

**村田 等**

Hitoshi Murata



## 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学

Department of Cell Biology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

## プロフィール

昭和55年生まれ

平成15年3月 岡山大学工学部生物機能工学科卒業

平成20年3月 岡山大学大学院自然科学研究科修了

平成20年4月 岡山大学医学部 客員研究員

平成20年5月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 特任助教

平成22年1月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 助教

現在に至る

## 受賞対象論文

Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH: SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 on depolarized mitochondria. *Mol Biol Cell* (2013) 24, 2772-2784.

## 研究の背景と経緯

パーキンソン病は中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの変性・脱落を主体とする神経変性疾患である。主な症状として安静時振戦，筋固縮，無動，姿勢反射障害などが挙げられる。有病率は人口10万人あたり100～150人と推定されており，我が国でも高齢化に伴い有病率が増加している。多くの場合，パーキンソン病は孤発性であるが，約5%程度は遺伝子変異を伴う家族性パーキンソン病であることが報告されている。孤発性と家族性パーキンソン病の臨床症状がよく似ていることから，家族性パーキンソン病でみられる特定遺伝子の変異による疾患発症機序を解明することによって，家族性のみならず孤発性パーキンソン病の予防・治療にもつながると考えられている。これまでにα-synuclein, UCH-L1, DJ-1, HTRA2, LRRK2, Parkin, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) などがパーキンソン病原因遺伝子として報告されている。

PINK1は40歳以下で発症する若年性パーキンソン病の原因遺伝子であり，主にミトコンドリアに局在するリン酸化酵素をコードしている。PINK1の細胞内での機能を明らかにすることは，パーキンソン病の発症メカニズムを理解するうえで重要である。最近，PINK1が他のパーキンソン病原因遺伝子産物であるParkinと協調して働き，細胞の自食作用オートファジ

ーの一種であるマイトファジーによって損傷を受けたミトコンドリアの除去に関与することが報告された<sup>1)</sup>。この過程において損傷ミトコンドリア上でPINK1が安定化することがマイトファジーの誘導に必要であるが，どのような機構でPINK1が安定化するのはわかっていなかった。本研究ではPINK1と相互作用するタンパク質の探索から，PINK1のミトコンドリア上での安定化機構及びマイトファジー誘導への関与について解析を行った。

## 研究成果の内容

## 1. PINK1の新規結合タンパク質 SARM1の同定

我々は免疫沈降法と質量分析計による解析を用いて，内在性PINK1と相互作用するタンパク質の解析を行い，sterile alpha and TIR motif containing 1 (SARM1)を同定した。SARM1は724アミノ酸からなるタンパク質で，免疫応答に関わる toll-like receptor と相互作用する TIR ドメインをもつアダプタータンパク質の1つである。SARM1は他にもタンパク質相互作用に関わる ARM ドメイン，SAM ドメインなどを有している。これまでの報告でSARM1は脳において特に発現が高いことが報告されているが，詳細な分子機構は不明であった。SARM1の配列解析及び免疫染色によってSARM1は1-106アミノ酸中にミトコンドリ

ア局在配列を有し、主にミトコンドリアに局在することが判明した。更にこのN末端側の領域にPINK1との結合サイトとユビキチンリガーゼである TRAF6との結合サイトを有していることを新たに発見した。実際、SARM1はPINK1, TRAF6と細胞内で複合体を形成しており、SARM1がミトコンドリア上でのPINK1とTRAF6の結合を媒介していることが示唆された。

## 2. ミトコンドリア膜電位低下時に SARM1, TRAF6 は PINK1 の Lys63鎖型のユビキチン化を促進する

TRAF6は76個のアミノ酸からなるユビキチンを数珠状につなげ、基質タンパク質に付加するユビキチンリガーゼである。このことから上記タンパク質複合体内 (SARM1/PINK1/TRAF6) の TRAF6がPINK1をユビキチン化するのではないかと考え、実験を行った。*in vitro* のユビキチン化反応及び細胞を用いたユビキチン化解析により、TRAF6がPINK1のユビキチン化を促進すること、SARM1がそのユビキチン化反応を増強する働きをもつことがわかった。更にこのユビキチン化に伴い、PINK1の細胞内でのタンパク質量が増加する傾向にあった。ユビキチン反応はユビキチン内の特定のリジン残基 (Lys6, Lys11, Lys27, Lys48, Lys63) もしくはメチオニン残基 (Met1) を介して行われるが、その反応部位の違いによってユビキチン鎖の構造が異なり、基質タンパク質の制御様式が変化することが知られている。代表的な例として、Lys48を介したポリユビキチン鎖は基質タンパク質のプロテアソームによる分解シグナルとなる。一方でLys63を介したポリユビキチン鎖はタンパク質結合ドメインとして働き、細胞内シグナル伝達などに関与する。TRAF6によってPINK1に付加されたポリユビキチン鎖の種類を特定するために、ユビキチンの各リジンをアルギニンに置換したユビキチン変異体を用いた解析を行った。TRAF6によってPINK1に付加されたポリユビキチン鎖はLys63鎖型であり、このユビキチン化によってPINK1の安定性が増し、PINK1を介した細胞内シグナルが増強されることが考えられた。家族性パーキンソン病において報告されているPINK1変異体G309DとW437XやPINK1のキナーゼ活性を消失させた変異体ではSARM1, TRAF6との結合及びユビキチン化が野生型PINK1と比較して減少していた。これらの結果からSARM1, TRAF6を介したPINK1のLys63鎖型のユビキチン化がPINK1の細胞内での安定性に関与し、PINK1のユビキチン化反応の減少がパーキンソン

