

要 旨

パーキンソン病(PD)は中脳のドパミンニューロンが変性・脱落することを主因とする神経変性疾患であり、遺伝性と孤発性に大別できる。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 PD 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。PD の発症原因については諸説あるが、1990 年代には PD 患者においてミトコンドリアの電子伝達系の活性が低下していることや、電子伝達系を障害する薬剤がヒトやモデル動物に PD 様の症状を引き起こすことが報告されており、病理学・薬理学の知見から「ミトコンドリアの機能低下が PD の発症に関係する」ことが示唆されていた。しかしながら、ミトコンドリアと PD を結びつける分子の実体は永らく不明であった。

遺伝性 PD と孤発性 PD の病態は完全に一致するわけではないが、類似点も多いことからその病因には共通項があると考えられる。PINK1 と Parkin は遺伝性劣性(潜性)PD の原因遺伝子産物であり、両者は通常時に PD の発症を抑える役割を担っている。PINK1 はプロテインキナーゼ、Parkin は基質にユビキチンを付加するユビキチン連結酵素(E3)である。PARKIN は 1998 年に順天堂大学と慶応大学の共同研究グループによって、常染色体劣性(潜性)若年性 PD の原因遺伝子としてクローニングされ(1)、2000 年には Parkin が E3 活性を有するという最初の報告が順天堂大学と東京都臨床医学総合研究所(現：東京都医学総合研究所)の共同研究グループ(2)や理化学研究所の研究グループによって行なわれた。このように、Parkin 研究の黎明期に日本の研究者が果たしてきた貢献は非常に大きい。

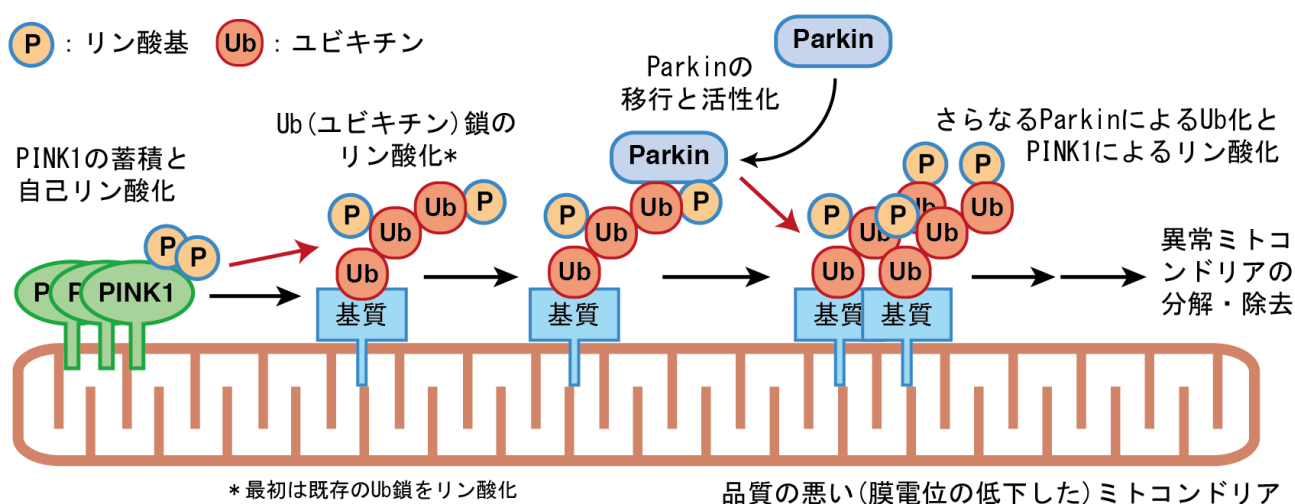
演者は Parkin の E3 機能の再構成から研究を開始し、偽基質を用いて試験管内で Parkin の E3 活性を明瞭に捉えることに成功した(3)。次にこの系を in cell に応用して Parkin の E3 活性を測定しようと試みたが上手くいかず、長い間苦勞した。転機が訪れたのは、米国の Youle らによって膜電位が消失した(ATP を合成できない)低品質ミトコンドリアに Parkin が移行して、そのような不良ミトコンドリアをオートファジー分解に導くことが提唱された 2008 年である(4)。この仕事にヒントを得て、我々と Youle らは独立して Parkin の機能解明に挑んだ。演者は独自に確立していた「偽基質を用いて E3 活性を検出する系(3)」を駆使して研究を進め、2010 年にミトコンドリア膜電位を低下させると細胞内でも Parkin の E3 活性を明瞭に観察できることや、この Parkin 活性化のステップに PINK1 が必須であることを発見した(5)。つまり、我々は「Parkin が普段は不活性型であり、ミトコンドリア膜電位の低下と PINK1 に依存して活性化される E3 である」ことを発見した。

