

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570116
 研究課題名 (和文) 転写制御と DNA 修復に関わる Lys63 結合ユビキチン認識機構の解明
 研究課題名 (英文) Recognition mechanism of Lys63-linked ubiquitin chain involved in transcription regulation and DNA repair
 研究代表者
 川崎 政人 (KAWASAKI MASATO)
 大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教
 研究者番号：00342600

研究成果の概要：NF- κ B は、免疫、炎症、抗アポトーシスなどに関わる様々な遺伝子の転写を活性化する転写因子であり、NEMO により活性化される。NEMO は Lys63 結合ユビキチン鎖と結合すると報告されていたが、意外なことにユビキチンが直列につながったタンデムユビキチン鎖により強く結合して NF- κ B を活性化することが判明した。タンデムユビキチンと NEMO の複合体の結晶構造解析の結果、NEMO はコイルドコイル二量体の両面で 2 分子のタンデムユビキチンを対称的に結合しており、NEMO によるユビキチン鎖の選択的認識機構が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、ユビキチン、転写制御、DNA 修復、分子認識

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写制御に関わる Lys63 結合ユビキチン

NF- κ B は、免疫、炎症、抗アポトーシスなどに関わる様々な遺伝子の転写を活性化する転写因子である。NF- κ B は非刺激時には I κ B と結合して不活性型として細胞質に留まっている。細胞外からの刺激を受けると、I κ B はリン酸化され、それがシグナルとなって Lys48 結合でつながったポリユビキチン化を受け、プロテアソームで分解される。そ

の結果 I κ B から開放された NF- κ B は核内に移行することができ、転写を活性化する。I κ B をリン酸化する I κ B キナーゼ (IKK) 複合体は、キナーゼである 2 つの触媒サブユニット IKK α と IKK β 、ならびに制御サブユニットである IKK γ (別名 NEMO; NF- κ B essential modulator) の 3 つのサブユニットで構成される。IKK 複合体の活性化には NEMO が重要な働きをしており、NEMO 自身もユビキチン化によって調節される。

前述のIKKのように、ユビキチンのLys48を介したポリユビキチン鎖はプロテアソームによる分解の標識となるが、一方Lys63を介したポリユビキチン鎖は、シグナル伝達やDNA修復に関与する。本研究開始当初、NEMOがLys63結合ポリユビキチンと結合できることが報告された。

NEMOは50kDaのタンパク質で、2つのコイルドコイルドメイン(CC1、CC2)とロイジンジッパー(LZ)、C末端に亜鉛フィンガー(ZF)を含む。NEMOのCC2とLZから構成されるCoZiドメインにはUBAN(ubiquitin binding in ABIN and NEMO)モチーフが存在し、Lys63結合ポリユビキチンと結合する。NEMOがどのような立体構造でポリユビキチンに結合し、IKK複合体を活性化するか、特にポリユビキチン鎖の結合の違いをどのように認識するかは、多彩なユビキチンシグナルの分子基盤を知る上でも、生物学的に極めて重要なテーマである。

(2) DNA修復に関わるモノユビキチンおよびLys63結合ユビキチン

損傷乗り越え複製(translesion synthesis)は、真核細胞がDNAの損傷を乗り越えて複製を行なう主要な経路である。DNAに損傷が起こると、核内増殖抗原(PCNA; proliferating cell nuclear antigen)がモノユビキチン化される。Yファミリーポリメラーゼpol ι (iota)およびpol η (eta)のC末端領域にはそれぞれ新規ユビキチン結合ドメインUBMおよびUBZが存在する。これらのユビキチン結合ドメインは、ポリメラーゼとモノユビキチン化したPCNAとの結合のために必要であり、これらは損傷乗り越え複製に重要な調節的役割を担っている。さらに、PCNAはモノユビキチン化だけでなく、Lys63結合ポリユビキチン化を受けることが報告された。その結合相手はまだ未同定であるが、その認識機構の解明は、同じくLys63結合ポリユビキチンを認識するNEMOとの関連からも重要なテーマである。

2. 研究の目的

(1) 転写制御に関わるユビキチン結合蛋白質の認識機構の解明

NEMOのユビキチン結合UBANモチーフを含むCoZiドメインとLys63結合ポリユビキチンの複合体の結晶構造解析を行う。その際、ユビキチンを直列につなげてLys63結合を模倣したタンデム(直鎖状)ユビキチンを用いて複合体の結晶化を行う。結晶構造に基づき、NEMOがLys63結合ユビキチンを認識し、IKK複合体を活性化するメカニズムを説明する。

