

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24247014

研究課題名(和文) ユビキチン鎖を介したDNA損傷応答制御の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for ubiquitin chain-mediated DNA damage responses

研究代表者

深井 周也 (Fukai, Shuya)

東京大学・放射光連携研究機構・准教授

研究者番号：10361792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチンは、タンパク質分解をはじめとする多様な細胞機能を制御するシグナル分子としての役割を担うが、複数のユビキチン分子が数珠つなぎになったポリユビキチン鎖として機能する例が多く知られる。本研究では、K63結合型ユビキチン鎖を介したDNAの二重鎖切断(DSB)応答のメカニズムを原子の解像度で明らかにすることを目的として、DSB応答を制御するK63結合型ユビキチン鎖の合成・分解・認識に重要なタンパク質複合体の立体構造を決定した。さらに、構造情報に基づいて設計した変異体を用いて、in viroおよび細胞レベルでの機能解析を行うことで機能と構造の相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin serves as a signaling molecule for regulation of protein degradation and other important cellular functions. In many cases, two or more ubiquitin molecules are tandemly linked through covalent bonding to function as polyubiquitin chains. In this research project, we determined three-dimensional structures of protein complexes that play important roles in synthesis, degradation and recognition of K63-linked polyubiquitin chains (K63 chains) for DNA double strand break (DSB) responses to elucidate mechanisms for the K63 chain-mediated regulation of the DSB responses at atomic resolution. Furthermore, we revealed the structure-function relationships through structure-guided mutational analyses at the molecular and cellular levels.

研究分野：構造生物学

キーワード：分子認識 DNA修復 タンパク質複合体 ユビキチン X線結晶構造解析 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームによるタンパク質分解のシグナル分子として知られるユビキチンは、タンパク質分解以外にも多様な細胞機能を制御するシグナル分子として必須な役割を担う。ユビキチンは、C末端のグリシン残基と基質タンパク質の特定のリジン残基とのイソペプチド結合を介して基質タンパク質に付加されるが、さらに、自身のリジン残基やN末端のアミノ基を介して数珠つなぎになったポリユビキチン鎖として機能する例が多く知られる。DNA二重鎖切断(DSB)に対する損傷応答は、ポリユビキチン鎖の機能的役割がよく知られている例の一つである。DSBは、ゲノムの完全性を脅かし、細胞のがん化とも密接に関連する。DSBは、損傷部位の周囲でのヒストンの翻訳後修飾を誘導し、その結果、DSBに応答するタンパク質複合体群が損傷部位にリクルートされて、DSBの修復が行われる。具体的には、キナーゼATRによる損傷クロマチン近傍のリン酸化に次いで、RNF8によるヒストンH2AのK63結合型ポリユビキチン化が起きる。さらに、K63結合型ポリユビキチン鎖(K63鎖)結合領域を複数持つRNF168が集積することでK63鎖が増幅され、それを目印としてDSB修復やG2/Mチェックポイントに必要なRAP80-BRCA1複合体や53BPが損傷部位にリクルートされる。K63鎖合成には、Ubc13が必要であり、その活性はOTUB1により抑制される。DSB応答において、K63結合型ユビキチン鎖(K63鎖)の合成・分解・認識は、リン酸化の制御・認識と同様に決定的に重要なプロセスであるが、その詳細なメカニズムの多くは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、DSBに応答するシグナル分子として機能するポリユビキチン鎖の伸長制御、分解および認識の新たなメカニズムを複合体のX線結晶構造解析と立体構造に立脚した変異体解析により解明することを目的とした。DSB応答でのユビキチンシグナルの制御と認識の新規メカニズムの解明は、損傷DNAの修復という非常に基本的な生命現象の理解を深めることに貢献する。また、研究対象であるOTUB1とUbc13の相互作用やBRCC36の脱ユビキチン化活性の阻害によってDSBに対する修復レスポンスを高められることから、本研究で決定する複合体の立体構造に基づいた薬剤設計により、放射線治療での副作用やゲノムの不安定性に関連した疾患の改善につながることを期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、DSB応答を制御するK63鎖の合成・分解・認識のそれぞれに重要なタンパク質複合体の立体構造をX線結晶構造解析により決定し、立体構造に基づいてデザインし