次にミトコンドリアの状況に応じて、PINK1 がどのように制御されるのかを調べた。まず、膜電位の正常なミトコンドリアでは PINK1 は速やかに分解されるが、膜電位が低下すると分解が停止して、PINK1 が異常ミトコンドリアに蓄積することを発見した(5, 6)。さらに、膜電位の低下時に PINK1 が 2 量体を形成して S228 を自己リン酸化することが、PINK1 の機能に必須であることも見出した(7, 8)。これらの結果は、PINK1 が自身の分解と自己リン酸を介して膜電位をモニターする“ミトコンドリア品質の監視役”であることを示している。

PINK1 はキナーゼなのでリン酸化される基質の同定が必須である。我々や順天堂大学の研究グループは PINK1 が Parkin の S65 をリン酸化することを見出したが(9, 10)、それ以上に重要な基質として、我々は膜電位低下時に PINK1 がユビキチンの S65 をリン酸化し、このリン酸化ユビキチンが Parkin 活性化因子であることを発見した(11)。また光架橋性アミノ酸を用いた生化学的な解析から、Parkin とリン酸化ユビキチンの結合様式を分子構造のレベルで提唱した(12)。

興味深いことに、Parkin が膜電位の低下したミトコンドリアに移行する際にも PINK1 が必須である(5)。このデータを念頭において、我々はリン酸化ユビキチンが Parkin の細胞内局在を制御する可能性を検討した。その結果、リン酸化ポリユビキチン鎖が異常ミトコンドリア上の Parkin 受容体であることを発見した(13)。Parkin は E3 なので、異常ミトコンドリアに移行した Parkin がユビキチン鎖を産生し、それが PINK1 によってリン酸化されてさらに Parkin 分子を呼び寄せる「正のフィードバックサイクル」が形成される。こうして異常なミトコンドリアが速やかにユビキチン化されると考えられる(図1)。なお、上述のいくつかのトピックに関しては、海外の研究グループも異なるアプローチから独立に同様の結論に達している(14-17)。

<図1：PINK1/Parkin が損傷ミトコンドリアの基質をユビキチン化する仕組み>

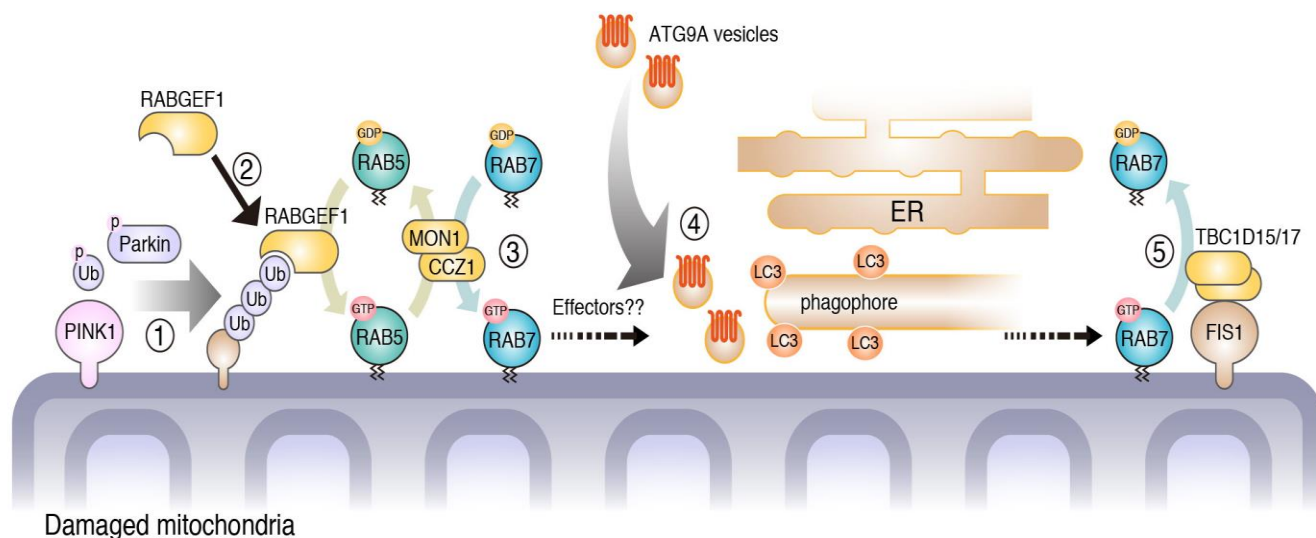


上記システムが働かないと、本来は除去されるべき細胞内の異常なミトコンドリアが取り除かれない。
 → 脳内に低品質のミトコンドリアが蓄積して、最終的に遺伝性劣性パーキンソン病が発症する。

