

令和元年6月2日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04750

研究課題名(和文) ユビキチンが制御するミトコンドリア品質管理の構造生物学

研究課題名(英文) Structural biology of mitochondrial quality control regulated by ubiquitin

研究代表者

佐藤 裕介 (Sato, Yusuke)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：50568061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の発症要因の1つとして不良ミトコンドリアの蓄積が報告されている。不良ミトコンドリアの蓄積は細胞の変性を引き起こすため、マイトファジーにより選択的に分解される。このミトコンドリアの分解シグナルは、PINK1とParkinによる、ユビキチン(Ub)のリン酸化とポリUb化である。一方、脱Ub化酵素USP30は、ミトコンドリア外膜上のUb鎖を切断してマイトファジーを抑制する。また、USP30は8種類存在するUb鎖のうち、K6結合型Ub鎖に特異性を持つ。本研究ではPINK1およびUSP30-K6結合型Ub鎖複合体の結晶構造を決定し、それぞれの機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化と、それに伴うパーキンソン病患者の増加から、パーキンソン病関連の研究は国内外問わず注目を集めている。パーキンソン病の原因遺伝子産物であるPINK1とParkinによるUb鎖合成と、USP30によるUb鎖除去がミトコンドリア品質管理の制御に関わる。その活性化、および抑制機構は細胞生物学と生化学的手法により示されてきたが、詳細な分子メカニズムについては不明な点も多かった。本研究によるPINK1によるParkin活性化メカニズムや、USP30によるUb鎖除去メカニズムの解明はパーキンソン病の発症の理解をするために重要である。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of damaged mitochondria is reported as one of the factors of parkinsonism. PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) and the E3 ubiquitin (Ub) ligase parkin are essential for ubiquitylation of damaged mitochondria and subsequent degradation. PINK1 phosphorylates Ser65 of Ub and the Ub-like (UBL) domain of parkin to allosterically relieve the autoinhibition of parkin. On the other hand, USP30 deubiquitinase opposes parkin-mediated Ub-chain formation on mitochondria by preferentially cleaving Lys6-linked Ub chains. In this study, we determined the crystal structures of PINK1 in complex with a nonhydrolyzable ATP analogue and USP30 in complex with Lys6-linked Ub chain.

研究分野：タンパク質X線結晶構造解析

キーワード：ユビキチン 結晶構造解析 パーキンソン病 マイトファジー オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は国内だけでも約 15 万人もの患者がいる、進行性の神経変性疾患である。高齢になるほど有病率が高くなるため、社会の高齢化に伴って患者数は増加しつづけており、その発症メカニズムの解明と根本的な治療法の確立が社会的に強く望まれている。

パーキンソン病には複数のタイプがあり、発症要因の 1 つとして不良ミトコンドリアの蓄積が報告されている。ミトコンドリアは酸化的リン酸化によるエネルギー産生の他、細胞周期やアポトーシスの調節など多様な機能を持つ重要な細胞内小器官であるが、常に酸化ストレスに曝されるため傷害を受ける。PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) は傷害を受け膜電位が低下した不良ミトコンドリアの外膜に蓄積する。外膜上で複合体を形成した PINK1 は parkin の Ubl (Ubiquitin-like) ドメインとユビキチン (Ub) をリン酸化することで、parkin のミトコンドリアへの移行と活性化を誘導する。活性型 parkin は Ub 鎖を不良ミトコンドリアの外膜へと付加し、最終的にミトコンドリア上に蓄積した Ub 鎖がマイトファジーによる分解シグナルとして働き、不良ミトコンドリアは分解される。ミトコンドリアに局在する脱 Ub 化酵素 USP30 は Ub 鎖を除去することで、マイトファジーに拮抗的に働く。このようにミトコンドリア品質管理におけるユビキチン修飾について近年非常に解析が進んでいるが、PINK1 の複合体形成メカニズムや、基質のリン酸化メカニズムは不明であった。また、USP30 は 8 種類存在する Ub 鎖のうち、Lys6 結合型 Ub 鎖 (Lys6 鎖) に対し特異的な活性を有するが、USP30 による Lys6 結合型 Ub 鎖切断のメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

(1) USP30 と Lys6 結合型 Ub 二量体 (Lys6-Ub₂) との複合体の結晶構造を決定する。得られた結晶構造から、USP30 が Lys6 結合型 Ub 鎖特異的な切断活性を持つメカニズムを解明する。

