

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08191

研究課題名(和文) ユビキチン ユビキチン結合タンパク質複合体の動的構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for studying conformational dynamics of ubiquitin-ubiquitin binding protein complex

研究代表者

上田 卓見 (Ueda, Takumi)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：20451859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：複数の構造を交換する動的平衡状態にある蛋白質-蛋白質複合体における、蛋白質に付加した常磁性プローブと観測原子の距離を決定できるNMR手法を開発した。開発した方法を応用することで、ユビキチンとYUHが、ユビキチンとYUHが多様な構造を取る複合体Bを一過的に形成することで、反応を進行できる最終的な複合体Aを効率よく形成して、望ましい基質特異性と高い反応効率を達成することが可能となることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン修飾による蛋白質の機能制御、および様々なマルチドメイン蛋白質による細胞ないシグナル伝達の制御において、動的構造が重要な役割を持つことが予想されている。一方、蛋白質-蛋白質複合体の動的構造平衡の知見は極めて乏しい。したがって、本研究で開発した手法は、従来にない新たな視点から機能制御のメカニズムの手掛かりを与えることを可能とすることが予想され、意義深い。

研究成果の概要(英文)：We developed an NMR method for determination of the distances between the observed atoms and the paramagnetic probes in the protein-protein complexes that undergo exchange between multiple conformations. We applied the developed method to the interaction between ubiquitin and a ubiquitin-binding protein, and revealed that these proteins transiently form a complex in which each protein adopts multiple conformations. The transient complex leads to rapid formation of the functional complex in the conformational selection manner.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 蛋白質-蛋白質複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内において、蛋白質は、様々なパターンのユビキチン修飾を受けることにより、機能制御を受けている。ユビキチン修飾やユビキチン修飾パターンの認識および切断には、数百種類のユビキチン結合蛋白質 (UBP) が関与する。様々な UBP との結合部位である、ユビキチンの C 末端や $\beta 1$ - $\beta 2$ ループが運動性に富むこと、およびユビキチン C 末端加水分解酵素 (UCH) 等の多くの UBP が多段階で複合体を形成することが最近提唱されている (Lange et al., Science, 2008, Wlodarski et al., PNAS, 2009, Phillips et al., PNAS, 2013)。

UCH は、ユビキチン付加体を迅速に切断する ($k_{cat}/K_m > 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。一方、ユビキチン非存在下では、UCH は活性部位が覆われた自己阻害型の構造を取り、細胞内蛋白質の非特異的な切断を防ぐことが知られている (Das et al., PNAS, 2006)。したがって、反応を進行できるユビキチン-UCH 複合体の形成に先立って、自己阻害を解除する一段階目の相互作用が形成されることが強く示唆される。

多段階のタンパク質 - タンパク質相互作用を解析する手法として、化学交換や常磁性緩和増大を利用する NMR 法が挙げられる。しかし、前者では化学シフトの情報と構造を対応づけることが困難であり、後者では一つ一つの段階に由来する構造情報を独立に観測することが困難である、といった問題がある。したがって、動的構造平衡にある蛋白質 - 蛋白質複合体の一つ一つの状態における構造情報を取得する手法が必要である。

申請者は、巨大な蛋白質 - 蛋白質複合体の結合界面を正確に決定することを可能とする、交差飽和法を開発した (J. Magn. Reson., 2010, J. Am. Chem. Soc., 2010, Plant Cell, 2012, Q. Rev. Biophys., 2014)。交差飽和法で用いる、プロトン密度の低い試料では、アミドプロトンの縦緩和時間が長いこと、微小な縦緩和速度の変化が検出できる、という特徴がある。この特徴を利用して、通常の常磁性緩和増大実験で測定する横緩和速度増大だけでなく、縦緩和速度増大も観測すれば、一つ一つの状態における距離情報を独立に得ることが可能となると考えた。また、予備的に行った化学交換を利用する NMR 実験により、UCH である酵母ユビキチン加水分解酵素 (YUH) とユビキチンの複合体が、ユビキチンアルデヒド-YUH 複合体の結晶構造に対応する構造である複合体 A と、複合体 B の動的構造平衡にあること、および複合体 A は 80%以上の確率で複合体 B を経由して形成されることが明らかとなった。したがって、上述の手法を応用すれば、複合体 B の構造を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、以下の項目を達成することにより、動的構造平衡にあるユビキチン-UBP 複合体の一つ一つの状態における距離情報を得る手法を開発すること、および開発した技術を応用して、ユビキチンと YUH が二段階で複合体を形成する機構を解明することを目的とした。

