

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06237

研究課題名(和文) Parkinの活性化と膜移行の再構成系および素反応の解析

研究課題名(英文) Reconstitution of Parkin activation and recruitment to target membrane

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・基礎医科学研究分野・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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの品質管理は細胞の恒常性維持にとって必要不可欠である。遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物であるParkinとPINK1は膜電位の低下した不良ミトコンドリアを認識し、その外膜にユビキチンを付加させる。本研究ではこの反応におけるE2酵素を同定し、Parkinの活性化と膜への移行を再構成することを目的とした。in cellでParkinと相互作用するE2酵素を複数同定し、単離ミトコンドリアを利用したユビキチン化反応を再構成した。本研究で構築した手法はユビキチンとオートファジーを橋渡しするアダプターの機能解析にも応用し、OPTNがATG9Aと相互作用するという発見につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダメージを受けた不良ミトコンドリアを適切に除去することは細胞の恒常性維持に重要であり、その機能が破綻するとパーキンソン病などの神経変性疾患に陥る。本研究は不良ミトコンドリアを選択的に分解・除去するParkinとPINK1の機能解析に焦点を当てた。そしてParkinの活性化に必要なユビキチン結合酵素を複数同定し、ミトコンドリアのユビキチン化反応を再構成した。また、不良ミトコンドリアがオートファジーによって正しく認識されるための新規な相互作用(OPTN-ATG9A)を見出した。これらの成果は不良ミトコンドリア分解の根本的理解の一助となった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial quality control is an essential process to maintain cell homeostasis. Parkin and PINK1, gene products mutated in a genetic Parkinsonism play critical roles in ubiquitination of mitochondrial outer membrane proteins, which leads to elimination of damaged mitochondria via autophagy. In this study, I aimed to identify E2 enzymes for Parkin and reconstitute Parkin activation followed by membrane association. I identified several E2 enzymes that interact with activated Parkin and reconstituted Parkin-mediated ubiquitination reactions using isolated mitochondria. I also applied these methods for the discovery of novel interactions between OPTN, one of the autophagy adaptors, and ATG9A.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ユビキチン オートファジー マイトファジー Parkin PINK1

## 1. 研究開始当初の背景

膜電位の低下した不良ミトコンドリアを選択的に除去することは細胞の生存に極めて重要である。研究開始当初から遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物である Parkin (ユビキチンリガーゼ) と PINK1 (ユビキチンを基質とするキナーゼ) が不良ミトコンドリアの選択的分解に必須であることがわかっていた。申請者もその機能解析を行い、PINK1 の通常時の分解機構や不良ミトコンドリア上で PINK1 が蓄積する分子メカニズムを解明してきた。これまでの解析から不良ミトコンドリア上で活性化した PINK1 はミトコンドリア外膜上のユビキチンをリン酸化し、サイトゾルの Parkin はリン酸化ユビキチンとの相互作用を介して外膜上にリクルートされ、PINK1 のリン酸化によって活性化し、ミトコンドリア外膜上のさまざまなタンパク質をユビキチン化すると考えられている。高度にユビキチン修飾された不良ミトコンドリアはその後、オートファジーアダプターによって認識され、隔離膜をリクルートすると考えられている。これまで上記の反応に必要な因子は siRNA などのノックダウンや CRISPR/Ca9 でのノックアウトで、その必要性が検証されてきたが、Parkin の活性化とユビキチン化反応を再構成した研究は報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では Parkin や PINK1 およびユビキチン反応系の因子を使って、Parkin の膜へのリクルートとユビキチン化反応を再構成することを目的とする。特にユビキチン反応系には Parkin (ユビキチンリガーゼ) の他に E1 酵素 (ユビキチン活性化酵素) と E2 (ユビキチン結合酵素) が必要不可欠である。しかし、E2 はヒトゲノムに 30 種類以上コードされている。そのため、どの E2 酵素が Parkin の活性化に必要なかについて検討することも目的とした。

## 3. 研究の方法

E2 酵素はヒトゲノムに 30 種類以上コードされている。E2 酵素は互いに機能の重複が考えられるため、例えば、特定の E2 酵素に対する siRNA を用いて、Parkin の不良ミトコンドリアへのリクルート阻害を観察するという従来の方法では E2 酵素の特定は期待できない。また、E2 は Parkin と異なり、ユビキチン分子を Parkin に受け渡すとすぐに不良ミトコンドリアから離れてしまうため、単純な顕微鏡観察では、E2 の不良ミトコンドリアへの移行を調べることができない。そこで本研究では Parkin と E2 酵素の相互作用を Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions) で検出する実験系を開発した。具体的にはホモ四量体を形成するアザミグリーンを E2 酵素に、ホモ多量体を形成する Ash タグを Parkin にそれぞれ融合させた。通常の培養条件下、つまりミトコンドリアが正常の場合は Parkin と E2 酵素は相互作用しないため、両者ともサイトゾルに拡散して存在するはずである。一方で、Parkin は不良ミトコンドリア上で PINK1 によるリン酸化を受けると、構造変化が誘起され、E2 酵素との相互作用面が露出する。したがって、不良ミトコンドリア上でのみ Parkin と E2 との相互作用が観察されると期待される。E2 は Parkin と相互作用するとユビキチンを Parkin の Cys431 に受け渡す。そこで Parkin と E2 の相互作用を安定化させるために、本研究では Parkin の Cys431 をアラニンに置換した変異体を使用した。

