

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05501

研究課題名（和文）ケモテクノロジーの分子基盤を創出するユビキチン構造生物学

研究課題名（英文）Ubiquitin structural biology providing the molecular basis for chemo-technologies

研究代表者

深井 周也（Fukai, Shuya）

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：10361792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 67,400,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質分解のシグナルとして発見されたユビキチン修飾は、現在では多様な細胞機能の制御において必須な役割を担うことが知られている。ユビキチンがつながって生じるユビキチン鎖は機能の多様性と密接に関わっており、鎖の付加・認識・除去の仕組みを理解して人為的に細胞機能を制御する研究は病態の改善にも寄与する。本研究では、新規のユビキチン鎖認識機構やユビキチン鎖が関与する分子機構の理解を深めることを目的として、関連するタンパク質が形成する複合体の立体構造を決定した。さらに、得られた立体構造情報に基づいて化合物を設計し、機能を制御することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン鎖と結合タンパク質の複合体（Np14-K48鎖やTab2-K6鎖など）の立体構造解析によって新たなユビキチン鎖認識機構を明らかにした。また、ユビキチンリガーゼLUBACの触媒サブユニットHOIPの阻害剤HOIPINやUSPファミリーの脱ユビキチン化酵素を阻害する化合物Subquinocinといったユビキチン鎖が関与するタンパク質に結合する化合物の作用メカニズムを立体構造に基づいて理解し、共同研究も含めて原子・分子レベルから細胞・個体レベルまでの解析を通じて免疫疾患に対する新たな治療法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The ubiquitin modification, which was originally identified as a signal for protein degradation, is now known to play an essential role in the regulation of diverse cellular functions. Ubiquitin chains formed by covalently linking ubiquitin molecules are closely associated with the diversity of functions. Research aimed at understanding the molecular mechanisms of attachment, recognition, and removal of ubiquitin chains and artificially controlling cellular functions could contribute to therapeutic development for various diseases. In this study, we determined the three-dimensional structures of protein complexes associated with the ubiquitin chain modification to deepen the understanding of novel ubiquitin chain recognition mechanisms and molecular mechanisms involving ubiquitin chains. Furthermore, based on the obtained structural information, we attempted to design compounds that could control the function.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物学 分子間相互作用 ユビキチン シグナル伝達 タンパク質工学 ケミカルバイオロジー X線結晶構造解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾の一つであるユビキチン修飾は、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の役割にとどまらず、多様な細胞機能の制御において必須な役割を担う。ユビキチンは、自身も修飾の対象であり、7ヶ所のリジン残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) と N 末端メチオニン (M1) 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も多く知られる。さらに、つながり方の異なる鎖が混在する混合鎖や一つのユビキチンに複数のユビキチンが結合する分岐鎖といった多様な鎖の形成に、リン酸化などの別の翻訳後修飾も加わって、ユビキチン修飾系が細胞内で処理する情報 (ユビキチンコード) は、想定を超える複雑さを呈してきていた。ユビキチンコードの分子機構を理解することで多様な生命現象の理解を深めるとともに、コードの操作によって細胞機能の異常やそれに伴う病態を改善したり、新たなコードを創ることで付加価値のある機能を追加したりといった次世代のユビキチン研究の潮流も生まれつつあった。我々は、デコーダー分子であるユビキチン結合ドメイン (UBD) やイレーサー分子である脱ユビキチン化酵素 (DUB) とユビキチン鎖との複合体の立体構造に基づいて、コードの解読と消去の詳細な分子機構を解明してきており (図 1)、M1、K48、K63 を介して結合したユビキチン鎖 (M1 鎖、K48 鎖、K63 鎖) の認識機構の理解が進んでいたが、これらの鎖以外のユビキチン鎖 (K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K29 鎖、K33 鎖) やユビキチン化したタンパク質の認識機構は不明な点が多かった。