(2) PINK1 の結晶構造を決定する。得られた結晶構造から、PINK1 による基質のリン酸化メカニズムを解明する。

本研究による PINK1 による Parkin 活性化メカニズムや、USP30 による Ub 鎖除去メカニズムの解明はパーキンソン病の発症の理解をするためにも重要である。

3. 研究の方法

(1) USP30 と Lys6-Ub₂ との複合体の構造・機能解析

USP30 と Lys6-Ub₂ との複合体の結晶構造解析

野生型の USP30 を用いると、結晶が成長する前に Lys6-Ub₂ は Ub 単量体へと分解されてしまうため、USP30 の触媒残基であるシステイン (Cys73) をアラニンに置換した不活性型変異体を作成した。また、Lys6 結合型 Ub 鎖を特異的に合成する酵素は見つかっていないため、Lys6-Ub₂ は、Lys6 と Lys48 結合型 Ub 鎖の 2 種類を特異的に合成する E3 である NleL を用いて Ub を反応させ、余計な Lys48 結合型ユビキチン鎖を Lys48 結合型 Ub 鎖特異的な脱ユビキチン化酵素である OTUB1 で除去する事で合成した。それぞれ調製した不活性型 USP30 と Lys6-Ub₂ を混合後に結晶化を行い、最終的にゼブラフィッシュ由来の USP30 と Lys6-Ub₂ との複合体の結晶が得られた。得られた結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 にて X 線回折データセットを収集した。データ収集後、プログラム MOLREP を用いて分子置換により位相を決定し、原子モデルの構築および修正にはプログラム COOT を用いた。構築した原子モデルはプログラム PHENIX を用いて精密化した。

変異体 USP30 の機能解析

USP30 と Lys6-Ub₂ との複合体の結晶構造から明らかとなった相互作用に関わる残基に変異を導入し、USP30 の Lys6-Ub₂、Lys11-Ub₂ に対する切断活性の速度論的解析を蛍光偏光法により行った。さらに、変異体 USP30 によりミトコンドリア外膜上の 8 種類の Ub 鎖の量が細胞内ではどのように変化するかを定量した。具体的には、CRISPR-Cas9 システムを利用して USP30 をノックアウトした HeLa 細胞を作成し、この細胞を用いて parkin と変異体 USP30 の安定発現細胞株を作成した。この細胞に対して CCCP 処理をすることでミトコンドリアに損傷を与えると、parkin によりミトコンドリア上に Ub 鎖が付加される。一方で、この Ub 鎖は変異体 USP30 により切断されるため、質量分析計を用いてこの Ub 鎖の量を定量する事で、変異体 USP30 によりミトコンドリア外膜上の 8 種類の Ub 鎖の量がどのように変化するのが解析できる。この実験は、東京都医学総合研究所の田中先生・佐伯先生のグループとの共同研究により行った。

(2) PINK1 の構造・機能解析

PINK1 の結晶構造解析

ヒト由来の精製 PINK1 は不安定で活性がないのに対し、一部の節足動物由来の精製 PINK1 が活性を有することが報告されていたため、コクヌストモドキ由来の PINK1 を用いた。野生型 PINK1 は自己リン酸化により不均一なリン酸化を受けるが、試料の不均一性は結晶化を阻害する。しかし、自己リン酸化を防ぐためにリン酸化の活性中心を潰してしまうと、PINK1 は凝集しやすくなり結晶化に向かない。そこで、自己リン酸化を主に受ける PINK1 のセリン、スレオ

ニン残基を質量分析により明らかにし、セリンをアスパラギン酸、スレオニンをグルタミン酸に置換した。加えて、フォスファターゼによる処理でわずかに残ったリン酸化を除去する事により、結晶化に適した均一な PINK1 を調製した。この PINK1 と非加水分解性 ATP アナログである AMP-PNP を混ぜて結晶化を行った。最終的に得られた PINK1 の結晶を用いて SPring-8 にて X 線回折実験を行い、構造決定を行った。位相決定はセレノメチオニン置換体を用いた異常分散法により行った。

