

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15078

研究課題名(和文) Parkinを活性化させるリン酸化Ubiquitinの構造揺らぎ機能相関研究

研究課題名(英文) Structure determination and pressure effects of major and minor conformations of phosphorylated ubiquitin

研究代表者

北沢 創一郎 (Kitazawa, Soichiro)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：50779030

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)：パーキンソン病関連タンパク質であるリン酸化されたユビキチンは二つの状態間で揺らいでいる。構造変化に敏感な高圧力NMR法によりその二つの状態間の体積差はほとんどないことが示された。また、分布率の大きいmajor状態においては非リン酸化ユビキチンの構造変化が保存されていることが示された。その一方で、minor状態においてはmajor状態にみられない構造変化が見られ、major-minor状態転移の中間状態の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸化ユビキチンは非リン酸化ユビキチンで機能していた一部のリガンドとの相互作用能が喪失していることが知られている。そのため、リン酸化ユビキチンと様々なリガンドとの相互作用とmajor-minor間の構造揺らぎの関係は興味深く、高圧力NMR法により解明されたminor状態転移への中間状態はその知見の一つになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin phosphorylated at Ser65 (pUb) is Parkin activator. Interestingly, two sets of NMR signals were observed in HSQC spectrum of pUb. The major form has a closely similar conformation to the wild type. On the other hand, the minor form has entirely different hydrogen bonding patterns at b-sheet region, in which b5-strand has retracted into the ubiquitin core region by two amino acid residues. The retracted minor conformation provides different interaction surface on the ubiquitin hydrophobic patch from that of the major one. Here, we report the analysis of conformational fluctuation of pUb using high-pressure NMR spectroscopy. Our results indicate that pressure-induced chemical shifts were markedly different at the b-sheet and a-helix regions between the major and minor ones, indicating that pressure-induced changes in hydrogen bond length and torsion angles are different at the b-sheet region.

研究分野：構造生物学

キーワード：Ubiquitin リン酸化Ubiquitin 構造揺らぎ

## 1. 研究開始当初の背景

一部のユビキチン様タンパク質は、PINK1 により S65 にリン酸化修飾を受ける。リン酸化ユビキチン(pUb)と Parkin のリン酸化ユビキチン様ドメインは、E3 リガーゼである Parkin を活性化させ、ミトコンドリアの品質管理にかかわる。(Iguchi et al. JBC 2013, Koyano et al. Nature 2014) 家族性パーキンソン病に強く関わる PINK1 と Parkin の機能不全がミトコンドリアの品質管理不全を生じ、異常なミトコンドリアが蓄積されることが、家族性パーキンソン病の原因の一つと考えられている。この機構は家族性パーキンソン病だけではなく孤発性パーキンソン病の発病モデルとしても注目されている。興味深いことに pUB 模倣変異体 S65E 及び S65D は、PINK1 を欠いた条件でも、PINK1 をバイパスし Parkin を活性化させる (Koyano et al. Nature 2014)。つまり、ユビキチンのリン酸化修飾そのものではなく、それに伴う三次元的な構造の変化が、Parkin の活性化することを示す。pUB-Parkin 複合体の結晶構造は、自己阻害活性を有する Ring0 が外れ、活性中心である C431 を有する Ring2 が露出する (Wauer et al. Nature 2015)。これは、Koyano らの活性化機構モデルを支持し、pUb と Parkin の相互作用機構に注目が集まっている。

