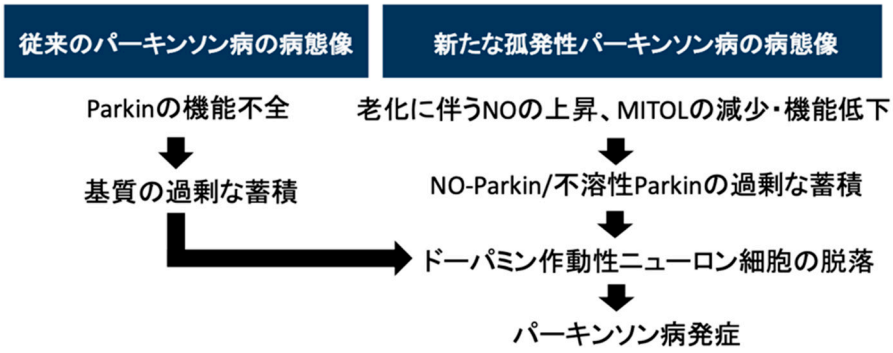
| 121　ミトコンドリアでの凝集物除去に着目したPD病態の解明 | 椎葉　一心 |
|---|---|

**【目的】**パーキンソン病は進行性に黒質ドパミン神経細胞が変性する疾患で、その結果、黒質・線条体におけるドパミンが減少し神経障害が生じる。病態の原因として患者脳の黒質・線条体領域でミトコンドリア機能障害やタンパク質の蓄積がみられることが明らかとなっているが、分子病態ついては未解明な点が多い。私たちはこれまでに、パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin が細胞死を誘導すること、その抑制系として Parkin を分解する酵素 MITOL を同定し、分子病態の一端を明らかにしてきた。一方、前述とは別に、Parkin が高度に凝集、不溶性化し細胞死を誘導することを新たに見出した。そのため本研究では、パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin の持つ毒性に焦点を当て、新規パーキンソン病病態メカニズムの解明を目指し解析を行った。

**【方法】**パーキンソン病患者脳ではミトコンドリア呼吸鎖 I の機能障害が観察される。よって、ミトコンドリア呼吸鎖 I の阻害剤である Rotenone を細胞へ添加することでパーキンソン病モデル細胞を作製できることが知られている。細胞レベルの解析では薬剤処理によるパーキンソン病モデル細胞等を用いて、Parkin 分解酵素 MITOL を軸とし研究計画に取り組んだ。1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（MPTP）の投与により、7 日間でパーキンソン病のモデルマウスを作出することができる。そのため個体レベルの解析では薬剤誘導性パーキンソン病モデルマウスを用い、生体内での不溶性ニトロシル化 Parkin の毒性および MITOL との関連について明らかにすることとした。

**【結果】**今回 MPTP 誘導性のパーキンソン病モデル神経特異的 MITOL 欠損マウスを作製し解析を行ったところ、パーキンソン病モデル MITOL 欠損マウスでは野生型に比べ不溶性 Parkin が顕著に増加し、病態の悪化が認められ、また Parkin の不溶性化は病態発症に先立って起こることが明らかとなった（下図）。細胞系では Parkin 自体に毒性があるという結果も得られた。これらより、Parkin が病態に先立って不溶性化し神経細胞性毒性となる可能性が示唆された。現在、国内外を問わずパーキンソン病の病態発症メカニズムの 1 つは Parkin の“loss of function”だと考えられている。事実、細胞を用いた実験において Parkin は多くの基質を分解し、蓄積を防ぐことで細胞毒性を回避することが報告されている。しかし、多くの Parkin 欠損マウスにおける *in vivo* 解析では既存基質の蓄積はおろかパーキンソン病の病態すら見られなかった。過去に筋萎縮性脊索硬化症（ALS）の病態メカニズムとして、当初の病因遺伝子 SOD1 の機能喪失（loss of function）が原因という考えではなく、ミスフォールドタンパクとしての異常（gain of toxic）が原因であることが近年証明され支持されている。よって、機能が正常な変異 Parkin をもつパーキンソン病患者の報告があることなどから、SOD1 の歴史的展開にみられるよう Parkin も同様に“gain of toxic”の可能性があるのではないかと考えられる。

