

令和元年6月12日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19344

研究課題名(和文) 核酸が促進するK63型ポリユビキチン鎖形成の分子メカニズムと生物学的意義

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of nucleic acid-dependent stimulation of K63-linked polyubiquitylation

研究代表者

黒川 裕美子 (Kurokawa, Yumiko)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：10381633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：K63Ub鎖は、環境変化・刺激応答などによる標的タンパク質の機能変換の惹起だけでなく、鎖自体もシグナルとして機能することから、細胞内では迅速かつ正確な鎖形成の制御がなされていると考えられる。しかしK63Ub鎖の形成にはE2酵素Ubc13/Mms2複合体が必須であるが、伸長の分子メカニズムは未解明の部分が多い。我々は*in vitro*において核酸(RNAやssDNA)がE3非依存的にK63Ub鎖形成を促進することを発見していた。本研究ではこの反応の分子メカニズムに着目した。解析の結果、E2がpH変化によって核酸に結合し、核酸-E2複合体がUb鎖伸長の足場となり反応が進行する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ub鎖の形成促進は、これまでE3酵素によってのみ触媒されると考えられてきた。しかしE3がどのようなメカニズムでUb鎖の伸長を促進しているかの詳細は未解明の部分が多い。我々はK63Ub鎖伸長の活性本体であるE2に着目し、E2の活性を上昇するメカニズムを探索した。その結果、核酸が直接E2と結合し、構造体としてK63Ub鎖の形成を促進することを生化学解析や高速AFMを用いた1分子解析から明らかにした。反応メカニズムの解明はUb分野への貢献が大きく、pHによるタンパク質の活性制御は酵素的にも意義が高い。DNA、RNAに関わる細胞内機構を中心に、pH変化による制御機構という新しい分野を見出した。

研究成果の概要(英文)：K63-linked polyubiquitin chain is known that it does not only stimulate the functional change of target proteins but also itself works as a signal of stress response, DNA damage, and so on. Although we believed that K63Ub chain formation must be up-regulated quickly/accurately *in vivo*, K63Ub chain formation by E2 enzyme Ubc13/Mms2 was slow reaction *in vitro*. To understand the molecular mechanism in up-regulation of K63Ub chain formation, we previously performed a screening assay for identifying factors which stimulates K63Ub chain reaction (without E3) and finally found that nucleic-acids (RNA and ssDNA) strongly promotes the E2-dependent K63Ub chain formation *in vitro*. In this study, we focused on the stimulatory mechanism of this reaction and we found that Ubc13/Mms2 heterodimer has nucleic-acid binding activity which is controlled by pH. E2-nucleic acid complex forms aggregate which seems to act as a K63Ub-assembly factory for chain extension.

研究分野：ゲノム恒常性維持

キーワード：ubiquitin K63 DNA RNA 核酸 ポリユビキチン E2 pH

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

1. 研究開始当初の背景

K63 型ポリユビキチン鎖 (K63Ub 鎖) は、標的蛋白質の 26S プロテアソームを介した分解指標としてではなく、機能変換を惹起するものであることが知られている。これまでの知見から、K63Ub 鎖の形成がゲノム安定性の維持やシグナルとして働くことがわかってきた。しかし、K63Ub 鎖伸長の分子メカニズムや K63Ub 鎖が関与する標的蛋白質、E3 酵素、関わる生命機構の多くは未解明な部分が多い。我々は、これらをより包括的に理解するため、K63Ub 鎖の形成に必須の E2 酵素である Ubc13/Mms2 複合体 (分裂酵母) に着目した。Ub, ATP, E1, E2 (Ubc13/Mms2) からなる *in vitro* Ub アッセイ系を構築し、K63Ub 鎖形成反応を解析したところ、反応速度が非常に遅いことがわかった (最大活性までに 1-2 時間)。そこで K63Ub 鎖の形成を制御するメカニズムの 1 つとして、E2 を直接のターゲットとした制御機構の存在を期待し、*in vitro* Ub アッセイ系 (E3 を含まない) を用いて K63Ub 鎖形成を促進する因子を分裂酵母細胞抽出液から探索した。その結果、RNA と DNA が同定された。当初は核酸が E3 様の促進活性を有することは驚くべき発見であった。二本鎖よりも単鎖の核酸で非常に強い促進活性 (数分程度で最大活性) が見られたことから、核酸の可塑性もしくは二次構造が重要であることが示唆された。リボザイム型 E3 の可能性を考えて配列特異性を検討したが、配列特異性は見つからず、むしろ鎖長が重要であることがわかった (200 base 以下では促進効果は低い)。その後、Ubc13/Mms2 がヘテロダイマーとして DNA や RNA と直接結合することがゲルシフト法から明らかになった。以上の知見から、研究開始当初においては「E2 が直接核酸に結合することで、K63Ub 鎖形成と伸長が促進される」というモデルを予想していた。しかし、直接このモデルを証明することと反応メカニズムの解明、さらに細胞内でもこのような核酸による促進反応が存在しているのかどうかについては明らかになっていなかった。そこで、DNA や RNA による K63Ub 鎖形成促進機構の分子メカニズムや生物学的意義を明らかにすることを本研究で目指すに至った。

