

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770099

研究課題名（和文）

TrabidによるLys63結合型ポリユビキチン鎖の選択的切断の構造的基盤

研究課題名（英文）

Structural basis for specific cleavage of Lys63-linked polyubiquitin chains by Trabid

研究代表者

佐藤 裕介（SATO YUSUKE）

東京大学・放射光連携研究機構・助教

研究者番号：50568061

研究成果の概要（和文）：マウス、ゼブラフィッシュ、ハエ Trabid の OTU ドメインを調製したが、500 種類の条件で結晶化を試みても結晶は得られなかった。一方、ユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC の構成因子である HOIL-1L の NZF ドメインと直鎖状ユビキチン二量体複合体の結晶構造を決定した。得られた結晶構造とそれを元にした変異体解析結果から HOIL-1L による直鎖状ユビキチン鎖認識機構を解明し、その結果は学術誌 PNAS に掲載された。

研究成果の概要（英文）：We prepared the mouse, zebrafish and fly Trabid OTU domain and screened against 500 crystallization conditions. However, the OTU domains of Trabid were not crystallized. On the other hand, we determined the crystal structure of the HOIL-1L NZF domain in complex with linear di-ubiquitin. Together with structure based mutagenesis experiments our structure reveals the mechanism for specific recognition of linear chains by the HOL-1L NZF domain. This result was published in PNAS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：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

1. 研究開始当初の背景

(1) ポリユビキチン（Ub）鎖

Ub は 76 残基からなるタンパク質で、標的タンパク質のリジン残基とイソペプチド結合を介して結合することでタンパク質の機能を制御する。さらに、結合した Ub 自身のリジン残基、もしくは N 末端メチオニン残基に Ub が付加してポリ Ub 鎖と呼ばれるポリマーを形成する。Ub には 7 つリジン

残基があるため N 末端メチオニンも含めると、結合に使われる残基の違いによって構造と機能が異なる 8 種類のポリ Ub 鎖が合成される。生体内には特定の Ub 鎖を選択的に認識するタンパク質が存在し、これらが繋がり方の異なる Ub 鎖を認識することで、それぞれの Ub 鎖は異なる生体内プロセスのシグナルとしてはたらく。Ub 鎖の識別機構はポリ Ub 鎖の機能を知る上で重要

であり、近年非常に注目されている分野である。しかし、構造生物学的知見が乏しく、より多くの結晶構造の解明が期待されている。

(2) Trabid の役割

Wnt シグナル経路では、Wnt の刺激により β -カテニンが核内へと移行し、TCF 等の転写因子と相互作用することで特異的な遺伝子発現を促進する。 β -カテニンと転写因子の結合は K63 結合型 Ub 鎖修飾を受けた APC により抑制される。Trabid は K63 結合型ポリ Ub 鎖特異的な切断活性をもち、APC から Ub 鎖を除去することで β -カテニンと転写因子との相互作用を促進する。

2. 研究の目的

(1) X 線結晶構造解析の手法を用いて Trabid の OTU ドメイン単体、及び K63 結合型 Ub2 量体との複合体の立体構造決定を行う。得られた結晶構造から、Trabid による K63 結合型 Ub 鎖特異的な切断機構を解明する。

(2) 研究開始当初の背景(1)に記したとおり、ポリ Ub 鎖識別メカニズムの解明は近年非常に注目されている分野である。したがって、Trabid のみにこだわらず、X 線結晶構造解析の手法を用いて Trabid 以外の Ub 鎖識別を行うタンパク質の立体構造決定を行う。得られた結晶構造から、Ub 鎖特異的な認識機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) Trabid 単体の結晶化

