

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770081

研究課題名（和文） 翻訳後修飾による NEMO の機能変換の構造生物学的研究

研究課題名（英文） Structural analysis for the functional exchange of NEMO by post-translational modifications

研究代表者

天野 剛志（TENNO TAKESHI）

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：70381663

研究成果の概要：翻訳後修飾は、タンパク質の機能を変換させる重要な引き金となる。免疫応答で重要なタンパク質である NEMO は、ユビキチン化や SUMO 化といった翻訳後修飾を受けたり、他のタンパク質に結合しているポリユビキチン鎖と相互作用したりすることで、機能を変化させている。本研究では、NEMO の C 末端 ZnF ドメインがユビキチンとの相互作用に重要であり、遺伝病の原因となるアミノ酸変異は ZnF ドメインの構造を壊し、ユビキチンとの相互作用もできなくなることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：構造生物学、分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：翻訳後修飾、ユビキチン、SUMO、シグナル伝達、分子認識

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能変換の手段の一つとして翻訳後修飾がある。翻訳後修飾はリン酸基や糖鎖・脂質など化学基による修飾と、ユビキチンや SUMO などタンパク質による修飾に大別できる。前者はタンパク質表面で提示されるといった比較的小さな変化であるが、後者はポリマーとなってタグとして機能したり、基質タンパク質との分子内相互作用によって基質タンパク質の高次構造の変化を誘起したりしている。

ユビキチンは 76 アミノ酸からなる真核生

物において高度に保存されたタンパク質である。ユビキチンが他の翻訳後修飾タンパク質と大きく異なるのは、ユビキチン自身のリジン残基を介したイソペプチド結合によりポリマー（ポリユビキチン鎖）を形成することである。ユビキチンには 7 個のリジン残基があり、その全てがイソペプチド結合の形成に利用されている。これらのリジン残基のうち、Lys 48 で連なっているポリユビキチン鎖と Lys 63 で連なっているポリユビキチン鎖では機能が異なることが報告されている。研究代表者がサブユニット特異的に安定同位

体を導入した Lys 48 リンクおよび Lys 63 リンクのユビキチン鎖 (二量体と四量体) を *in vitro* で作製し NMR で解析した結果、イソペプチド結合部位に依存してユビキチン鎖の高次構造が異なり、この高次構造の差が異なる機能を生み出している可能性を示した。またユビキチンと相互作用する UBD (ubiquitin binding domain) である UIM (ubiquitin-interacting motif) や UBA (ubiquitin associated) ドメインのユビキチンの認識機構 (UIM はユビキチン様ドメインを使用) について解析した結果、これらの UBD がユビキチンの Ile 44 を中心とした疎水性表面を認識していることを明らかにした。しかしながら、これらの UBD はユビキチン 1 分子を認識しているに過ぎず、イソペプチド結合の違いによるポリユビキチン鎖の機能の違いを解明するためには、UBD をもつタンパク質によるポリユビキチン鎖の高次構造認識機構を明らかにする必要がある。

一方 SUMO (small ubiquitin-related modifier) においても SUMO を認識する SBM (SUMO binding motif) が存在する。SUMO がタグとして機能する場合、SBM をもつタンパク質は SUMO と基質タンパク質の両方を認識し新たな複合体を形成することが報告されている。また基質タンパク質が SBM をもつ場合、SUMO と基質タンパク質との間のイソペプチド結合と SUMO と SBM との間の非共有結合的な相互作用によって、基質タンパク質の構造変化を誘起することが報告されている。したがって、SUMO による基質タンパク質の機能変換のメカニズムを解明するためには、SBM による SUMO 化タンパク質の認識機構を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究で対象としている NEMO は上記の疑問を解決する上で優れたタンパク質である。NEMO (NF- κ B essential modulator) は NF- κ B (nuclear factor κ B) シグナル伝達経路に関与する必須の調節因子である。転写因子である NF- κ B は通常サイトゾルで阻害因子である I κ B (inhibitor of NF- κ B) と複合体を形成し、不活性の状態にある。腫瘍壊死因子 (TNF) による細胞外からの刺激が膜受容体・アダプタータンパク質複合体を介して IKK (I κ B kinase) 複合体 (IKK α , IKK β , NEMO) に伝わり IKK が活性化すると、I κ B をリン酸化する。この過程において NEMO は K63 リンクポリユビキチン鎖に相互作用しキナー

