

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04342

研究課題名(和文) PINK1/リン酸化ユビキチンによるユビキチン転移酵素Parkinの活性化機構

研究課題名(英文) Activation mechanism of ubiquitin ligase parkin by PINK1 and phosphorylated ubiquitin

研究代表者

菅瀬 謙治 (Sugase, Kenji)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00300822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：E3酵素のparkinは損傷ミトコンドリアを分解に導く役割を担う。parkinは自身がリン酸化され、かつリン酸化ユビキチンが結合することによって活性化する。すでに不活性型と活性型parkinの結晶構造が明らかであるが、その動的な活性化機構は明らかでない。そこで、本研究ではNMRを用いてparkinの動的な活性化機構の解明を目指した。NMR測定では大量の安定同位体標識試料が必要であるが、parkinをM9培地で培養すると常に不溶化画分に発現した。そのため、ここでは不溶化したparkinを巻き戻す方法論を確立した。同手法で得たparkinは単量体でかつユビキチン化活性を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性パーキンソン病患者の多くにparkinの変異が報告されている。parkinの機能不全がパーキンソン病発症に直結するため、parkinの反応機構の解明はパーキンソン病の発症機構の解明や疾患の治療薬の創出につながると期待されている。そして、その実現にはNMRによるparkinの研究が不可欠である。これまでNMR研究用の安定同位体標識parkinの大量調製は極めて困難であったが、本研究ではその基盤となる安定同位体標識parkinの大量試料調製を可能とした。そのため、今後のNMR研究によりparkinの活性化機構の理解が深まることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Parkin, an E3 ubiquitin ligase, regulates mitophagy pathway by conjugation of ubiquitin chains on damaged mitochondria. Parkin is activated by phosphorylation and binding of phosphorylated ubiquitin. Although tertiary structures of parkin in the autoinhibited and activated states have been determined, its activation mechanism remains unclear, especially dynamic processes in activation are still elusive. In this study, we aim at elucidating structural dynamics of parkin by NMR to reveal the activation mechanism. For NMR measurements, a large amount of isotope-labeled protein is required, but parkin was obtained only in insoluble fractions in *E. coli* when we used M9 media. Here, we established a refolding method of parkin, in which insoluble parkin was solubilized by denaturant and the denaturant was removed gradually. The refolded parkin was monomeric and had ubiquitination activity.

研究分野：生物物理学

キーワード：parkin リフォールディング 大量発現系 NMR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは、不要蛋白質の目印であるポリユビキチン修飾として有名であるが、最近、ポリユビキチンとは全く異なるユビキチンの形態としてリン酸化ユビキチンが発見された。リン酸化酵素 PINK1 によって Ser65 がリン酸化されたユビキチンは、損傷ミトコンドリア上でユビキチン転移酵素 parkin を活性化する。続いて、活性型 parkin がミトコンドリア膜上の蛋白質をユビキチン化することによってマイトファジーを誘導する（図1）。リン酸化ユビキチンが新規な形態であることだけでなく、PINK1 と parkin が常染色体劣性遺伝若年性パーキンソン病の原因蛋白質であることから、リン酸化ユビキチン/PINK1/parkin のシステムは多くの研究者から注目されている。そのため関連する研究の競争は熾烈で、例えば、リン酸化ユビキチンの機能解析に関する論文は、今年の同時期に Nature<sup>1</sup> を含む3つの科学雑誌に報告された。parkin のリン酸化や parkin の結晶構造に関する論文も同様で、ほぼ同時期に複数のグループから報告されている。

最近、報告された parkin の結晶構造では、活性中心である Cys431 とユビキチン結合酵素 E2 結合部位が parkin 自身の他の領域によって阻害されていた（図1）。この自己阻害を解除するためには、リン酸化ユビキチンが parkin と結合することに加えて、parkin のユビキチン様（UBL）ドメインにある Ser65 が、ユビキチンと同じく PINK1 によってリン酸化される必要がある。しかし、この Ser65 も構造中に埋もれており、容易に PINK1 がアクセスできるようには見えない。したがって、parkin の活性化には大きな構造変化を伴うことが強く示唆される。申請者らがこれまでに実施した等温滴定カロリーメトリー（ITC）実験からも、ユビキチン-parkin 相互作用には大きなエントロピー変化（構造変化）が生じることが示された。しかし、現在のところ、どのようなドメイン配置の変化があるのか？といった、より詳細な parkin の活性化機構は不明である。