興味深いことに、pUb は二つの conformation がおよそ 7:3 で存在し、水溶液中で構造的に揺らいでいる (Wauer et al. EMBO 2015)。また、Parkin の pUBL およびリン酸化ユビキチン模倣変異体 S65E 及び S65D では、マイナー状態は観測されない。Wauer らは、「S65E 及び S65D は、リン酸化ユビキチンのすべてを再現できていないかもしれない」と指摘している。X 線結晶構造解析により、リン酸化ユビキチンの Major 状態の立体構造は、野生型とほぼ同一である。一方、Minor 状態の立体構造は、NMR による化学シフト値解析・水素結合ペアの解析・いくつかの距離状態の解析・主鎖の緩和速度解析により、 $\beta_5$ -strand と  $\beta_1$ -strand および  $\beta_3$ -strand 間の水素結合パターンが 2 残基分スライドする。これらの  $\beta$ -strand は、ユビキチン表面に疎水性パッチを形成し、多数のタンパク質と相互作用する活性中心である。この構造の変化は、分子間相互作用やポリユビキチンへ影響すると予想できる。興味深いのは pUB-Parkin 複合体のリン酸化ユビキチンの立体構造は Major 状態とほぼ同一である点である。これは Minor 状態は、単純なタンパク質-タンパク質相互作用モデルである”鍵と鍵穴モデル”では、複合体形成を阻害すると予想され、機能的な存在意義に合理性が欠ける。また、Minor 状態は、上記のように幾つかの構造情報に基づいたモデルは示されたが、精密な原子座標決定には至ってなく、その転移機構も不明である。リン酸化ユビキチンの構造揺らぎを明らかにし、Parkin の認識機構を明らかにすることはパーキンソン病抑制機構の解明につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

Ser65 がリン酸化されたユビキチンは Parkin の活性化因子であり、ミトコンドリアの品質管理に関与している。pUb は水溶液中で 2 つの NMR 信号を与え、NMR 的に遅い交換による二状態の平衡状態にある。pUb の Major 状態の立体構造及び pUb の結晶構造は、非リン酸化ユビキチン(Ub)の立体構造と概ね一致している。一方、pUb の Minor 状態は、 $\beta_5$ -strand が二残基分スライドし、 $\beta_5$ -strand の N 末端側に存在する  $3_{10}$ -helix が伸長する。それに伴い  $\beta$ -sheet 領域の構造が変化している。リン酸化により一部のリガンドとの相互作用能が喪失するとの報告もあり、pUb と様々なリガンドとの相互作用と Major-Minor 間の構造揺らぎの関係は重要である。しかし、これまでにリン酸化ユビキチンの構造揺らぎについ

での十分な知見はない。本研究では構造変化に敏感な高圧力 NMR 法を用いたリン酸化ユビキチンの構造揺らぎ研究について明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 標識されたpUbを作成し、 $^1\text{H}$  950 MHz-NMR装置（大阪大学蛋白質研究所）を用いた三重共鳴実験によりMajor状態, Minor状態の信号を帰属した。 $^{15}\text{N}$  edited NOESY-HSQC,  $^{13}\text{C}$  edited NOESY-HSQCによる距離制限及びTALOS+による二面角角度制限、水素結合情報をもとにMajor状態とMinor状態の立体構造解析を行った。 $^{15}\text{N}$ 標識されたpUb及びS65D,S65Eを作成し $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを1気圧から2500気圧の範囲で測定した。

### 4. 研究成果

pUbの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを298 K, pH 7.2, 1 barをFig.1 に示す。各残基のMajor状態とMinor状態の信号強度比からMinor状態の存在比を計算すると1気圧でおよそ20%であり、1気圧から2500気圧までの範囲で分布率はほとんど変化しなかった(Fig.2)。この結果は、Major状態とMinor状態間の立体構造が大きく違うにも関わらず、二状態間の部分モル体積差( $\Delta V$ )は、非常に小さいことを示す。