2. 研究の目的

本研究においては「核酸による K63Ub 鎖形成促進の分子メカニズム解明」「核酸促進型 K63Ub 鎖が関わる生命機構の探索と理解」の二つを目標に、分裂酵母を用いた生化学的・遺伝学的・構造学的・生物物理学的なアプローチからこの反応現象の本質に迫る。「核酸が E3 様の促進効果を有する」事実は、既存のユビキチン研究の概念を超えている。これまでユビキチン化反応を促進するものは E3「タンパク質」と当然のように認識されている。そのため、我々が発見した RNA もしくは DNA といった核酸が反応を促進するという結果を理解するためには、数々の生化学的な裏付け実験が必要である。同時に、核酸への E2 の結合様式を理解することは、反応促進メカニズムの解明には必須のステップとなる。生化学的解析をベースに、細胞内での意義についても迫りたい。本研究はユビキチン分野の発展だけでなく、K63Ub 鎖と核酸が関わる生命機構全体において新規のメカニズム発見の可能性を有している。

3. 研究の方法

「核酸による K63Ub 鎖の形成促進反応の理解」について、大きく以下の(1)(2)(3)に分けて解析を進めた。

(1)「Ubc13/Mms2 と核酸の結合様式の解析」

MEGADOCK プログラムを用いた結合予測

これまでの解析から、核酸に直接結合するのは Ubc13/Mms2 ヘテロダイマーであることがゲルシフト法から明らかになっている。Ubc13 単体や Mms2 単体では結合が見られなかったことから、ヘテロダイマー化した際に核酸結合部位が形成されると考えてきた。実際、ドッキング予測プログラムである ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu>) を用いて Ubc13/Mms2 複合体と各種核酸 (dsRNA, dsDNA, ssDNA) の結合を予測した結果、いずれの核酸も Ubc13 と Mms2 のヘテロダイマーを形成するジョイント部分近傍へのドッキングが予測されたが、アミノ酸残基などの詳細な結合部位の特定には至っていない。そこで今回はより高速かつ網羅的な相互作用予測にも有用な MEGADOCK (https://www.bi.cs.titech.ac.jp/megadock/index_ja.html) プログラムを活用した解析を行った。

高速 AFM を用いた ssDNA と Ubc13/Mms2 (E2) の直接結合をリアルタイム観察

Ubc13/Mms2 と ssDNA の直接結合はゲルシフト法で観察していたが、どのように結合しているかは明らかになっていなかった。直接観察できる方法として電子顕微鏡法や AFM (原子間力顕微鏡) 法が考えられたが、最終的にはユビキチン鎖伸長反応をモニタリングすることを視野に入れ、ここでは溶液中のタンパク質と DNA を 1 分子として観察可能な高速 AFM を用いることにした。高速 AFM の解析方法は、金沢大学バイオ AFM 先端研究センターの紺野宏記准教授と古寺哲幸教授にご指導いただいた。ファージ由来 ssDNA (ϕ X174 viron) と Ubc13/Mms2 ヘテロダイ

イマーを buffer 溶液中で混合し、30 度で 10 分インキュベートしたものをマイカ基盤上にスポットし、buffer 溶液中で高速 AFM NanoExplore にて観察した。

