

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06077

研究課題名(和文) GCN5のPCAF-HDが担う肝糖新生亢進機構の立体構造からの解明

研究課題名(英文) Structural study of the PCAF-HD domain of GCN5 to reveal signaling in hepatic gluconeogenesis

研究代表者

深井 祥子(藤間祥子)(Toma-Fukai, Sachiko)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：40363535

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)：2型糖尿病の患者では肝糖新生が亢進するが、その情報伝達機構の詳細は不明である。糖新生の亢進には糖新生酵素群遺伝子の発現を伴う。肝糖新生には、GCN5のヒストンアセチル基転移活性による肝糖新生酵素群の発現が関与することが報告されているが、その全容は明らかになっていない。GCN5は、PCAF_Nと名付けたユビキチンE3活性を持つと推定されるドメインを持つ。本研究では、糖新生に関与するアセチル基転移酵素GCN5が持つ新しい触媒活性、E3活性に着目して構造研究を行なった。結果、PCAF_Nが新規フォールドを持つE3酵素であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アセチル化やユビキチン化は蛋白質合成後に起こる翻訳後修飾である。シグナル伝達において翻訳後修飾は互いに競合または協調しながら多様な情報を伝える。本研究では、GCN5のE3活性機構の解明はGCN5が分解シグナルを誘導するという全く新しい機能を立体構造から解明した。これは、GCN分子が持つ未知シグナル伝達の可能性を示し、GCN5が担う糖新生シグナルの解明に貢献する学術的意義、社会的意義のある研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Hepatic gluconeogenesis is an issue in patients with type 2 diabetes, but the details of the signaling mechanism are unknown. The expression of genes in the glycogenic enzyme group causes gluconeogenesis. Previously it was reported that histone acetyltransferase GCN5 is one of the enzymes involved in hepatic gluconeogenesis, but the full extent of this mechanism has not been clarified.

GCN5 has a domain presumed to have ubiquitin E3 activity, named PCAF_N. We focused our structural studies on a novel catalytic activity, E3 activity, of GCN5, an acetyltransferase involved in gluconeogenesis. As a result, we revealed that PCAF_N is an E3 enzyme with a novel fold.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 ユビキチン ユビキチンE3リガーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本において、『糖尿病が強く疑われる、または糖尿病の可能性を否定できない者』は約 2000 万人と推計されている¹⁾。糖尿病の発症要因としては、遺伝的要因と環境要因があるが、日本における糖尿病の大部分を占めるのは生活習慣が環境因子となる 2 型糖尿病で、治療および予防法の確立の必要性が唱えられている。

血糖値は、膵臓から分泌されるインスリンによる血糖値低下作用とグルカゴンによる肝臓での糖新生などにより調節される。2 型糖尿病の患者では肝糖新生が亢進するが²⁾、その情報伝達機構の詳細は不明な部分が多い。糖新生の亢進には糖新生酵素群遺伝子の発現を伴う。これらの遺伝子は転写共役因子 PGC-1 α により発現が強力に誘導される。摂食時、PGC-1 α はアセチル基転移酵素である GCN5 によりアセチル化され活性が抑制されている。一方、絶食時または 2 型糖尿病ではグルカゴンにより cAMP-PKA シグナルが誘導される。GCN5 はキナーゼ PKA によりリン酸化を受けて PGC-1 α へのアセチル化能を消失する。同時にヒストンに対するアセチル化能を獲得する。GCN5 のヒストンアセチル基転移活性、非アセチル化 PGC-1 α による転写因子の活性化の 2 つの相乗効果により肝糖新生酵素群の発現が強く誘導され、肝糖新生が亢進する³⁾