た変異体の機能解析を行うことによって、K63鎖を介したDSB応答のメカニズムを原子の解像度で明らかにした。我々は、K63鎖の最小ユニットであるK63結合型ジユビキチン(K63-Ub₂)の大量合成方法を確立し、さらに、RAP80のタンデムUIMなどのK63鎖結合タンパク質との複合体の結晶構造解析を行うことで、様々なK63鎖特異的な認識メカニズムを世界に先駆けて明らかにしてきた(Sato *et al.*, *Nature*, 2008など)。本研究では、これらの研究成果を生み出す過程で構築した技術基盤を活用した。

結晶構造解析では、まず、大腸菌や昆虫細胞Sf9でタンパク質試料を発現させた。発現したタンパク質試料を抽出・回収し、液体クロマトグラフィシステム(GEヘルスケア社製Akta PurifierおよびAkta Prime)により精製した。精製には、アフィニティーカラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを試料に応じた組み合わせで用いた。精製した試料を数g/Lから数十g/Lの濃度に濃縮し、微量自動結晶化装置(TTP LabTech社製Mosquito 2-way)を用いて約500種類の結晶化条件をスクリーニングした。結晶が生成した条件を最適化し、最適な条件下で成長した結晶を用いて、X線回折データセットを収集した。X線回折データセットの収集は、大型放射光施設SPring-8およびPFで行ない、プログラムパッケージHKL2000とCCP4を用いてデータを処理した。位相決定は、プログラムMOLREPを用いて、構造既知のホモログ分子やユビキチン分子をサーチモデルとした分子置換法、または、セレノメチオニン置換法をもちいた異常分散法により行った。原子モデルの構築および修正にはプログラムCOOTを用いた。構築した原子モデルをプログラムPHENIXまたはREFMAC5を用いて精密化した。

メカニズムを裏付けるための機能解析では、部位特異的な変異体を作製して、表面プラズモン共鳴(SPR)分光測定、あるいは、蛍光標識した試料の蛍光偏向測定による相互作用解析を行った。SPR測定には、GEヘルスケア社のBiacore T200を、蛍光偏向測定にはパーキンエルマー社のマルチラベルプレートリーダーEnvisionを用いた。さらに、実際の細胞での機能に与える影響を調べることで、細胞レベルでの裏付けも行った。

4. 研究成果

(1) OTUB1-Ubc13-Mms2複合体

UBC13はK63鎖を合成する唯一のユビキチン連結酵素(E2)として知られており、E2バリエーションであるUEV1aまたはMMS2を補因子としてはたらく。脱ユビキチン化酵素OTUB1は、UBC13と結合してそのE2活性を阻害することにより、自身の脱ユビキチン化活性とは無関係にDNA二重鎖切断の周辺でおきるクロマチンへのK63鎖の付加を抑制する。OTUB1は、*in vitro*で

UBC13 依存的な K63 結合型のトリユビキチンの合成を強く抑制するのに対して、OTUB1 存在下でもジユビキチンは合成される。このような非古典的な OTUB1 によるユビキチン化抑制のメカニズムは不明であった。さらに、ヒト OTUB1 と UBC13 の相互作用の原子レベルの情報は報告されていなかった。我々は、ヒト由来の OTUB1 と UBC13-MMS2 との複合体の結晶構造を 3.15 Å 分解能で決定した (図 1)。立体構造情報に基づいて作製した変異体を SPR 法で解析することにより、構造から明らかになった原子レベルの相互作用を確認した。設計した OTUB1 変異体は、*in vitro* では K63 鎖合成を、また、*in vivo* では DNA 二重鎖切断部位周辺のヒストンのユビキチン化や 53BP1 の集合を阻害できなかった。最後に、OTUB1-UBC13-MMS2/UEV1a 複合体がジユビキチンに蓋をすることで効率的にトリユビキチンの合成を阻害するモデルを提案した (Sato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2012)。

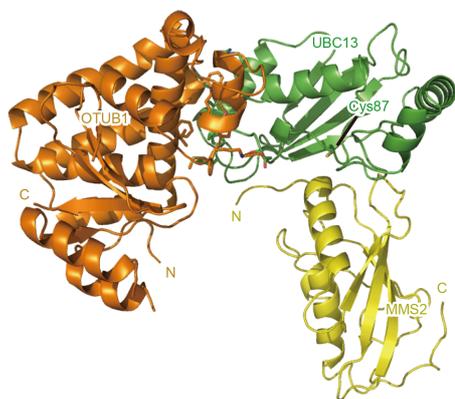


図 1 OTUB1-UBC13-MMS2 複合体の結晶構造

(2) BRCC36 複合体

BRCC36 は、JAMM ファミリーに属する脱ユビキチン化酵素であり、核内では RAP80-BRCA1 複合体として DNA 損傷応答を制御し、細胞質では BRISC 複合体として炎症・免疫応答を制御する。BRCC36 単独では切断活性を持たないが、制御因子と結合して巨大な複合体 (分子量 160 kDa) を形成することで K63 鎖特異的な切断活性を持つ。BRCC36 複合体による K63 鎖特異的な切断機構を明らかにすることを目的として、BRCC36 複合体の結晶構造解析を試みた。BRCA1 複合体と BRISC 複合体共に、サブユニット単独での発現・精製は困難であったが、MultiBac システムによる昆虫細胞での発現系を用いることで高い活性をもつ BRCA1 複合体および BRISC 複合体を調製することが可能になった。BRISC 複合体については K63 鎖との複合体の予備的な結晶化にも成功しており、8 Å 分解能の X 線回折データを収集している。分解能の向上

に向けて、発現コンストラクトや結晶化・測定条件の改良を引き続き行っている。

(3) RNF168

RNF168 は、損傷クロマチン近傍のヒストンに付加される K63 鎖を増幅する役割を担うと考えられているユビキチン転移酵素 (E3) であり、複数のユビキチン結合モチーフを持つ。研究を開始した当初は、新規のユビキチン結合ドメインである UMI (UIM- and MIU-related UBD) が単独で K63 鎖と選択的に結合し、その結合が RNF168 の DNA 損傷部位への局在制御の一端に関わると報告されていた (Pinato *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 2010)。しかし、我々の実験では、UMI 単独で K63 鎖への特異性が確認できなかったため、ユビキチンとの複合体の結晶構造を決定し、変異体を用いた分子間相互作用解析 (SPR 法および蛍光偏光法) の結果と合わせて、ユビキチン認識機構を明らかにした (図 2) (論文未発表)。その後、国際学会での海外の研究グループからの発表で、UMI は別の領域と共にはたらくことで K63 鎖への特異性を獲得していることが示唆された。そこで、UMI 以外の領域も含めて K63 鎖への特異性を再検討した結果、新たなユビキチン結合部位を見出し、その領域も含めて K63 鎖との複合体の結晶構造を決定した。さらに、*in vitro* および細胞レベルでの変異体解析と合わせて K63 鎖特異的な相互作用機構を解明しつつある (論文未発表)。