変異体 PINK1 の機能解析

結晶構造から予測される、PINK1 のリン酸化活性や Ub 認識に関わる残基に変異を導入し、Ub に対するリン酸化活性を Phos-tag PAGE により解析した。また、PINK1 をノックアウトした HeLa 細胞に、変異体 PINK1 を発現させ、parkin と Ub の結合を確認した。

4 . 研究成果

(1) USP30 と Lys6-Ub₂ との複合体の構造・機能解析

USP30 と Lys6-Ub₂ の結晶構造を 1.87 Å 分解能で決定した (図 1a)。Lys6-Ub₂ の 2 つの Ub のうち、結合に C 末端グリシンを使用している Ub を先端側 Ub、そうでない方を近傍側 Ub と呼ぶが、USP30 は両方の Ub と同時に結合し、USP30 の活性中心 (Cys73) が Ub 鎖の切断部位に接近していた (図 1b)。また、USP30 による先端側 Ub の認識は、これまで報告されている USP ファミリーと同様のメカニズムであった。一方、USP30 による近傍側 Ub の認識はこれまで報告された USP の構造では見られない、新規のメカニズムであった。

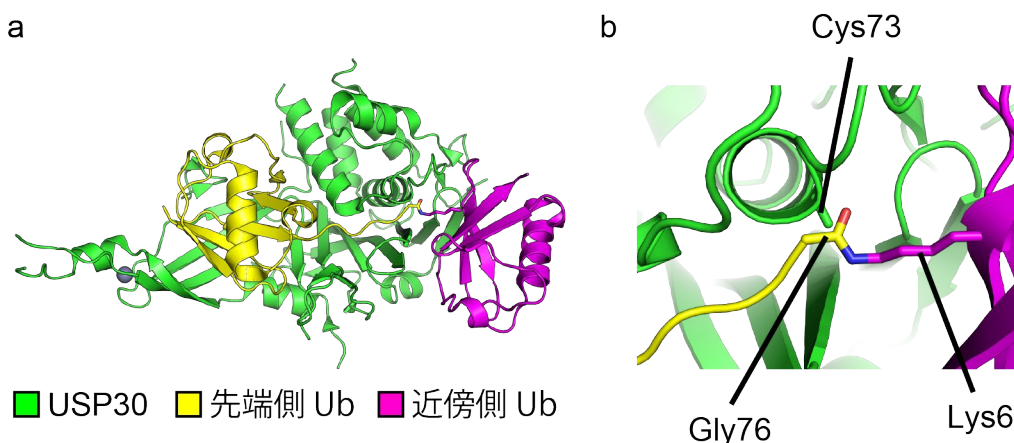


図 1 USP30 と Lys6-Ub₂ との複合体の結晶構造

つづいて、USP30 と Lys6-Ub₂ との相互作用に関わる残基に変異を導入し、USP30 の Lys6-Ub₂、Lys11-Ub₂ に対する切断活性の速度論的解析を行った。その結果、先端側 Ub との相互作用領域に変異を導入すると、USP30 の活性は Lys6、Lys11-Ub₂ どちらに対しても減少した。一方、近傍側 Ub との相互作用領域に変異を導入すると、USP30 の切断活性は Lys6-Ub₂ に対しては減少する一方、Lys11-Ub₂ に対しては影響が小さかった。この結果から、先端側 Ub の認識は Ub 鎖の切断に寄与し特異性への影響は無いが、近傍側 Ub の認識は Lys6 鎖への切断活性のみ上昇させる事で、USP30 の Lys6 鎖特異的切断に寄与しているという事が明らかとなった。

変異体 USP30 を安定発現させた細胞内の、不良ミトコンドリア外膜上の Ub 鎖の量を質量分析計により定量したところ、USP30 は 8 種類の Ub 鎖の内、Lys6 鎖の量のみを顕著に減少させる事が確かめられた。さらに、先端側 Ub、近傍側 Ub どちらの相互作用領域に変異を導入した場合でも、ミトコンドリア外膜上の Lys6 鎖の割合が上昇した。この実験により、結晶構造中で確認できた相互作用が、細胞中でも実際に機能しているという事が裏付けられた (Sato *et al.*, Nature Struct Mol Biol., 2017)。