GCN5 は、N 末から PCAF ホモロジドメイン (PCAF-HD)、アセチル基転移 (AT) ドメイン、アセチル化リジン認識するブロモ (Bromo) ドメインを持つ (図 1)。AT、Bromo 両ドメインは酵母からヒトに至るまで広く保存されているが、PCAF-HD は脊椎動物以上でのみ保存されている。PKA によりリン酸化される 275 番目のセリン残基 (Ser275) は PCAF-HD 上に存在する (図 2)。非常に興味深いことに、GCN5 と配列相同性が 75% と高く類似酵素であるヒト PCAF の PCAF-HD はユビキチン E3 リガーゼ活性 (E3 活性) を有し、蛋白質分解に関与することが報告されている⁴⁾。アミノ酸の配列相同性の高さから、GCN5 の PCAF-HD もまた E3 活性を有することが強く示唆される。PCAF-HD は多くの E3 酵素が持つ Zn 配位モチーフであるリングフィンガーモチーフ構造を有しておらず、類似蛋白質の立体構造の報告も無い。完全に新規フォールドを持つ E3 酵素となる。GCN5 が E3 活性を有するという報告のみならず、PCAF-HD の立体構造もこれまで報告されていなかった。

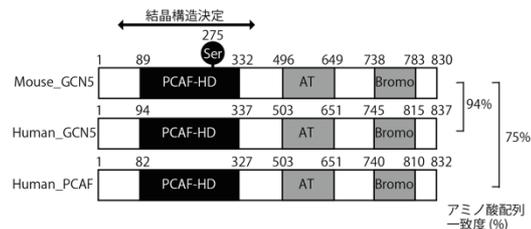


図 1 GCN5, PCAF のドメイン構成図

シグナル伝達において翻訳後修飾は互いに競合または協調しながら多様な情報を伝える。GCN5 の E3 活性機構の発見解明は GCN5 が分解シグナルを誘導するという全く新しい機能を付与するものであり、GCN5 分子が持つ未知シグナル伝達の可能性を示す。また、E3 活性を担う新規ドメイン構造の発見は未知の分解シグナルの存在を立体構造から示すこととなり、分解シグナル研究に新しい視点を与えるものである。

2. 研究の目的

本研究では、GCN5 が持つ E3 活性に着目し、活性発揮機構の解明および PKA によるリン酸化が GCN5 の E3 活性に与える影響、E3 活性が肝糖新生酵素発現に関与するのかを明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

(1) データベースを用いた PCAF-HD (PCAF_N) の立体構造の新規性の確認と新規ドメイン命名

本研究の着手に先立って、申請者らグループはマウス GCN5 の PCAF-HD の X 線結晶構造を決定していた。データベース Protein Data Bank を用いて、PCAF-HD がこれまでに構造決定した全ての E3 酵素と類似性があるのかを検討した。また PCAF-HD の溶液構造を評価し、決定した PCAF-HD が 1 つのドメインとして存在するかを検討し、PCAF-HD が新規の E3 酵素ドメインと定義できるかどうかを評価した。結果欄に詳細を記述するが、PCAF-HD を改め PCAF_N ドメインと命名した。今後全ての記述を PCAF_N とする。

(2) E2 酵素の選別

ユビキチン E3 リガーゼは、ユビキチン結合酵素 (E2 酵素) と協調して基質蛋白質へユビキチンを転移する。一般に、各 E3 リガーゼは E2 酵素に対して嗜好性がある。PCAF_N がどの E2 酵素を好むのかを検討した。市販の E2 酵素 10 種類を購入し、各 E2 酵素を用いた場合の GCN5 の自己ユビキチン化活性を評価し、嗜好性を評価した。自己ユビキチン化活性が確認できた E2 酵素の遺伝子を理化学研究所バイオリソースセンターより購入し、大腸菌発現系を用いて高純度精製標品を調製した。

(3) Zn フィンガー構造の E3 活性における役割の解明

申請者グループが決定した結晶構造から、PCAF_N は特徴的な 2 核配位の亜鉛 (Zn) フィンガーモチーフを持つことを明らかになっていた。この特徴的な Zn フィンガーモチーフと E3 活性の関係を調べるために変異体を作成して、その溶液物性と活性を評価した。

Zn に配位する 7 つの配位残基の前半と後半をアラニンに置換した 2 種類のアラニン変異体を作成した。立体構造から同定した Zn 領域 (図 2) を欠損させた欠損変異体も作成した。これらをそれぞれ大腸菌で発現させ、溶液中での安定性と自己ユビキチン化活性を測定した。