パーキンソン病の新たな考え方



# 121. ミトコンドリアでの凝集物除去に着目した PD 病態の解明

椎葉　一心

学習院大学 理学部 生命分子科学研究所

Key words：パーキンソン病，ミトコンドリア，Parkin，アグリソーム

## 緒　言

本研究の目的は、数十年支持されてきた「パーキンソン病病態は Parkin による細胞保護機能破綻である」という仮説から視点を変え、「パーキンソン病病態は不溶性 Parkin による細胞毒性によるもの」という全く新しい考え方を提供することである（図 1）。それに伴い治療薬の開発対象が「不溶性 Parkin の毒性および形成を解消するもの」へと大きくシフトする可能性がある。私たちの研究室ではユビキチンリガーゼ活性を持つミトコンドリア酵素 MITOL を同定し、MITOL が神経変性疾患に関連する変性タンパク質（PolyQ、mSOD1 など）の除去機能を有することを明らかとしてきた。また、私たちは Parkin に関連する論文が 7,000 報を超える中、世界に先駆けて Parkin を分解する酵素として MITOL を見出した。予備的な実験データより Parkin 分解酵素 MITOL を欠損させたパーキンソン病モデル細胞では不溶化性ニトロシル化 Parkin が過剰に蓄積し細胞死が強く起こる結果を得ていた。さらに、患者脳では不溶性ニトロシル化 Parkin の蓄積が認められている。これらの情報から、本研究では、Parkin による細胞毒性の発生機序とその抑制機構に着目することとした。具体的にはニトロシル化修飾を受けた不溶性 Parkin の蓄積機序と MITOL による Parkin 分解機構の 2 つの点を解明することとした。

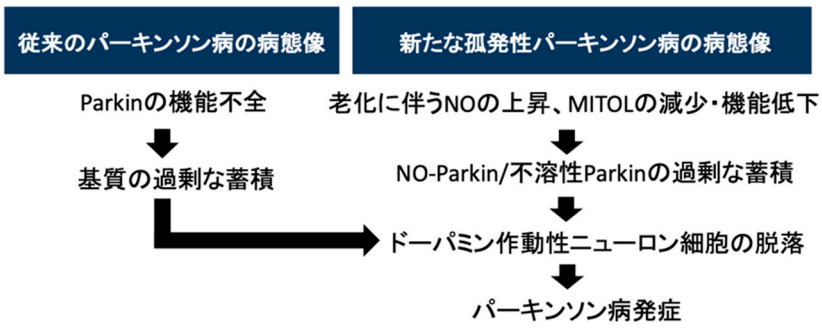



図 1. パーキンソン病の新たな考え方

## 方法および結果

### 1. MITOL はニトロシル化修飾を受けた Parkin と結合し Parkin の量的制御を行う

先行研究において MITOL はマイトファジー時においてリン酸化修飾を受けた Parkin と結合し、分解することが明らかとなっている［1］。マイトファジーはミトコンドリア選択的オートファジーの 1 種であり、ミトコンドリア脱共役剤 mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone（CCCP）で誘導されることが知られている［2］。しかし、その試薬の強さゆえに、生理的な現象を反映しているか疑問視されている。そのため、今回 PD 患者でミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の機能不全が見られることから、呼吸鎖複合体 I の阻害剤である Rotenone をもちいて実験を行うこととした。Rotenone 刺激では Parkin のリン酸化やマイトファジーが起こらないことが報告されている。そのため、まず初めに Rotenone 処理時に MITOL がリン酸化を