PINK1 と Parkin によって不良ミトコンドリアに付加されたユビキチン鎖はオートファジー分解の目印となりえる。既に、オートファジーアダプターと称される分子群がユビキチン鎖を認識して、隔離膜（オートファゴソーム膜）マーカーである LC3 をリクルートすることはよく知られている(18)。しかしながら、損傷ミトコンドリアのオートファジー（マイトファジー）に際しては LC3 以外にも ULK1 複合体, PI3K 複合体, Atg9 などが正しくミトコンドリアへとリクルートされる必要があるが、その分子機構は不明である。また、ユビキチン → オートファジーアダプター → LC3 の系で PINK1/Parkin 依存的なミトコンドリア分解の全てを説明できるのかどうかは不明であった。

我々は、不良ミトコンドリア上に形成されたユビキチン鎖によって初期エンドソーム因子である RABGEF1(Rabex5)が不良ミトコンドリアへと移行することを発見した。さらに RABGEF1 によって普段はエンドソームの膜融合過程で機能する Rab 低分子量 GTPase : RAB5 がリクルートされ、不良ミトコンドリア上で RABGEF1 → RAB5 → MON1/CCZ1 → RAB7 という RAB のカスケード反応が起こることが損傷ミトコンドリアのリソソーム依存的分解に必要であることを見出した(図 2)。このカスケード反応は、オートファジー必須タンパク質である ATG9A の不良ミトコンドリアへのリクルートやアセンブリーに重要な役割を担っていると考えられる(19)。

<図 2 : ユビキチン化された不良ミトコンドリアが分解に導かれる仕組み>



まとめると、膜電位の低下した不良ミトコンドリアは PINK1 によって認識され、Parkin によるユビキチン化を受ける。さらに Rab 低分子量 GTPase の働きを介して、オートファジー・リソソーム系によって分解・除去されるが、このプロセスが破綻すると低品質ミトコンドリアや活性酸素種が蓄積して、遺伝性劣性(潜性)PD の発症につながると考えられる(20)。ほぼ全ての PD 患者由来の PINK1/Parkin ミスセンス変異が上記のプロセスを阻害することも、我々の仮説を支持している。

なお、字数制限から全ての仕事を紹介することはできないが、2010 年から 2017 年にかけては、我々やアメリカの Richard Youle 博士のグループに加えて、イギリスの Miratul Muqit 博士のグループや David Komander 博士のグループ、アメリカの Wade Harper 博士のグループ、順天堂大学の服部信孝博士のグループも多くに関連論文を報告している。本発表では我々の実験データをもとに、パーキンソン病とミトコンドリア品質管理 (マイトファジー) の関係について紹介したい。

<参考文献>

- (1) Kitada, T., et al. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. **392**, 605-608
- (2) Shimura, H., et al. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics*. **25**, 302-305
- (3) Matsuda, N., et al. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *The Journal of biological chemistry*. **281**, 3204-3209
- (4) Narendra, D., et al. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. **183**, 795-803
- (5) Matsuda, N., et al. (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology*. **189**, 211-221
- (6) Okatsu, K., et al. (2015) Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of cell science*. **128**, 964-978
- (7) Okatsu, K., et al. (2012) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature communications*. **3**, 1016
- (8) Okatsu, K., et al. (2013) A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *The Journal of biological chemistry*. **288**, 36372-36384
- (9) Iguchi, M., et al. (2013) Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. **288**, 22019-22032
- (10) Shiba-Fukushima, K., et al. (2012) PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific reports*. **2**, 1002
- (11) Koyano, F., et al. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*. **510**, 162-166
- (12) Yamano, K., et al. (2015) Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation. *The Journal of biological chemistry*. **290**, 25199-25211
- (13) Okatsu, K., et al. (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *The Journal of cell biology*. **209**, 111-128
- (14) Kane, L.A., et al. (2014) PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *The Journal of cell biology*. **205**, 143-153
- (15) Wauer, T., et al. (2015) Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation. *Nature*. **524**, 370-374
- (16) Kazlauskaitė, A., et al. (2014) Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *The Biochemical journal*. **460**, 127-139
- (17) Ordureau, A., et al. (2014) Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Molecular cell*. **56**, 360-375
- (18) Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. **147**, 728-741
- (19) Yamano, K., et al. (2018) Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy. *eLife*. **7**,
- (20) Yamano, K., et al. (2016) The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO reports*. **17**, 300-316