(4) PCAF_N ドメイン単独での E3 活性有無の確認

GCN5 の E3 活性が PCAF_N のみで発揮されるのかどうかを検討するために、PCAF_N 単独でのユビキチン E3 リガーゼ活性を有するかどうかを確認した。

まず、市販のユビキチン活性化酵素 (E1 酵素)、ユビキチンを用いて、GCN5 全長および GCN5 の PCAF-HD による E2 酵素からユビキチンを転移する能力が有るかを評価した。次に、E1 酵素、ヒトユビキチン遺伝子大腸菌発現ベクターを京都大学理学研究科深井教授グループより供与いただき、既報にしたがって培養精製した。自作で調製した高純度精製標品を用いて GST-mGCN5 (PCAF_N), GST-mGCN5, GST-hGCN5, GST-hPCAF のユビキチン E3 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) データベースを用いた PCAF-HD (PCAF_N) の立体構造の新規性の確認と新規ドメイン命名

PDB データベースを用いた解析の結果、我々が決定した PCAF_N 構造は、既存のどのユビキチン E3 酵素とも類似の構造を持たないことが確認された。また、広くユビキチン様蛋白質に視点を広げても類似構造のないユニークな構造を有することを確認した。また、X 線小角散乱の結果や決定構造から PCAF_N が 1 つのドメインとして働くと考えられたことから、新規ドメインであるとみなし、PCAF_N と命名した。また、Pfam データベースを用いた解析から、PCAF_N は 393 種に保存され、PCAF_N ドメインを含む異なるドメイン構成からなるタンパク質は、26 種類存在することを確認した。

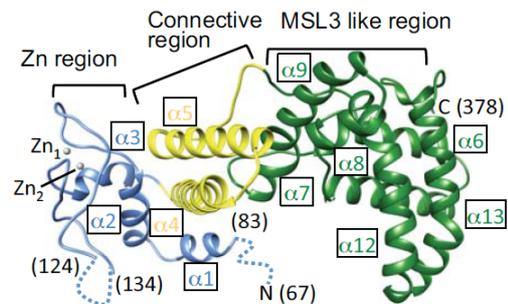


図 2 PCAF_N の結晶構造

(2) E2 酵素の選別

市販の 10 種類の酵素を用いた検討の結果、UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c において明確なポリユビキチン化反応を確認した。GCN5 の自己ユビキチン化活性発揮には、これら E2 酵素が利用されることを明らかにした。UbcH5a, 5b, 5c はアミノ酸配列相同性が高く、同様のポリユビキチン化反応パターンを示したため、同様の機構で働く判断し、次の実験からは、UbcH5b を用いることにした。UbcH3 遺伝子は所持していなかったため、購入し、UbcH5b と同様に大腸菌発現系を用いて高純度精製標品を調製した。独自に調製した高純度の 2 種類の E2 酵素を用いて、自己ユビキチン化反応を再度評価した。結果、UbcH5b がより効率高く GCN5 の自己ユビキチン化反応を進めることを見出した。(図 3)

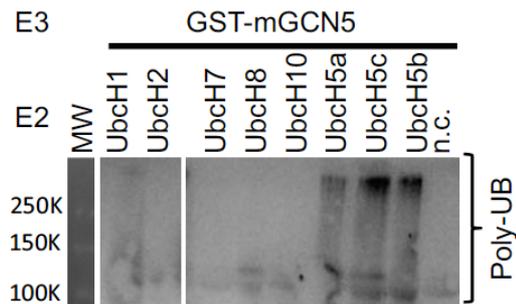


図 3 E2 酵素選別結果

(3) Zn フィンガー構造の E3 活性における役割の解明

Zn 配位に関与するアミノ酸のアラニンへの変異により、発現精製時に GCN5 の顕著な分解が見られた。このことから、亜鉛配位は GCN5 の安定化に寄与することが明らかになった。亜鉛配位部位の変異体 GCN5 は不安定なため、自己ユビキチン化活性を測定することができなかったが、Zn 領域を欠損させた変異体において自己ユビキチン化活性の測定可能な試料を調製できた。結

