

パーキンの網羅的基質同定によるパーキンソン病の解明

北海道大学大学院 医学研究科 生化学講座 医化学分野
渡部 昌

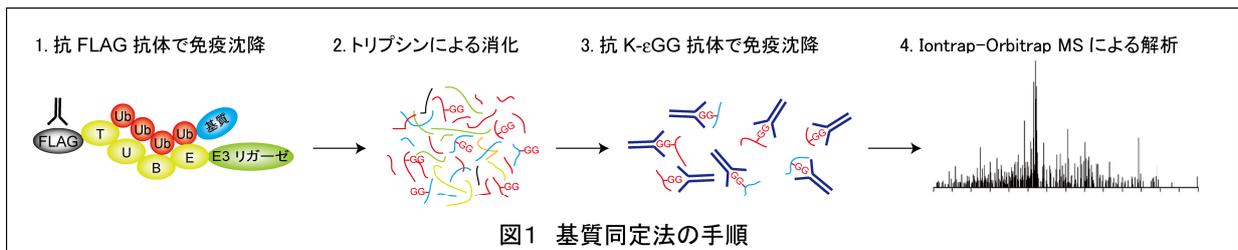
1. はじめに

パーキンソン病はドーパミンを産生する黒質の神経細胞が変性・脱落することによって、線条体でのドーパミンが低下することで静止時振戦、筋強剛、動作緩慢、姿勢反射障害等の臨床症状を呈する神経変性疾患である。近年の研究の進展により、家族性パーキンソン病である常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム(AR-JP)は不良ミトコンドリア除去の不全による病であることが明らかとなりつつある。ユビキチンリガーゼParkinはリン酸化酵素PINK1と共に家族性パーキンソン病であるAR-JPの原因遺伝子として同定され、Parkinのユビキチン化活性は不良ミトコンドリア除去に必須である。ミトコンドリアが機能不全に陥ると、PINK1がこれを感じ、ユビキチンとParkinをリン酸化することで、Parkinをミトコンドリアに局在化させて活性化する。活性化したParkinは異常ミトコンドリア上で基質をユビキチン化し、ミトコンドリアオートファジー（マイトファジー）経路による分解除去へと導く。ParkinはRING-IBR-RINGドメインを有するユビキチンリガーゼ(E3)であり、AR-JP患者で変異しているParkinはE3活性を消失している。そのため、Parkin標的タンパク質のユビキチン化の消失が疾患の発症原因となっていることが示唆され、Parkinの基質を同定することがパーキンソン病の病態解明に重要と考えられている。

ユビキチン化修飾はユビキチンリガーゼ(E3)が選択的に基質を認識することによって起こる反応であり、さまざまな生命現象を制御する。ユビキチンリガーゼ(E3)による選択的な基質認識の重要性が明らかとなって以来、申請者を含め、多くの研究者がさまざまな方法でE3の基質を同定してきた[eLIFE 4 (2015); J Biochem(in press)]. 遺伝学的な情報から同定した例や、レポーターアッセイを指標としたスクリーニング法などが存在したが、過去最も多く試みられた方法は、E3と基質の結合力を利用した方法である。しかし、E3との結合力の強い分子はユビキチン化を受けない例が多いことや偽陽性が多いことなどのため、実験上の問題が存在した。近年では基質の半減期を指標とする方法などが報告されているが、プロテアソーム輸送シグナル以外のユビキチン化を受ける基質は同定できない問題点がある。以上のようにさまざまなアプローチでE3の基質の同定が試みられているが、基質を網羅的かつ特異性高く同定する手法は未だ標準化されていないのが現状である。また特にParkinの基質探索については、マイトファジー誘導下でユビキチン化タンパク質を同定した報告は存在するが、他のE3によるユビキチン化と区別することができず、Parkinの本来の基質の全貌解明には未だ至っていない。そこで本研究提案では、ユビキチンリガーゼの基質とそのユビキチン化部位を定量的・網羅的に同定する手法を確立し、Parkinに適用することで、パーキンソン病の解明を目指した。

2. 方法

本研究で用いる基質同定法は、①プローブを作製し細胞に安定に導入後、プローブが捕獲するユビキチンリガーゼの基質を抗FLAG抗体で免疫沈降、②トリプシンによって消化し、③ユビキチンレムナント抗体(K-εGG抗体)によってユビキチン化を受けたペプチドのみを再精製、④Iontrap-Orbitrap型質量分析