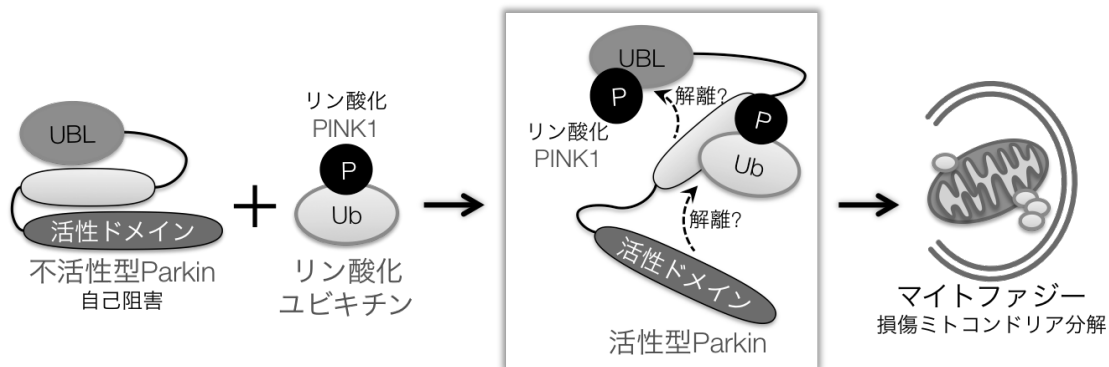


図1 parkin の活性化モデル

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の3つの課題に取り組み、PINK1 による parkin のリン酸化とリン酸化ユビキチンの結合が引き起こす parkin の活性化機構を動的構造の観点から解明する。

### (1) ユビキチンと parkin の結合能の解析

ITC を用いてユビキチン-parkin 相互作用を巨視的な熱力学的パラメータ（解離定数  $K_d$ 、エンタルピー変化  $\Delta H$ 、エントロピー変化  $\Delta S$ ）で記述する。とくに、ユビキチンと parkin のそれぞれに対するリン酸化が、どのように結合能に影響を及ぼすのかを明らかにする。現在のところ、S65D ユビキチンと S65E parkin を、それぞれのリン酸化ミミック体として実験に用いている。これらの変異体は、分子生物学的な実験から parkin を活性化することが確認されている。しかし、ITC や NMR などの高い定量性を誇る物理化学的な実験においても、これらが十分にリン酸化体をミミックしているか否かは不明である。そこで、本研究では、化学合成およびリン

酸化酵素 PINK1 との共発現系を用いて、リン酸化ユビキチンとリン酸化 parkin を調製して ITC 実験に用いる。得られた結果の評価と蛋白質の調製の容易さを考慮して、続く実験で用いるユビキチンと parkin のコンストラクトを決定する。

## (2) リン酸化ユビキチン-リン酸化 parkin の相互作用解析と parkin の動的構造解析

NMR を用いてユビキチンと parkin の相互作用解析を行う。まずは滴定実験を行い、ユビキチンと parkin の相互作用部位を特定する。とくに、ユビキチンと parkin のそれぞれに対するリン酸化がどのように相互作用に変化をもたらすかを明らかにする。また、parkin を活性化するためには、PINK1 とリン酸化ユビキチンが parkin のドメイン-ドメイン間に入り込む必要があるが、不活性型 parkin の結晶構造ではドメイン-ドメイン間は閉じていて、容易に他の蛋白質がアクセスできるようには見えない。このことは、静止した結晶中とは異なり、溶液中では parkin のドメイン-ドメイン間が過渡的に開いて、PINK1 とリン酸化ユビキチンが結合できるようになることを示唆する。本研究では、このように想定される parkin の過渡的な構造揺らぎを、緩和分散法などの NMR による動的構造解析法を用いて詳細に解析する。なお、緩和分散法は、揺らぎの大きさと速度を定量化できる NMR 法で、過渡的に形成される低存在比状態を検出できる。申請者らは、緩和分散法による蛋白質の動的構造解析で多くの実績を有する。

