

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18545

研究課題名(和文) RBR型E3ユビキチンリガーゼの活性化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism for activation of RBR-type E3 ubiquitin ligases

研究代表者

山野 晃史 (YAMANO, Koji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：30547526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトゲノムに13種類コードされているRBR型E3酵素の一つで、損傷ミトコンドリアの除去に重要であるParkinの機能解析を通じて、in cellでその活性化をモニターする実験系を開発した。この方法を用いて、ヒトゲノムにおよそ40種類コードされているE2酵素の内、活性化Parkinと相互作用するE2酵素の同定に成功した。さらにこの方法を用いて、ある機能未知RBR型E3酵素は、核内で複数のリング状構造を形成すること、また別のRBR型E3酵素は脂肪滴に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：E3 ligases transfer ubiquitin molecules to substrate proteins for their degradation. Molecular functions of RBR-type E3 ligases, however, largely remain unknown because their activities normally keep autoinhibited. Parkin is one of the RBR type E3 ligase that activates only on the dysfunctional mitochondria. In this study, I developed a method in which Parkin activation can be monitored in cultured cells through the interaction of E2 enzymes. E2 enzymes play a role in transferring ubiquitin molecule to E3 ligases and 40 different E2 enzymes are encoded in human genome. Using the method, I identified several E2 enzymes to interact with activated Parkin on the damaged mitochondria. Furthermore, this method also identified that one of the uncharacterized RBR-type E3 ligase forms several dot-like structures in the nucleus, and another RBR-type E3 ligase localizes on the lipid droplets.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ユビキチン RBR型リガーゼ ミトコンドリア マイトファジー

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質分解はタンパク質合成と平行して行われる、細胞内で最も重要な反応の一つである。特にユビキチン・プロテアソーム系の分解は、ユビキチンが、E1、E2 および E3 酵素のカスケードで活性化され、最終的に基質に結合することで分解の目印となっている。ヒトにおいて、少なくとも 500 種類存在する E3 酵素は 1 次アミノ酸配列とドメイン構造から 4 つのグループ (HECT, RING, U-box, および RBR 型) に大別される。他の E3 リガーゼと比較して RBR 型 E3 酵素の多くはその機能が全く不明である。代表者は RBR 型 E3 酵素の一つである Parkin の機能および Parkin が関与するミトコンドリア選択的オートファジー (以下、マイトファジー) の分子機構の解明に従事してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、RBR 型 E3 酵素の活性化に必須となる「E2 酵素との相互作用」を指標に、その活性化メカニズムを解明する。ヒトゲノムには 13 種類の RBR 型 E3 酵素がコードされていると考えられている。RBR 型 E3 酵素は、その活性が厳密に制御されており、普段は活性がオフであるという特徴をもつ。そのため、何らかの刺激 (ストレス誘導など) で活性化型に変換させないとその機能はおろか分解基質の同定も不可能である。さらに、これまではあるストレス誘導で活性化型になったとしてもそれを検出する方法がないという技術的な障壁もあった。本研究では「RBR 型 E3 酵素が活性化したときのみ、E2 酵素と複合体を形成するはずである」ことを仮定に置き、E3 酵素の活性化を in cell でモニターする実験系を構築する。そしてそれを利用し、1) 活性化型 Parkin にユビキチン分子を受け渡す E2 酵素を同定し、さらに 2) Parkin 以外の RBR 型 E3 酵素の活性化メカニズムに迫る。

## 3. 研究の方法

E2 酵素はヒトゲノムにおよそ 40 種類コードされている。E1 酵素によって活性化されたユビキチンは E2 酵素を経由して E3 酵素に受け渡される。

近年、明らかにされた Parkin の立体構造から、不活性化型 Parkin は E2 酵素と相互作用する RING1 ドメインが自身の REP ドメインによってマスクされていることが判明した。つまり、Parkin の URL ドメインのリン酸化およびリン酸化ユビキチンとの相互作用により、Parkin の分子内 (ドメイン間の) 構造変化が誘起されると、この REP ドメインが RING1 からリリースされ、その結果、E2 酵素との相互作用が可能になると示唆される。すでに Parkin は損傷ミトコンドリア上で活性化されることがわかっているため、上述のモデルが

