

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15757

研究課題名（和文）遊離非定型ユビキチン鎖の物性および細胞内機能解析

研究課題名（英文）Elucidation of physical properties and intracellular functions of unanchored atypical ubiquitin chains

研究代表者

森本 大智（Morimoto, Daichi）

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：40746616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチン鎖は基質に結合し様々な生命現象に関わる。最近、分岐や環状などの非定型かつ遊離のユビキチン鎖が発見された。しかし、その物性や機能はよくわかっていない。本研究は遊離非定型ユビキチン鎖をより深く理解するため溶液NMR法による構造解析をおこなった。その結果、ユビキチン鎖はユビキチンユニット間で異なる構造ゆらぎを示し、翻訳後修飾の受けやすさが異なることがわかった。さらに、細胞内に大量に存在するATPとユビキチンは弱く相互作用し、細胞内でユビキチン鎖は自己会合や凝集しにくくなることが示唆された。また、環状ユビキチン鎖は非環状型と異なる認識機構を示し、切断されにくくなることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのユビキチン鎖研究は単一の結合型で形成された直鎖状の短いユビキチン鎖が中心であった。だが現在、続々と非定型のユビキチン鎖が発見されており、ユビキチン鎖研究でパラダイムシフトが起こっている状況にある。本研究で明らかにしたユビキチン鎖におけるユニット間の異なる構造ゆらぎ、ATPとの弱い相互作用、環状鎖の特異的な認識機構はいずれも既存のユビキチンバイオロジーでは想定できなかった知見であり、新規の概念を与えるものとなった。また、タンパク質科学の観点から、これまでの静的な構造解析とは一線を画し、タンパク質機能を明らかにする上での動的構造解析の重要性を示した研究結果となった。

研究成果の概要（英文）：Conjugation of ubiquitin chains with substrates plays a role in various biological phenomena. Recently, atypical (branched and cyclic chains) and unanchored ubiquitin chains have been identified. However, their physical properties and functions remain poorly understood. In this study, we conducted a structural analysis of atypical and unanchored ubiquitin chains using solution NMR to gain a deeper understanding of their characteristics. Our findings reveal that ubiquitin chains exhibit distinct structural fluctuations among ubiquitin units, which are related with susceptibility of post-translational modifications. In addition, ubiquitin weakly interacts with ATP, which is abundantly present in cells. This suggests that ubiquitin chains are less likely to self-associate or aggregate in cells. Additionally, cyclic ubiquitin chains demonstrate a different recognition mechanism compared with the noncyclic form and the cyclic chains are found to be less prone to cleavage.

研究分野：構造生物学

キーワード：ユビキチン 構造ゆらぎ ATP 環状 NMR

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは1978年にエネルギー依存的タンパク質分解への関与が報告されて以来、その広範で多様な生物学的役割が明らかにされてきた。ユビキチン修飾で最も重要な点はユビキチンが幾つも重合し鎖をつくることである。通常、ユビキチン鎖は基質となるタンパク質に結合し機能を発現する。しかし近年、基質に結合していない遊離体でも機能を発現することが分かってきた。共凝集あるいは相分離することでアグリソームやストレス顆粒の形成を制御したり (Hao, et al. 2013; Xie, et al. 2018)、特異的認識されることで免疫応答を活性化したり (Zeng, et al. 2010) することが報告された (図1左)。

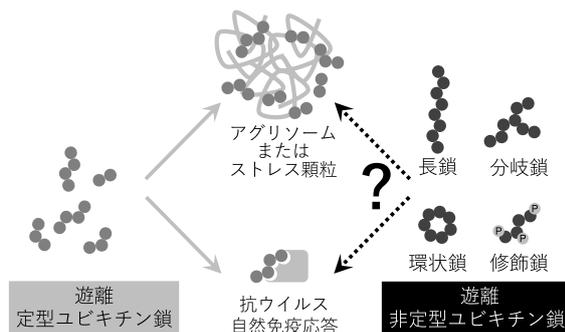


図1. 遊離ユビキチン鎖の未知の機能.