Trabid をディスオーダー予測プログラム、Disopred2 を用いて解析した結果、NZF ドメインや OTU ドメインの間に存在するリンカー領域は変性領域であり、決まった構造をとらない柔軟な領域であることが示唆された。変性領域が含まれていると、結晶の形成や成長が阻害されるほか、得られた結晶の X 線回折データにも悪影響を及ぼすことが多い。また、本研究は Trabid の OTU ドメインによる K63 ポリ Ub 鎖の切断メカニズムを明らかにすることを目的としているため、全長の結晶構造決定は必要ではない。

以上の理由により、本研究では変性領域を欠失させたヒト、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエの Trabid の OTU ドメインそれぞれについて、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として大腸菌を用いた発現系で構築し、グルタチオンセファロース精製、陰イオン交換カラム精製、HRV3C による GST タグの切断を経て、最終的にゲルろ過により精製を行い、それぞれ 500 条件の結晶化のスクリーニングを行った。

(2) Trabid と K63Ub2 量体複合体の結晶化

K63 ポリ Ub 鎖は、Ub を ATP 存在下で、Ub 活性化酵素 E1 および Ub 結合酵素 E2 (UBC13-MMS2 複合体) と反応させることで行う。Ub と E2 に関しては大腸菌を用いた発現系で、E1 については昆虫細胞を用いた発現系を用いて調製し、K63 結合型 Ub2 量体を合成した。

また、野生型の Trabid を用いると、結晶が成長する前に K63Ub2 量体は Ub 単体へと分解されてしまうため、安定な複合体を得ることはできない。しかし、Trabid の活性残基であるシステインをセリンに置換することで、K63Ub2 量体と Trabid の複合体を得られると考え、そのような変異を導入した。Trabid 変異体は野生型と同様の方法で精製した。

調製した Trabid 変異体と K63Ub2 量体を混合し、500 条件の結晶化のスクリーニングを行った。

(3) HOIL-1L と直鎖状 Ub2 量体の結晶構造解析

HOIL-1L は HOIP と複合体を形成し、直鎖状ポリ Ub 鎖特異的に合成する Ub リガーゼとして働く。HOL-1L は直鎖状ポリ Ub 鎖と特異的に結合すると報告があったため、ドメインごとに切り詰めてプルダウンアッセイを行った結果、HOIL-1L の NZF ドメインが直鎖状ポリ Ub 鎖特異的に結合することを解明した。この結果に基づき、HOIL-1L の NZF ドメインを GST 融合タンパク質として大腸菌を用いた発現系で構築し、グルタチオンセファロース精製、陰イオン交換カラム精製、HRV3C による GST タグの切断を経て、最終的にゲルろ過により精製を行った。精製した HOIL-1L NZF ドメインに直鎖状 Ub2 量体を加えて再びゲルろ過にかけ、HOIL-1L NZF と直鎖状 Ub2 量体の複合体を精製し、500 条件の結晶化のスクリーニングを行った。

(4) HOIL-1L と直鎖状 Ub2 量体の解離速度定数測定

HOIL-1L と直鎖状 Ub2 量体複合体の結晶構造から、相互作用に関わる残基に点変異を導入した。野生型と点変異体の HOL-1L について、GST 融合直鎖状 Ub2 量体との解離速度定数を Biacore で測定した。

(5) 変異体 HOIL-1L を用いた NF- κ B 活性測定

HEK293T 細胞に NF- κ B 応答プロモーターを持つルシフェラーゼ、HOIP、野生型もしくは変異体 HOL-1L をトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、変異体 HOIL-1L が NF- κ B 活性にどのような影響を及ぼすかを解析した。

4. 研究成果

(1) Trabid 単体の結晶化

変性領域を欠失させた、ヒト、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエの Trabad の OTU ドメインを精製した結果、結晶化に十分な純度の試料が得られた。しかし、結晶化のスクリーニングを行ったところ結晶は得られなかった。

(2) Trabad と K63Ub2 量体複合体の結晶化

Trabad 単体では結晶が得られなかったものの、K63Ub2 量体との共結晶であれば得られる可能性があったため、両者を混ぜて結晶化のスクリーニングを行った。しかし結晶は得られなかった。

