

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18076003

研究課題名（和文） 細胞内分解システムの構造学的解析

研究課題名（英文） Structural analysis of the intracellular proteolytic system

研究代表者

朽尾 豪人 (TOCHIO HIDEHITO)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70336593

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ユビキチン、オートファジー、構造生物学、溶液 NMR、X 線結晶構造解析

1. 研究計画の概要

ユビキチン-プロテアソーム系やオートファジー系におけるタンパク質の分解は、単なるタンパク質の破壊ではなく、複雑に制御された、生命活動の根幹に関わる過程である。本研究では、(1) ユビキチン受容体、(2) ユビキチンリガーゼ、(3) Atg タンパク質群を採り上げ、X 線、NMR による立体構造の決定、生化学的な分子機能の解析を行ない、タンパク質分解の分子機構の解明を行なう。

2. 研究の進捗状況

(1) ユビキチン受容体

- ① p62 UBA の結晶構造を決定し、これが溶液中では二量体を形成しているが、ユビキチンとの結合にはこれが解離する必要があることを明らかにした。
- ② 従来のユビキチン(Ub)鎖の構造研究は、テトラまでであった。ペンタ、ヘキサまでの Ub 鎖の調製法を確立した。Lys48 リンク型ヘキサユビキチンの結晶構造を決定した。
- ③ RAP80 のタンデム UIM と Lys63 リンク di-Ub 複合体の調製を行ない、結晶化を試み、微結晶を得た。
- ④ HeLa 細胞内の蛋白質の構造を観察する In-cell NMR 法を開発した。これにより、細胞内でのユビキチン分子の状態を観察し、フォールディング安定性や相互作用の解析を行なった。

(2) ユビキチンリガーゼ、プロテアソーム

- ① NEDD8 修飾による SCF 複合体型 E3 の活性化メカニズムを提案した (論文①)。

- ② ペプチド:N-グリカナーゼ (PNGase) の NMR 解析および糖鎖との相互作用解析を行い、PNGase の PUB ドメインが hHR23 の Ubl ドメインと相互作用することを見出した。
- ③ 中性子小角散乱測定により 20S プロテアソームの $\alpha 7$ サブユニットの溶液中での構造解析を行った。7 個の $\alpha 7$ が会合してリングとなり、20S プロテアソーム中の β リングと相互作用し、二重リング構造を形成していることを明らかにした (論文③と関連)。
- ④ ヒストンの E3 とされる UHRF1 の SRA ドメイン (DNA 結合) と DNA 複合体の結晶構造を決定した (論文②)。

(3) オートファジー

- ① Atg8 とリン脂質の結合を触媒する Atg3、および Atg5 の立体構造を X 線結晶解析により決定した。
- ② Atg12-Atg5 結合体について Atg16 との複合体の結晶構造を決定した。Atg12-Atg5 結合体が Atg8 系において新規 E3 様の役割を担っていることを明らかにした。
- ③ Atg4B による LC3 の脂質修飾状態の制御機構を解明した (論文④)。

3. 現在までの達成度

- ② おおむね順調に進展している。
(理由) 本計画班は、三つのグループ (京大、北大、名市大) で研究を進めているが、各グループとも既に複数の構造解析に成功している。それぞれ、タンパク質分解システムの制御に分子論的基盤を与える成果である。

4. 今後の研究の推進方策

- (1) ユビキチン受容体 : RAP80 UIM と Lys63 型 di-Ub に関して結晶化が進展しない場合は NMR を用いて解析を行なう。また、ヘキサ Ub の結晶構造を解いたが、これがテトラ Ub と大きく異なることを見いだした。その溶液中での構造・p62 UBA との相互作用を解析する。
- (2) ユビキチンリガーゼ・プロテアソーム : 直鎖型ユビキチン鎖を形成する HOIL-1・HOIP 複合体の相互作用部位である HOIL-1 (Ubl) および HOIP (UBA) の共結晶化に成功したので、解析を進める。また、NMR、X 線のほか中性子小角散乱、電子顕微鏡も駆使し、プロテアソームおよび小胞体関連分解 (ERAD) マシーナリーなどの超分子複合体の構造解析を行なう。これまでの個々のタンパクレベルあるいはドメイン・モチーフレベルでの静的な相互作用解析の結果を統合し、分解装置の動作機構を理解することを目指す。
- (3) オートファジー : Atg16 全長の X 線結晶構造解析を行なう。オートファジーに必須な Atg12-Atg5-Atg16 三者複合体の全体構造を X 線溶液散乱法で決定し、Atg16 および昨年決定した Atg12-Atg5 結合体の結晶構造を組み合わせることで三者複合体の全体構造を明らかにする。また、オートファジー特異的ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼの構成因子である Atg6 および Atg14 の X 線結晶構造解析を行ない、これらの因子がオートファジーに果たす役割を明らかにする。微結晶の析出に成功した Atg17-Atg29-Atg31 複合体について研究を進める。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

- ① E. Sakata, Y. Yamaguchi, Y. Miyauchi, K. Iwai, T. Chiba, Y. Saeki, N. Matsuda, K. Tanaka and K. Kato, "Direct interactions between NEDD8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes upregulate cullin-based E3 ligase activity.", *Nature Struct. Mol. Biol.*, **14**, 167-168 (2007). 査読有り
- ② Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Nakamura Y, Shirakawa M., "Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism.", *Nature*,

455, 818-821 (2008). 査読有り

- ③ Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K, Kameyama T, Hayashi H, Kishimoto T, Niwa S, Kasahara M, Kurimoto E, Sakata E, Takagi K, Suzuki A, Hirano Y, Murata S, Kato K, Yamane T, Tanaka K., "Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes." *Nature Struct. Mol. Biol.*, **15**, 228-236 (2008). 査読有り
- ④ Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F, "The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy.", *The EMBO Journal*, in press. 査読有り
- ⑤ Inomata K, Ohno A, Tochio H, Isogai S, Tenno T, Nakase I, Takeuchi T, Futaki S, Ito Y, Hiroaki H, Shirakawa M., "High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells.", *Nature*, 458, 106-109 (2009). 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

- ① 岡本健太, 栗本英治, 坂田絵理, 鈴木淳巨, 山根隆, 平野祐子, 村田茂穂, 田中啓二, 加藤晃一、「20S プロテアソームのアッセンブリーシャペロン PAC3 の結晶構造」、第7回日本蛋白質科学会年会、2007年5月26日
- ② Isogai S., Tenno T., Morimoto D., Abe S., Tochio H., Arita K., Ariyoshi M., Tanaka K., Shirakawa M., "Crystal structure of p62 ubiquitin associated (UBA) domain.", 2008年8月26-27日, IUCr 2008, 大阪
- ③ 藤岡優子, 野田展生, 松下美奈子, 大隅良典, 稲垣冬彦、「オートファジーに必須な出芽酵母 Atg16 の多量体ドメインの X 線構造解析」、第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会合同年会、2008年12月12日、神戸

[その他]

京大グループの論文⑤の成果が以下の新聞にて報道された。京都新聞(3月5日 26面)、科学新聞(3月13日 1面)、日刊工業新聞(3月5日 24面)および読売新聞(3月5日 3面)および朝日新聞(4月3日 13面)。