しかし現在、詳細な分子機構は未解明で、どの種類の遊離ユビキチン鎖がどのような機能を持つのかははっきりしない。ユビキチン鎖は結合様式の違いで8種類あるが、近年、長鎖や分岐鎖、環状鎖、翻訳後修飾を受けた鎖まで発見された。驚くべきことに、最新の研究で分岐鎖はユビキチン鎖全体の20%も占めることが分かり (Swatek, et al. 2019)、これら非定型ユビキチン鎖に注目が集まっている。一方、これまでのユビキチン鎖研究は単一の結合型で形成された直鎖状の短いユビキチン鎖が中心であった。だが現在、続々と非定型のユビキチン鎖が発見されており、ユビキチン鎖研究でパラダイムシフトが起こっている。基質に結合していない非定型鎖も細胞内で同定されているが、生物学的・物理化学的性質は分かっていない (図1右)。

2. 研究の目的

本研究は、試験管内で合成した遊離非定型ユビキチン鎖 (長鎖、分岐鎖、環状鎖、修飾鎖) の物性、相互作用、細胞内機能を解明することを目的とする。先行研究で示された遊離鎖の凝集体形成と免疫応答活性化は、ユビキチン鎖の物性と特異的認識が密接に関係する。だが、これまでの物性ならびに認識機構解析のほとんどは定型鎖に関したものであり、非定型鎖は未開拓である。その中で応募者は先駆的に長鎖の持つ凝集体形成能を明らかにした (Morimoto, et al. Nat Commun 2015)。この研究経験を活かし、本研究ではまず試験管内で遊離非定型鎖の構造安定性や凝集体形成能などの物性および認識様式を解析し、遊離定型鎖との差異を解析する。

3. 研究の方法

遊離非定型ユビキチン鎖 (長鎖、分岐鎖、環状鎖、修飾鎖) に関して構造安定性や認識様式を調べる。手法は熱安定性を評価できる示差走査熱量測定 (DSC) や、構造学的性質を原子分解能で解析できる溶液 NMR 法といった物理化学的手法を主に用いる。特に、認識様式の違いは鎖の伸長や切断反応の感受性に影響を及ぼす。事実、リン酸化体はこれらの反応に対し鈍くなることが報告されているため (Wauer, et al. 2015)、伸長・切断反応の感受性変化について解析する。また、細胞内は試験管内と異なり夾雑環境であり、細胞内環境に模擬した条件 (特に細胞内に大量に存在する ATP 存在) 下での構造学的影響も解析する。

4. 研究成果

(1) K48 結合型ダイユビキチンの構造ゆらぎと翻訳後修飾の相関

ユビキチン鎖を構成するユビキチンユニットの静的な三次構造はほぼ違いが無いと認められている (Komander, et al. 2012)。一方、リン酸化酵素である PINK1 は鎖内のユビキチンユニットの相対的な角度や距離は認識できないが、ユビキチンユニット選択的にリン酸化することができる (Gersch, et al. 2017)。しかし、どのような機構で PINK1 が鎖内のユビキチンユニットを判別しているのかわかっていない。本研究では、ユビキチン鎖の物性を理解する上で、ユビキチンユニット間の構造学的差異を明らかにすることが重要であり、細胞内で最も存在する K48 結合型ユビキチン鎖の最小単位であるダイユビキチン内の二つのユビキチンユニットの動的構造学的差異を調べた。溶液 NMR 法を用いた温度依存的な水素核化学シフト変化解析をおこなった結果 (図 2a)、二重合体界面だけでなく、界面から離れた構造部位において、ナノ秒からマイクロ秒の構造ゆらぎがあることが観測された (図 2b)。二重合界面の構造ゆらぎは、二つのユビキチンユニットが開閉運動をする際に生じるナノ秒からマイクロ秒の速いゆらぎに起因することが、低温下における窒素核緩和分散測定によって特定することができた。注目すべきは、二重合体界面から離れた構造部位における構造ゆらぎを示すアミノ酸は、2つのユビキチンユニットにおいて非対称的に分布しており、特に近位ユニットにおけるリン酸を受ける Ser65 近傍に集中していることがわかった (図 2b 橙色)。したがって、近位ユニットの Ser65 近傍の特異的な構造ゆらぎはリン酸化を受けやすくする機能がある可能性がある。そこで、各ユビキチンユニ