ゼ活性を調節する足場タンパク質として機能している。一方 NEMO は核内において DNA 障害のシグナルによって、SUMO 化、リン酸化、ユビキチン化と一連の翻訳後修飾を受けて核外へ移行し IKK 複合体を活性化する伝令タンパク質としても機能している。

ヒト NEMO は約 50 kDa からなるタンパク質で、2 カ所のコイルドコイル (CC1, CC2)、ロイシンジッパー (LZ)、Zn フィンガー (ZnF) の各ドメインをもっている。NEMO は CC2 ドメインから LZ ドメインにかけての領域で K63 リンクポリユビキチン鎖を特異的に認識することが報告されている。すなわち NEMO が K63 リンクポリユビキチン鎖の高次構造を特異的に認識している可能性がある。一方、この領域に存在する Lys 277 と Lys 309 が SUMO 化部位であり、SUMO 化によって NEMO が核に局在することで一連の翻訳後修飾カスケードが始まることが報告されている。すなわち、SUMO 化によって別の因子がリクルートされているか、もしくは NEMO 自身に構造変化が起きている可能性がある。したがって NEMO は翻訳後修飾分子と相互作用あるいは共有結合することによって異なる機能を発揮しているタンパク質である。本研究では、翻訳後修飾による NEMO の機能変換のメカニズムを構造生物学的アプローチで解明する。

3. 研究の方法

翻訳後修飾による NEMO の機能変換メカニズムを解明するために以下の研究を行った。

(1) NEMO-ポリユビキチン鎖複合体の立体構造解析

GST プルダウンにより、立体構造解析に適した NEMO のタンパク質ドメインの検討を行った。

NEMO の全長および M135、Q183、M204、P393 から始まる NEMO のコード領域を GST 遺伝子の下流に接続し、直鎖状ポリユビキチン鎖 ($n = 5$) との共発現系をそれぞれ構築した。これらの発現ベクターを大腸菌に導入し、各タンパク質を発現させた。大腸菌を破碎し、上清画分に含まれている GST-NEMO タンパク質をグルタチオンセファロース樹脂に吸着させた。樹脂を洗浄後、ポリユビキチン鎖が相互作用しているかどうか SDS-PAGE により分析した。

(2) SUMO 化 NEMO の立体構造解析

大腸菌内 SUMO 化システムを用い、SUMO 化 NEMO を大量調製し、結晶化に適した NEMO のタンパク質ドメインの検討を行った。

SUMO 化に必要な酵素群と NEMO の共発現系を構築し、大腸菌に導入した。各タンパク質を発現させ、NEMO が SUMO 化されているかどうか SDS-PAGE により分析した。

(3) NEMO の ZnF ドメインの構造解析

NEMO の ZnF ドメインは構造未知であったので、NMR による構造解析を行った。

安定同位体ラベルを導入した GST 融合 ZnF ドメインを大腸菌で発現させた。融合タンパク質を精製後、プロテアーゼで ZnF ドメインを単離した。一連の NMR 測定により得られたデータからシグナルの帰属、原子間距離情報の取得を行い、ZnF ドメインの構造計算を行った。

(4) ZnF ドメインとユビキチンとの相互作用解析

NEMO の ZnF ドメインの機能を明らかにするために、ユビキチンや SUMO との相互作用解析を行った。

GST 融合 ZnF ドメインを使い、モノユビキチン、直鎖状ポリユビキチン鎖 ($n = 2 \sim 5$)、SUMO-1 との相互作用を GST プルダウンにより、解析した。また、ユビキチンとの相互作用については、NMR 滴定法により相互作用表面の探索を行った。