病の発症や進展に何らかの関わりがあることが示唆された。

次に細胞がどのような環境におかれた時にPINK1がユビキチン化されるのかを検討した。これまでの研究において、ミトコンドリアの膜電位が低下した時にPINK1がミトコンドリアで安定化することが報告されていた<sup>2)</sup>。この膜電位低下時のPINK1の安定化にTRAF6を介したユビキチン化が寄与しているのではないかと考え、実験を行った。PINK1を強制発現した細胞にミトコンドリアの膜電位を低下させる試薬 carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) を添加し、PINK1の発現及びユビキチン化を解析した。ミトコンドリアの膜電位低下によってPINK1の安定化及びユビキチン化が有意に促進された。この際、ユビキチン化触媒部位を除いたドミナントネガティブ TRAF6変異体を共発現させると、膜電位低下時に起こるPINK1の安定化とユビキチン化が阻害された。同様にsiRNAを用いてTRAF6の発現を抑制すると、膜電位低下時のPINK1の安定化が阻害された。次に他のストレスで刺激した場合のPINK1の安定化及びユビキチン化について検討した。ミトコンドリア complex I の阻害、活性酸素種、ミトコンドリアDNAの傷害などを誘導する試薬を用いて検討したが、ミトコンドリア膜電位低下以外の環境下ではPINK1の安定化とユビキチン化は観察されなかった。これらの結果から、SARM1とTRAF6はミトコンドリアの膜電位低下時にPINK1のLys63鎖型のユビキチン化を促進し、PINK1の安定化に働くと考えられた。

## 3. PINK1のユビキチン化はマイトファジーを促進する

ミトコンドリアの膜電位が低下しPINK1が損傷ミトコンドリア上で蓄積すると、パーキンソン病原因遺伝子産物であるParkinがミトコンドリアに集まり、損傷ミトコンドリアの分解 (マイトファジー) を誘導することが知られている。そこでこの過程におけるPINK1のユビキチン化の関与について解析を行った。強制発現系を用いた解析により、SARM1及びTRAF6の共発現によってParkinのミトコンドリアへの移行が増強されることがわかった。ユビキチン化触媒部位を除いたドミナントネガティブ TRAF6変異体の共発現ではParkinの移行は促進されず、その後起こるマイトファジーも阻害され、分解される損傷ミトコンドリアの量が減っていた。またsiRNAを用いた

SARM1, TRAF6の発現抑制によってParkinのミトコンドリア移行は有意に減少した。これらの結果から、SARM1, TRAF6によって誘導されるPINK1のユビキチン化が損傷ミトコンドリアへのParkinの移行及びマイトファジー誘導に必要であることが判明し、今回の論文発表に至った。

## 研究成果の意義

パーキンソン病は神経変性疾患の中でアルツハイマー病に次いで罹患率の高い病気である。現在の治療はドーパミンの前駆体物質L-ドーパの補充療法など対症療法が主であり、根本的な治療法は確立されていない。そのため、どのような機構でパーキンソン病が発症・進展するのかを解明することは治療法開発のためにも非常に重要である。パーキンソン病のはっきりとした病因は現在のところ不明であるが、以前からミトコンドリアの障害が疾患発症につながるという説が有力な仮説の1つとして提唱されていた。2008年、Narendra等は膜電位の低下したミトコンドリア上にパーキンソン病原因遺伝子産物であるParkinが集積することを発見した<sup>3)</sup>。このParkinの集積は損傷をう

けたミトコンドリアの分解マイトファジーの誘導に必要であり、家族性パーキンソン病に関わる遺伝子変異をもつParkinではマイトファジーの誘導が阻害されていた。その後、この現象は複数のグループで確認され、損傷をうけたミトコンドリアが分解されずに神経細胞内に蓄積することがパーキンソン病発症の大きな要因となるという考えが広く受け入れられるようになった。更にParkinの上流分子としてPINK1が機能し、損傷ミトコンドリア上でPINK1が蓄積し、損傷ミトコンドリアの分解センサーとして働くことが報告された。しかしどのようなメカニズムでPINK1が損傷ミトコンドリア上に蓄積するのかはわかっていなかった。