受けていない Parkin と結合するか確認した。免疫沈降法を用いた結果にて、MITOL は Rotenone を処理した時のみに Parkin と結合することが確認された。次に、PD 患者でニトロシル化（NO）された Parkin が蓄積していることを踏まえ、MITOL が NO-Parkin を制御している可能性を疑った。初めに、病態で見られる呼吸鎖複合体 I の障害が Parkin のニトロシル化を誘導できるか確認を行ったところ、Rotenone 刺激依存的に NO-Parkin が検出された。次に、他の報告で Parkin のシステイン（Cys）323 に NO 修飾が起こることが明らかとなっているため［3]、Rotenone 刺激によって Parkin の C323 に NO 修飾が行われるかどうかを Parkin の C323 をアラニン（A）に置換した Parkin C323A 変異体を作製し検討を行ったところ、変異体では Rotenone 刺激での NO 修飾が行われなくなった。Rotenone 刺激による C323 への NO 修飾が MITOL と Parkin との結合に必要かどうかを確認するため、C323A 変異体と MITOL との結合を確認したところ、野生型の Parkin は Rotenone 刺激依存的に MITOL と結合したのに対し、C323 変異体では結合が見られなかった。さらに、MITOL が NO-Parkin の量にどのような影響を与えているか検討するため、HA タグを付加した Parkin を安定的に発現した MITOL 欠損 HA-Parkin 安定発現株を作製し Rotenone 刺激時の NO-Parkin の量を確認したところ、野生型株より MITOL 欠損株では NO-Parkin が過剰に蓄積している様子が観察された。さらに、PD 患者では不溶性度の高い Parkin が蓄積していることが報告されていたため、界面活性剤に不溶な分画における Parkin の量を確認したところ、NO-Parkin の蓄積と同様に野生型株より MITOL 欠損株では NO-Parkin が過剰に蓄積していることが確認できた。

**2. MITOL はニトロシル化修飾を受けた Parkin をアグリソーム経路にて分解する**

Rotenone 刺激時に Parkin が MITOL と結合し、さらに量的な制御を行う可能性が示唆されたため、MITOL が Parkin に対してどのような制御を行っているか検討することとした。非常に興味深いことに、先行研究で、MITOL は CCCP 刺激時のリン酸化 Parkin に対して K48 型のユビキチン鎖を付加し分解することが明らかとなっていたが、Rotenone 刺激時においては、K48 型ではなく K63 型のユビキチン鎖を NO-Parkin に付加していることが確認できた。このことから MITOL が状況に応じてユビキチンシグナルのスイッチングを行っていると考えられる。タンパク質除去機構の一つであるアグリソーム機構において K63 型のユビキチンの付加が重要である報告があることから［4]、MITOL は NO-Parkin に K63 型のユビキチン鎖を付加し分解しているのではないかと考えた。そこで、K63 型ユビキチンシグナルを介したアグリソーム経路に必須である HDCA6 をノックダウン（KD）し NO-Parkin の量を確認したところ、HDAC6 を KD した群では NO-Parkin の蓄積が観察された。

さらに、アグリソーム経路はオートファジーの機構を用いてタンパク質を分解しているため、オートファジー抑制剤である bafilomycin を添加した際の NO-Parkin の量を確認したところ、NO-Parkin の蓄積が観察された。一方で、プロテアソーム阻害剤である epoxomycin を添加した際には、その蓄積が確認できなかったことから、NO-Parkin の分解はプロテアソーム経路によるものではないことが明らかとなった。このことから、NO-Parkin はアグリソーム経路を用いて分解されていること、及び、MITOL はその分解経路に関係している可能性が示唆された。

**3. 不溶化しニトロシル化修飾を受けた Parkin の毒性は TUDC によって解消される**

現時点で PD を根本的に治せる治療薬は存在しない。そこで、不溶性 Parkin に毒性があると仮定し、不溶性 Parkin の毒性を抑制する薬剤を見つけることとした。以前の報告から、分子シャペロンである TUDC（tauroursodeoxycholic acid）が不溶性タンパク質を細胞内から解消できるとの報告があることから［5]、TUDC が NO-Parkin の不溶化を解消できるのではないかと仮定し、検討を行った。まず、MITOL 欠損細胞において過剰に蓄積する不溶性 Parkin を TUDC が解消できるか検討したところ、TUDC を添加した細胞では不溶化した Parkin の量が減少した。これらは細胞内凝集タンパク質を染色できる試薬 proteostat の蛍光シグナルの減弱でも同様に確認された。さらに、これらの細胞内凝集体が毒性を持っているかを検討するため細胞の生存率を