- (i) EDTA に結合した、常磁性金属 Ni^{2+} , VO^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} の電子スピン緩和速度を決定する。
- (ii) (i) の金属イオンもしくは反磁性金属イオンの Zn^{2+} が結合した EDTA プローブを、約 10 種類の部位に導入した YUH を調製した上で、過剰量の均一 ^2H , ^{15}N 標識ユビキチンを添加して、常磁性縦緩和増大および横緩和増大を測定する。
- (iii) (i), (ii) の結果を用いて、理論式に対するフィッティングを行い、複合体 B における、YUH に導入した常磁性プローブとユビキチン中の各アミド水素原子からの距離を決定する。

3. 研究の方法

YUH の E16, N29, T40, E43, A46, I61, S104, S110, S118, S123, N140, A156, N174, S186, G192, T197, A212, E220, N234 にシステイン残基を導入した変異体を作成した上で cysteaminy-EDTA 修飾反応を行った。各種 EDTA 修飾体に各種金属をキレートさせた上で、過剰量の均一 ^2H , ^{15}N 標識ユビキチンを添加した試料を調製して、常磁性縦緩和増大および横緩和増大を測定した。

観測された緩和増大が、一段階目に形成される複合体 B に起因するかどうかを調べるために、均一 ^2H , ^{15}N 標識ユビキチンと、T40C に cysteaminy-EDTA を付加した YUH を用いて、複合体 B を形成しないユビキチンアルデヒド-YUH 複合体を調製して、常磁性縦緩和増大および横緩和増大を測定した。また、二段階目に形成される複合体 A の割合が野生型より低いことが予備的な実験で分かっている、YUH の C90L 変異体に対して、過剰量の均一 ^2H , ^{15}N 標識ユビキチンを添加した試料でも、常磁性縦緩和増大および横緩和増大を測定した。

次に、 Ni^{2+} , VO^{2+} , Fe^{3+} の電子スピン緩和時間を調べるために、各種金属イオンをキレートした EDTA プローブを付加した YUH と $[\text{ul-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]\text{Ubal}$ の複合体における、縦緩和速度増大および横緩和速度増大を観測した上で、先行報告に従って解析を行った。

得られた電子スピン緩和時間を使って、観測した常磁性緩和増大の結果を理論式に対してフィッティングすることで、複合体 B における、YUH に導入した常磁性プローブとユビキチン中の各アミド水素原子との距離を算出した。さらに、得られた距離情報を再現する複合体 B の構造を XPLOR-NIH で探索した。

4. 研究成果

ユビキチン結合部位に隣接した部位である E16, T40, E43, A156, E220, N234 に Zn-EDTA 修飾を施した YUH に関して、ユビキチンとの親和性が野生型と同程度であることを ITC 実験

により確認した。T40 を Zn-EDTA 修飾した YUH に対して、コピキチンアルデヒドを過剰量添加して、HPLC 解析を行った結果、99%以上の YUH が Ubal-YUH 複合体を形成したことから、YUH の C90 は EDTA 修飾されておらず、T40 だけが EDTA 修飾されていることが示された。

T40 に cysteaminy-EDTA を付加した YUH と均一 ^2H , ^{15}N 標識コピキチンを用いて常磁性縦緩和増大および横緩和増大を測定した結果、Ubal-YUH 複合体の結晶構造において T40 と近接している部位に加えて、T40 から離れているコピキチン C 末端に顕著な緩和増大が観測された。一方、均一 ^2H , ^{15}N 標識コピキチンと、T40C に cysteaminy-EDTA を付加した YUH がコピキチンアルデヒド-YUH 複合体を形成させた条件では、結晶構造において YUH の T40 から離れたコピキチンの C 末端には緩和増大は観測されなかった。また、YUH の C90L 変異体に対して、過剰量の均一 ^2H , ^{15}N 標識コピキチンを添加した試料では、コピキチンの C 末端領域に顕著な緩和増大が観測された。以上の結果から、コピキチンの C 末端に観測された緩和増大が、複合体 B に由来することが示された。