次に各状態の圧力応答について着目する。Major状態の化学シフトの圧力応答は、Ubのそれと類似していた。Major状態とUbの1気圧と2500気圧の化学シフト差の相関をとると、その決定係数 $R^2$ は0.798( $^1\text{H}$ ), 0.958( $^{15}\text{N}$ )と相関がみられた(Fig.3 A,B)。また、化学シフトの圧力応答から天然状態 $N_1$ と準安定状態 $N_2$ 間のギブス自由エネルギー差  $\Delta G^0$ と体積差  $\Delta V^0$ は $4.1 \pm 0.1$  kJ/mol,  $-23 \pm 1$  ml/molと見積もられ、同条件でのUbの $\Delta G^0$ ,  $\Delta V^0$ は  $3.4$  kJ/mol  $\pm$   $0.1$  kJ/mol ,  $-24.7 \pm 0.8$  ml/mol (Kitazawa et al, *Biochemistry*, 2013)に非常に近い。これらUbとMajor状態の結果の類似性からUbで観測される $N_1$ - $N_2$ の状態転移がMajor状態でも存在することが示された。また、PINK1をバイパスするS65D,S65Eの化学シフト変化の圧力依存性はともにUb野生型と非常に類似しており( $R^2$ が0.9332( $^1\text{H}$  S65D), 0.974 ( $^{15}\text{N}$  S65D), 0.8809( $^1\text{H}$  S65E), 0.9653 ( $^{15}\text{N}$  S65E))、また、Minor状態を示す信号も観測されなかった。S65D及びS65EはMinor状態への転移が圧力によっては転移しないことが示唆された。

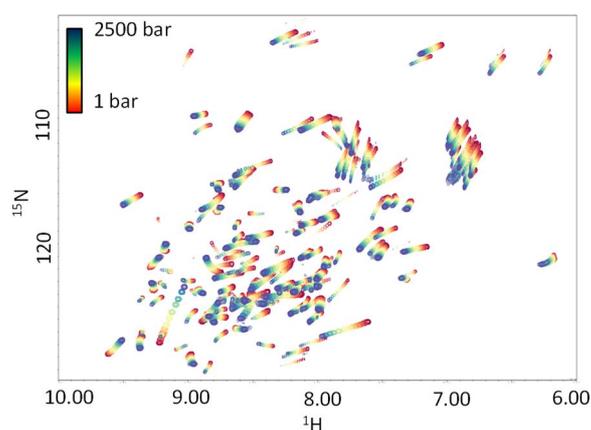


Fig.1 0.1–250 MPa における pUB の  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの変化