さらに本研究では、Parkin と PINK1 とユビキチン反応系を大腸菌のゲノムに組み込み、Parkin の膜への移行を再構成する系の構築も行なった。

## 4. 研究成果

まずヒトゲノムにコードされている 28 種類の E2 酵素の遺伝子をクローニングし、アザミグリーンとの融合タンパク質を発現できるプラスミドを作成した。また、Parkin C431A 変異体には Ash タグを遺伝的に融合させた。通常の培養条件ではアザミグリーンを付加した E2 も Ash を付加した Parkin もサイトゾル (一部の E2 は核内または小胞体膜上) に局在した。一方、培養細胞にバリノマイシンを添加して人為的に膜電位を消失させると Parkin のミトコンドリアへのリクルートが観察され、いくつかの E2 については Parkin とともにミトコンドリアへとリクルートし、そこで蛍光輝点を形成することがわかった (図)。Ash

タグを付加していない Parkin は膜電位の消失に伴い、不良ミトコンドリアにリクルートされるが、アザミグリーンを付加しない E2 酵素 (Parkin と相互作用することがすでに報告されている UBE2L3 であっても) は、そのようなリクルートがほとんど観察されなかったため、Parkin と E2 の相互作用を検出するためには Fluoppi システム用のタグが融合される必要があることが確かめられた。顕微鏡観察で不良ミトコンドリア上で Parkin とともに蛍光起点を形成する E2 を網羅的に調べ、その強度を定量したところ、予想よりも多くの E2 酵素が Parkin と相互作用することが判明した。

次に Fluoppi の実験系で Parkin と相互作用することがわかった E2 酵素は、大腸菌で発現させ、リコンビナントタンパク質を調整した。また、ユビキチン反応系に必要な E1 酵素と Parkin、ユビキチンも大腸菌で発現させ、リコンビナントタンパク質を調整した。さらに内在性の Parkin を発現しない HeLa 細胞をバリノマイシンで処理した後、分画によりミトコンドリアを単離した。そして ATP 存在下で単離ミトコンドリアと上記のリコンビナントタンパク質をインキュベートさせた。その結果、TOMM20 や MitoNEET などのミトコンドリア外膜タンパク質が高度にユビキチン化されることがわかった。さらに Fluoppi の解析で Parkin と相互作用することがわかった E2 酵素はそのほとんどが Parkin 依存的なミトコンドリアのユビキチン化も誘導できることが確かめられた。