観察したところ、MITOL 欠損細胞において、不溶性 Parkin が蓄積している条件下で細胞の生存率が著しく低下し、さらにそれらは TUDC の添加によって緩和されることが明らかとなった。これらのことより、MITOL 欠損によって蓄積した不溶性 Parkin が毒性をもち、それらは TUDC によって解消され毒性を緩和できることが明らかとなった。

MITOL 欠損細胞で蓄積した不溶性 Parkin の毒性とその毒性を緩和できる薬剤を発見できたことから、これらが生体内において有効かどうかを確認するために、パーキンソン病誘導剤である MPTP を用いてパーキンソン病モデル MITOL 欠損マウスを作出しその病態と TUDC 投与による病態への影響を観察することとした。その結果、パーキンソン病モデル MITOL 欠損マウスではパーキンソン病モデル野生型マウスに比べて病態マーカーであるドパミン作動性ニューロン TH（Tyrosine hydroxylase）の減弱が観察され、病態が悪化していることがわかった。さらに、細胞の結果と同様に、病変部である線条体においてパーキンソン病モデル MITOL 欠損マウスではパーキンソン病モデル野生型マウスに比べて、不溶性 Parkin の蓄積が確認され、TH の減弱を指標とする病態の悪化が観察された（図 2）。また、MPTP 投与によるパーキンソン病の病態悪化は TUDC の投与によって改善され、不溶性 Parkin の蓄積も同時に解消された。

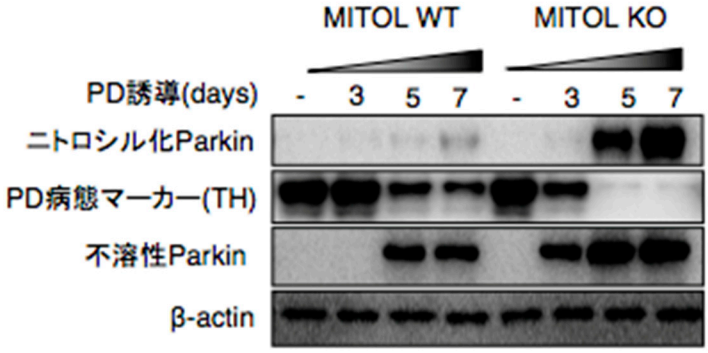



図 2. パーキンソン病モデル脳特異的 MITOL 欠損マウスでは
ニトロシル化 Parkin の蓄積と病態悪化がみられる。

## 考　察

近年、PD 患者脳で化学修飾を受けた Parkin が多く蓄積していることが報告された［6］。Parkin は種々のストレスに応じて化学修飾を受けその活性が調節されていることが知られている。特にミトコンドリア脱分極時には Parkin がリン酸化修飾を受けることで活性化し機能不全ミトコンドリア除去（マイトファジー）の実行因子として働く。先行研究にて MITOL はマイトファジー時にリン酸化 Parkin を分解することが明らかとなったが、他の修飾を受けた Parkin の制御については明らかとされていない。そこで、今回私は新たに MITOL がニトロシル化修飾を受けた Parkin を分解することを見出した。また、非常に興味深いことに同じ分子にもかかわらず異なる分解経路を用いてタンパク質を分解する結果が得られた。これら、分解経路の違いは修飾を受けた Parkin の性質の違いによるものだと推察する。リン酸化修飾を受けた Parkin は大きく構造を変化させ活性化することが知られている［7］。一方でニトロシル化を受けた Parkin は一過的に活性が上がるが、その後は活性が抑制される。これらの知見から、各々の修飾によって Parkin が同等の制御を受けていないことが伺える。リン酸化 Parkin については結晶構造解析によって構造の全貌が明らかとなっているが［8］、NO-Parkin の構造についてはほとんど知見がない。もしかすると、リン酸化 Parkin と NO-Parkin の構造の違いが、MITOL による基質認識の違いを生み出しているのかもしれない。

当研究室では MITOL が基質に対して K63 型ユビキチン鎖および K48 ユビキチン鎖を付加することを報告してきた。今回、新たに同じ分子にもかかわらず MITOL によって付加されるユビキチン種が刺激に応じて変化す