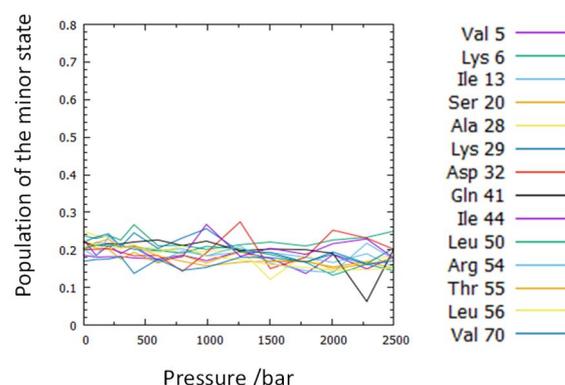


Fig.2 pUB の Minor 状態の分布率の圧力依存性

一方、Minor状態とUbの化学シフトの圧力応答は大きく異なった。両者の1気圧と2500気

圧の化学シフト差の相関は、 $R^2$ が0.172 ( $^1\text{H}$ ), 0.162 ( $^{15}\text{N}$ )と低く、相関がみられなかった(Fig. 3 C,D)。Minor状態で $3_{10}$ -helixが伸長形成した62-65アミノ酸残基で圧力摂動による大きな化学シフト変化(Fig. 4A)と信号強度の減弱(Fig. 4B)が観測された。これらのことからMinor状態ではUbにみられる状態転移は存在しないが、新たに形成された $3_{10}$ -helixにおいて局所的な構造変化が生じていることが示唆される(Fig. 5B)。また、化学シフト変化から見積もられたギブス自由エネルギー差  $\Delta G^0$ と体積差  $\Delta V^0$ は、 $1.5 \pm 1$  kJ/mol,  $-26 \pm 9$  ml/molと見積もられた。Fig. 5にNOESY NMR測定をもとに見積もられたMajor状態とMinor状態の立体構造と圧力により変化したアミノ酸残基を示す。大きく構造変化していたC末端残基を除く主鎖アミノ酸(1-70)のRMSDは0.046(Major), 0.536(Minor)であり十分に収束した。また、この構造はDongらによるリン酸化ユビキチンのそれぞれの状態の立体構造と非常に類似している (Dong et al, PNAS 2017)。化学シフト変化の圧力依存性はMajor状態においてはほとんど野生型と類似していたことから、野生型と同様にC末端 $\beta_5$ -strandと $\alpha$ -helixが変化した準安定状態が保存されていることを示唆する。それに対して、Minor状態は新たに形成された $3_{10}$ -helixが顕著な化学シフト変化をしていることが示された。これは $3_{10}$ -helixの安定性が低下していることを示唆する。一方で2残基分スライドしたMinor状態の $\beta_5$ -strandではほとんど化学シフト変化が観測されず、 $3_{10}$ -helixより安定であることから、Minor状態の中間状態はMajor状態の $\beta_5$ -strandがスライドしたが伸長した $3_{10}$ -helixが形成されていないMajor状態Minor状態間の中間状態であることが示唆された。またその体積変化 $\Delta V^0$ はMajor状態 ( $-23 \pm 1$  ml/mol) とMinor状態 ( $-26 \pm 9$  ml/mol) で類似していたことから圧力摂動によって分布率が増加するMajor状態とMinor状態の高エネルギー状態の存在がMajor Minor間の分布率を変化させなかったと考えられる。以上のことからリン酸化ユビキチンにおけるMajor Minor状態間の転移に関わる中間状態が明らかとなった。

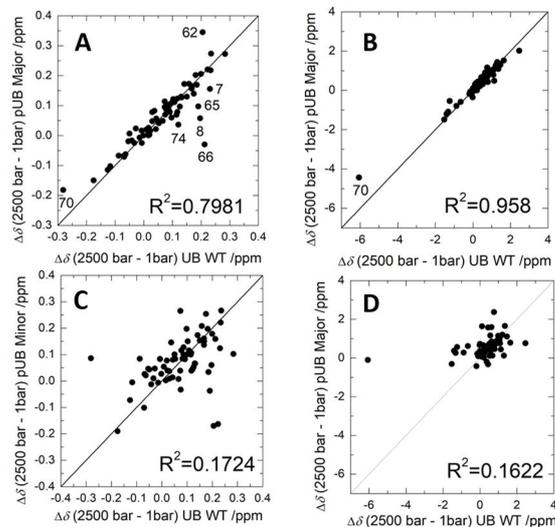


Fig. 3 ユビキチン野生型とリン酸化ユビキチンにおける 1 bar から 2500 bar の化学シフト差の相関

リン酸化ユビキチン Major 状態との(A) $^1\text{H}$ , (B) $^{15}\text{N}$  の化学シフト差。リン酸化ユビキチンの Minor 状態との(C) $^1\text{H}$ , (D) $^{15}\text{N}$  の化学シフト差

