

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15084

研究課題名(和文)炎症抑制ユビキチンリガーゼTriad3によるユビキチン認識と作動機構の解明

研究課題名(英文)Structural basis for ubiquitin recognition and catalytic mechanism of ubiquitin ligase Triad3

研究代表者

尾勝 圭(Kei, Okatsu)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：00739641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Triad3は、CueドメインとRBRドメインから構成されるユビキチンリガーゼである。Cueドメインはユビキチン鎖認識に関与し、RBRドメインはユビキチンリガーゼの活性に関与する。本研究では、Triad3のユビキチン認識に必要な最小ドメインを決定した。また、Cueドメインのユビキチン鎖選択性を明らかにした。さらにCueドメインとユビキチン鎖複合体の精製条件と結晶化条件を最適化し、2.79オングストロームのデータを得ることができた。RBRドメインについては、足場タンパク質を融合して分子量を増やし、クライオ電子顕微鏡でタンパク質粒子の画像を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Triad3は、Gordon Holmes 症候群(GHS)と呼ばれる性腺機能低下症をきたす小脳失調症との関連が示唆されている。Triad3の機能としては炎症抑制やシナプス可塑性への関与が知られている。しかし、Triad3による炎症や自然免疫の細胞内シグナリングの認識機構は未解明であった。本研究で、Triad3のCueドメインのユビキチン鎖選択性を明らかにしたことで、特定の細胞内シグナリングへの応答の理解が進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：Triad3 is a ubiquitin ligase composed of a Cue domain and an RBR domain. The Cue domain is involved in ubiquitin chain recognition and the RBR domain is involved in ubiquitin ligase activity. In this study, we determined the minimum domain required for ubiquitin recognition in Triad3. We also determined the ubiquitin chain selectivity of the Cue domain. Furthermore, we optimized the purification and crystallization conditions of the Cue domain and the ubiquitin chain complex and obtained data at 2.79angstrom. For the RBR domain, we increased the molecular weight by fusing a scaffold protein and obtained images of protein particles by cryo-EM.

研究分野：生命科学

キーワード：ユビキチン 炎症 細胞内シグナル伝達 X線結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Triad3 は、炎症や自然免疫シグナル抑制機能のあるユビキチン連結酵素 (ユビキチンリガーゼ) である。C 末端側の RING1-IBR-RING2 (RBR) ドメインでユビキチン鎖形成を触媒する。Triad3 の基質は、炎症に関連して TNF や IL-1 受容体の下流分子の RIPK1、自然免疫に関連して Toll 様受容体 TLR4 や TLR9、RIG-I 経路の TRAF3 など複数のタンパク質が報告されている。また、Triad3 の中央にはユビキチン鎖認識ドメインと予測される領域がある。ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン連結酵素 (E3) による連続した反応によって、基質タンパク質のリジン残基に共有結合する。ユビキチン自身の 7ヶ所のリジン残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) や N 末端のアミノ基 (M1) にも結合し、鎖状に連結したユビキチン鎖を形成する。細胞内の炎症や自然免疫シグナリングには K63 鎖や M1 鎖が関わっている。TRAF6、RIPK1 や TRAF3 は K63 結合型ユビキチン鎖 (K63 鎖) を受け、LUBAC 複合体 (HOIL-1L, HOIP, SHARPIN) が NEMO を基質として直鎖ユビキチン鎖 (M1 鎖) 形成する。しかし、Triad3 がどのようにシグナル分子を認識し、シグナリングを制御するのかということは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、Triad3 が炎症や自然免疫シグナルにリクルートされるメカニズムと作動機構を明らかにすることである。本研究では Triad3 のユビキチン鎖認識に着目して炎症や自然免疫シグナルを認識するメカニズムと酵素活性制御機構を解明し、Triad3 の炎症や自然免疫シグナル抑制機能の理解を深める。

### 3. 研究の方法

ユビキチン認識ドメインのユビキチン鎖選択性とユビキチン認識の最小領域決定のため、GST 融合 Triad3 を大腸菌で発現し、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーで精製タンパク質を作製した。精製 Triad3 とユビキチン鎖タンパク質を使用してプルダウンアッセイを行った。また Triad3 のユビキチン鎖認識ドメインと蛍光標識したユビキチンおよび 5 種類のユビキチン鎖を用いて蛍光偏光法によって偏光度測定し、解離定数を算出した。GST 融合 Triad3 をアフィニティークロマトグラフィーで精製した後、ユビキチン鎖を混合してイオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーによって複合体状態で精製した。結晶化の一次スクリーニングは 20 と 4 で実施し、結晶が得られた条件について沈殿剤濃度、添加剤条件検討を検討した。Triad3 の活性中心である RBR ドメインの立体構造解析では、アミノ酸残基数を検討、種 (ヒト、マウス、ラット) の検討、SERp server を用いた表面残基エントロピー減少法による変異の導入を検討するため、各精製タンパク質を作製して結晶化スクリーニングを実施した。クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) 解析では、多量体を形成する足場タンパク質を融合した複数のアミノ酸残基数で作製した。さらに、足場タンパク質の乖離を防ぐために化学的架橋によって固定した。再度、そのサンプルをゲルろ過精製し、単一フラクションをグリッドに塗布して凍結した。複数のプロットング条件で cryo-EM 測定を試みた。