4. 研究成果

(1) NEMO-ポリユビキチン鎖複合体の立体構造解析

大腸菌で各種 GST-NEMO と直鎖状ポリユビキチン鎖 ($n = 5$) を共発現させ、GST プルダウンにより相互作用を解析した結果、少なくとも NEMO の M204~H360 までの領域があれば、直鎖状ポリユビキチン鎖と相互作用できることが明らかとなった。この領域には K63 リンクポリユビキチン鎖や直鎖状ポリユビキチン鎖と相互作用し、NEMO や ABIN タンパク質に保存されている UBAN ドメインが含まれており、妥当な結果である。さらに、一連の解析において興味深いことは、NEMO の ZnF ドメインが単独でポリユビキチン鎖と相互作用できることである。NEMO の ZnF ドメインは機能がよく分かっておらず、構造も未知であったために、

このドメインの構造解析・機能解析を進めた。

(2) SUMO 化 NEMO の立体構造解析

Miyamoto らにより、細胞の DNA に傷害が生じると、NEMO の K277、K309 が SUMO 化されること、その SUMO 化には E3 として PIASy が必要であることが報告されている。大腸菌内で NEMO の SUMO 化を行うために、E1、E2、PIASy、NEMO を様々な組み合わせ・条件で共発現させ、SUMO 化の検出を行ったが、残念ながら本研究期間内で SUMO 化 NEMO を得ることができなかった。大腸菌内 SUMO 化については、Saitoh らにより既に確立された技術であり、他の SUMO 化タンパク質では実績がある。したがって、NEMO が SUMO 化できなかった原因としては、大腸菌において PIASy が正しく発現できていない、または、未知のほかの因子が存在する可能性が考えられる。

(3) NEMO の ZnF ドメインの構造解析

NEMO の P393、C397 からはじまる ZnF ドメインの発現系を構築し、NMR による立体構造解析を試みた。どちらも構造解析可能なサンプルを得ることができたが、P393 からはじまるサンプルには、亜鉛との相互作用に関与していないフリーのシステイン残基が存在し、高濃度下では還元剤を必要としたため、構造解析は C397 ではじまるサンプルを用いた。

一連の解析の結果、397-417 の主鎖 R.M.S.D. が 0.20 \AA の溶液構造が得られた。NEMO の ZnF ドメインは CCHC タイプの典型的な ZnF ドメインであり、2 本の β -ストランド、1 本の α -ヘリックスから構成されていた。発現ベクター由来のアミノ酸 2 残基が第 1 番目の β -ストランドに含まれていたが、特に問題なく β -シート構造を形成していた (図 1)。

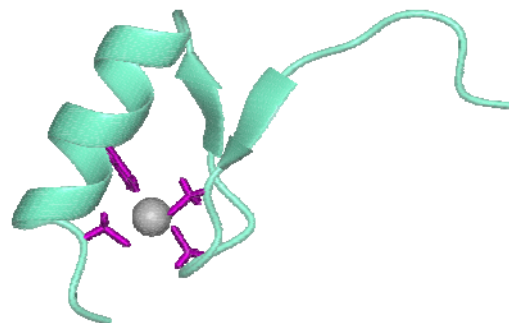


図 1 NEMO の ZnF ドメイン

注目すべき点として、亜鉛原子をトラ

ップしている 4 残基のうち最後のシステイン残基は、ヒトNEMO全長 419 アミノ酸のうち 417 番目であり、C末端に非常に近い位置にある。このシステインに変異が生じれば、亜鉛との親和性は著しく低下し、立体構造を保持できないと予想できる。実際にC417F変異体について、野生型のサンプルと同様に調製し、 ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを測定したところ、野生型と全く異なるスペクトルが得られ、ほとんど立体構造を保持していないと考えられる。この残基の変異はHDE-ID (低汗性外胚葉形成不全を伴う免疫不全症)を引き起こすことが知られている。したがって、変異によるZnFドメインの構造異常が病気の原因の可能性のひとつと考えられる。