## (3) リン酸化ユビキチン-リン酸化 parkin の複合体構造の決定

リン酸化ユビキチンがリン酸化 parkin と結合した活性型 parkin の結晶構造を決定する。結晶構造が得られたならば、parkin とユビキチン結合酵素 E2 および基質となるユビキチンとの結合モデルを構築する。また、parkin は損傷ミトコンドリア上に局在することが知られているため、その局在機構についても得られた構造に基づいて考察する。

## 3. 研究の方法

研究開始当初、parkin の大量発現系は大腸菌を用いたシステムが確立していた。しかし、LB 培地では可溶化画分に parkin が発現して問題なかったが、NMR 用の安定同位体標識試料を M9 培地で調製しようとする、試した限りの条件では常に不溶化画分に発現された。そのため、本研究では、まずは不溶化画分に発現される parkin を可溶化しリフォールディングすることに取り組んだ。以下にその詳細を述べる。

### (1) parkin の大量発現、可溶化、リフォールディング

ヒト parkin の RORBR 領域 (141-465 番目の残基) に His-SUMO タグを組み込んだ cDNA 断片をプラスミド pET21a に挿入し、大腸菌発現ベクターを作製した。この発現ベクターを大腸菌株 BL21 (DE3) に形質転換した。アンピシリンナトリウムを添加した 100 mL M9 培地中で 15 時間、37°C で振盪培養した後に、2 L M9 培地に植え継いだ。濁度 (OD<sub>660</sub>) が 0.8 に達した時点で IPTG を終濃度 0.2 mM となるように添加し、37°C で 3 時間発現誘導をかけた。培養後の大腸菌を 5000 rpm で 20 分間遠心し、菌体を回収した。

超音波破砕機で大腸菌を破砕後、上清と不溶性画分を遠心分離した。不溶性画分を可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl, 6 M Guanidine-HCl, 10 mM β-ME, pH 9.0) に懸濁し、25°C で 1 時間静置した。その後、再度遠心分離によって上清と不溶性画分を分離し、上清を Ni-NTA Agarose で精製した。粗精製した parkin を濃度が 0.5 mg/ml になるように希釈し、4°C でバッファー組成を以下の様に変えながら段階的に透析した。

- ① 4 M 尿素, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -ME で 3 時間透析
- ② 2 M 尿素, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -ME, 400 mM L-arginine, 5  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> で 3 時間透析
- ③ 1 M 尿素, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -ME, 400 mM L-arginine, 5  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> で 12 時間透析
- ④ 0.5 M 尿素, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -ME, 400 mM L-arginine, 5  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> で 12 時間透析
- ⑤ 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -ME, 400 mM L-arginine, 5  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 12 時間透析
- ⑥ 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.5 mM TCEP で 6 時間透析

透析した溶液を回収し、0.45  $\mu$ m フィルターを通したのちに陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q HP) で精製した。精製後の溶液に SENP 酵素を加え、4 °C で終夜静置して His-SUMO タグを切断した。反応液をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (HiLoad 26/60 Superdex 75) または GSH アフィニティクロマトグラフィー (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow) および金属アフィニティクロマトグラフィー (Ni-NTA Agarose) で精製した。

## (2) 活性評価

リフォールディングにより調製した parkin の活性を評価するために、バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) 中に 4 mM ATP, 0.2  $\mu$ M E1 酵素 (Uba1), 2  $\mu$ M E2 酵素 (UbcH7), 0.6 mM ユビキチンを混合し、終夜 37°C で parkin の自己ユビキチン化反応を行った。

## (3) NMR 測定

NMR 測定にはクライオプローブ付き Avance II 700 (Bruker) を用いた。1D <sup>1</sup>H NMR 測定と 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N hetero-nuclear single quantum coherence (HSQC) 測定を行った。なお、NMR 用の試料を調製する際には M9 培地に 1 g/L の濃度で <sup>15</sup>N 塩化アンモニウムを唯一の窒素源として添加した。