(2) DNA修復に関わるユビキチン結合蛋

白質の認識機構の解明

Yファミリーポリメラーゼpol ι のUBMドメインおよびpol η のUBZドメインについて、モノユビキチンとの共結晶化を行い、ユビキチン表面の相互作用部位を特定する。YファミリーポリメラーゼはPCNA-interacting peptide(PIP box)を持ち、もともとPCNAと結合できるが、PCNAがユビキチン化されることによりさらに親和性が増す。これら単体と複合体形成後の立体構造の比較により、ユビキチンがポリメラーゼと相互作用して損傷乗り越え複製を誘起する機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) NEMOのユビキチン結合UBANモチーフとタンデムユビキチンとの複合体の結晶構造解析

モノユビキチンとポリユビキチンの双方を用いてNEMOのUBANモチーフとの複合体の結晶化を行う。Lys63でイソペプチド結合したポリユビキチンの合成は困難である。しかしながら、Lys63の位置は3次構造上、ユビキチンのN末端の近くにあるため、ユビキチンのC末端を次のユビキチンのN末端につなげて発現させたタンデム(直鎖状)ユビキチンを使うことにより、Lys63結合ユビキチンを模倣したサンプルとして代用できると考えた。

NEMOのUBANモチーフ、およびLys63結合を模倣したタンデムユビキチンを大腸菌で発現・精製し、相互作用をプルダウン実験で検出し、表面プラズモン共鳴により結合力を定量化する。相互作用領域を決定し、結晶化に最適な長さの発現コンストラクトを探索する。

(2) Yファミリーポリメラーゼの新規ユビキチン結合ドメインUBM、UBZとユビキチンとの複合体の結晶構造解析

新しく同定されたYファミリーポリメラーゼpol ι の2つのUBMドメインそれぞれについてモノユビキチンとの共結晶化を行う。pol η のUBZについてはユビキチンとの相互作用面が未知であるので、モノユビキチンとの共結晶化と平行して結合面を同定するための生化学実験を行う。いずれのドメインも30アミノ酸程度の短い配列のため、結晶化が困難なことも予想される。その場合は結晶成長を助けるためにGSTなどのタグを付加した状態での精製・結晶化も検討する。結晶成長のパッキングを効率よく行わせるために、ユビキチンとユビキチン結合ドメインをつなげた融合タンパク質としての発現・結晶化も検討する。

4. 研究成果

1. 転写制御に関わる NEMO のユビキチン結合 UBAN モチーフとタンデムユビキチンとの複合体の結晶構造解析

NEMO の UBAN モチーフは Lys63 でインペプチド結合したポリユビキチンを認識すると報告されていた。Lys63 の位置は 3 次構造上、ユビキチンの N 末端の近くにあるため、タンデム (直鎖状) ユビキチンは Lys63 結合ユビキチンと同様に NEMO に結合すると考えられた。ところが NEMO とポリユビキチンとの相互作用を表面プラズモン共鳴により定量化したところ、驚いたことに NEMO と Lys63 結合 2 連結ユビキチンとの結合は検出できず、一方タンデム 2 連結ユビキチンとは強く結合する (平衡解離定数 $1.6 \mu\text{M}$) ことが判明した。

NEMO の UBAN モチーフを含む CoZi ドメイン単独での結晶構造を解析したところ、長く伸びたヘリックスが 2 本より合わさったコイルドコイル構造のホモ 2 量体を形成していた (図 1)。2 量体は Pro292 残基のところで折れ曲がっているが、その前後はそれぞれほぼ完全な 2 回対称性を持っている。UBAN モチーフで保存されているアミノ酸は Pro292 よりも C 末端側に集中しており、分子表面に沿って列を作って並んでいる (図 1)。立体構造の対称性から、2 量体の両側の面で表面の形状や電荷分布は同様であり、ユビキチンはコイルドコイル 2 量体の両面に等価に結合するものと予想された。

