

## 研究題目 ミトコンドリア品質管理で機能する2種類のユビキチン 連結酵素 MITOL と Parkin の基質の解析

### 研究組織

研究代表者：松田憲之（東京都医学総合研究所 ユビキチンプロジェクト）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

PINK1（セリンスレオニンキナーゼ）と Parkin（ユビキチン連結酵素 E3）は、それぞれ *PARK6* および *PARK2* として知られる遺伝性劣性（潜性）パーキンソン病の原因遺伝子産物であり、変異によって本来発揮されるべき機能が損なわれて病気の発症に至ると考えられている。

PINK1 と Parkin の両者は協調して損傷ミトコンドリアをユビキチン化して分解に導く "ミトコンドリアの品質管理" 経路を形成している。研究代表者らは徳島大学先端酵素学研究所の小迫博士と連携することにより、今までも『PINK1 のリン酸化したユビキチンが Parkin を活性化すること』や『Parkin が損傷ミトコンドリアに移行する際に PINK1 によってリン酸化されたユビキチン鎖が必要であること』を解明してきた。このプロセスでは ① PINK1 によるユビキチンと Parkin のリン酸化 → ② Parkin の活性化および損傷ミトコンドリアへのリクルート → ③ Parkin による基質蛋白質のユビキチン化 → ④ → … とした正のフィードバックが形成される。

ここで疑問となるのが、『正のフィードバックが成立する以前に Parkin が移行するためには、ミトコンドリア上に既にユビキチン鎖が存在する必要があると思われるが、このユビキチンがどのような過程で供給されるのか？』という点である。また『フィードバックの際に Parkin によってユビキチン化される多数の基質が報告されているが、それらが全て真の基質であるのか、仮にそうであれば Parkin の基質選択性はどのように定義されているのか？』という疑問も生じる。いずれも興味深いポイントであるが、

未解明である。そこで本研究では、それら問題点の解明を目指した。

#### [1-2]研究の方法・経過

第一の研究計画として、質量分析装置を用いて MITOL の結合因子を同定し、MITOL の基質や相互作用因子を単離することを目指した。

さらに Parkin が基質を認識する仕組みを理解し、Parkin の基質特異性の有無を明らかにするために、第二の研究計画として、細胞内に本来存在しない外来蛋白質をミトコンドリアに局在化させて、それを Parkin が基質として認識してユビキチン化するかどうか、質量分析装置を用いて検討した。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

研究代表者らは予備的な実験として、ミトコンドリア E3 として知られている MITOL, MuL1, RNF185, Huwe1 をノックダウンして Parkin による損傷ミトコンドリアのユビキチン化が阻害されるかどうかを調べた。その結果、ミトコンドリア上の複数膜貫通 E3 である MITOL がミトコンドリア外膜上の基質を恒常的にユビキチン化しており、これが Parkin によるユビキチン化の契機となる"種火ユビキチン"を供給している可能性を見出した。一方で、既に報告されているいくつかの MITOL 基質候補蛋白質の MITOL 依存的なユビキチン化は研究代表者らの技術では検出できなかった。そこで、質量分析装置を用いて MITOL の結合因子を同定することで、MITOL の基質や相互作用因子を単離することを目指した。現在いくつかの候補因子を得て、解析中である。

次に Parkin の基質認識機構を検討して基質特異性の有無を明らかにするために、細胞内には本来は存在しない外来蛋白質をミトコンドリアに局在化させて、それを Parkin が基質として認識してユビキチン化するかどうかを、質量分析装置を用いて検討した。TOMM20 の N-末端ミトコンドリア外膜アンカー配列の K27 に変異を導入し、Lysine-free のミトコンドリア外膜局在化配列 (OMM-anchor w/o K) を作製した。この OMM-anchor w/o K に外来蛋白質として GFP や MBP (Maltose Binding Protein) を融合したものを細胞で発現させ、ミトコンドリアに標的化したことを確認した上で、Parkin 依存的にユビキチン化されるかどうかを検討した。OMM-anchor-GFP や OMM-anchor-MBP が Parkin によってユビキチン化されることが確認されたことから、Parkin には配列レベルの基質選択性は無いことが証明された。

さらに上記の研究を進める過程で、予期せぬ進展もあった。Parkin による mitophagy 誘導条件下での MITOL の貢献を調べるために、MITOL の細胞内局在を解析したところ、我々は不思議な現象を見出した。つまり、ミトコンドリアに局在していた MITOL が、脱共役剤処理 (膜電位の低下) によってペルオキシソームに移行していた。MITOL がミトコンドリアからペルオキシソームに移行するためには、PINK1 と Parkin の両者が必要であった。共同研究者の小迫英尊博士による Mass spectrometry 解析の結果、膜電位の低下した不良ミトコンドリアでは、Parkin によって MITOL の K268 が顕著にユビキチン化されることがわかった。Parkin によるユビキチン化が起こらない MITOL K268A 変異体や MITOL K268R 変異体ではペルオキシソームへの移行が阻害されることから、K268 を介したユビキチン化が MITOL のペルオキシソームへの移行に必要なシグナルであることが強く示唆された。ペルオキシソーム膜蛋白質の輸送に関わる Pex3 や Pex16 をノックダウンすると、MITOL のペルオキシソームへの移行が阻害された。加えて、ミトコンドリア膜から MITOL を引き抜くために必要な因子を探索したところ、VCP/p97 が同定された。

これらの結果から、ミトコンドリア外膜蛋白質である MITOL の C 末端領域が Parkin によってユビキチン化されると、VCP/p97 依存的にミトコンドリア膜から引き抜かれ、Pex3 および Pex16 依存的にペルオキシソームに輸送されるという新たな現象が明らかになった。

#### [2-2] 本共同研究による波及効果

ミトコンドリアとペルオキシソームは、オルガネラの分裂に関わる因子や  $\beta$  酸化をはじめとした代謝経路を共有し、分子および機能面で共通点が多い。しかし、個々のオルガネラ研究は進んでいるものの、『ミトコンドリア・ペルオキシソーム間で遷移する蛋白質とその分子メカニズム』は全く不明である。本研究から示された (i) ミトコンドリアの膜電位低下に応答して四回膜貫通型の蛋白質 MITOL がペルオキシソームに移行すること、(ii) ユビキチン化がミトコンドリアとペルオキシソーム間輸送のシグナルとして機能すること、は過去に例のない独自の発見であり、新奇の現象として興味深い。本研究から「マイトファジー発動時にミトコンドリア以外のオルガネラの膜蛋白質の挙動が変化する」というマイトファジーの新たな局面の理解が進むことが期待できる。

#### 【3】 主な発表論文等

##### [3-1] 論文発表

共同研究者を一重下線、研究代表者を二重下線で示す。

Koyano, F., Yamano, K., Kosako, H., Kimura, Y., Kimura, M., Fujiki, Y., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2019) Parkin-mediated ubiquitylation redistributes MITOL/March5 from mitochondria to peroxisomes. **EMBO Rep.**, e47728

Koyano, F., Yamano, K., Kosako, H., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2019) Parkin recruitment to impaired mitochondria for nonselective ubiquitylation is facilitated by MITOL. **J. Biol. Chem.**, 294:10300-10314

#### 【4】 今後の課題等

Parkin によって触媒される MITOL の K268 におけるユビキチン化を認識して、ペルオキシソーム移行に導く因子を同定する。