研究成果(1)、(2)から、本研究で作成した Trabad は結晶化には不適當であることがわかった。今後、Trabad の結晶化を成功させるためには、さらに N 末端もしくは C 末端を切断し変性領域を減らす、もしくは他の生物種由来の Trabad を調製する必要があると考えられる。

(3) HOIL-1L と直鎖状 Ub2 量体の結晶構造解析

1.6 Å 分解能で複合体の結晶構造を決定した (図 1)。

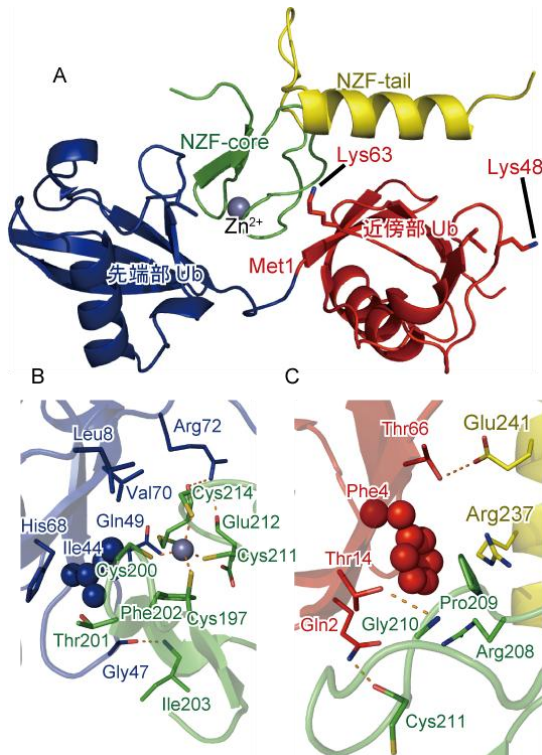


図 1. HOIL-1L・直鎖状 Ub2 量体結晶構造

HOIL-1L の NZF ドメインは一般的な NZF ドメインと同様の構造をもつ NZF-core 領域に加えて、その C 末端側に 11 残基のループとそれに続く 16 残基のヘリックスからなる

NZF-tail 領域を持つことがわかった。NZF-core は直鎖状 Ub2 量体の 2 つの Ub と同時に結合していた。NZF-core の近傍部 Ub 結合部位はすべての Ub 結合性 NZF でよく保存された領域で、先端部 Ub の Ile44 を中心とした疎水性のパッチを認識していた (図 1B)。一方、NZF-core の近傍部 Ub 結合部位は他の NZF では保存されておらず、HOIL-1L のみよく保存された領域で、基部 Ub の Phe4 を中心とした領域を認識していた (図 1C)。さらに、NZF-tail のヘリックス部分も近傍部 Ub と相互作用していた。HOIL-1L は Ub2 量体間のリンクの直接的な認識は行っていないが、近傍部 Ub の Lys48 および Lys63 のアミノ基は先端部 Ub の Gly76 から離れており、Met1 アミノ基のみが安定に結合できる距離にある (図 1A)。このため、直鎖状 Ub 鎖のみ 2 つの隣接した Ub が同時に HOIL-1L と結合でき、直鎖状 Ub 鎖特異的な結合をするという識別機構が明らかとなった。

(4) HOIL-1L と直鎖状 Ub2 量体の解離速度定数測定

研究成果(3)で得られた複合体の結晶構造から、相互作用に関わる残基に変異を導入し、Biacore を用いて解離速度定数を測定した (表 1)。

表 1 HOIL-1L と各種 Ub2 の解離速度定数

	$K_D, \mu\text{M}$			
	Ub単量体	直鎖状Ub2	K48-Ub2	K63-Ub2
WT	462 ± 19	17.2 ± 0.1	317 ± 19	330 ± 13
ΔNZF-tail	390 ± 22	118 ± 13	487 ± 31	528 ± 28
T201A	2,100 ± 305	996 ± 48	2,045 ± 16	1,972 ± 116
R208A	564 ± 15	261 ± 2	398 ± 19	390 ± 21