## 4. 研究成果

### (1) リフォールディングによる parkin の調製

不溶性画分に発現した parkin を可溶化、精製した後にリフォールディングを行った。透析の過程で、2 M 尿素的透析の段階で透析膜内が白濁することが確認された。これは parkin が凝集することが原因であると判断し、2 M 尿素への透析の段階から凝集抑制剤である L-arginine と parkin の構造の形成に必要な ZnCl<sub>2</sub> を加え透析を行った。この結果、2 M 尿素でも凝集しないようになった。

透析終了後の陰イオン交換クロマトグラフィーでは二つの分子種に分けることができた (図 2A)。この二つの分子種について SDS-PAGE を行ったところ、両者ともに目的タンパク質の分子量付近にバンドが確認された (図 2B)。続いて、Native-PAGE を行ったところ、一方では単一のバンドが確認されたが、もう一方ではゲル上部にバンドが複数重なっていることが確認された (図 2C)。このバンドの重なりは、タンパク質が凝集したことを示す。以上の結果から、リフォールディングによって単量体の parkin が得られたことが示唆された。

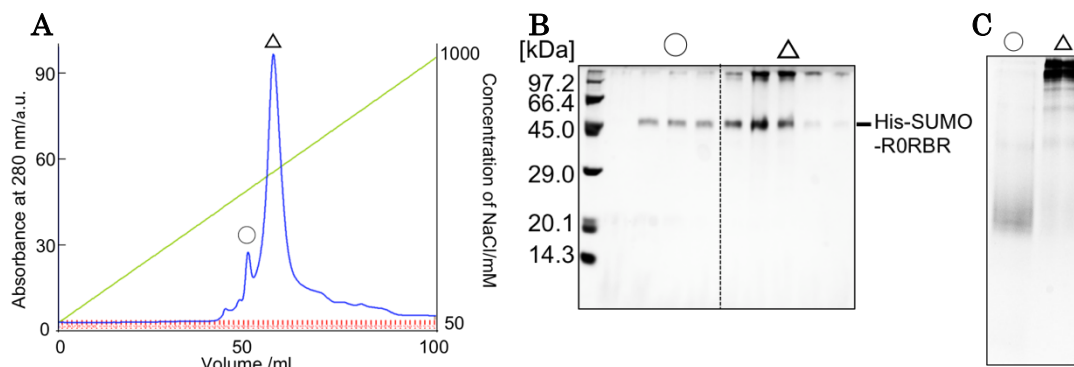


図2. リフォールディングにより得られた parkin の精製

次に、リフォールディングで調製した parkin に SENP 酵素を加えて、His-SUMO タグを切除した。反応液を用いて SDS-PAGE を行ったところ、His-SUMO タグと parkin (R0RBR) 単体のバンドが確認された(図3)。

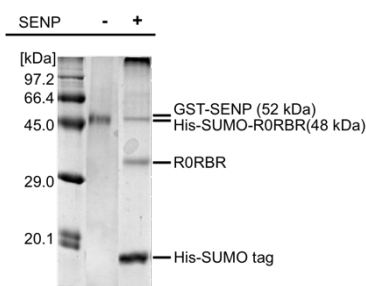


図3 His-SUMO タグの切断

## (2) 活性評価

parkin は自己ユビキチン化活性を持ち、自身を基質としてユビキチン分子を修飾することができる。巻き戻しによって調製した parkin も酵素活性部位が正常な構造をとっていれば、自己ユビキチン化できるはずであるため、酵素活性があるか否かを自己ユビキチン化反応によって確認した。その結果、ATP を加えた条件において parkin (R0RBR) 単体の分子量より高分子量のバンドが確認された(図4)。これは自己ユビキチン化反応が進行し、1つまたは2つのユビキチンが結合したためであると考えられる。この結果から、巻き戻しによって得られた parkin は正常な立体構造を形成していることが確認できた。