ることを見出した。しかしながら、MITOL が基質に付加するユビキチン鎖をどのように使い分けているのかはいまだに明らかにできていない。近年、脱ユビキチン酵素 OTUD4 が自身の修飾変化により K63 鎖と K48 鎖を切断し分けているという報告がされた［9］。OTUD4 は未修飾時には K48 型のユビキチン鎖を選択的に切断し、リン酸化修飾を受けると K63 型のユビキチン鎖を選択的に切断する。OTUD4 はミトコンドリアにも局在しているため、MITOL と結合することで、基質に対してのユビキチン修飾の種別化を制御している可能性があるのではないかと考えている。

Parkin は基質分解能を有するため、基質の分解を通して基質蓄積を防ぎ細胞毒性を回避すると考えられている。一方で、孤発性パーキンソン病患者においては基質および Parkin 自体（高度に凝集した Parkin）が蓄積するといった報告がある［6］。実際今回の解析から Parkin 分解酵素である MITOL を欠損することで、不溶性化し細胞死を誘導するという Parkin の新たな一面が明らかとなった。病態の初期、進行に伴い機能不全の Parkin が増加し、基質が蓄積することで病態が悪化することは想像に難しくない。そのためパーキンソン病を含む多くの神経変性疾患は不溶性タンパク質の蓄積が神経障害の原因であることを踏まえ、Parkin 自体に基質分解能（細胞保護機能）を有する反面、不溶性化し毒性となる可能性があるのではないかと考える。今後十分な検討が必要だがパーキンソン病の新たな病態像の端緒を開ければと慎重に解析を進める。

## 謝　辞

本研究の遂行に際してご支援賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

## 文　献

1） Shiiba I, Takeda K, Nagashima S, Ito N, Tokuyama T, Yamashita SI, et al. MITOL promotes cell survival by degrading Parkin during mitophagy. EMBO Rep. 2021 Mar 3;22(3):e49097. Epub 2021/02/11. PMID: 33565245 DOI: 10.15252/embr.201949097.

2） Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. J Cell Biol. 2008 Dec 1;183(5):795-803. Epub 2008/11/26. PMID: 19029340 DOI: 10.1083/jcb.200809125.

3） Ozawa K, Komatsubara AT, Nishimura Y, Sawada T, Kawafune H, Tsumoto H, et al. S-nitrosylation regulates mitochondrial quality control via activation of parkin. SciRep. 2013;3:2202. PMID: 23857542 DOI: 10.1038/srep02202.

4） Olzmann JA, Li L, Chudaev MV, Chen J, Perez FA, Palmiter RD, et al. Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. J Cell Biol. 2007 Sep 10;178(6):1025-38. Epub 2007/09/12. PMID: 17846173 DOI: 10.1083/jcb.200611128.

5） Fakruddin M, Wei FY, Suzuki T, Asano K, Kaieda T, Omori A, et al. Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease. Cell Rep. 2018 Jan 9;22(2):482-96. PMID: 29320742 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.051.

6） Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, et al. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. J Clin Invest. 2009 Mar;119(3):650-60. Epub 20090223. PMID: 19229105 DOI: 10.1172/JCI37617.

7） McWilliams TG, Barini E, Pohjolan-Pirhonen R, Brooks SP, Singh F, Burel S, et al. Phosphorylation of Parkin at serine 65 is essential for its activation in vivo. Open Biol. 2018 Nov 7;8(11). Epub 20181107. PMID: 30404819 DOI: 10.1098/rsob.180108.

8) Trempe JF, Sauve V, Grenier K, Seirafi M, Tang MY, Menade M, et al. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. Science. 2013 Jun 21;340(6139):1451-5. Epub 2013/05/11. PMID: 23661642 DOI: 10.1126/science.1237908.

9) Zhao Y, Mudge MC, Soll JM, Rodrigues RB, Byrum AK, Schwarzkopf EA, et al. OTUD4 Is a Phospho-Activated K63 Deubiquitinase that Regulates MyD88-Dependent Signaling. Mol Cell. 2018 Feb 1;69(3):505-16 e5. PMID: 29395066 DOI: 10.1016/j.molcel.2018.01.009.