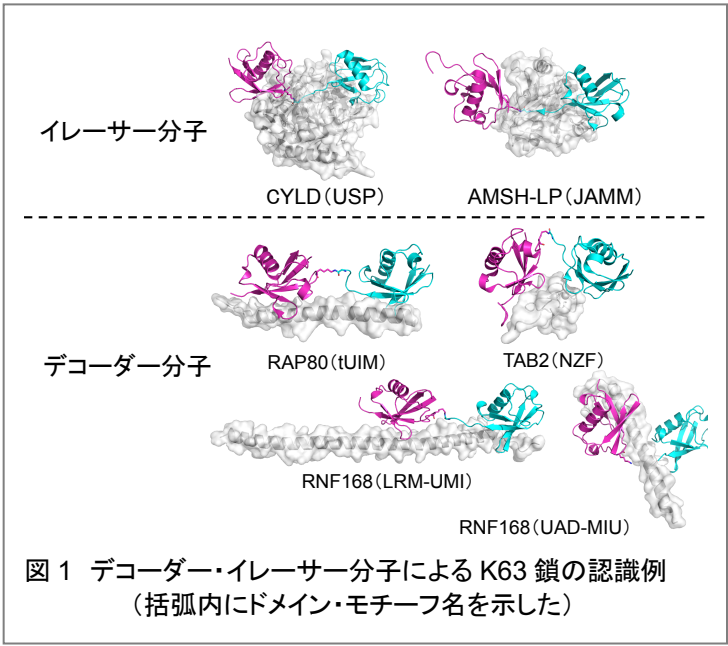


図 1 デコーダー・イレーサー分子による K63 鎖の認識例 (括弧内にドメイン・モチーフ名を示した)

2. 研究の目的

本研究では、M1 鎖、K48 鎖、K63 鎖に加えて、K6 鎖、K27 鎖、K33 鎖などの非古典的なユビキチン鎖やユビキチン化タンパク質の認識機構を解明し、さらに、構造情報を活用して次世代のユビキチン研究に必要な新たな分子ツールの開発につながる研究の推進を目指した。具体的には、(1) 構造未知の UBD や DUB の立体構造を決定して新たな選択的ユビキチン鎖認識機構を原子レベルで解明すること、(2) 研究領域内で創出される機能性化合物やユビキチンが介する制御因子などの作用機構解明に必要な立体構造解析を実施すること、(3) UBD や DUB を改変して、次世代のユビキチンコード研究に有用な分子ツールを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

K48 鎖、K63 鎖および M1 鎖に加えて、K6 鎖、K27 鎖、K33 鎖などの非古典的なユビキチン鎖の認識機構を解明するために、これらのユビキチン鎖と UBD や DUB との複合体の結晶化を行い、良質の結晶が得られた試料について X 線結晶構造解析を行った。また、ユビキチンコードが関与する分子シグナルを制御するタンパク質についても、複合体の X 線結晶構造解析を行った。構造解析の対象としたタンパク質には、細胞内での機能が明確ではない分子も含まれるが、立体構造情報をもとに機能を失った、あるいは、機能を抑えた変異体を発現させるなどによって、新たな機能解明につながる研究も進めた。さらに、酵素の改変やペプチド化合物の設計などによる分子ツールの開発も試みた。

4. 研究成果

1. ユビキチンコードの解読・消去の構造基盤の解明

プロテアソームの分解基質をアンフォールディングする六量体 ATPase Cdc48/p97 のコファクター Npl4 による K48 鎖の認識 (図 2) とそれに共役した Cdc48-Ufd1-Npl4 (Cdc48-UN) 複合体の ATP 加水分解の分子機構 (Nature Communications, 10,5708 (2019))、プロテアソームに含まれる DUB 複合体 Rpn11-Rpn8 によるユビキチン化ペプチドの切断の制御機構、免疫応答シグナルのアダプター分子 TAB2 による K6 鎖の認識機構 (Biophysical Journal, 120, 3355-3362 (2021)) に関して構造基盤を解明した。また、プロテアソームサブユニット PSMD4 (Rpn10) と結合するユビキチンリガーゼ UBE3A (E6-AP) について、その相互作用の構造基盤を解明した。一方で、イ

ンターフェロンシグナル経路において K33 鎖選択的な切断活性が報告されている USP38 や網羅的スクリーニングで K27 鎖選択的な切断活性が報告されている UCHL3 について構造解析を試みたが、USP38 は結晶が得られず、また、UCHL3 は海外の研究グループからの結晶構造の報告があったために結晶化を中断することとした。本研究領域では、ユビキチン選択的オートファジーの制御に関しての研究が進進したので、それに伴って、オートファジーアダプターの一つ optineurin (OPTN) と Rab8 との複合体や SINTBAD と TBK1 との複合体の結晶構造解析を行なって、相互作用の構造基盤を明らかにした。

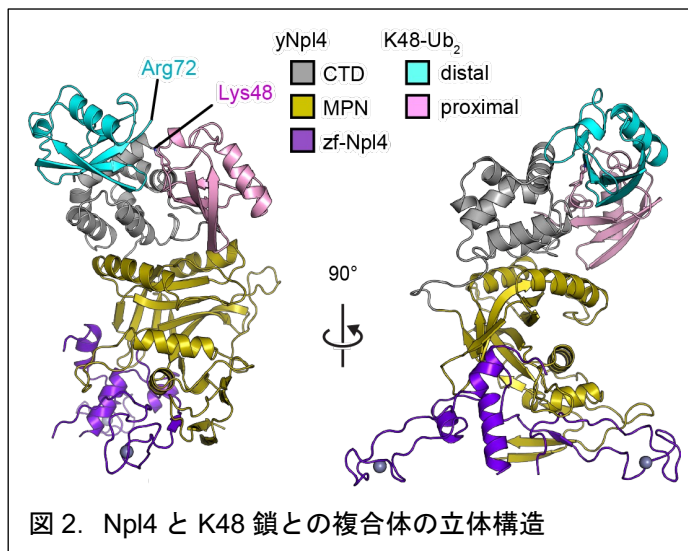


図 2. Npl4 と K48 鎖との複合体の立体構造

2. ユビキチンコードを操作する化合物の開発と作用機構の解明

研究開始時点では、ユビキチン鎖に作用する化合物を念頭にいた研究を想定していたが、領域研究内の連携を踏まえて、UBD や DUB、ユビキチンリガーゼを含めたコードの制御に関わるシグナル分子を対象とした化合物の開発と作用機構の解明を目指した。M1 鎖選択的ユビキチンリガーゼ LUBAC の触媒サブユニット HOIP の阻害剤 HOIPIN の結合様式を結晶構造解析により明らかにし、領域内共同研究による原子・分子レベルから細胞・個体レベルまでの解析を通じて、免疫疾患に対する新たな治療法の可能性を示した (Communications Biology, 3, 163 (2020))。また、USP ファミリーの DUB を阻害する化合物 Subquinoxin が、M1 鎖/K63 鎖選択的 DUB である CYLD の活性部位に結合する様式を *in silico* で解析して、結合に重要なアミノ酸残基を予測した。領域内共同研究による化合物探索から細胞レベルまでの解析を通じて、免疫疾患に対する新たな治療法の可能性を示した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 524, 1-7 (2020))。一方で、SNIPER 分子と標的分子、ユビキチンリガーゼの三者複合体の立体構造解析によって、標的分子とユビキチンリガーゼとの副次的な相互作用が標的分子の分解に与える分子機構を明らかにすることを試みたが、構造解析に適する試料調製が想定以上に難航して構造決定に至らなかった。

上記 1. で記述した Cdc48/p97 については、Npl4 コファクターと K48 結合型ユビキチンとの複合体に加えて、Cdc48 のもう一つのコファクターである Ufd1 と Npl4 との複合体 (UN 複合体) の結晶構造も決定した (Nature Communications, 10, 5708 (2019); 図 3)。その結果、Ufd1 との相互作用部位に結合する化合物を合理的に設計できることが期待された。プロテアソーム分解系が抗がん剤の標的となっていることから、ヒト p97-Ufd1-Npl4 も標的となりうるため、ヒト Npl4-Ufd1 の相互作用を阻害するペプチド化合物の開発を進めた。Ufd1 の Npl4 結合領域 15 残基を同定し、変異・修飾を導入することで結合親和性を向上させた。予備的な結果ではあるが、合成したペプチド化合物の一つは、p97-UN 複合体によるユビキチン化基質のアンフォールディングを阻害する結果を得た。