NEMO の ZnF ドメインについては、Agouらにより先に立体構造が報告されたが、基本的には本研究により決定された構造とほぼ同一である。しかしながら、彼らが作製した C417F 変異体は、残りの 3 残基により亜鉛原子がトラップされていて、 α -ヘリックスの C 末端側以外は野生型と変わらない構造であったと報告している。本研究の結果と異なる理由のひとつは、彼らが構造解析に用いたサンプルは合成ペプチドであり、C末端にアミド保護基が残っており、水を介した水素結合により亜鉛原子が保持されていると考えられる。

(4) ZnF ドメインとユビキチンとの相互作用解析

GST-プルダウンにより、ZnF ドメインとユビキチン、直鎖状ポリユビキチン鎖 ($n = 2 \sim 5$)、SUMO-1 との相互作用を解析した。その結果、モノユビキチンとは非常に弱く相互作用し、直鎖状ポリユビキチン鎖のユビキチンのユニット数が多ければ多いほど見かけの親和性が強くなる結果が得られた。一方、SUMO-1 とは相互作用しなかった。

ユビキチンとの相互作用が確認できたので、NMR 滴定法により ZnF ドメインとユビキチンの相互作用表面の検出を行った。滴定実験で得られたシグナルの変化は fast exchange、すなわちモノユビキチンと ZnF ドメインは弱く相互作用していることを示していた。ユビキチンについては、I44 を中心とした疎水性パッチが主な相互作用領域であり、現在までに知られているユビキチン結合ドメインの相互作用領域と同様であった。一方、ZnF ドメインについては、 α -ヘリックスを構成しているアミノ酸残基のシグナルが変化しており、 α -ヘリックスが主な相互作用部位であると考えられる (図 2)。この結果は、Agouらの結果とほぼ同様であった。

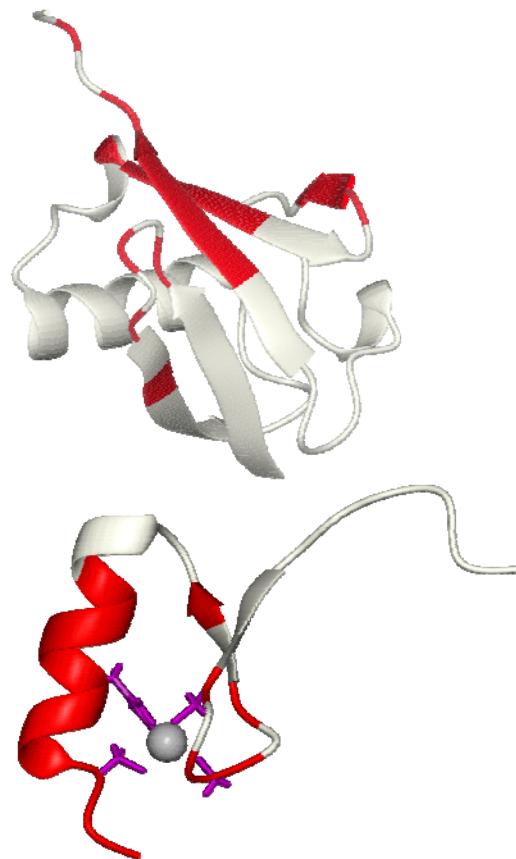


図 2 NMR 滴定実験によりシグナルが変化した残基を示したリボン図 (上) ユビキチン (下) NEMO ZnF ドメイン

C417F 変異体について、同様の実験を行ったところ、シグナルの変化は観察されず、ユビキチンとは相互作用しないことが明らかとなった。すなわち、変異によりドメイン構造が保持できず、ユビキチンとの相互作用もできなくなったと考えられる。したがって、C417 の変異はドメイン構造が保持できなくなった結果、他のタンパク質との相互作用、例えばポリユビキチン鎖との相互作用ができなくなることが病気の原因となっている可能性がある。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 剛志 (TENNO TAKESHI)
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
研究者番号：70381663

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者