ットの PINK1 によるリン酸化速度をリアルタイム NMR 法で計測した(図 2c)。興味深いことに、構造ゆらぎを示す近位ユニットが優位に速くリン酸化を受けることが分かった(図 2c)。このように、特定したユニット特異的構造ゆらぎはリン酸化の受けやすさと相関していることが分かった。得られた結果をまとめ、学術論文として発表した。研究内容が評価され、学術雑誌の表紙(カバーアート)に選ばれた (Morimoto, et al. *Biochemistry* 2021, 60, 573–583)。

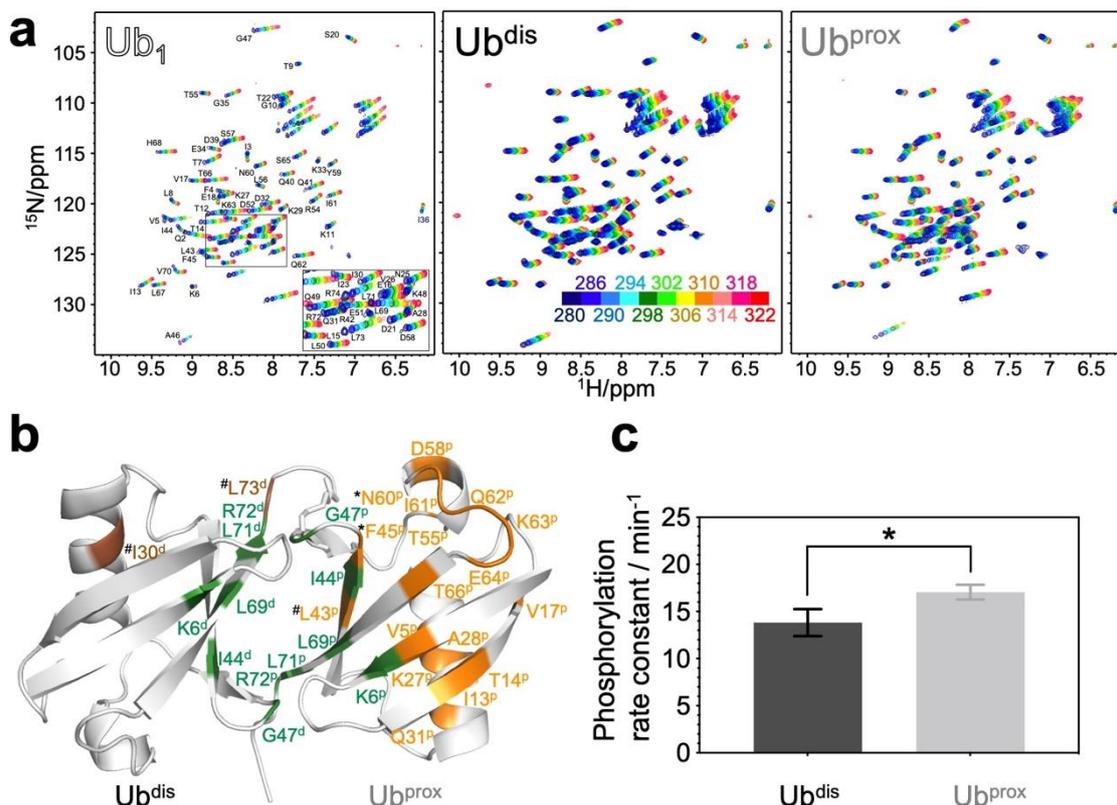


図 2. 温度依存的水素核化学シフト変化解析によるユビキチンユニット特異的な構造ゆらぎ。
a, モノユビキチン(左)、K48 結合型ダイユビキチン遠位ユニット(中央)および近位ユニット(右)の温度依存的化学シフト変化解析(^1H - ^{15}N 二次元相関スペクトル)。各色は中央下に示した温度に対応している。**b**, 構造ゆらぎを示したアミノ酸のマッピング。緑色は両ユビキチンユニットに共通した構造ゆらぎ。茶色、橙色は遠位ユニット、近位ユニットに特異的な構造ゆらぎ。
c, リアルタイム NMR 法で求めた K48 結合型ダイユビキチン遠位ユニット(左)および近位ユニット(右)の PINK1 によるリン酸化速度定数。速度定数は独立した 3 回の実験の平均値を示しており、アスタリスクは $p < 0.05$ (Student's *t* test)を示している。図は Morimoto, et al. *Biochemistry* 2021, 60, 573–583 を改変したものである。

(2) ユビキチンと ATP との弱い相互作用の原子レベル構造解析