(2) PINK1 の構造・機能解析

コクヌストモドキ由来の PINK1 の自己リン酸化部位を解析したところ、Ser205、Ser377、

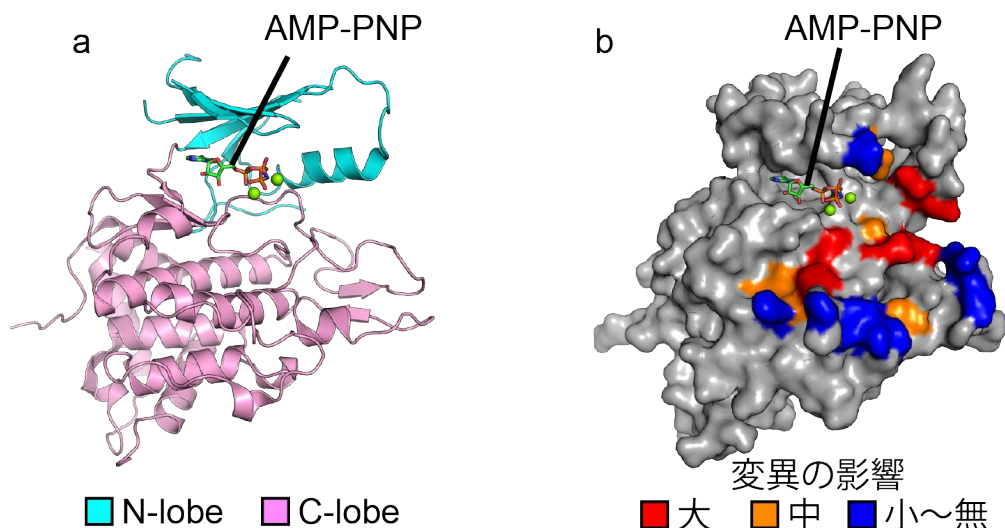


図2 USP30 と Lys6-Ub₂ との複合体の結晶構造

Thr386、Thr530 の 4 残基が主に自己リン酸化修飾を受ける事がわかった。これら 4 残基を酸性残基に置換した (S205D, S377D, T386E, T530E) PINK1 を、フォスファターゼ処理により完全にリン酸化修飾を除去し、AMP-PNP との複合体として結晶構造を 2.53 Å 分解能で決定した (図 2a)。PINK1 は N-lobe と C-lobe からなり、AMP-PNP は N-lobe と C-lobe の間の溝に結合していた。基質が結合すると考えられる溝は、同じキナーゼファミリーに属する protein kinase A や protein kinase C と比べると広く、これは PINK1 の基質である Ub や parkin の Ubl ドメインが入り込むのに適した広さであると考えられる。また、Ub のリン酸化修飾を受ける領域はネガティブチャージを持っているのに対し、PINK1 の Ub が結合すると予想される領域はポジティブチャージを持ち、この電荷の差が両者の結合を促進すると考えられる。

つづいて、PINK1 の Ub 結合部位と予想される領域に変異を導入し、変異体 PINK1 による Ub のリン酸化活性を解析したところ、リン酸化の触媒反応に直接関与しない多くの残基の変異において、リン酸化活性の低下が見られた (図 2b)。したがって、これらの残基は Ub の認識に関与すると考えられる。これらの Ub を認識すると考えられる残基の多くはヒト PINK1 においても保存されており、ヒト PINK1 においても重要な残基であると予想された。そこで、これらの変異と同様の変異をヒト PINK1 にも導入し、細胞内で parkin (C431S) と Ub の結合を解析した。PINK1 は Ub をリン酸化する事で、parkin (C431S) を活性化させ、活性化 parkin (C431S) は Ub とエステル結合を形成する。しかし、これらの変異体 PINK1 は parkin (C431S) と Ub の結合をほとんど促進しなかった。したがって、Ub 結合部位と予想される領域への変異は、ヒト細胞内においても Ub のリン酸化および parkin の活性化を減弱する事が確かめられた (Okatsu *et al.*, *Sci Rep.*, 2018)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Takahashi TS, **Sato Y**, Yamagata A, Goto-Ito S, Saijo M, *Fukai S, "Structural basis of ubiquitin recognition by the winged-helix domain of Cockayne syndrome group B protein", *Nucleic Acids Res*, 47(4), 3784-3794, 2019 (査読有)

DOI: 10.1093/nar/gkz081.