正しいとすると、損傷ミトコンドリア上でのみ Parkin は E2 酵素と相互作用し、そこでユビキチン分子の受け渡しが行なわれると予想される。

これまで、E2 酵素と E3 酵素の関連性は、基質のユビキチン化を指標に、主に in vitro で解析がなされてきた。本研究では、より生理的条件下に近い in cell で RBR 型 E3 酵素と E2 酵素の相互作用を可視化することを目指している。そのための方法として Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions) と呼ばれる蛍光技術を利用する。これは細胞内で目的タンパク質間の相互作用を蛍光輝点として検出する方法である。2 種類のタンパク質にそれぞれアザミグリーンと Ash タグを付加して、培養細胞に発現させる。この 2 種類のタンパク質が相互作用すると、アザミグリーンと Ash タグのオリゴマー化を介して、アザミグリーンが蛍光輝点として観察できるというシステムである。まず、ヒトゲノムにコードされている代表的な E2 酵素をクローニングして、その N 末端にアザミグリーンを付加する。そしてマイトファジーの誘導で、Parkin と E2 酵素が損傷ミトコンドリア上で相互作用するかを共焦点顕微鏡で観察する。相互作用の観察ができた E2 酵素については、in vitro の解析で Parkin 依存的な基質のユビキチン鎖が形成できるかどうか合わせて解析する。

## 4. 研究成果

膜電位の低下したミトコンドリア上で Parkin は活性化され、様々なミトコンドリア外膜タンパク質をユビキチン化する。しかし、細胞内でどの E2 酵素がユビキチン分子の Parkin への受け渡しを担っているか不明であった。そこでまず、ヒトゲノムに約 40 種類コードされている E2 酵素の内、代表的なもの 12 種類をクローニングし、膜電位低下時における Parkin との相互作用を観察することにした。一般的に、活性化した Parkin であっても E2 酵素からのユビキチン分子の受け渡しは瞬時に行なわれると予想される。そのため、まず in cell でマイトファジー誘導時特異的に活性化型 Parkin と E2 酵素との相互作用を安定化する必要がある、その実験系を構築した。ユビキチン分子は E2 酵素から Parkin の C431 残基に転移することがわかっている。そこで、Parkin の C431 をアラニン残基で置換した。E2 酵素からのユビキチン分子の転移をブロックすることで Parkin と E2 酵素との相互作用を安定化できるのではないかと考えた。さらに細胞内で Parkin と E2 酵素の相互作用を可視化するため、Fluoppi と呼ばれる技術に応用した。Fluoppi は細胞内で目的タンパク質間の相互作用を蛍光輝点として検出する方法である。ホモ 4 量体を形成するアザミグリーンに E2 酵素の一つである UbcH7 を付加し、ホモ多量体を形成する Ash タグに Parkin

(C431A)変異体を付加させた。UbcH7 は in vitro 解析から Parkin にユビキチン分子を受け渡すことができる E2 酵素であることがわかっていて、そして、それらをコードする遺伝子をプラスミドとして HeLa 細胞に導入し、蛍光輝点が観察されるかを調べた。通常の培養条件下ではアザミグリーンを付加した UbcH7 も Ash タグを付加した Parkin もサイトゾルに局在し、両者の相互作用を示す蛍光輝点は観察されなかった。これはサイトゾルの Parkin が不活性型で、E2 酵素である UbcH7 と相互作用できないためと考えられた。一方、バリノマイシンを添加してミトコンドリア内膜の膜電位を人為的に低下させると Parkin がミトコンドリアへとリクルートし、それと同時に UbcH7 に付加したアザミグリーンが蛍光輝点として観察された。この蛍光輝点はミトコンドリア外膜タンパク質のマーカーである TOMM20 と共局在したため、Parkin と UbcH7 が損傷ミトコンドリア上で相互作用していることがわかった。Fluoppi 技術で Parkin と UbcH7 の相互作用が in cell で観察されたため、その他の E2 酵素についても同様の方法を適用し、Parkin と相互作用し、ユビキチン分子を受け渡すことができる E2 酵素のスクリーニング・同定を試みた。その結果、活性化型 Parkin と最も効率よく結合する E2 酵素は UbcH5a, UbcH5b および UbcH5c であることがわかった。また、UbcH6 や Rabd6B も UbcH7 と同程度に、活性化型の Parkin と相互作用することを見出した。特に UbcH6 は通常の培養条件下では核内に局在しているが、マイトファジーを誘導すると核外に出て Parkin と相互作用することがわかった。

次に UbcH7 の立体構造から Parkin の RING1 ドメインとの相互作用に必要であると予想されるアミノ酸残基を選択し、それらの変異体を発現できるプラスミドを作成した。上述の Fluoppi を適用したところ、いくつかの変異体において、蛍光輝点の形成が阻害され、Parkin と相互作用できなくなる変異体が取得できたことが示唆された。そこで、in vitro の実験系で、これら UbcH7 変異体が野生型 UbcH7 と同様に損傷ミトコンドリアをユビキチン化することができるかを検討した。ミトコンドリアは培養細胞から単離し、E1 酵素、UbcH7, Parkin およびユビキチンは大腸菌からリコンビナントタンパク質として精製した。まず、通常の培養条件下で培養した細胞から単離したミトコンドリアを用いると、いかなる条件でもミトコンドリアのユビキチン化は観察できなかった。次にあらかじめバリノマイシン処理した細胞からミトコンドリアを単離した場合、野生型の UbcH7 を加えた場合においてのみミトコンドリアのユビキチン化が観察された。一方、Fluoppi で蛍光輝点が形成できなかった UbcH7 変異体では、ミトコンドリアのユビキチン化も阻害されることが判明した。従って Fluoppi の実験から Parkin と相互作用できなくなった UbcH7 変異