細胞内に大量に(2–8 mM)存在するアデノシン三リン酸(ATP)は、天然変性タンパク質 FUS の凝集を大幅に阻害する効果があると報告された (Patel, et al. *Science* 2017)。凝集を阻害するためには ATP とタンパク質との直接的な相互作用が重要であり、この相互作用はある特定のタンパク質に限られたものではないことが示唆される。しかし、現在詳細な機構はわかっていない。本研究では、細胞内におけるユビキチン鎖の物性を明らかにするため、溶液 NMR 法や等温滴定カロリメトリー法を用いて、ATP とユビキチンとの弱い相互作用を定量的に解析した。まず、NMR 滴定実験をおこなったところ、ATP はユビキチンの柔軟または疎水性の高い領域に弱く相互作用することがわかった(図 3a)。興味深いことに、単純な相互作用と異なり、ATP を滴定にしたがってユビキチンのアミド水素の化学シフト変化量がシグモイド曲線様に変化した(図 3b)。これは ATP の濃度によって ATP とユビキチンとの相互作用が変化することを示唆する。実際、等温滴定カロリメトリー法により、ATP は高濃度の条件下でオリゴマーを形成していることが示された。加えて、高濃度に ATP が存在する条件下では、ユビキチンの水和状態が変化することが溶液 NMR 法を用いた解析によってわかった。この結果は分子動力学法によるシミュレーションでも裏付けられた(図 3c)。このように、ATP は高濃度存在するとオリゴマーを形成し、オリゴマーを形成する条件下でユビキチンと共存すると、弱く相互作用し、ユビキチンの水和状態を変化させることがわかった。ATP が非特異的に結合することにより、自己会合や凝集を阻害することが示唆され、細胞内ではユビキチンならびにユビキチン鎖はより安定化されることが示唆された。得られた結果をまとめ、学術論文として発表した (Nishizawa, Morimoto, et al. *JACS* 2021, 143, 31, 11982–11993)。