Yamagata A, Goto-Ito S, **Sato Y**, Shiroshima T, Maeda A, Watanabe M, Saitoh T, Maenaka K, Terada T, Yoshida T, *Uemura T, *Fukai S, "Structural insights into modulation and selectivity of transsynaptic neurexin-LRRTM interaction", *Nature Commun*, 9(1), 3964, 2018 (査読有)

DOI: 10.1038/s41467-018-06333-8.

Okatsu K, **Sato Y**, Yamano K, Matsuda N, Negishi L, Takahashi A, Yamagata A, Goto-Ito S, Mishima M, Ito Y, Oka T, Tanaka K, *Fukai S, "Structural insights into ubiquitin phosphorylation by PINK1", *Sci Rep*, 8(1), 10382, 2018 (査読有)

DOI: 10.1038/s41598-018-28656-8.

Chang JW, **Sato Y**, Ogawa T, Arakawa T, Fukai S, *Fushinobu S, *Masaki H, "Crystal structure of the central and the C-terminal RNase domains of colicin D implicated its translocation

pathway through inner membrane of target cell", *J Biochem*, 164(5), 323-339, 2018 (査読有)
DOI: 10.1093/jb/mvy056.

Yamagata A, Miyazaki Y, Yokoi N, Shigematsu H, **Sato Y**, Goto-Ito S, Maeda A, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Shirouzu M, Fukata Y, *Fukata M, *Fukai S, "Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LGI1-ADAM22", *Nature Commun*, 9(1), 1546, 2018 (査読有)
DOI: 10.1038/s41467-018-03947-w.

Goto-Ito S, Yamagata A, **Sato Y**, Uemura T, Shiroshima T, Maeda A, Imai A, Mori H, *Yoshida T, *Fukai S, "Structural basis of trans-synaptic interactions between PTPδ and SALMs for inducing synapse formation.", *Nature Commun*, 9(1), 269, 2018 (査読有)
DOI: 10.1038/s41467-017-02417-z.

Takahashi TS, Hirade Y, Toma A, **Sato Y**, Yamagata A, Goto-Ito S, Tomita A, *Nakada S, *Fukai S, "Structural insights into two distinct binding modules for Lys63-linked polyubiquitin chains in RNF168", *Nature Commun*, 9(1), 170, 2018 (査読有)
DOI: 10.1038/s41467-017-02345-y.

Sato, Y, Okatsu K, Saeki Y, Yamano K, Matsuda N, Kaiho A, Yamagata A, Goto-Ito S, Ishikawa M, Hashimoto Y, Tanaka K, *Fukai S, "Structural basis for specific cleavage of Lys6-linked polyubiquitin chains by USP30", *Nature Struct Mol Biol*, 24(11), 911-919, 2017 (査読有)
DOI: 10.1038/nsmb.3469.

Goto-Ito S, Yamagata A, Takahashi TS, **Sato Y**, *Fukai S, "Structural basis of the interaction between Topoisomerase IIIβ and the TDRD3 auxiliary factor", *Sci Rep*, 7, 42123, 2017 (査読有)
DOI: doi: 10.1038/srep42123.

Chen J, Yamagata A, Kubota K, **Sato Y**, Goto-Ito S, *Fukai S, "Crystal structure of Sec10, a subunit of the exocyst complex", *Sci Rep*, 7, 40909, 2017 (査読有)
DOI: 10.1038/srep40909.

Kimura S, Yamashita M, Yamakami-Kimura M, **Sato Y**, Yamagata A, Kobashigawa Y, Inagaki F, Amada T, Hase K, Iwanaga T, *Ohno H, *Fukai S, "Distinct Roles for the N- and C-terminal Regions of M-Sec in Plasma Membrane Deformation during Tunneling Nanotube Formation.", *Sci Rep*, 6, 33548, 2016 (査読有)
DOI: 10.1038/srep33548.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. **佐藤裕介**, 高橋富雄, 深井周也
「ユビキチン鎖が制御する複雑なシステムの構造基盤」
第91回 日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 2018年9月

2. **佐藤裕介**
「USP30によるLys6結合型ユビキチン鎖特異的切断機構の構造的基盤」
ConBio2017, 神戸ポートアイランド, 2017年12月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/SRR0LifeSciDivJp2/Top.html>

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：尾勝 圭

ローマ字氏名：Okatsu Kei

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。