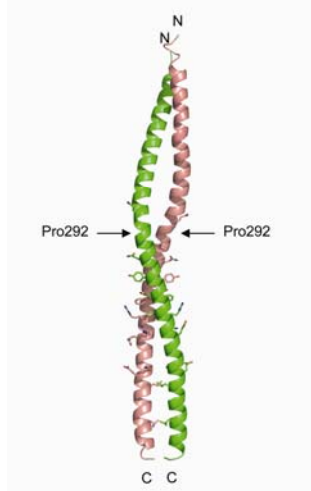


図 1. NEMO の CoZi ドメイン単独の結晶構造。UBAN モチーフで保存されたアミノ酸残基の側鎖をスティックモデルで示す。

引き続きタンデム 2 連結ユビキチンと NEMO の CoZi ドメインの複合体の共結晶化を行い、結晶構造解析に成功した。その結果 NEMO はコイルドコイル二量体の両面で 2 分子のタンデムユビキチンを対称的に結合

していた (図 2)。タンデムユビキチンを構成する 2 つのユビキチンは UBAN モチーフの保存されたアミノ酸残基の列に沿って結合していた。1 番目 (先端側) のユビキチンは Ile44 を中心とする疎水性の面が NEMO の一方のヘリックスに結合していた。一方、2 番目 (手前側) のユビキチンは Ile44 とは別の面を使って、主に静電的相互作用で NEMO と結合していた。しかも手前側ユビキチンは先端側ユビキチンが結合しているのとは別の NEMO のヘリックスと相互作用していた。

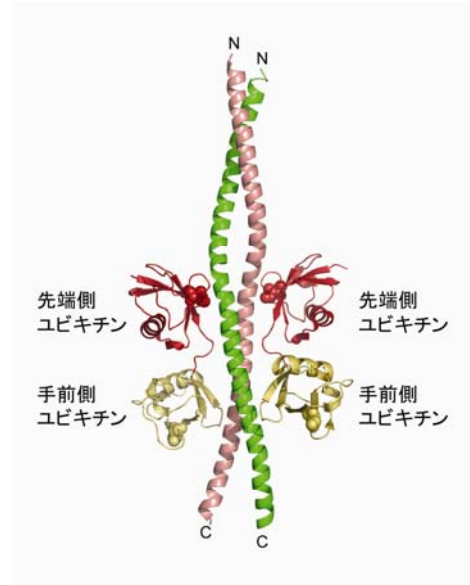


図 2. NEMO の CoZi ドメインとタンデムユビキチンの複合体の結晶構造。それぞれのユビキチンの Ile44 残基を空間充填モデルで示す。

先端側ユビキチンの C 末端付近の Arg72、Leu73、Arg74 残基は NEMO の両方のヘリックスにまたがって相互作用し、2 つのユビキチン間の連結部付近が特に NEMO によって認識されていることが明らかになった。しかし先端側ユビキチンの C 末端の Gly75 と Gly76、それに続く 2 番目 (手前側) のユビキチンの Met1 は NEMO からいったん遠ざかり、これらのアミノ酸残基は直接 NEMO と相互作用していない。そしてその次の残基である Gln2 が NEMO と相互作用する。この Gln2 残基がタンデムユビキチン鎖と Lys63 結合ユビキチン鎖を見分けるのに重要である。すなわち結晶構造に基づいて Lys63 結合ユビキチン鎖が結合したモデルを作ると、手前側ユビキチンの Glu2 残基が NEMO と相互作用できなくなる。このことが NEMO がタンデムユビキチンを選択的に結合する理由であると考えられる。

タンデムユビキチンの結合によって CoZi ドメインの Pro292 の N 末端側の部分が C 末

端側に沿って並び、コイルドコイルの超らせんのピッチが伸びてほどけるような構造変化を起こしていた。この局所的な構造変化が NEMO 全体の構造にどのような影響を及ぼすかは今後の課題である。また、NEMO のタンデム（直鎖状）ポリユビキチン化が NEMO 同士の会合を促進し、高次複合体が形成されることによって IKK 複合体の活性化が起こる可能性も結晶構造から示唆された。

2. DNA 修復に関わる Y ファミリーポリメラーゼの新規ユビキチン結合ドメインの結晶構造解析

pol η の UBZ 単独での結晶構造解析に成功した（図 3）。引き続き pol η の UBZ ドメインとモノユビキチンとの共結晶化を行ったが結晶は得られなかった。一方 pol ι の UBM ドメインについてはタグタンパク質と融合させた状態で結晶化することに成功した。