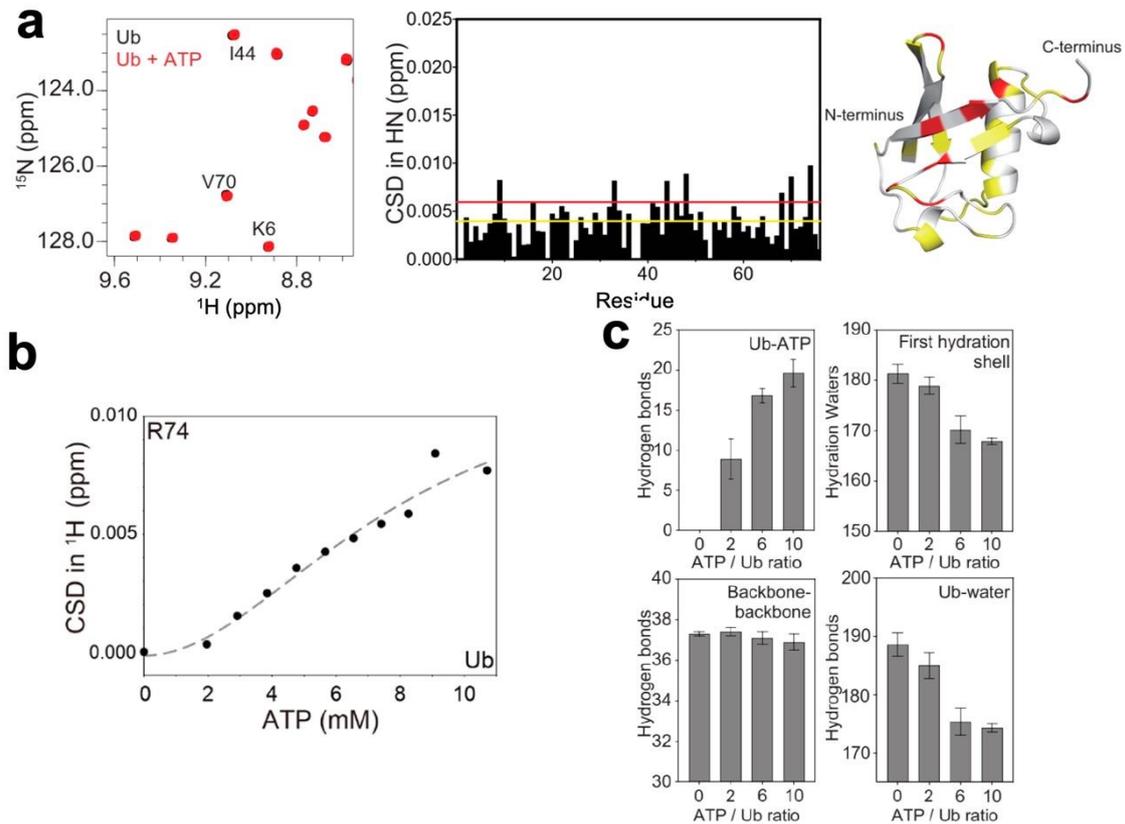


図 3. ATP とユビキチンとの弱い相互作用。

a, 左、ATP 存在 (赤, 10 mM) または非存在下 (黒) におけるユビキチンの ^1H - ^{15}N 二次元相関スペクトル。中央、ATP 添加によるユビキチンの化学シフト変化量の残基に対するプロット。黄色の線が平均値を示し、赤色の線が平均値に標準偏差を加えた値を示している。右、ATP の有無で化学シフトが顕著に変化した残基のマッピング。 **b**, ATP 添加による R74 のアミド水素の化学シフトの変化の ATP 濃度依存性。 **c**, 異なる ATP 濃度におけるユビキチンの分子動力学法による 250 ナノ秒間のシミュレーション。左上、ユビキチンと ATP との分子間水素結合の数。左下、ユビキチン分子内の水素結合の数。右上、ユビキチンの第一水和水を構成する水分子の数。右下、ユビキチンと水との分子間水素結合の数。図は Nishizawa, Morimoto, et al. JACS 2021, 143, 31, 11982-11993 を改変したものである。