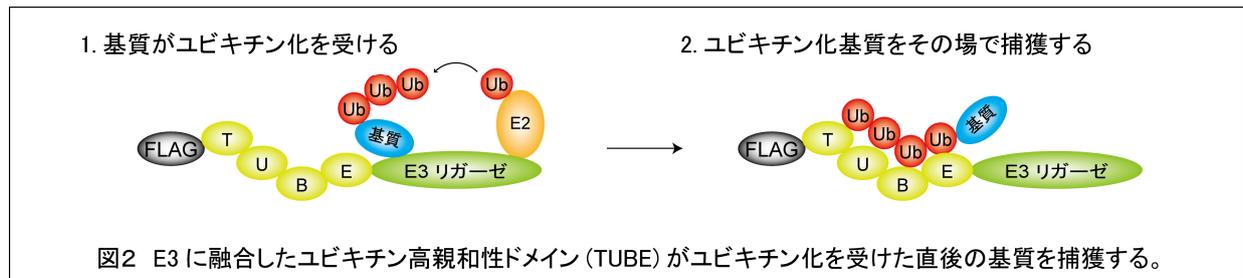


器にて検出、という手順からなる（図1参照）。

本手法はFLAGタグ、ユビキチン高親和性人工タンパク質(TUBE)、および解析したい任意のE3タンパク質の3つのドメインを融合したプローブを用いることに特徴があり、「細胞内で」E3がユビキチン化した直後の基質を「その場で」捕獲し、かつ「ユビキチン化ペプチドのみ」を精製し網羅的に検出することが期待できる（図2参照）。ユビキチン化を受けたペプチドのみを再精製するため、ユビキチン化部位の同定も同時に可能となる。E3が細胞内で実際に司る酵素反応を検出するため、偽陽性が少なく特

異性が高い状態で、生理的な基質を定量的に同定することが期待できる。

(1) 基質同定法の改良



予備実験としてE3の1つであるTRIM23を用いて行ったところ、特異的なペプチドが同定可能なことが判明していたが、さらなる改良が必要であると思われたため、いくつかの条件検討を行った。まず、E3の1種であるTRIM24、TRIM28、TRIM33を用いて、E3とFLAG-TUBEの融合の有無で同定される基質候補数の変動を検討した。また、FLAG-TUBE-TRIM28融合プローブ、FLAG-TUBE-RNF10融合プローブ、FLAG-TUBE-TRIM9融合プローブ、を用いて、プローブのHEK293T細胞内での一過性発現と安定発現による変動も検討を行った。

(2) 基質同定法のParkinへの適用

マウスParkin遺伝子をFLAG-TUBEのアミノ末端、カルボキシル末端それぞれに融合する形でレトロウイルスベクターへ組み込み、プローブを作製した。各プローブのレトロウイルスを作製し、HeLaS3細胞に感染させプローブ安定発現細胞を作製した。ParkinのE3活性は、損傷ミトコンドリア非存在下では不活性化状態で存在することが知られているため、作製した細胞をミトコンドリア膜電位低下誘発剤CCCP投与によりParkinを活性化した。回収した細胞の溶解液を調製し、抗FLAG抗体によって免疫沈降を行い、ビーズに結合した状態でトリプシンによる消化を行った。得られたペプチドを脱塩・濃縮後、ユビキチンレムナント抗体(K-εGG抗体)によって再度免疫沈降を行い、ユビキチン化を受けたペプチドのみを再精製し、再度脱塩・濃縮を行った。得られたペプチドは、nanoLC-Iontrap-Orbitrap型質量分析器 (Orbitrap Elite, Thermofisher scientific社) を用いてデータを取得し、Sequest HT(Thermofisher scientific社) を用いて同定を行った。

(3) Ubiquitin化アッセイによるParkin基質候補の妥当性評価

同定された基質候補遺伝子をFLAGタグと融合する形でレトロウイルスベクターへ組み込み、レトロウイルスを用いてHCT116細胞に感染させ基質候補遺伝子(FAF2, MARC2)安定発現細胞を作製した。安定発現細胞をsiRNAを用いてParkin遺伝子をノックダウンし、48時間後CCCP処理を行い細胞を回収した。相互作用分子のユビキチン化を排除し、基質候補分子のユビキチン化のみを検出するため、回収した細胞の溶解液を1%SDS存在下で調製し、90°Cで10分間処理することで溶解タンパク質を変性後、10倍希釈しSDS濃度を下げ、抗FLAG抗体によって免疫沈降を行い、抗ユビキチン化抗体を用いたウェスタンブロット法によりParkinノックダウンの有無による候補分子のユビキチン化量の変化を評価した。

3. 結果

(1) 基質同定法の改良

TRIM24、TRIM28、TRIM33とTUBEを融合させずに共発現させた場合と、融合させたプローブを用いた場合を比較したところ、融合させずに共発現させた場合はTRIM24が5種類の候補分子を得た一方で、TRIM28、TRIM33については基質候補分子の同定に至らなかった。一方融合プローブを用いたところ、TRIM24は6種、TRIM28は13種、TRIM33は15種の基質候補分子を得た。

また、FLAG-TUBE-TRIM28融合プローブをHEK293T細胞に一過性に発現させた場合は13種の、安定発現株を作製して用いた場合は49種の基質候補分子を得た。FLAG-TUBE-RNF10融合プローブをHEK293T細胞に一過性に発現させた場合は1種の、安定発現株を作製して用いた場合は5種の基質候補分子を得た。FLAG-TUBE-TRIM9融合プローブをHEK293T細胞に一過性に発現させた場合は候補分子の同定には至らず、安定発現株を作製して用いた場合は7種の基質候補分子を得た。

以上より、プローブはE3とFLAG-TUBEを融合させ、細胞内に安定に発現を誘導することが望ましいものと思われた。

(2) 基質同定法のParkinへの適用

FLAG-TUBEのアミノ末端にParkinを融合させたプローブで、CCCP依存性に増加する49の基質候補分子を同定した。この内訳は、ミトコンドリア外膜タンパク質が25種類、ミトコンドリア内膜タンパク質が8種類とその多くを占め、細胞質、核、ER/細胞膜に局在するタンパク質がそれぞれ8種類、2種類、6種類であった。過去に基質として報告されているTOMM70A、MFN1、MFN2、VDAC1、VDAC2、VDAC3、FIS1、そしてMCL1も同定できている。一方FLAG-TUBEのカルボキシル末端にParkinを融合させたプローブで同定することのできた基質候補は10種類に留まった。

(3) Ubiquitin化アッセイによるParkin基質候補の妥当性評価

Parkinノックダウンによって、基質候補分子(FAF2, MARC2)のユビキチン化量が減少することが確認できた。

4. まとめ

本研究により、ユビキチンリガーゼ基質同定法の改良を行いParkinに適用することで、マイトファジーへの関与が想定されるミトコンドリア外膜タンパク質を中心に、基質候補分子を49種類同定した。このうち少なくとも8種類は過去に報告されているParkinの基質であり本手法の有効性を確認することができた。またFLAG-TUBEのアミノ末端にParkinを融合させたプローブで数多くの候補分子を同定することができた一方で、FLAG-TUBEのカルボキシル末端にParkinを融合させたプローブでは限られたものとなった。実はParkinのE3活性はタグの融合部位によって低下することが経験的に知られており、今回の結果はこれを反映するものとなった。この結果を踏まえると、本基質同定法を他のE3に適用する場合、融合部位についてはそれぞれ検討することが必要であると思われる。

本研究では現時点で2種類の候補分子が基質であることを確認している。今後、候補分子の評価をさらに進め、Parkinの新規基質を同定したい。基質候補分子はミトコンドリア上のタンパク質に限らず、細胞質やER、細胞膜などに局在する分子も同定されているため、これらの分子がParkinの新たな機能や病態へ重要な役割を果たしている可能性がある。解析を詳細に行い、パーキンソン病の病態解明へ結びつけていきたい。

5. 発表論文、参考文献

- 1), [Watanabe M](#), Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, Hatakeyama S: The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR γ . *eLIFE*, 4, e05615, 2015
- 2), [Watanabe M](#) and Hatakeyama S: TRIM proteins and diseases. *J. Biochem.*, *in press*.