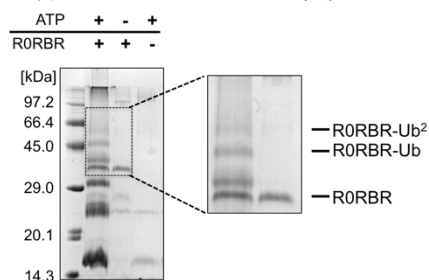


図4 parkin の酵素活性

## (3) parkin の NMR 測定

最終精製後の parkin の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した(図5黒)。今のところ詳細な解析を行うために十分な感度を得られていない。また、SUMO だけの HSQC スペクトルを測定したところ、parkin のシグナルと一部重なった(図5緑)。このことは、SENP によって切断した His-SUMO タグがゲル濾過クロマトグラフィーによって除去仕切れていないことを意味する。

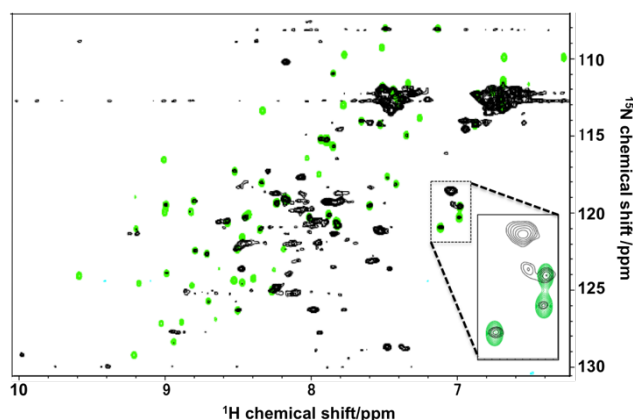


図5 parkin の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル

parkin はユビキチンと結合するが、SUMO とユビキチンの構造が類似しているため、His-SUMO タグが parkin と結合したまま精製されたためと考察される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Walinda E., Morimoto D., Sugase K. (2018) Resolving biomolecular motion and interactions by  $R_2$  and  $R_{1\rho}$  relaxation dispersion NMR. *Methods* **148**, 28-38, 査読有.
- ② Walinda E., Sugase K. (2018) Overview of relaxation dispersion NMR spectroscopy to study protein dynamics and protein-ligand interactions. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **92**(1) e57, 査読有.
- ③ Walinda E., Morimoto D., Shirakawa M., Sugase K. (2017) Practical considerations for investigation of protein conformational dynamics by  $^{15}\text{N}$   $R_{1\rho}$  relaxation dispersion. *J. Biomol. NMR* **67**(3), 201-209, 査読有.
- ④ Walinda E., Morimoto D., Shirakawa M., Sugase K. (2017)  $F_1F_2$ -selective NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **68**(1), 41-52, 査読有.
- ⑤ Yanaka S., Moriwaki Y., Tsumoto K., Sugase K. (2017) Elucidation of potential sites for antibody engineering by fluctuation editing. *Sci. Rep.* **7**(1), 9597, 査読有.
- ⑥ Walinda E., Morimoto D., Sugase K., Shirakawa M. (2016) Dual Function of Phosphoubiquitin in E3 Activation of Parkin. *J. Biol. Chem.* **291**(32), 16879-16891, 査読有.
- ⑦ Furukawa A., Konuma T., Yanaka S., Sugase K. (2016) Quantitative analysis of protein-ligand interactions by NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **96**, 47-57, 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 菅瀬謙治 (2017)  $F_1F_2$ -Selective NMR Spectroscopy, 第56回 NMR 討論会.
- ② Sugase K. (2016) Elucidation of potential sites for antibody engineering by fluctuation editing., The 5th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR
- ③ 菅瀬謙治 (2016) NMRによる生体高分子の動的構造解析, 「柔らかな分子系」ワークショップ『ダイナミクス観測からタンパク質の「柔らかさ」を観る』.
- ④ Sugase K. (2016) Elucidation of Structural Dynamics of Di-Ubiquitin by NMR., ICMRBS2016.

[図書] (計1件)

- ① Walinda E., Sugase K. (2018) Chapter 7 Elucidating Functional Dynamics by  $R_{1\rho}$  and  $R_2$  Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy. *Experimental approaches of NMR spectroscopy -Methodology and application to life science and materials science-, Springer*

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：水谷 明洋

ローマ字氏名：Akihiro MIZUTANI

※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。