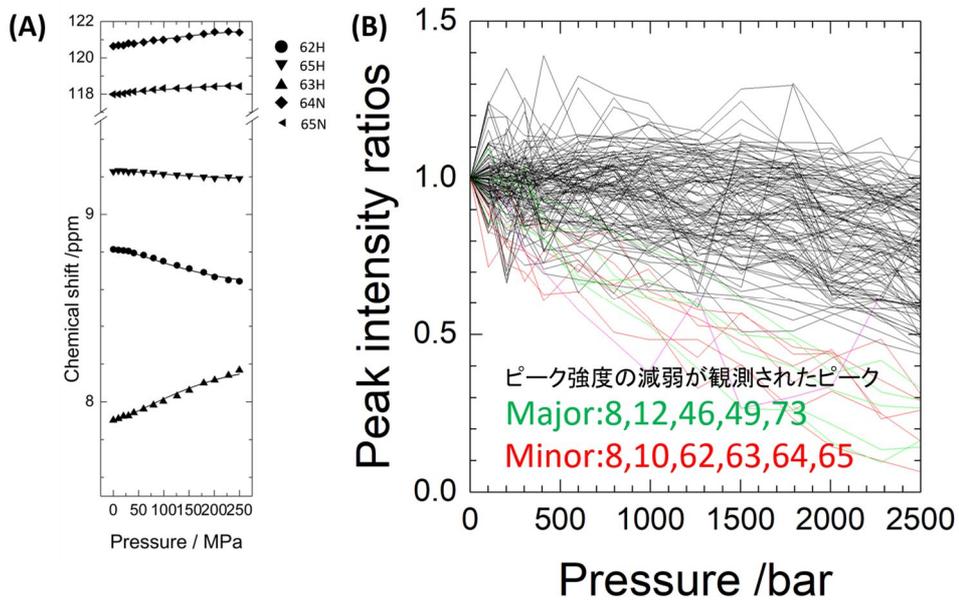


Fig. 4 リン酸化ユビキチン Minor 状態の圧力摂動による(A)化学シフト変化と(B)信号強度変化

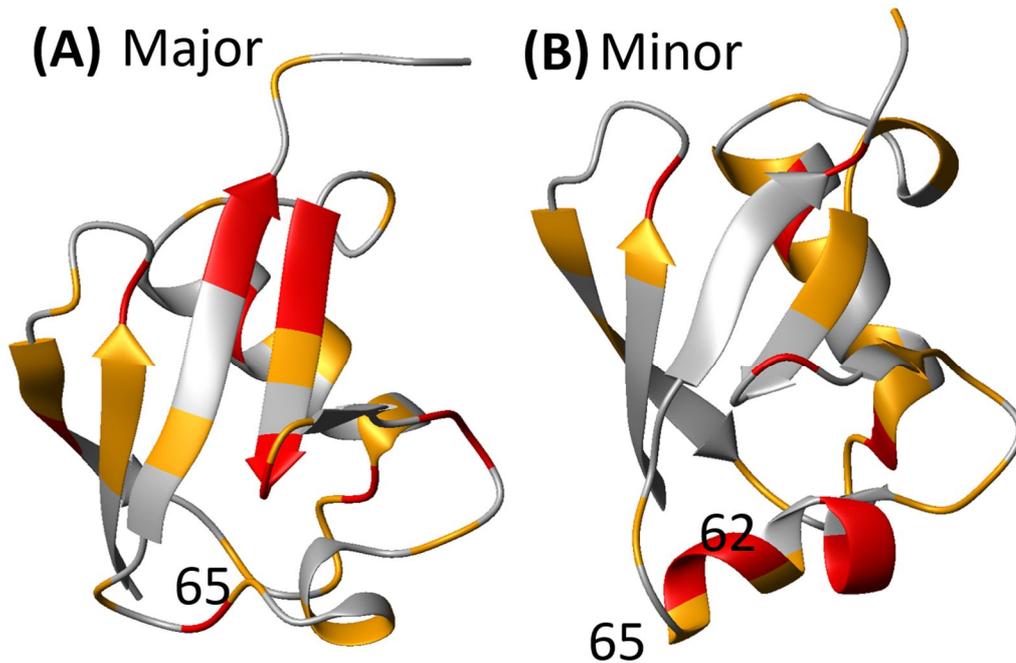


Fig. 5 リン酸化ユビキチンの(A)Major 状態と(B)Minor 状態の立体構造と圧力摂動により大きく化学シフト変化が観測された残基  
 赤 Chemical shift > 0.25 ppm, 橙 0.25 ppm > ΔChemical shift > 0.15 ppm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kitazawa Soichiro, Aoshima Yu, Wakamoto Takuro, Kitahara Ryo               | 4. 巻<br>115             |
| 2. 論文標題<br>Water-Protein Interactions Coupled with Protein Conformational Transition | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Biophysical Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>981 ~ 987 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bpj.2018.08.003                                 | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎、若本 拓朗、北原 亮                        |
| 2. 発表標題<br>高圧力NMR法によるコピキチンのコンフォメーション変化に伴う水和状態に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第140回年会                             |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎、若本 拓朗、北原 亮                                      |
| 2. 発表標題<br>高圧下におけるコピキチンの水-アミド水素交換反応:H/D Exchange & CLEANEX-PM NMR |
| 3. 学会等名<br>第58回NMR討論会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎、若本 拓朗、北原 亮   |
| 2. 発表標題<br>Water-protein interactions coupled with protein conformational transition |
| 3. 学会等名<br>第57回日本生物物理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎、青島 佑、若本 拓郎、北原 亮                                       |
| 2. 発表標題<br>High Pressure CLEANEX-PM NMR 法による Ubiquitin の構造揺らぎに伴う水和環境の変化 |
| 3. 学会等名<br>第19回蛋白質科学会年会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北沢創一郎, 柳恵一郎, 青島佑, 北原亮   |
| 2. 発表標題<br>High-pressure NMR reveals conformational fluctuation of major and minor forms of phosphorylated ubiquitin |
| 3. 学会等名<br>第57回NMR討論会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Soichiro Kitazawa, Yu Aoshima, Takuro Wakamoto, Ryo Kitahara  |