(2)核酸による K63Ub 鎖の形成促進反応の理解

高速 AFM を用いた K63Ub 鎖伸長反応のリアルタイム観察

これまでの解析から、核酸上に Ubc13/Mms2 が結合することが明らかになっており、K63Ub 鎖の形成反応は核酸上で展開されることが予想された。そこで高速 AFM を用いて Ub 鎖が実際に形成されていく過程をモニタリングすることで、反応メカニズムを理解できると考えた。in vitro Ub 化反応系として、E1, Ub, Ubc13/Mms2, ssDNA を混合し、観察直前に ATP を加えて高速 AFM で反応をリアルタイム観察する。

(3)K63Ub 鎖形成促進反応のさらなる条件検討

pH が K63Ub 鎖形成反応に影響することを見出した。そこで以下の反応について至適 pH 等を検討する。

pH による K63Ub 鎖形成反応の制御

in vitro K63Ub 鎖形成促進反応 (E1, Ub, ATP, Ubc13/Mms2, ssDNA を含む) における buffer の至適 pH 条件を検討した。反応後はウェスタンブロットで Ub 抗体を用いて Ub 鎖形成能を比較した。

pH による Ubc13/Mms2 の ssDNA 結合能への影響

pH 変化によって Ub 鎖形成能が変化したことから、pH が Ubc13/Mms2 の核酸結合能にも影響している可能性を考えた。そこで ssDNA と Ubc13/Mms2 のゲルシフト法において反応 buffer の至適 pH を検討した。

pH による DNA 結合タンパク質の活性変化(Rad51, Cohesin)

DNA 結合タンパク質にとって、pH 変化による活性への影響があるのかについて、DNA 相同組換えに働く Rad51 タンパク質、また姉妹染色分体接着に働く Cohesin タンパク質を用いて解析した。Rad51 に関しては dsDNA 結合活性を DNA プルダウン法で解析した。Cohesin タンパク質では dsDNA の capture 活性について解析した。

4. 研究成果

(1)「Ubc13/Mms2 と核酸の結合様式の解析」

MEGADOCK プログラムを用いた結合予測

ZDOCK 同様、MEGADOCK を用いて ssDNA との結合を予測したが、候補が多く、結合部位の同定には至らなかった。また、現時点では予測には短い ssDNA (20 mer 前後) を用いるしか方法がなく、実際の結合様式と差異が生じている可能性もある。そこで予測と並行して、以下に示すように高速 AFM を用いた解析を進めることとした。

高速 AFM を用いた ssDNA と Ubc13/Mms2 (E2) の直接結合についてのリアルタイム観察

金沢大学との共同研究により、1 分子レベルでの高速 AFM を用いた解析が可能となった。まず、Ubc13/Mms2 ヘテロダイマーを溶液中で観察し、直径 20 nm ほどのダイマー構造を形成していることを確認した。次に ssDNA を観察したところ、溶液中では二次構造をとりながら非常に早く動く像が観察された。ここに Ubc13/Mms2 を添加すると、徐々に ssDNA 上に Ubc13/Mms2 が集合してくる様子が観察され、それとともに ssDNA の動きも遅くなっていった。添加の数十秒後には複数の ssDNA-E2 複合体同士がさらに集まり大きな凝集体が形成された。このことから、核酸による Ub 鎖形成反応の促進は、E2 が直接核酸に結合することが最初のステップとして重要であり、さらに核酸を足場に E2 同士が凝集することで、その後の反応が促進されているのではないかと考えられた。dsDNA では Ub 鎖伸長促進反応が進行しにくいこともこれまでの in vitro の解析からもわかっており、核酸の可塑性と鎖長が反応促進に重要な E2 凝集体の形成に必須であることが示唆された。さらに、反応溶液の pH を変化させると、この凝集体の形成能が低下もしくは上昇することも明らかになった。

(2)核酸による K63Ub 鎖の形成促進反応の理解

高速 AFM を用いた K63Ub 鎖伸長反応のリアルタイム観察

Ubc13/Mms2 と ssDNA の結合をリアルタイムで観察できたことから、次は K63Ub 鎖の伸長反応自体をリアルタイム観察することを目指した。E2 と ssDNA の結合観察と同様にタンパク質複合体

