成果は、2010 年 12 月 2 日に米国のオンライン科学誌「*PLoS Genetics*」に掲載され、NHK 仙台放送、日本経済新聞、河北新報などにニュースとして取り上げられました。

#### 5. 発表論文、参考文献

- 1 Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H. and Lu, B. (2006) Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10793-10798.
- 2 Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A. and Guo, M. (2006) *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, **441**, 1162-1166.
- 3 Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M. *et al.* (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, **441**, 1157-1161.
- 4 Imai, Y., Soda, M. and Takahashi, R. (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 35661-35664.
- 5 Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F. and Youle, R.J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, **183**, 795-803.
- 6 Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R. and Youle, R.J. (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*, **8**, e1000298.
- 7 Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S. *et al.* (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 378-383.
- 8 Geisler, S., Holmstrom, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J. and Springer, W. (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*, **12**, 119-131.
- 9 Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F. *et al.* (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol*, **189**, 211-221.
- 10 Takeda, K., Komuro, Y., Hayakawa, T., Oguchi, H., Ishida, Y., Murakami, S., Noguchi, T., Kinoshita, H., Sekine, Y., Iemura, S. *et al.* (2009) Mitochondrial phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 12301-12305.
- 11 Imai, Y., Kanao, T., Sawada, T., Kobayashi, Y., Moriwaki, Y., Ishida, Y., Takeda, K., Ichijo, H., Lu, B. and Takahashi, R. (2010) The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. *PLoS Genet*, **6**, e1001229.