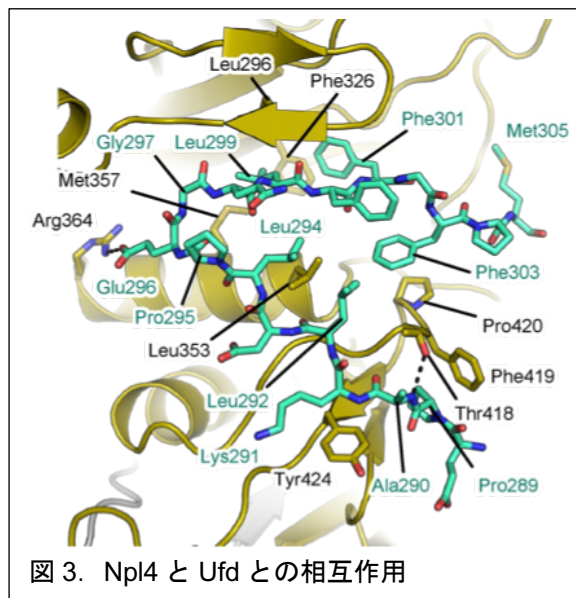


図 3. Npl4 と Ufd との相互作用

3. ユビキチンコードの研究に有用な分子ツールの設計と開発

DUB 複合体 Rpn11-Rpn8 をベースとして、ユビキチン鎖を *en bloc* にタンパク質から切断する分子ツールの開発を試みた。立体構造に基づいて活性を制御するループ領域への変異導入による機能改変を試みたが、期待する活性を持つ酵素複合体は得られなかった。また、上述の PSMD4-UBE3A や RAD23A-K48 鎖の結合を阻害するステープルペプチドの設計やパーキンソン病の原因遺伝子産物であるユビキチンリガーゼ Parkin の活性状態に応じた結合分子の探索なども試みたが、いずれも期待した化合物を得ることはできなかった。一方で、分子ツールとして領域内で開発されたユビキチンに対する人工抗体 (ナノボディー) について、ユビキチンとの複合体の結晶構造を決定して認識機構を明らかにした (特許出願中 (共同出願))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Li Yanjun, Okatsu Kei, Fukai Shuya, Sato Yusuke	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 -
1. 著者名 Takahashi H, Yamanaka S, Kuwada S, Higaki K, Kido K, Sato Y, Fukai S, Tokunaga F, Sawasaki T.	4. 巻 4
2. 論文標題 A Human DUB Protein Array for Clarification of Linkage Specificity of Polyubiquitin Chain and Application to Evaluation of Its Inhibitors. Biomedicines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamanaka Satoshi, Sato Yusuke, Oikawa Daisuke, Goto Eiji, Fukai Shuya, Tokunaga Fuminori, Takahashi Hirotaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 524
2. 論文標題 Subquinocin, a small molecule inhibitor of CYLD and USP-family deubiquitinating enzymes, promotes NF- B signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.049	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 Sato Yusuke, Tsuchiya Hikaru, Yamagata Atsushi, Okatsu Kei, Tanaka Keiji, Saeki Yasushi, Fukai Shuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural insights into ubiquitin recognition and Ufd1 interaction of Npl4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13697-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oikawa Daisuke, Sato Yusuke, Ohtake Fumiaki, Komakura Keidai, Hanada Kazuki, Sugawara Koji, Terawaki Seigo, Mizukami Yukari, Phuong Hoang T., Iio Kiyosei, Obika Shingo, Fukushi Masaya, Irie Takashi, Tsuruta Daisuke, Sakamoto Shinji, Tanaka Keiji, Saeki Yasushi, Fukai Shuya, Tokunaga Fuminori	4. 巻 3
2. 論文標題 Molecular bases for HOIPINs-mediated inhibition of LUBAC and innate immune responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0882-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okatsu Kei, Sato Yusuke, Yamano Koji, Matsuda Noriyuki, Negishi Lumi, Takahashi Akiko, Yamagata Atsushi, Goto-Ito Sakurako, Mishima Masaki, Ito Yutaka, Oka Toshihiko, Tanaka Keiji, Fukai Shuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural insights into ubiquitin phosphorylation by PINK1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28656-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Tomio S, Sato Yusuke, Yamagata Atsushi, Goto-Ito Sakurako, Saijo Masafumi, Fukai Shuya	4. 巻 47
2. 論文標題 Structural basis of ubiquitin recognition by the winged-helix domain of Cockayne syndrome group B protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 3784-3794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shuya Fukai
2. 発表標題 Structure-guided design of peptide derivatives that inhibit the Ufd1-Np14 cofactor complex of p97
3. 学会等名 The International Symposium in Tokyo 2022 Ubiquitin New Frontier “from Neo-Biology to Targeted Protein Degradation” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深井 周也
2. 発表標題 特定のユビキチン鎖を選択的に切断する脱ユビキチン化酵素の作動機構
3. 学会等名 第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李 彦君, 尾勝 圭, 深井 周也, 佐藤 裕介
2. 発表標題 炎症シグナルタンパク質TAB2のNZFドメインによるK6結合型ユビキチン鎖認識の構造基盤
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深井 周也
2. 発表標題 ユビキチンコードの理解と制御のための構造生物学
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuya Fukai
2. 発表標題 Structural and functional studies on factors associated with the ubiquitin-proteasome system
3. 学会等名 Pacifichem2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深井 周也
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼRNF168によるK63結合型ユビキチン鎖の認識メカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

不要なタンパク質が分解を受ける前に解きほぐされる仕組み
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0207_00021.html

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
研究協力者	尾勝 圭 (Okatsu Kei)		
研究協力者	佐藤 裕介 (Sato Yusuke)		
研究協力者	李 彦君 (Li Yanjun)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岡本 明憲 (Okamoto Akinori)		
研究協力者	山本 隼士 (Yamamoto Hayato)		

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