図 3. pol η の UBZ ドメインの結晶構造。配位した亜鉛を球で示す。

5. 主な発表論文等

（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 1 件）

- ① Simin Rahighi, Fumiyo Ikeda, Masato Kawasaki, Masato Akutsu, Nobuhiro Suzuki, Ryuichi Kato, Tobias Kensche, Tamami Uejima, Stuart Bloor, David Komander, Felix Randow, Soichi Wakatsuki, Ivan Dikic, Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF- κ B Activation, *Cell* 136, 1098-1109, 2009, 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① Simin Rahighi, Fumiyo Ikeda, Masato Kawasaki, Masato Akutsu, Nobuhiro Suzuki, Ryuichi Kato, Tobias Kensche, Tamami Uejima, Stuart Bloor, David Komander, Felix Randow, Soichi

Wakatsuki, Ivan Dikic, NEMO selectively binds to ubiquitin chain in NF- κ B activation, 第 61 回日本細胞生物学会大会、2009 年 6 月 2 日、名古屋国際会議場、名古屋

- ② Simin Rahighi, Fumiyo Ikeda, Masato Kawasaki, Masato Akutsu, Nobuhiro Suzuki, Ryuichi Kato, Tobias Kensche, Tamami Uejima, Stuart Bloor, David Komander, Felix Randow, Soichi Wakatsuki, Ivan Dikic, NEMO (NF- κ B essential modulator) selectively binds linear ubiquitin chains in NF- κ B activation, 第 26 回 PF シンポジウム、2009 年 3 月 25 日、つくば国際会議場、つくば

- ③ Nobuhiro Suzuki, Masato Kawasaki, Ryuichi Kato, Ivan Dikic, Soichi Wakatsuki, Crystallographic study of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human polymerase eta, 国際結晶学会 IUCr2008、2008 年 8 月 26 日、グランキューブ大阪国際会議場、大阪

- ④ Simin Rahighi, Masato Akutsu, Nobuhiro Suzuki, Masato Kawasaki, Ryuichi Kato, Ivan Dikic, Soichi Wakatsuki, Structure determination of NEMO (NF- κ B essential modulator) UBAN domain, 国際結晶学会 IUCr2008、2008 年 8 月 26 日、グランキューブ大阪国際会議場、大阪

- ⑤ 鈴木喜大, 川崎政人, 加藤龍一, Marzena Bienko, Ivan Dikic, 若槻壮市, ヒト DNA ポリメラーゼ η のユビキチン結合 Zn フィンガードメインの結晶構造解析, 第 25 回 PF シンポジウム、2008 年 3 月 19 日、KEK、つくば

- ⑥ 鈴木喜大, 川崎政人, 加藤龍一, Marzena Bienko, Ivan Dikic, 若槻壮市, ヒト DNA ポリメラーゼ η のユビキチン結合 UBZ ドメインの結晶構造, 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜、横浜

- ⑦ Nobuhiro Suzuki, Masato Kawasaki, Ryuichi Kato, Marzena Bienko, Ivan Dikic and Soichi Wakatsuki, Crystallographic analysis of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human DNA polymerase eta, 2nd International Symposium on Diffraction

Structural Biology、2007年9月12日、
タワーホール船堀、東京

[その他]

ホームページ

<http://www.kek.jp/ja/news/press/2009/NEMO.html>

<http://www.kek.jp/newskek/2009/marapr/NEMO.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 政人 (KAWASAKI MASATO)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教

研究者番号：00342600

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

若槻 壮市 (WAKATSUKI SOICHI)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号：00332114

加藤 龍一 (KATO RYUICHI)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：50240833

五十嵐 教之 (IGARASHI NORIYUKI)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：80300672

平木 雅彦 (HIRAKI MASAHIKO)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究機関講師

研究者番号：20282676

松垣 直宏 (MATSUGAKI NAOHIRO)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教

研究者番号：50342598

山田 悠介 (YAMADA YUSUKE)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教

研究者番号：20391708

鈴木 喜大 (SUZUKI NOBUHIRO)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究員

Simin Rahighi

総合研究大学院大学・大学院生

Ahmed Rohaim

総合研究大学院大学・大学院生