果、Zn 領域の欠損によりユビキチン化反応がほぼ消失することを見出した。(図 4)

(4) PCAF_N ドメイン単独での E3 活性有無の確認

市販の弱い活性しか確認出来ず、また再現性においても課題があった。検討した結果、使用したユビキチンの購入ロットにより活性に差が出るのが明らかとなった。そこで、E1 酵素、ユビキチンも自作で高純度精製し活性測定を行うことにした。結果、安定に酵素活性が確認できるようになった。また、GST 融合 mGCN5 (PCAF_N) を用いた結果から、PCAF_N は付加タグ GST に効率良くユビキチン転移反応を触媒することが明らかになった。この結果から、研究代表者らが決定した PCAF_N が新規フォールドを持つユビキチン E3 酵素であることが明確になった。(図 5)

(5) 結果のまとめと今後の展望

本研究で得られた、新規ユビキチン E3 酵素 PCAF_N の立体構造決定の構造を基盤とした機能解析について、原著論文を執筆し査読付き国際雑誌に掲載した⁵⁾。原著論文の結果を用いて、『Structural Diversity of Ubiquitin E3 Ligase.』と題したユビキチンリガーゼ酵素の構造の多様性に着目した総説を執筆し、国際学会誌 *Molecules* に発表した⁶⁾。

PCAF_N のユビキチン E3 活性発揮機構の解明に向けた研究は成果が得られたものの PKA による修飾が活性に与える役割など目標に掲げたものの明らかにできていない課題もある。今後すすめていきたい。

<引用文献>

- 1) 平成 28 年度国民健康・栄養調査結果の概要, 厚生労働省
- 2) Biddinger, S & Kahn, C. R., *Annu. Rev. Physiol.* 2006
- 3) Sakai M., et al., *Nat. Commun.* 2016
- 4) Linares LK., et al., *Nat. Cell Biol.* 2007
- 5) Toma-Fukai., et al., *JBC.* 2020
- 6) Toma-Fukai. and Shimizu., *Molecules.* 2021