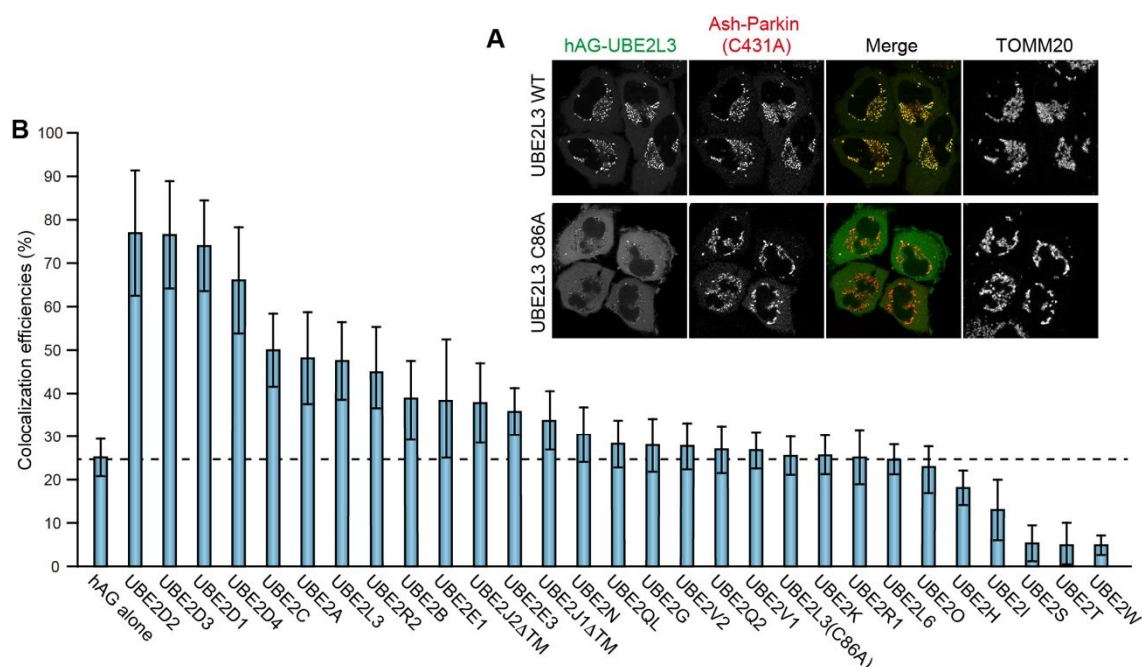


図: Fluoppi を用いた Parkin と E2 酵素の細胞内相互作用解析  
 (A) hAG-UBE2L3 と Ash-Parkin(C431A) を HeLa 細胞に発現させ、バリノマイシンを添加してミトコンドリアの膜電位を消失させ、3 時間後に細胞を固定し、免疫染色を行なった。野生型の UBE2L3 (WT) は Parkin とともにミトコンドリア上で輝点を形成したが、ユビキチンと結合できない C86A 変異体はミトコンドリアへリクルートされなかった。この結果は Parkin は E2 酵素のみでなく、E2 に結合したユビキチンも認識していることを示唆している。  
 (B) さまざまな E2 酵素について (A) と同様の実験を行い、マイトファジー依存的な E2 酵素のミトコンドリア移行を定量した。

さらにユビキチン化反応に必須となる E1 酵素、E2 酵素、ユビキチンが大腸菌に導入して、ユビキチン化反応の一部を再構成することができた。具体的には非還元条件下で E2 と Ub がチオエステル結合でつながったダイマーを観察することができたため、大腸菌内でユビキチンが E1 を介して E2 に受け渡されることが確認できた。さらに大腸菌の内膜にアンカーさせた PINK1 は、大腸菌内でユビキチンをリン酸化できることもわかった。この条件で Parkin を発現させたが、発現量が過剰であったため、膜への集積を確認するには至らなかった。Parkin や PINK1 の発現を厳密に調整する必要があったため、SD 周辺配列に変異を導入したが、改善には繋がらなかった。

さらに本研究で改良した Fluoppi アッセイをオートファジーアダプターに応用することで予想外の発見につながった。オートファジーアダプターはヒトでは 5 種類 (OPTN、NDP52、TAX1BP1、p62、NBR1) が知られているが、ミトコンドリア分解における個々の役割については不明な部分が多く残されていた。特にミトコンドリア分解においては OPTN と NDP52 が必須であることが知られているが、なぜそれら 2 種類が必須アダプターとなりう

るかの理由が不明であった。細胞内でアザミグリーンを融合したオートファジーアダプターと Ash タグを融合したタンデムユビキチン鎖を発現させ、人工的に Fluoppi を形成させると、OPTN の場合のみオートファジー必須タンパク質である ATG9A が、Fluoppi 輝点にリクルートされることがわかった。これは OPTN が LC3 のみならず ATG9A とも相互作用し、不良ミトコンドリア上での隔離膜形成を促進していることを示唆している。ATG9A と相互作用する OPTN の領域を絞りこみ、N 末端近傍のロイシンジッパーが責任ドメインであることを突き止めた。さらに OPTN のロイシンジッパーに変異を導入するとミトコンドリア分解が阻害されることがわかった。これらの結果から OPTN は LC3 に加えて ATG9A も不良ミトコンドリア上にリクルートさせる能力があることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koyano, F., Yamano, K., Kosako, H., Kimura, Y., Kimura, M., Fujiki, Y., Tanaka, K., and Matsuda, N.	4. 巻 20
2. 論文標題 Parkin-mediated ubiquitylation redistributes MITOL/March5 from mitochondria to peroxisomes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201947728.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koyano, F., Yamano, K., Kosako, H., Tanaka, K., and Matsuda, N.	4. 巻 294
2. 論文標題 Parkin recruitment to impaired mitochondria and unspecified ubiquitylation are facilitated by MITOL	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 10300-10314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.006302.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamano, K., Kikuchi, R., Kojima, W., Hayashida, R., Koyano, F., Kawawaki, J., Shoda, T., Demizu, Y., Naito, M., Tanaka, K., and Matsuda, N.	4. 巻 219
2. 論文標題 Critical Role of Mitochondrial Ubiquitination and the OPTN-ATG9A Axis in Mitophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201912144.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohnishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., and Okamoto, K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104705.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamano, K., and Youle RJ.	4. 巻 16
2. 論文標題 Two different axes CALCOCO2-RB1CC1 and OPTN-ATG9A initiate PRKN-mediated mitophagy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 2105-2107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1815457.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山野 晃史
2. 発表標題 ストレスに応答した損傷ミトコンドリアの選択的分解
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Yamano
2. 発表標題 Mitochondrial Degradation: Dance with Ubiquitin and Autophagy
3. 学会等名 AUS-OsakaMito2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Yamano
2. 発表標題 Critical Roles of Ubiquitin and Autophagy Adaptors in Mitochondria-Selective Degradation
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ユビキチンプロジェクトHP  
<http://www.igakuken.or.jp/protein/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------