が ssDNA 上に形成されている様子は観察できたが、伸長していく K63Ub 鎖の鮮明な像をとることはできなかった。しかし DNA-タンパク質複合体の中に線状の動きの早い像が時折観察できており、これが ssDNA もしくは Ub 鎖である可能性が高い。溶液中の観察のため動きが非常に早く、今後は分子運動を抑える buffer 条件下での観察や、マイカ基盤上へより強く固定するといった条件検討も必要だろう。今回得られた高速 AFM での知見は、反応モデルを考える上で大変重要なものとなった。

(3)K63Ub 鎖形成促進反応のさらなる条件検討

pH による K63Ub 鎖形成反応の制御

「核酸による K63Ub 鎖の形成促進反応」の分子メカニズムの解析を進める上で、この促進反応は pH に大きく影響されることがわかってきた。in vitro Ub 化反応系を様々な pH 条件下で解析したところ、弱酸性条件下で非常に強く反応が促進されることがわかった。一般的に K48Ub 化反応は弱アルカリ性条件下で多少促進されることが知られているが、我々の K63Ub 鎖伸長反応を核酸非存在下で解析すると、確かに多少の Ub 化バンドは検出される。しかし、弱酸性条件下での核酸による反応促進では、反応系に加えた Ub が全て polyUb に変換されるほどの強い反応促進が検出された。このことから、弱酸性条件は核酸と K63Ub 鎖に特異的なものであることが示唆された。

pH による Ubc13/Mms2 の ssDNA 結合能への影響

K63Ub 鎖形成において、最大活性が見られる pH 条件下ではどのような反応ステップが影響を受けているのだろうか。核酸と E2 の結合に影響が出ている可能性を考え、ゲルシフト法を様々な pH 条件下で解析した。その結果、Ubc13/Mms2 (E2) の核酸結合活性が弱酸性条件下において最大となることがわかった。この発見をもとに分子メカニズムを考えると、K63Ub 鎖形成促進反応は E2 の核酸結合に依存して促進されると言える。そしてこの核酸結合は pH によって大きく制御される。これらの結果は、E2 における核酸結合部位の探索においても非常に重要なヒントを与えると期待できる。今後 pH で影響を受けるアミノ酸を中心に Ubc13/Mms2 に変異を導入することで、核酸結合変異体タンパク質ならびに核酸結合変異株の作成が進められると期待している。これらの材料は in vivo における核酸依存的 K63Ub 鎖形成機構の存在と意義の理解に大いに役立つであろう。

pH による DNA 結合タンパク質の活性変化(Rad51, Cohesin)

本研究結果から、新規の制御機構として、「pH による核酸結合タンパク質の活性制御機構」の存在が示唆された。そこで、Ubc13/Mms2 以外にも核酸結合タンパク質が pH による活性制御を受けるケースがあるのかどうかを検討した。まず DNA 修復・組換えに働く Rad51 (分裂酵母) について、dsDNA 結合能を解析した結果、弱酸性条件下において、結合量が増加することがわかった。さらに別の例として、染色体構造形成に関わる cohesin (分裂酵母) の in vitro における dsDNA キャプチャー反応についても解析した結果、弱酸性条件下において結合活性が大きく上昇することがわかった。以上の結果から、pH による活性制御は核酸結合タンパク質において普遍的な現象である可能性が示唆された。この発見は、本研究の目的である「核酸による K63Ub 鎖形成促進反応」のメカニズム理解において大きな進展であるだけでなく、ユビキチン分野を超えて、タンパク質機能制御機構の理解にまで発展した成果を生み出したと言える。

一方で、細胞内での解析については本研究期間内で精力的に進めることはできなかったが、今後 pH による反応制御を視野に入れつつ解析を進めることで新たな進展が可能になると期待している。細胞内では局所的な pH の違いや、ストレス応答などでも pH 変化が存在することは知られている。このような環境下では、pH によるタンパク質の活性制御も存在するであろう。今後は細胞内 pH における活性制御を視野にいれた解析を進めていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松崎 由理
ローマ字氏名：Matsuzaki Yuri
所属研究機関名：東京工業大学
部局名：リーダーシップ教育院
職名：特任准教授
研究者番号（8桁）：30572888

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。