| 2. 発表標題<br>High-pressure NMR reveals water-protein interactions coupled with protein conformational transition |
| 3. 学会等名<br>XXVIII international conference on magnetic resonance in biological systems (国際学会)                  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北沢創一郎, 青島佑, 若本拓郎, 北原亮   |
| 2. 発表標題<br>by using high-pressure CLEANEX NMR, water protein interaction coupled with protein conformational transition. |
| 3. 学会等名<br>第19回日本蛋白質科学会年会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Soichiro Kitazawa, Yu Aoshima, Junki Iga, Ryo Kitahara                   |
| 2. 発表標題<br>High-pressure NMR studies of phosphorylated Ub and phospho-mimic mutants |
| 3. 学会等名<br>9th international meeting on biomolecules under pressure                 |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎, 青島 佑, 伊賀 惇記, 池谷 鉄兵, 北原 亮   |
| 2. 発表標題<br>リン酸化ユビキチンの2つのコンフォメーションの立体構造決定と圧力効果 |
| 3. 学会等名<br>第56回NMR討論会                         |
| 4. 発表年<br>2017年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎, 青島 佑, 伊賀 惇記, 北原 亮  |
| 2. 発表標題<br>パーキンソン関連タンパク質Ser65リン酸化ubiquitinとリン酸化Ubiquitin模倣変異体 S65D, S65Dの高圧力NMR研究 |
| 3. 学会等名<br>第18回若手NMR研究会   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Soichiro Kitazawa, Yu Aoshima, Junki Iga, Takuro Wakamoto Ryo, Kitahara                          |
| 2. 発表標題<br>Conformational fluctuation of phosphorylated-ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy |
| 3. 学会等名<br>第55回日本生物物理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎、若本 拓朗、北原 亮               |
| 2. 発表標題<br>高圧力NMR法によるユピキチン高エネルギー状態の水和状態の解析 |
| 3. 学会等名<br>第61回高圧討論会                       |
| 4. 発表年<br>2020年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北沢 創一郎、若本 拓朗、北原 亮   |
| 2. 発表標題<br>Water-amide proton exchange coupled with protein conformational transition studied by high-pressure NMR |
| 3. 学会等名<br>第20回日本タンパク質学会年会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|