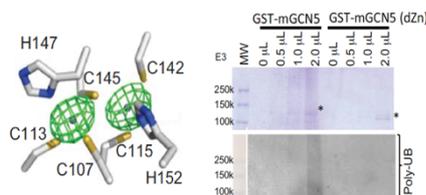


図 4 Zn 領域の構造と活性測定

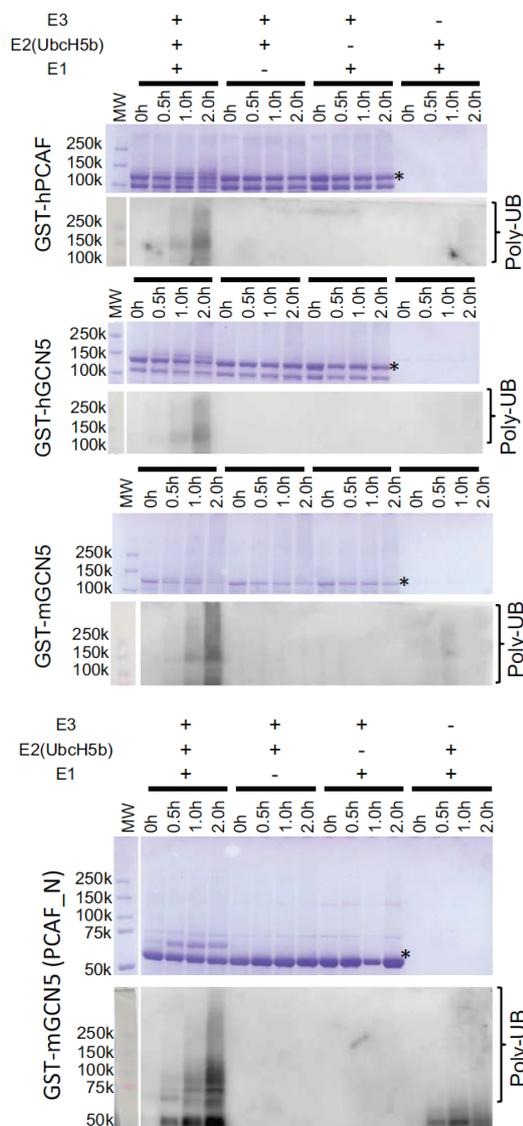


図 5 PCAF_N の E3 活性測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Toma-Fukai Sachiko, Hibi Ryota, Naganuma Takao, Sakai Mashito, Saijo Shinya, Shimizu Nobutaka, Matsumoto Michihiro, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 Crystal structure of GCN5 PCAF N-terminal domain reveals atypical ubiquitin ligase structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14630 ~ 14639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013431	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Shimizu Hikaru, Toma-Fukai Sachiko, Kontani Kenji, Katada Toshiaki, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 115
2. 論文標題 GEF mechanism revealed by the structure of SmgGDS-558 and farnesylated RhoA complex and its implication for a chaperone mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9563 ~ 9568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1804740115	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 日比亮太, 藤間祥子, 酒井真志人, 長沼孝雄, 松本道宏, 清水敏之
2. 発表標題 Crystal structure of GCN5 PCAF-homology domain reveals atypical ubiquitin ligase structure
3. 学会等名 第93 回日本生化学会大会 (2020年)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sachiko TOMA-FUKAI, Ryota HIBI, Mashito SAKAI, Takao NAGANUMA, Shinya SAIJO, Nobutaka SHIMIZU, Michihiro MATSUMOTO, and Toshiyuki SHIMIZU
2. 発表標題 Crystal structure of PCAF homology domain of GCN5 reveals its unique structure as ubiquitin E3 ligase
3. 学会等名 AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko TOMA-FUKAI, Ryota HIBI, Mashito SAKAI, Takao NAGANUMA, Shinya SAIJO, Nobutaka SHIMIZU, Michihiro MATSUMOTO, and Toshiyuki SHIMIZU
2. 発表標題 Crystal structure of PCAF homology domain of GCN5 reveals its unique structure as ubiquitin E3 ligase
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤間 祥子
2. 発表標題 創薬標的蛋白質のPX-BioSAXS相関構造解析の現状と今後の展望
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会 (JPrOS・JES2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota HIBI, Sachiko TOMA-FUKAI, Mashito SAKAI, Takao NAGANUMA, Michihiro MATSUMOTO, Toshiyuki SHIMIZU
2. 発表標題 Crystal structure of PCAF homology domain of GCN5 reveals its unique structure as ubiquitin E3 ligase
3. 学会等名 AsCA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤間祥子
2. 発表標題 細胞内創薬標的蛋白質のPX-BioSAXSを用いた構造機能相関解析
3. 学会等名 PF研究会 多様な物質・生命科学研究に広がる小角散乱(他)分野の小角散乱を学ぼう!(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比亮太, 藤間祥子, 酒井真志人, 長沼孝雄, 松本道宏, 清水敏之
2. 発表標題 新規ユビキチンE3リガーゼドメインmGCN5 PCAF-HDの結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤間祥子
2. 発表標題 リード化合物創成を目指した創薬標的蛋白質の構造機能相関解析
3. 学会等名 平成30年度第2回構造生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日比亮太, 藤間祥子, 酒井真志人, 長沼孝雄, 松本道宏, 清水敏之
2. 発表標題 新規E3フォールド酵素PCAF-HDの構造科学研究
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (千葉)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikaru SHIMIZU, Sachiko TOMA-FUKAI, Nobutaka SHIMIZU, Shinya SAIJO, Toshiaki KATADA, and Toshiyuki SHIMIZU
2. 発表標題 Structural basis of RhoA recognition by unique guanine nucleotide exchange factor SmgGDS
3. 学会等名 AsCA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水光, 藤間祥子, 紺谷圈二, 堅田利明, 清水敏之
2. 発表標題 特異なグアニンヌクレオチド交換因子SmgGDSによるRhoA認識機構の構造基盤
3. 学会等名 PPF2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=1&key=1536299827 http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2018/180907/ http://pfwww.kek.jp/publications/pfnews/36_2/saikin1.pdf http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/
--

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