体では、Parkin の損傷ミトコンドリアのユビキチン化もできなくなることがわかった。

これまで、E2 酵素と E3 酵素の相互作用は主に in vitro 実験系で解析されてきたが、本研究で構築した方法はその相互作用を in cell で検出できるという点において新規性が高い。

次に、この技術を免疫応答に重要である LUBAC 複合体のサブユニットである HOIP に応用した。HOIP も Parkin と同様、RBR 型 E3 酵素に分類されている。Ash タグを付加した HOIP とアザミグリーンを付加した UbcH7 を培養細胞に発現させたところ、Parkin と同様、通常の培養条件下では UbcH7 に付加したアザミグリーンの蛍光輝点は観察できなかった。一方、TNF-alpha を添加すると、数分でアザミグリーンの蛍光輝点が形成された。従って、HOIP も TNF-alpha の刺激依存的に活性化し、UbcH7 と結合することが示唆された。また同時に、この技術が RBR 型 E3 酵素と E2 酵素の相互作用を調べる上で非常に有用な技術であることを示している。

さらにこの技術を適用することで、ある RBR 型 E3 酵素は核内で活性化し、複数のリング状の構造を形成することを見出した。また別の RBR 型 E3 酵素は、脂肪滴に局在することを見出した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1) Yamano, K., Wang, C., Sarraf, S.A., Münch, C., Kikuchi, R., Noda, N.N., Hizukuri, Y., Kanemaki, M.T., Harper, W., Tanaka, K., Matsuda, N., and Youle, R.J.

Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy.

*Elife* (2018) 7:e31326 (32 page)

査読有

doi: 10.7554/eLife.31326.

2) Matsuda, N., Kimura, M., Queliconi, B.B., Kojima, W., Mishima, M., Takagi, K., Koyano, F., Yamano, K., Mizushima, T., Ito, Y., and Tanaka, K.

Parkinson's disease-related DJ-1 functions in thiol quality control against aldehyde attack in vitro.

*Sci. Rep.* 7:12816 (2017)

査読有

doi: 10.1038/s41598-017-13146-0.

3) Sato, Y., Okatsu, K., Saeki, Y., Yamano, K., Matsuda, N., Kaiho, A., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Ishikawa, M., Hashimoto, Y., Tanaka, K., and Fukai, S.

Structural basis for specific cleavage of Lys6-linked polyubiquitin chains by USP30.

*Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 911-919 (2017)

査読有

doi: 10.1038/nsmb.3469.

4) Kojima, W., Kujuro, Y., Okatsu, K., Bruno, Q., Koyano, F., Kimura, M., Yamano, K., Tanaka, K., and Matsuda, N. Unexpected mitochondrial matrix localization of Parkinson's disease-related DJ-1 mutants but not wild-type DJ-1.

*Genes Cells* **21**, 772-788 (2016)

査読有

doi: 10.1111/gtc.12382.

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Koji Yamano

Positive Feedback Ubiquitylation Cycles upon Parkin-mediated Mitophagy

OsakaMito2017 –International Workshop on Mitochondrial Dynamics-

2017 年

2) Koji Yamano

Positive Feedback Ubiquitination Cycles upon Parkin-mediated Mitophagy

2017 International Protein Metabolism & Disease Conference

2017 年

3) Koji Yamano, Richard J. Youle, Keiji Tanaka, and Noriyuki Matsuda

Autophagosome morphogenesis upon Parkin-mediated mitophagy

The 13<sup>th</sup> Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and the 16<sup>th</sup> Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine [J-mit]

2016 年

4) 山野 晃史, 松田憲之, Richard J. Youle, 田中 啓二

マイトファジーにおけるオートファゴソーム形成機構

第 89 回日本生化学会大会 3S01-4

2016 年

〔図書〕(計 1 件)

1) 山野 晃史

マイトファジー：Parkin/PINK1 によるダメージ認識とユビキチン化

実験医学 (羊土社) Vol. 35, No11, page 1794-1799 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所・ユビキチンプロジェクトホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/protein/>

不良ミトコンドリアを分解する新しい仕組みを解明

<http://www.igakuken.or.jp/topics/2018/0123.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 晃史 (YAMANO, Koji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：30547526

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし