

## 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5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21687009

研究課題名（和文） ポリユビキチン鎖認識の構造生物学

研究課題名（英文） Structural biology of polyubiquitin chain recognition

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

## 研究成果の概要（和文）：

ユビキチンは、タンパク質分解の目印としてよく知られているが、近年の研究の進展に伴い、分解以外にも多様な細胞機能を制御する目印であることが明らかになってきた。本研究では、ユビキチンが様々な認識タンパク質に結合した複合体の三次元構造解析を行い、DNAの損傷に対する応答や炎症に対する応答の際に、ユビキチンの目印がどのように認識されているのかを原子の解像度で明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Ubiquitin is well-known as a label for protein degradation. Recent studies have showed that ubiquitin functions as labels for various cellular processes besides the protein degradation. In this research, we determined three-dimensional structures of complexes comprising ubiquitin and its binding proteins and showed how ubiquitin is recognized during responses towards DNA damage and inflammation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,600,000	4,080,000	17,680,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	21,000,000	6,300,000	27,300,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析・ユビキチン・分子間相互作用・炎症シグナル・DNA損傷応答

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン (Ub) は酵母からヒトまで広く保存されたタンパク質であり、鎖状につながった複数個の Ub (ポリ Ub 鎖) がプロテアソームによるタンパク質分解のシグナルとしてはたらくことが広く知られている。しかし、近年では、Ub はタンパク質分解以外にも多様なプロセスで重要であることが明らかになってきている。ポリ Ub 鎖は、Ub の C 末端

のグリシン残基と別の Ub のリジン残基がイソペプチド結合を形成することによって合成されるが、Ub には 7 つのリジン残基があるため、どのリジン残基を介して結合するかによってポリ Ub 鎖の形と機能は異なる。実際に、タンパク質分解のシグナルとして働くポリ Ub 鎖のほとんどは 48 番目のリジン残基 (K48) を介して結合している (K48 鎖)。K48 鎖以外のポリ Ub 鎖の役割は完全に理解され

ているわけではないが、K63 結合型のポリ Ub 鎖 (K63 鎖) は K48 鎖とは明確に区別され、DNA 損傷応答、炎症シグナル、受容体の下方制御などのプロセスではたらくことが知られている。このように細胞の中で明確に区別されているはずの形の異なるポリ Ub 鎖が、細胞内でどのように結合タンパク質によって認識され、区別されているのかは、ほとんどわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、Ub 鎖と結合タンパク質との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定し、変異体を用いた結合解析や反応速度論的解析によってポリ Ub 鎖識別メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、細胞内での役割が明確な K63 鎖の認識メカニズムの解明を主にすすめてきた。K63 鎖の最小単位である K63 結合型ジユビキチン (K63 diUb) を酵素学的に合成し、結合タンパク質と複合体を形成させ、それを結晶化して X 線結晶構造解析により複合体の三次元構造を決定した。得られた三次元構造に基づいて結合の特異性を決定しているメカニズムを推測し、そのメカニズムを裏付けるための部位特異的変異体を作成して、GST プルダウンや表面プラズモン共鳴 (SPR) 分光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 を用いた。

結晶構造解析の具体的な手順は、以下の通りである。まず、大腸菌で発現させたタンパク質試料をアフィニティーカラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いた液体クロマトグラフィーにより精製し、微量自動結晶化装置を用いて約 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 SPring8 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をサーチモデルとした分子置換法により行った。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 CNS、PHENIX、REFMAC5 を用いて精密化した。

## 4. 研究成果

(1) タンデムにつながった  $\alpha$  ヘリックス型の Ub 結合ドメインによる K63 鎖認識メカニズム

RAP80 は、タンデムに繋がった Ub

interacting motif (tUIM) を介して K63 鎖を認識し、DNA 修復に必要な Abraxas-BRCC36-BRCA1-BARD1 複合体を DNA 損傷部位にリクルートする。我々は、RAP80 の tUIM と K63 diUb との複合体の結晶構造を 2.2 Å 分解能で決定した (図 1)。二つの UIM (UIM1 と UIM2) は、 $\alpha$  ヘリカルな inter-UIM 領域と共に 60 Å の一本の繋がった  $\alpha$  ヘリックスを形成する。UIM1 と UIM2 は、それぞれ基部および先端部の Ub を認識する。UIM1 と UIM2 共に Ub の Ile 44 を中心とした疎水表面を認識するが、Lys 63 で繋がったイソペプチド結合は直接認識しない。我々の構造は、12 Å の  $\alpha$  ヘリックスを形成する inter-UIM 領域が、2つの UIM を K63 diUb と特異的に結合できるように配置させていることを示唆する。このことは、様々な長さの inter-UIM 領域をもつ変異体を用いたプルダウンアッセイによって確認された。さらに我々は、同様の inter-UIM 領域をもつ Epsin1 の tUIM も同様に K63 diUb と選択的に結合することを示した。