(3) 環状ユビキチン鎖の物性と認識機構解析

本研究は、非定型ユビキチン鎖である K48 結合型の環状ユビキチン鎖を試験管内で作製し、物性ならびに認識機構を解析した。そもそも環状ユビキチン鎖は試験管内における酵素反応の副産物として同定されたものであった (Yao, et al. 2000)。しかし近年、細胞内に存在することが報告され (Dickinson, et al. 2012)、ユビキチン結合タンパク質による認識機構も定型ユビキチン鎖と異なることが示唆された (Sokratous, et al. 2012)。これらの知見より、環状ユビキチン鎖は定型ユビキチン鎖とは異なる細胞内機能を示す可能性があるが、現在あまり研究が進んでいない状況にある。その理由の一つに、試験管内で大量に調製することが困難であることが挙げられる。そこで、本研究では作製が困難な K48 結合型の環状ダイユビキチンを、大腸菌発現系を用いて、高純度かつ大量に調製する手法を確立した。調製した環状ダイユビキチンを用いて、まず、脱ユビキチン化酵素である OTUB1 による切断実験をリアルタイム NMR 法により定量的におこなった。すると、環状ダイユビキチンは非環状体に比べて、大幅に切れにくくなることがわかった (図 4a)。OTUB1 は立体障害によって環状ダイユビキチンの切断部位に接近することができなくなると考えられるが、環状ダイユビキチンは僅かながら OTUB1 に切断されていた (図 4a)。どのように立体障害を乗り越えて、環状ダイユビキチンは OTUB1 に切断されるのか。それを理解するため、NMR 滴定実験をおこない分子間相互作用を解析した。滴定による ^1H - ^{15}N 二次元相関スペクトル上のクロスピーク変化量を解析し、OTUB1 とユビキチン鎖との解離定数を見積もったところ、環状ダイユビキチンは非環状体に比べ、OTUB1 と 20 倍以上弱く相互作用することがわかった (図 4b)。一方、環状ダイユビキチンは非環状体に比べ、より多くの残基を使って OTUB1 と相互作用することがわかった。これらの結果から、環状ダイユビキチンは OTUB1 との相互作用に立体障害がある立体構造から構造変化を起こし、非環状体とは異なる分子表面を使い、弱く相互作用すると考えられる。得られた結果をまとめ、学術論文として発表した (Sorada, Morimoto, et al. BBRC 2021, 562, 12, 94-99)。

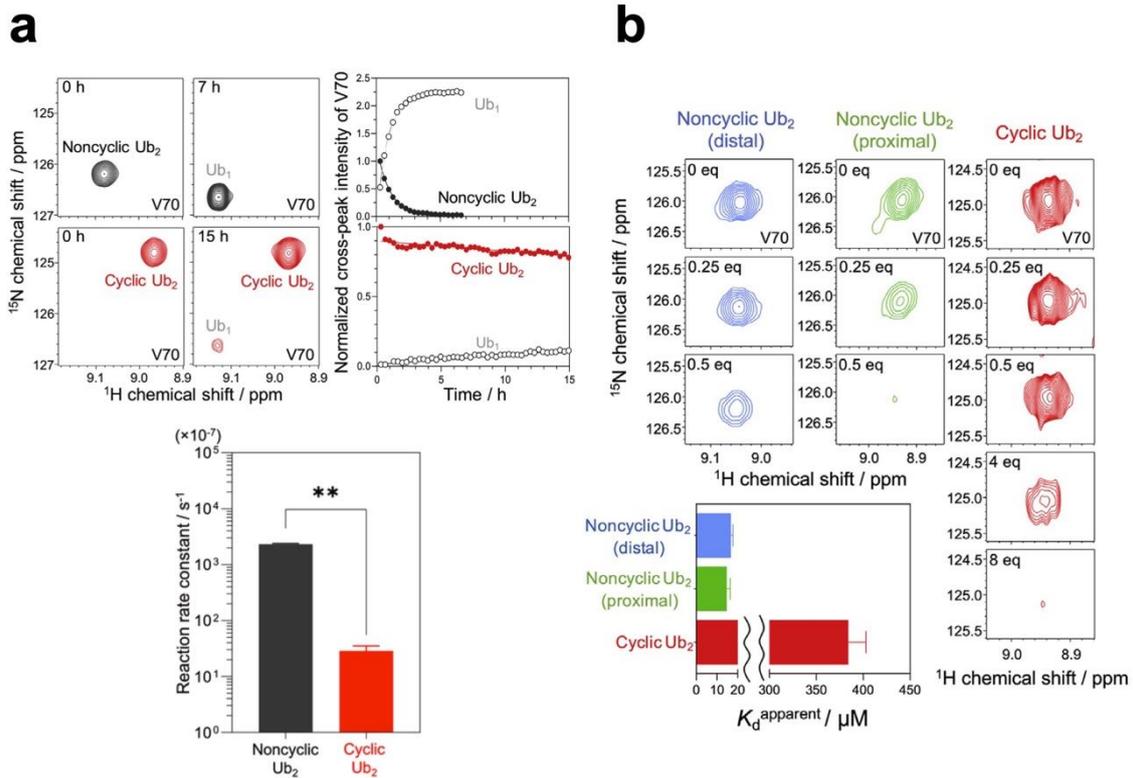


図4. 環状ダイユビキチンの脱ユビキチン化酵素 OTUB1 による切断.