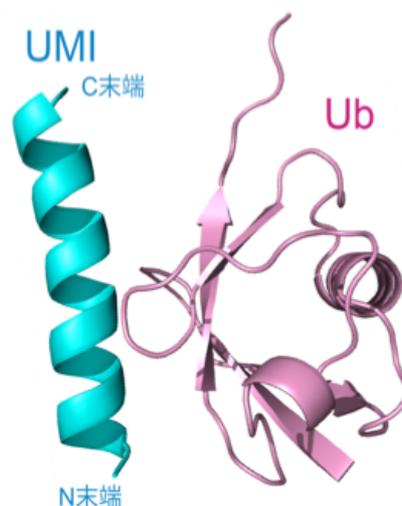


図 2 RNF168 UMI とユビキチンとの複合体の結晶構造

(4) その他

DNA 損傷応答に関わる新規のユビキチン結合タンパク質である FAAP20 の Zn フィンガードメイン (UBZ) とユビキチンの相互作用について、複合体の結晶構造を決定し (図 3)、変異体の相互作用解析や損傷時の細胞内での局在観察を行って、機能と構

造の相関を明らかにした (Toma *et al.*, *PLoS One*, 2015). また, K63 鎖/M1 鎖を介した炎症シグナルに関連して, 脱ユビキチン化酵素 CYLD とユビキチン鎖との複合体の構造機能解析を行った (Sato *et al.*, *Nature Struct. Mol. Biol.*, 2015).

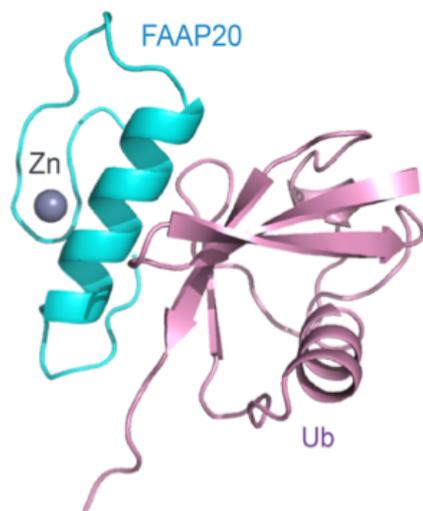


図 3 FAAP20 UBZ とユビキチンとの複合体の結晶構造

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 9 件)

- ① Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Inoue, J., Takekawa, M., Tokunaga, F. and Fukai, S. “Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 222-229 (2015), 査読有, doi: 10.1038/nsmb.2970
- ② Toma, A., Takahashi, T. S., Sato, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Nakada, S., Fukuto, A., Horikoshi, Y., Tashiro, S. and Fukai, S. “Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20” *PLoS One*, **10**, e0120887 (2015), 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0120887
- ③ Fukai, S. “Core structures of ubiquitin dictate its dynamics and function” *J. Mol. Biol.*, **426**, 1367-1369 (2014), 査読無, doi: 10.1016/j.jmb.2013.12.008
- ④ Sato, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Miyamoto, R., Nakada, S. and

Fukai, S. “Molecular basis of Lys-63-linked polyubiquitination inhibition by the interaction between human deubiquitinating enzyme OTUB1 and ubiquitin-conjugating enzyme UBC13” *J. Biol. Chem.*, **287**, 25860-25868 (2012), 査読有, doi:10.1074/jbc.M112.364752

[学会発表] (計 12 件)

- ① 深井周也, 「ユビキチン鎖による炎症シグナル制御の構造基盤」, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15 日, 国立京都国際会館 (京都市)
- ② 深井周也, 「中程度の分解能での結晶構造解析」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 2014 年 6 月 27 日, ワークピア横浜 (横浜市)
- ③ Fukai, S., “Structural basis for selective cleavage of M1- and K63-linked polyubiquitin chains by a CYLD deubiquitinase”, Cold Spring Harbor Laboratory 2013 meeting - The Ubiquitin Family, 2013 年 5 月 14 日, Cold Spring Harbor (米国)

[図書] (計 2 件)

- ① 佐藤裕介, 深井周也 生化学, 84 巻, 「ポリユビキチン鎖選択的結合による細胞機能制御」, 776-780 頁, 2012 年

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井 周也 (FUKAI SHUYA)

東京大学・放射光連携研究機構・准教授
研究者番号: 10361792