この結果から野生型の HOIL-1L は K48 および K63 結合型 Ub2 量体よりも直鎖状 Ub2 量体に 17 以上強く結合することがわかった。また、先端部 Ub との相互作用に関わる Thr201 に変異を導入すると、直鎖状、K48、K63 結合型 Ub2 量体に対する解離速度定数が大きく増加することがわかった。一方、近傍部 Ub との相互作用に関わる NZF-tail を除去、もしくは Arg208 に変異を導入すると、直鎖状 Ub2 量体に対する解離速度定数のみ増加し、他の Ub 鎖に対する解離速度定数は大きく変化しないことがわかった。この結果から、研究成果(3)で得られた結晶構造で見られる相互作用は HOIL-1L と直鎖状 Ub2 量体との結合に重要な役割を果たし、さらに近傍部 Ub との相互作用部位を持つことで直鎖状 Ub 鎖に対する特異性を獲得しているということが明らかとなった。

(5) 変異体 HOIL-1L を用いた NF- κ B 活性測定
研究成果(3)で得られた複合体の結晶構造から、相互作用に関わる残基に変異を導入し、細胞内で NF- κ B 活性がどのように変化するかを解析した (図 2)。

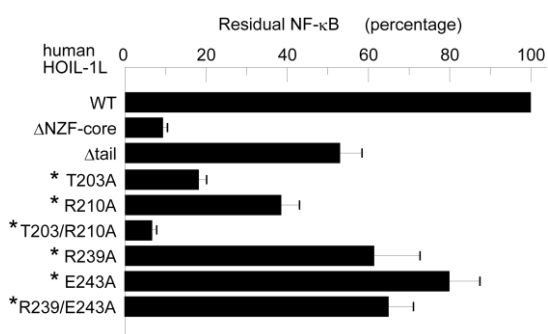


図 2. HOIL-1L 変異体による NF- κ B 活性化

この解析はヒトの HOIL-1L を使用したため、構造解析に用いたマウスの HOIL-1L とは残基番号が異なるが、NZF-tail 上の残基である Arg239 と Glu243 (マウス HOIL-1L の Arg237 と Glu241 に対応) に変異を導入したものは NZF-tail を除去したものと同程度、また NZF-core 上の残基である Thr203 と Arg210 (マウス HOIL-1L の Thr201 と Arg208 に対応) に変異を導入したものは NZF-core を除去したものと同程度、NF- κ B 活性が弱まった。この結果から、HOIL-1L が直鎖状ポリ Ub 鎖と結合することは、NF- κ B 伝達に必須であることが明らかとなった。

研究成果(3)、(4)、(5)の成果はこれまで知られていなかった HOIL-1L NZF ドメインの詳細な機能を世界ではじめて解明し、直鎖状ポリ Ub 鎖の NF- κ B 伝達経路における役割の一つを明らかにした。この成果は米学術誌 PNAS に掲載された。

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)

佐藤裕介., 藤田宏明., 吉川梓., 山下雅美., 山形淳史., Kaiser, SE.., 岩井一宏., *深井周也.
“Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by the HOIL-1L NZF domain”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(51):20520-5, 2011 (査読有)
DOI:10.1073/pnas.1109088108

[学会発表] (計 1 件)

佐藤裕介、Structural basis for specific recognition of K63-linked polyubiquitin chains by TAB2 and TAB3、Pacifichem 2010、2010 年 12 月 19 日、Hawaii Convention Center

[その他]

ホームページ

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/SRRORLifeSciDivJp2/Top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 裕介 (SATO YUSUKE)

東京大学・放射光連携研究機構・助教

研究者番号：50568061