

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 五十嵐 遼子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 933 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Gemcitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1
(ゲムシタビンはミトコンドリア常在性 E3 ユビキチンリガーゼ MUL1 を介して PINK1 を安定化し Parkin 非依存性マイトファジーを誘導する)

論文審査委員 主査 教授 河内 裕
副査 教授 藤井 雅寛
副査 准教授 中津 史

博士論文の要旨

【背景と目的】

ミトコンドリアは ATP 産生をはじめとする多くの代謝を担っており、その恒常性の維持は細胞の生存にとって非常に重要である。ミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) は、不良なミトコンドリアを選択的に分解することで、ミトコンドリア恒常性維持に寄与していると考えられている。家族性パーキンソン病の原因遺伝子である PINK1 は、ストレス条件下でのみミトコンドリア外膜に安定化し、下流のユビキチンリガーゼのミトコンドリアへの局在化を介してマイトファジーを誘導することが報告されており、パーキンソン病とマイトファジーとの関係が盛んに研究されるようになった。一方で、PINK1 を安定化するストレスやその際の安定化機構については未解明な点が多い。本研究では、これまでに当研究室で同定されてきたマイトファジー誘導薬物のうち、PINK1 の安定化を介してマイトファジーを誘導する薬剤を用いて、PINK1 の安定化機構やその下流の分子機構を解明することを目的とした。

【方法と結果】

PINK1 遺伝子を CRISPR/Cas9 法によって破壊した HeLa 細胞 (PINK1 KO 細胞) に、生理活性物質ライブラリーを用いて同定された複数のマイトファジー誘導剤を処理した結果、ゲムシタビンで誘導されるマイトファジーが PINK1 KO 細胞で阻害された。さらに、ゲムシタビン処理をした細胞で、PINK1 がミトコンドリアに安定化することを、細胞分画法、ウエスタンブロットによって明らかにした。これまでに報告されている PINK1 の安定化条件の多くは、ミトコンドリア膜電位の低下を伴うものであったが、面白いことにゲムシタビンはミトコンドリアの膜電位に影響を与えなかった。

PINK1 とともにマイトファジー誘導に寄与するユビキチンリガーゼとして、Parkin が報告されているが、HeLa 細胞には Parkin が発現していないため、別のユビキチンリガーゼの関与が予想された。本研究では、Parkin と重複してマイトファジーに寄与することが報告されている MUL1 に注目した。MUL1 遺伝子破壊細

胞 (MUL1 KO 細胞) を作製し、ゲムシタビンによるマイトファジーを解析した結果、PINK1 KO 細胞と同様にマイトファジーが阻害された。さらに、ウエスタンブロット解析の結果、MUL1 KO 細胞では、ゲムシタビンによる PINK1 の安定化が減少していた。より詳しく 2 種類のタンパク質のマイトファジーにおける階層性について解析するために、PINK1 MUL1 二重遺伝子破壊細胞 (PINK1 MUL1 DKO 細胞) を作製し、PINK1 と MUL1 の様々な変異体を発現させマイトファジーの相補能を調べた。その結果、PINK1 の常時安定化型変異体を PINK1 MUL1 DKO 細胞に発現させたときに、MUL1 の有無にかかわらずマイトファジーが相補された。これらの結果から、MUL1 はゲムシタビン処理時に、PINK1 の上流でその安定化に寄与していることが分かった。

【考察】

本研究では、抗がん剤の一種であるゲムシタビンが、PINK1 依存的、Parkin 非依存的にマイトファジーを誘導することを明らかにした。さらに、ゲムシタビンは PINK1 をミトコンドリア外膜に安定化させるが、この過程はミトコンドリア常在性のユビキチンリガーゼである MUL1 によって促進されることを見出した。これらの結果は、PINK1 の安定化機構や PINK1 が関与するマイトファジーでの新しい知見であり、マイトファジーの分子機構解明に大きく寄与するものである。

これまで、PINK1 が関与するマイトファジーにおいては、Parkin と MUL1 が重複して機能することが報告されてきた。しかし、1) MUL1 KO 細胞で阻害されたゲムシタビン誘導性マイトファジーが、Parkin の過剰発現によって回復できないこと、2) Parkin が PINK1 の下流で働くのに対し、MUL1 は上流で PINK1 の安定化に働くこと、からゲムシタビン誘導性マイトファジーにおける MUL1 の役割は Parkin と全く異なると考えられる。また、これまで多くの報告で、PINK1 の安定化はミトコンドリア膜電位の低下を伴うことが示されてきたが、ゲムシタビン処理はミトコンドリア膜電位に影響を与えなかった。このことは、新たな PINK1 の安定化機構を示唆している。定常状態での PINK1 の分解は、①ミトコンドリア内膜への移行、②ミトコンドリア内膜に局在するプロテアーゼによる切断、③細胞質へ逆行輸送後されプロテアソームで分解、というステップで進行する。ミトコンドリア膜電位の低下は、ステップ①を阻害するため PINK1 が安定化される。ゲムシタビン処理時に MUL1 が①～③のどのステップを阻害することで PINK1 を安定化しているかについては、今後さらなる解析が必要である。本研究で見出した、新規のマイトファジーがゲムシタビン処理以外で、どのような環境下でミトコンドリア恒常性の維持に寄与するのか、どのような組織で働く経路なのかについては、PINK1 や MUL1 遺伝子破壊細胞や動物を用いて解析することで解明できると考えられる。

審査結果の要旨

ミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) は、不良なミトコンドリアを選択的に分解することで、ミトコンドリア恒常性維持に寄与している。家族性パーキンソン病の原因遺伝子である PINK1 と Parkin は協調してマイトファジーに関与することが報告されているが、PINK1 の安定化機構については未解明な点が多い。本研究では、これまでに当研究室で同定されてきたマイトファジー誘導薬物のうち、PINK1 の安定化を介してマイトファジーを誘導する薬剤を用いて、PINK1 の安定化機構やその下流の分子機構を解明することを目的とした。その結果、抗がん剤ゲムシタビンが、PINK1 依存的、Parkin 非依存的にマイトファジーを誘導することを明らかにした。さらに、ゲムシタビンは PINK1 をミトコンドリア外膜に安定化させるが、この過程はミトコンドリア常在性のユビキチンリガーゼである MUL1 によって促進され、その際ミトコンドリアの膜電位に影響を与えないことを見出した。

本研究での結果は、PINK1 の安定化機構や PINK1 が関与するマイトファジーでの新しい知見であり、マイトファジーの分子機構解明に大きく寄与するもので、学位論文としての価値を認める。