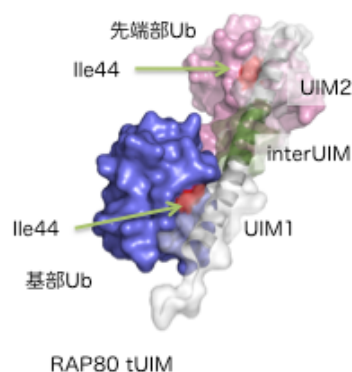


図 1 . RAP80 tUIM と K63 diUb との複合体の立体構造

(2) Zn フィンガー型の Ub 結合ドメインによる K63 鎖認識メカニズム

TAB2 および TAB3 は、Npl4 型 Zn フィンガー (NZF) ドメインを介して K63 鎖を特異的に認識し、JNK 経路や NF- $\kappa$ B 経路を活性化する。我々は、TAB2 と TAB3 の NZF ドメインと K63 diUb との複合体の結晶構造を 1.18 および 1.4 Å 分解能で決定した (図 2)。保存された Thr-Phe のジペプチドが、Npl4 の NZF と単量体 Ub との相互作用に重要であることが示されていたが、TAB2 と TAB3 の NZF では、このジペプチドが先端側の Ub と結合する。対照的に、TAB2 と TAB3 に特徴的な表面は基部側の Ub と結合する。TAB2 と TAB3 の先端側および基部側の Ub 結合部位は、両方共に Ub の Ile44 を中心とする疎水表面を認識するが、Lys63 で繋がったイソペプチド結合を直接認識しない。変異体解析は両

方の Ub 結合部位が K63 diUb に必要であることを示す. TAB2 および TAB3 の NZF ドメインによる K63 鎖の認識において, diUb ユニットが一つの NZF ドメインによって特異的に認識されるメカニズムを提案した.

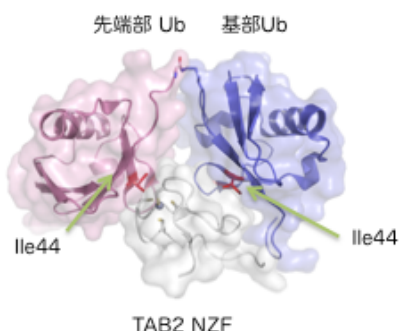


図 2. TAB2 NZF と K63 diUb との複合体の立体構造

### (3) Coiled coil 型の Ub 結合ドメインと K63 鎖との弱い相互作用のメカニズム

NEMO はタンパク質の Ub 化により制御されている NF- $\kappa$ B シグナリング経路の活性化に必須である. NEMO の C 末端のロイシンジッパーと、それに隣接する coiled-coil 領域 (CC2-LZ) は、直鎖に 1  $\mu$ M の親和性で結合し、K63 鎖に 100  $\mu$ M の親和性で結合することが報告されている. 我々は、マウス NEMO の CC2-LZ 領域と K63 diUb との複合体の結晶構造を 2.7 Å 分解能で決定した. Ub 結合領域は、130 Å の  $\alpha$  ヘリックスで構成され、平行な coiled-coil 二量体を形成する. Ub の Ile 44 を中心とする疎水表面は、NEMO の Ub 結合領域の中心部で認識される. NEMO は、K63 diUb と一つの結合部位で相互作用しており、K63 diUb との低い親和性の結合と一致した.

### (4) Zn フィンガー型の Ub 結合ドメインによる直鎖認識メカニズム

Ub 直鎖の合成を行う複合体 (LUBAC) は、NF- $\kappa$ B シグナル経路の活性化において重要な役割を担う. LUBAC の HOIL-1L サブユニットが直鎖と結合することはすでに示されていたが、その構造的・機能的な解析は行われていなかった. 本研究において、我々は、HOIL-1L の NZF ドメインが直鎖に特異的に結合することを見出し、HOIL-1L の NZF ドメインと直鎖ジユビキチンとの複合体の結晶構造を 1.7 Å 分解能で決定した. HOIL-1L の NZF ドメインは、亜鉛イオンを配位した「NZF コア」領域とそれに付随するヘリカルな「NZF テール」から構成される. NZF コアは、先端部ユビキチンの Ile44 を中心とする疎水領域と基部ユビキチンの Phe4 を中心と

する疎水領域の両者と結合しており、直鎖特異的な結合のメカニズムを示している. NZF テールは、基部ユビキチンと相互作用して結合親和性を高めている. これらの認識メカニズムを *in vitro* および *in vivo* での変異体解析によって裏付けた.

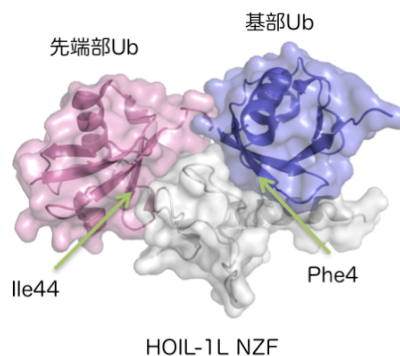


図 3. HOIL-1L NZF と直鎖 diUb との複合体の立体構造

### (5) その他

Ub 鎖を切断する脱 Ub 化酵素 OTUB1 は、Ub 結合酵素 Ubc13-Mms2 複合体に結合することで、脱 Ub 化活性非依存的に K63 鎖の伸長を抑制する. 我々は、OTUB1-Ubc13-Mms2 の三者複合体の立体構造を決定し、OTUB1 による K63 鎖伸長抑制のメカニズムの解明を目指した. OTUB1 と Ubc13-Mms2 との複合体の結晶化を行い、3.1 Å 分解能の X 線回折データを収集した.

### 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 9 件)

- ① Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S. E., Iwai, K., Fukai, S. “Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex” *Proceedings of National Academy of Science United States of America* 108 巻 20520-20525 頁 2011 年 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1109088108
- ② Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Fukai, S. “Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by NZF domains of TAB2 and TAB3” *The EMBO Journal* 28

巻 3903-3909 頁 2009 年 査読有  
DOI: 10.1038/emboj.2009.345

- ③ Yoshikawa, A., Sato, Y., Yamashita, M., Mimura, H., Yamagata, A., Fukai, S. “Crystal structure of the NEMO ubiquitin-binding domain in complex with Lys 63-linked di-ubiquitin” FEBS Letters 583 巻 3317-3322 頁 2009 年 査読有 DOI:10.1016/j.febslet.2009.09.028
- ④ Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., Fukai, S. “Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80” The EMBO Journal 28 巻 2461-2468 頁 2009 年 査読有 DOI: 10.1038/emboj.2009.160

[学会発表] (計 8 件)

- ① 深井周也 「構造解析のためのユビキチン鎖の大量合成」 第 11 回日本蛋白質科学会年会 2011 年 6 月 9 日 ホテル阪急エキスポパーク
- ② 深井周也 “Structural basis of ubiquitin chain recognition by NZF domains for NF- $\kappa$ B activation” TNF2011 2011 年 5 月 18 日 淡路夢舞台国際会議場
- ③ 深井周也 “Mechanisms for recognition of K63-linked polyubiquitin chains” Pacificchem2010 2010 年 12 月 19 日 ハワイコンベンションセンター
- ④ 深井周也 「Zn フィンガーによるユビキチン鎖認識のメカニズム」 平成 22 年度日本結晶学会年会 2010 年 12 月 5 日 大阪大学
- ⑤ 深井周也 「ユビキチン化シグナルを読み解くユビキチン受容体の構造生物学」 文部科学省科研費特定領域研究「タンパク質分解」公開シンポジウム 2010 年 8 月 21 日 東京ガーデンパレス
- ⑥ 深井周也 「Lys63 結合型ポリユビキチン鎖認識のメカニズム」 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 パシフィコ横浜

[図書] (計 4 件)

- ① 深井周也 秀潤社 細胞工学 29 巻 [特集] ユビキチン修飾系の多彩な機能 1231-1235 頁 2010 年
- ② 佐藤裕介, 深井周也 日本結晶学会 日

本結晶学会誌 52 巻 特集 構造生物学研究の新展開 20-24 頁 2010 年

- ③ 佐藤裕介, 深井周也, 金原一郎 記念医学医療振興財団/医学書院 生体の科学 60 巻 [特集] ユビキチン化による生体機能の調節 593-598 頁 2009 年
- ④ 深井周也 日本生化学会 生化学 81 巻 815-819 頁 2009 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: