

研究題目 ヘキソキナーゼ活性によるミトコンドリア品質管理の制御

研究組織

研究代表者：岡 敏彦（立教大学理学部）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：赤羽しおり（立教大学理学部）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ユビキチンキナーゼ PINK1 は、活性酸素種などにより障害を受け膜電位が低下したミトコンドリアの外膜上に集積し活性することで、ユビキチンリガーゼ Parkin をリン酸化して、障害ミトコンドリアのポリユビキチン化を促進する。これにより、オートファジーを介した障害ミトコンドリアの排斥が促される。PINK1 は障害ミトコンドリア外膜上でタンパク質複合体の形成と自己リン酸化を介して活性化することが知られており、この過程には様々なシグナル経路が関与している。私達は、解糖系の初発酵素であるヘキソキナーゼが PINK1 複合体のメンバーであり、その活性が複合体形成に重要であることを明らかにした。その制御機構にはヘキソキナーゼの活性が必須であるため、基質タンパク質や相互作用因子をプロテオーム解析により同定することで、その分子機構の全容を明らかにすることを目指している。さらに、PINK1 複合体のメンバーである TIM23 もヘキソキナーゼ同様に PINK1 の安定化に寄与するため、その分子機構の解明も進めている。

[1-2]研究の方法・経過

まず TIM23 の発現抑制により、PINK1 以外のタンパク質で、その量が大きく変動するものを検討した。その際に、PINK1 の分解に関わることが報告されているミトコンドリア内膜プロテアーゼも合わせて発現抑制することで、PINK1 分解に連動して変化するタンパク質の検索を行った。TIM23 またはミトコンドリアプロテアーゼを RNA 干渉法により発現抑制し、脱共役剤 CCCP 処理を施した後に細胞抽出液をした。その細胞抽出液からトリプシン消化で得

られた全ペプチドに対して Q Exactive Plus 及び Orbitrap Fusion を用いた質量分析を行い、ラベルフリー定量解析を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

Q Exactive Plus 及び Orbitrap Fusion を用いた質量分析で、RNA 干渉法による TIM23 タンパク質量の低下を検出できたことから、予定通りのサンプルが調製できたことが確認された。PINK1 複合体の主要メンバーである TOM 複合体の各サブユニットでは、タンパク質量の変動は観察されなかった。また、TIM23 発現抑制により発現量が大きく変動するタンパク質で、これまでに PINK1 との相互作用が報告されているタンパク質は見出せなかった。しかし、PINK1 やミトコンドリアプロテアーゼは発現量が少ないため、今回のラベルフリー定量解析では検出できなかったため、今後は、PRM (parallel reaction monitoring)を用いたターゲット質量分析による精密定量が必要と考えられた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

PINK1 はミトコンドリア品質管理の中心的な役割を担うタンパク質であり、パーキンソン病の原因遺伝子としても知られている。その PINK1 の分解に関わる TIM23 やミトコンドリアプロテアーゼの分子メカニズムを解明することは、パーキンソン病のターゲット創薬研究の一助となることが期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

該当なし

[3-2]学会発表

該当なし

[3-3]成果資料等

該当なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

PINK1-FLAG 安定発現 HeLa 細胞を用いて、ヘキソキナーゼ阻害剤 2DG の添加により PINK1-FLAG との共免疫沈降が抑制されるタンパク質を質量分析により検索することを試みたが、PINK1/Parkin 経路に関わる因子の同定には至らなかった。そこで、今後は、ヘキソキナーゼ-FLAG 安定発現 HeLa 細胞を用いて、2DG 添加により共免疫沈降されなくなる候補因子の検索を進めることで、ヘキソキナーゼの PINK1/Parkin 経路における役割を明らかにする。