### 4. 研究成果

Triad3 のユビキチン認識領域と二量体型ユビキチン鎖を用いたプルダウンアッセイの結果、

Triad3 のユビキチン認識領域は特定のユビキチン鎖と強く結合した。同様に、Triad3 のユビキチン鎖認識に必要な最小領域を特定した。Triad3 のユビキチン鎖認識ドメインと蛍光標識したユビキチンを用いた解離定数測定の結果、特定の2つのユビキチン鎖では一桁  $\mu\text{M}$  の数値を示した。この結果はプルダウンアッセイの結果と一致しており、Triad3 のユビキチン鎖認識の選択性を見出した。これらの相互作用情報に基づいて精製した Triad3 とユビキチン鎖の複合体タンパク質は、960 条件の結晶化試薬を使って 20 と 4 の条件でスクリーニングした。結晶が得られた条件について沈殿剤濃度、添加剤条件検討によって再現性の高く大きな結晶が得られる条件を決定した(図左)。この結晶に Triad3 のユビキチン鎖認識ドメインとユビキチン鎖が含まれることを SDS-PAGE で確認し、大型放射光施設 SPring-8 で測定、回折像を得ることができた(図右)。しかし、ユビキチンや Cue ドメインの予測構造の単体構造を利用した解析では位相決定には至っていない。

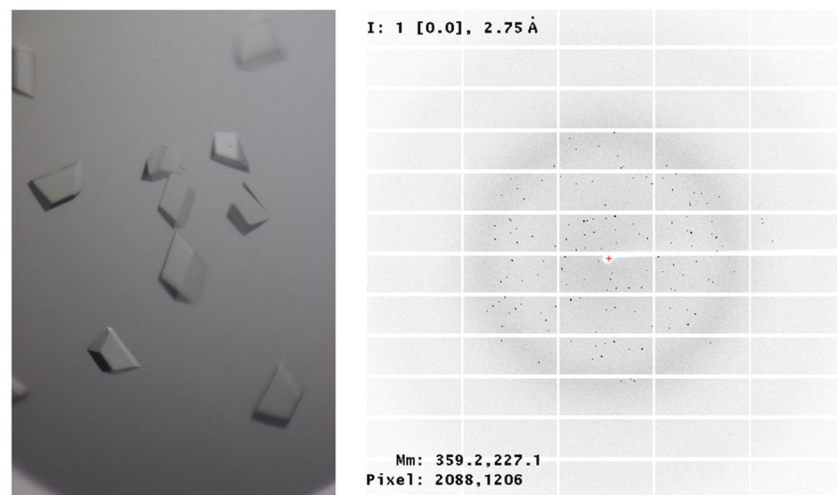


図. Triad3のユビキチン認識ドメインとユビキチン鎖複合体の結晶(左)と回折像(右)

また、炎症に関わるシグナルタンパク質 TAB2 の精製タンパク質を用いて、さまざまなユビキチン鎖とプルダウンアッセイをおこなった。その結果、TAB2 は K63 鎖の他に K6 鎖も認識でき、dual specificity が明らかになった (Li et, Biophys J. 2021)。Triad3 の活性中心のある RBR ドメインの立体構造解析では、アミノ酸残基数を検討、種(ヒト、マウス、ラット)の検討、SERp server を用いた表面残基エントロピー減少法による変異を導入した精製タンパク質の結晶化したが、結晶を得ることができなかった。そこで、クライオ電子顕微鏡(cryo-EM)解析に着手した。Triad3 単体では分子量が小さいため解析が難しいので、多量体を形成する足場タンパク質を融合したタンパク質を精製し、足場タンパク質の乖離を防ぐために化学的架橋によって固定した。再度、架橋サンプルをゲルろ過精製し、単一フラクションをグリッドに塗布して凍結した。複数のプロットング条件で cryo-EM 測定を試みることで、電顕画像を収集でき、タンパク質粒子の画像を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yanjun Li, Kei Okatsu, Shuya Fukai, Yusuke Sato	4. 巻 120
2. 論文標題 Structural basis for specific recognition of K6-linked polyubiquitin chains by the TAB2 NZF domain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 3355-3362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2021.06.037	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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