今回の研究成果によって、これまで謎であったPINK1の損傷ミトコンドリア上での安定化機構が明らかになった。PINK1は健全な状態のミトコンドリアにおいてはミトコンドリア内膜まで輸送され、その後分解されてタンパク質量が低いレベルに保たれている。一方でミトコンドリアの膜電位低下が起こると、PINK1はミトコンドリア外膜に輸送されSARM1, TRAF6と複合体を形成し、ミトコンドリア上に蓄積していくことがわかった(図)。今回の発見によって損傷をうけたミトコンドリアが細胞内から除かれる際の分

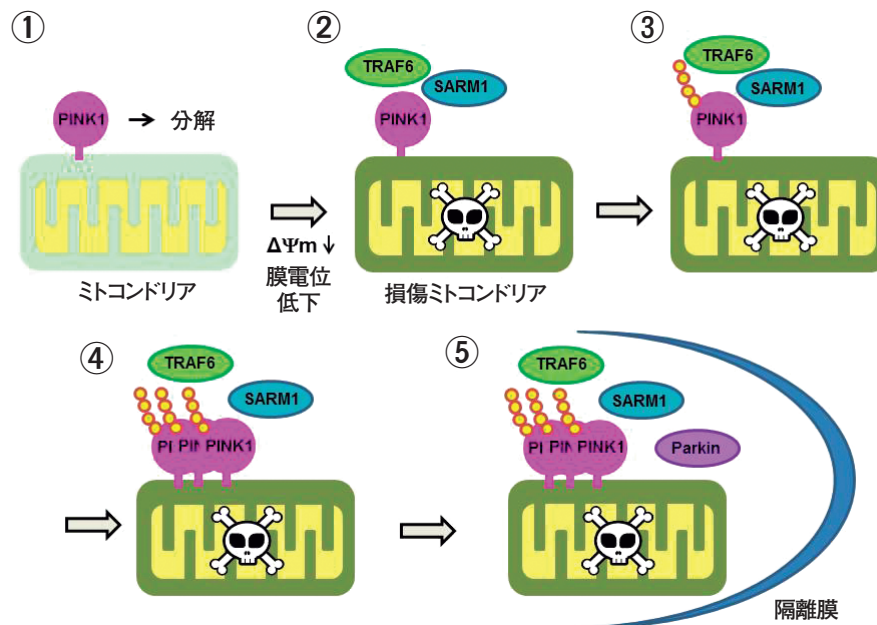


図 PINK1の損傷ミトコンドリア上での安定化機構とマイトファジー誘導

① PINK1は健全ミトコンドリアにおいて速やかに分解され、タンパク質量が低い状態に保たれている。②様々なストレスによりミトコンドリアの膜電位が低下するとPINK1がミトコンドリア上でSARM1, TRAF6と複合体を形成する。③ SARM1, TRAF6によってPINK1はLys63鎖型のユビキチン化修飾をうける。④ユビキチン化によってPINK1は損傷ミトコンドリア上で安定化し、蓄積する。⑤蓄積したPINK1を認識しParkinがミトコンドリアに集積する。その後隔離膜が形成され、マイトファジーによって損傷ミトコンドリアが細胞内から除去される。

子メカニズムの詳細が明らかになったと考えられる。

## 今後の展開

今回の研究によってPINK1の結合タンパク質としてSARM1, TRAF6を新規に同定した。家族性及び孤発性パーキンソン病においてこれまでに複数のPINK1遺伝子の変異が報告されており、PINK1の機能低下が損傷ミトコンドリアの分解不全やストレスへの脆弱性につながり、病態の進展に関わることがわかってきている。一方でSARM1, TRAF6の神経細胞内での役割やパーキンソン病との関わりはほとんど明らかとなっていない。特にSARM1に関してはタンパク質の機能もあまりわかっていない状況であったが、今回の研究によってSARM1の機能の一端が明らかとなった。最近、SARM1の発現が特に神経系において高く、末梢神経線維の切断によって生じるワーラー変性に関わることも報告された<sup>4)</sup>。これらのことからSARM1の機能について更に解析を行い、中枢神経系における役割や、パーキンソン病の発症・進展への関与について更に解明していきたいと考えている。今後PINK1やSARM1などミトコンドリアタンパク質の働きに焦点を当て、ミトコンドリアの恒常性とパーキンソン病との関連に着目し、新しい治療戦略の確立に貢献できる

よう研究を続けていきたい。

## 文 献

- 1) Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ : PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* (2010) 8, e1000298.
- 2) Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, et al. : PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* (2010) 189, 211-221.
- 3) Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ : Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* (2008) 183, 795-803.
- 4) Osterloh JM, Yang J, Rooney TM, Fox AN, Adalbert R, Powell EH, Sheehan AE, Avery MA, Hackett R, Logan MA, MacDonald JM, Ziegenfuss JS, et al. : dSarm/ Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science* (2012) 337, 481-484.

---

平成26年5月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7397 FAX：086-235-7400

E-mail：murata@md.okayama-u.ac.jp