

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16068

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼParkinによる触媒機構の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for catalytic mechanism of ubiquitin ligase Parkin

研究代表者

尾勝 圭 (Okatsu, Kei)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：00739641

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)：Parkinはユビキチンリガーゼ(E3)である。Parkinは膜電位の低下したミトコンドリア上で活性化して、ミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化を触媒する。しかし、触媒メカニズムには不明な点が残されている。本研究では、ParkinのE3活性に必要な最小領域を特定した。E2スクリーニングを実施して、ParkinのE3活性に必要なE2を同定した。更にE2とParkinの酵素活性ドメインの構造情報から触媒に重要な残基を探索した。このように、生化学実験や立体構造に基づいた触媒機構の理解を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は高齢になるほど発症確立が高くなるので、高齢化社会において原因遺伝産物の機能を理解することは重要である。Parkinは若年性パーキンソン病の原因遺伝子産物であり、酵素活性がその機能に重要であることが知られている。本研究では、E2の認識や活性中心とユビキチン鎖の関係を生化学実験や立体構造に基づいて理解した。

研究成果の概要(英文)：Parkin is a ubiquitin ligase E3 that is activated on mitochondria at reduced membrane potential to catalyze the ubiquitination of mitochondrial outer membrane proteins. However, the catalytic mechanism remains unclear. In this study, we identified the minimal region required for E3 activity of Parkin. The E2 required for the E3 activity of Parkin was identified by the screening of recombinant E2. Furthermore, we searched for residues important for catalysis based on the structural information of E2 and the catalytic domain of Parkin. Thus, we have obtained an understanding of the catalytic mechanism based on biochemical experiments and steric structure.

研究分野：生命科学

キーワード：ユビキチン化 リン酸化 パーキンソン病 ミトコンドリア オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年発症の家族性パーキンソン病の原因遺伝子 Parkin は、PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) と協調して、膜電位の低下した不良ミトコンドリアを分解へ導く細胞内機能が知られている。Parkin はユビキチン連結酵素 (ユビキチンリガーゼ, E3) であり、RING 型 E3 と HECT 型 E3 を合わせた特徴をもつ。PINK1 はタンパク質リン酸化酵素であり、Parkin とユビキチンをリン酸化する。リン酸化ユビキチンは Parkin の E3 酵素活性の活性化を引き起こす。不良ミトコンドリア分解において、Parkin によって形成されたユビキチン鎖はオートファジー (マイトファジー) の引き金になる。これまでに、PINK1-Parkin の酵素活性制御機構とマイトファジーに関わる細胞内での動態を中心に解析されてきた。しかし、Parkin によるユビキチン鎖形成に関わる重要な分子機構は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Parkin によるユビキチン転移機構とユビキチン連結様式に関する解析を行い、Parkin によるユビキチン鎖形成における触媒メカニズムを明らかにすることである。E2 の選択性や、Parkin 依存的に複数種類のユビキチン鎖が生じる理由は未解明である。E2 の選択性は E2 と RING2 の相互作用やユビキチンと Parkin の活性中心の側鎖の位置を把握することが、また、ユビキチン鎖の形成はユビキチンのリジン残基と Parkin の活性中心の位置関係を把握することが必要である。そのために生化学的な実験と構造情報の両面からユビキチン鎖形成時の触媒機構に関する理解を深める必要があった。

3. 研究の方法

細胞内ではユビキチン化関連酵素を分けて解析するのは困難であるため、*in vitro* で精製タンパク質を用いたユビキチン化アッセイ (E3 アッセイ) 行う。Parkin の E3 酵素活性を測定するために、大腸菌にユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、Ub、Parkin、PINK1 をそれぞれ発現させて精製する。精製は His タグや GST タグを用いたアフィニティー精製とイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせる。Parkin の活性化因子 (リン酸化 Ub; pUb) は、PINK1 で Ub をリン酸化した後に再精製する。E3 アッセイ系を確立した後は最小化 Parkin を作製する。E2-Ub は、E2 と Ub を E1 の酵素活性で結合させた後に、再び精製する。E2-Ub のチオエステル結合は不安定なので、E2 の活性中心のシステイン残基をセリン残基やリシン残基に置換した変異体 (CS 体や CK 体) を用いて安定にする。構造解析によって相互作用部位や触媒に必要な残基の情報を得る。点変異を導入して相互作用や活性に与える影響を検証する。また、単体構造上の表面に露出している残基やパーキンソン病患者から検出された変異部位を基に変異を導入して解析する。

4. 研究成果

In vitro E3 アッセイに必要な E1、E2、Ub、Parkin、PINK1 をそれぞれ大腸菌に発現させて、アフィニティー精製、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムク

ロマトグラフィーを組み合わせることで高純度の精製タンパク質を大量に作製した。pUb は精製 Ub と精製 PINK1 を用いてリン酸化反応を行った後で、再精製を行うことで作製した。これらの高純度タンパク質を使用して、pUb 依存的に Parkin の E3 活性を検出できる反応条件を確立した。ヒトとラット、昆虫の Parkin の N 末端に GST-tag や His-tag を融合したコンストラクションを作製した。複数の N 末端欠損変異体を作製し、発現量の良好な欠損変異体を取得した。構造解析で利用される全長と RING0-RING1-IBR-RING2 (R0RBR) と RING2 近傍は発現が良好であったのもの、RBR や IBR-RING2 は発現が悪かった。また全長に関してはユビキチン様 (UBL) ドメインのリン酸化が知られていて、リン酸化を模倣した S65E 体も作製した。これまで Parkin の *in vitro* E3 アッセイでは、細胞内で見られるようなリン酸化ユビキチンの依存性が無くなる問題点があった。今回、生化学的解析の反応条件を精査することで活性化因子であるリン酸化ユビキチン依存的に活性化する反応条件を確立することができた。この実験系では恒常的活性化変異を導入することで活性が上昇し、E2 との結合が減弱する変異で反応が遅くなることも確認できた。また PINK1 でリン酸化した Parkin では E3 活性が最も強力になり、リン酸化と比較すると E3 活性が劣るもののリン酸化模倣変異でも野生型と比較して明らかに E3 活性が強まっていることが検証できた。このような結果から生体内での反応に近い E3 活性測定が行えているものと考えられる。さらに Parkin の E3 活性に必要な最小化ドメインを数残基レベルで特定した。その領域には 3 ヶ所の患者由来の変異が含まれていることが明らかになった。次に、E2-Ub 作製は精製した E1、E2、Ub を用いて反応させた後に再精製することで大量に作製することができた。E2-Ub の反応中間体は不安定であるために、安定化するためには E2 の活性中心のシステイン残基をセリン残基やリシン残基に変異させる必要があり、本研究では、それらの変異体のコンストラクションを作製し、E1、E2、Ub の適切な反応条件を確立した。特に、セリン残基に置換した場合は中性付近で中間体の形成がよく進み、リシン残基に置換した場合は塩基性付近で中間体の形成がよく進む傾向があった。その後中間体が最もよく形成できる条件で E2-Ub を合成し、再精製を行うことで、大量の中間体を得ることができた。さらに溶液中での複合体形成を確認するために Parkin と pUb、E2-Ub のプルダウンアッセイを行い、Parkin R0RBR では三者複合体が形成できていることを確認した。また、Parkin-Ub の反応中間体を作製するために、Parkin の活性中心 431 番目のシステイン残基をセリン残基に置換した変異体 (C431S 変異体) のコンストラクションを作製し、タンパク質を精製した。E3 アッセイと同様の反応系で Parkin-Ub の合成を試みたが、結晶化を行うのに十分な量のタンパク質を得ることができなかった。また、化学的な反応による作製法も検討した。まず、脱ユビキチン化酵素によるユビキチンの C 末端の加水分解反応を利用して、光架橋可能なユビキチンプローブを作製した。Parkin の最小ドメインと混合し、UV を照射することで架橋を行った。活性中心のシステインとの反応を期待したが、非特異的な架橋状態が多数引き起こってしまい、結晶化を行うための均一なタンパク質を得ることはできなかった。最終的には Parkin の R0RBR ドメインや R2 ドメイン (最小ドメイン) と E2-Ub やユビキチン鎖を用いて、自動ナノリッター分注システムを使い、1 つの組み合わせに対して約 1000 条件の結晶化作業を行った。また、温度条件などの条件検討も行い共結晶化を試みた。結晶は得られたが、Parkin が含まれていないものや、良好な回折像が得られなかった。一方で、全種類の精製 E2 を用いて Parkin の E3 活性に必要な E2 のスクリーニングを *in vitro* E3 アッセイで行った。その結果、Parkin の E3 活性が強く観察できる E2 と、E3 活性が観察できない E2 が存在していた。Parkin の E3 活性に

おける E2 の選択性を観察することができた。Parkin の E3 活性を観察できる E2 の構造情報を整理して、E2 との相互作用に必要な残基を探索した。また、Parkin と E2-Ub の結合を検出することができた。パーキンソン病患者由来の変異体や恒常的活性型変異体を用いて、pUb 依存的な酵素活性の減弱や亢進を検出できた。立体構造の観点から精査すると Parkin の RING2 ドメインと類似の構造をもつユビキチン認識タンパク質があり、ユビキチン認識残基の比較検討を行うことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kei Okatsu, Noriyuki Matsuda, Shuya Fukai
2. 発表標題 PINK1 activation by its unconventional localization to the outer mitochondrial membrane
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------