a, リアルタイム NMR 法による環状ダイユビキチンの脱ユビキチン化酵素 OTUB1 による切断の追跡. 左上, OTUB1 を加えた非環状(黒)および環状(赤)ダイユビキチンの ^1H - ^{15}N 二次元相関スペクトル. 右上, ダイユビキチン(上)およびモノユビキチン(下)由来のクロスピークのピーク強度の時間変化. 下, 見積もられた切断速度. **b**, 切断活性を失った OTUB1 変異体を滴定したときの非環状(青: 遠位ユニット, 緑: 近位ユニット)および環状(赤)ダイユビキチンの V70 のクロスピークの変化. 左下, 見積もられた切断活性を失った OTUB1 変異体とダイユビキチンとの相互作用の解離定数. 図は Sorada, Morimoto, et al. BBRC 2021, 562, 12, 94-99 を改変したものである.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwakawa Naoto, Morimoto Daichi, Walinda Erik, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 143
2. 論文標題 Multiple-State Monitoring of SOD1 Amyloid Formation at Single-Residue Resolution by Rheo-NMR Spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 10604 ~ 10613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c02974	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Morimoto Daichi, Osugi Masanori, Mahana Yutaka, Walinda Erik, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 15
2. 論文標題 Backbone resonance assignments of the A2 domain of mouse von Willebrand factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecular NMR Assignments	6. 最初と最後の頁 427 ~ 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12104-021-10041-8	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Nishizawa Mayu, Walinda Erik, Morimoto Daichi, Kohn Benjamin, Scheler Ulrich, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 143
2. 論文標題 Effects of Weak Nonspecific Interactions with ATP on Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 11982 ~ 11993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c13118	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Walinda Erik, Morimoto Daichi, Sorada Tomoki, Iwai Kazuhiro, Sugase Kenji	4. 巻 187
2. 論文標題 Expression, solubility monitoring, and purification of the co-folded LUBAC LTM domain by structure-guided tandem folding in autoinducing cultures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 105953 ~ 105953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2021.105953	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Hirakawa Takuya, Walinda Erik, Morimoto Daichi, Sugase Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Rigorous analysis of the interaction between proteins and low water-solubility drugs by qNMR-aided NMR titration experiments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 21484 ~ 21488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CP03175A	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Mahana Yutaka, Ohki Izuru, Walinda Erik, Morimoto Daichi, Sugase Kenji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural Insights into Methylated DNA Recognition by the Methyl-CpG Binding Domain of MBD6 from <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 3212 ~ 3221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c04917	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Iwakawa Naoto, Morimoto Daichi, Walinda Erik, Leeb Sarah, Shirakawa Masahiro, Danielsson Jens, Sugase Kenji	4. 巻 125
2. 論文標題 Transient Diffusive Interactions with a Protein Crowder Affect Aggregation Processes of Superoxide Dismutase 1 -Barrel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2521 ~ 2532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c11162	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 該当する

1. 著者名 Morimoto Daichi, Walinda Erik, Takashima Shingo, Nishizawa Mayu, Iwai Kazuhiro, Shirakawa Masahiro, Sugase Kenji	4. 巻 60
2. 論文標題 Structural Dynamic Heterogeneity of Polyubiquitin Subunits Affects Phosphorylation Susceptibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 573 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00619	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 -

1. 著者名 Tanaka Yuka, Morimoto Daichi, Walinda Erik, Sugase Kenji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 529
2. 論文標題 Quantitative monitoring of ubiquitination/deubiquitination reaction cycles by 18O-incorporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 418 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.008	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		
ドイツ	IPF		