T40 以外のコピキチン結合部位に隣接した残基に cysteaminy-EDTA を付加した YUH を用いた実験においても、Ubal-YUH 結晶構造では修飾部位から離れているコピキチンの C 末端に顕著な緩和増大が観測された。以上の結果から、複合体 B では、コピキチンの C 末端以外の領域は結晶構造と類似した様式で YUH と結合する一方、C 末端領域は複数の構造を交換していることが示唆された。

さらに Ni^{2+} , VO^{2+} , Fe^{3+} をキレートした EDTA プローブを付加した YUH と [^{15}N]Ubal の複合体における、縦緩和速度増大および横緩和速度増大から、EDTA にキレートされた状態における Ni^{2+} , VO^{2+} , Fe^{3+} の電子スピン緩和時間が、それぞれ 0.11, 16.5, 2.1 ns と算出された。

以上のデータに基づいて、複合体 B における、YUH に導入した常磁性プローブとコピキチン中の各アミド水素原子との距離を 135 組算出した。得られた距離情報を再現する複合体 B の構造を XPLOR-NIH で探索した結果、単一の構造では常磁性緩和増大の実験値を再現することができなかった。そこで、アンサンブルリファインメントを行った結果、10 種類以上の構造アンサンブルで、実験値を十分再現することが可能であることが示された。これらの構造アンサンブルでは、いずれもコピキチンの構造形成領域は同様の様式で YUH と結合している一方、C 末端が反応部位に入っていなかった。また、YUH のシグナルを観測する NMR 解析を行った結果、YUH の N 末端領域に位置する残基がコピキチンアルデヒド-YUH 複合体では先鋭な NMR シグナルを与えるのに対し、コピキチン-YUH 複合体では YUH の N 末端領域の NMR シグナルが顕著に広幅化した。この結果から、複合体 B において、YUH の N 末端が多様な構造を交換していることが示唆された。以上より、コピキチンと YUH が、コピキチンの C 末端と YUH の N 末端が多様な構造を取る複合体 B を一過的に形成することで、反応を進行できる最終的な複合体 A を効率よく形成して、望ましい基質特異性と高い反応効率を達成することが可能となると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) [Shimada I](#), [Ueda T](#), Kofuku Y, Eddy MT, Wüthrich K, “GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures”, *Nat Rev Drug Discov* (2019)18,59-82 (査読有)
- (2) Takaoka Y, Uchinomiya S, Kobayashi D, Endo M, Hayashi T, Fukuyama Y, Hayasaka H, Miyasaka M, [Ueda T](#), [Shimada I](#), Hamachi I, “Endogenous Membrane Receptor Labeling by Reactive Cytokines and Growth Factors to Chase Their Dynamics in Live Cells”, *Chem*. (2018) 4(6),1451-1464 (査読有)
- (3) Kofuku Y, Yokomizo T, Imai S, Shiraiishi Y, Natsume M, Itoh H, Inoue M, Nakata K, Igarashi S, Yamaguchi H, Mizukoshi T, Suzuki EI, [Ueda T](#), [Shimada I](#), “Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β_2 -adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system”, *J Biomol NMR*. (2018) 71(3), 185-192 (査読有)
- (4) Shiraiishi Y, Natsume M, Kofuku Y, Imai S, Nakata K, Mizukoshi T, [Ueda T](#), Iwai H, [Shimada I](#), “Phosphorylation-induced conformation of β_2 -adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR”, *Nat Commun*. (2018) 9(1), 194 (査読有)
- (5) Minato Y, [Ueda T](#), Machiyama A, Iwai H, [Shimada I](#), “Dynamic domain arrangement of CheA-CheY complex regulates bacterial thermotaxis, as revealed by NMR”, *Sci Rep*. (2017) 7(1), 16462 (査読有)
- (6) Minato Y, Suzuki S, Hara T, Kofuku Y, Kasuya G, Fujiwara Y, Igarashi S, Suzuki E, Nureki O, Hattori M, [Ueda T](#), [Shimada I](#), “Conductance of P2X₄ purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2016) 113(17),4741-4746 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) Takumi Ueda, Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Tomoaki Hara, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Eiichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Ichio Shimada, “Conductance of P2X₄ receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region”, 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA, USA, 2017
- (2) 上田 卓見、嶋田 一夫, “Functional dynamics of membrane proteins revealed by NMR”, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017
- (3) 上田 卓見、嶋田 一夫, “安定同位体標識法の応用による、蛋白質の動的構造の解明”, 第 56 回 NMR 討論会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：嶋田 一夫

ローマ字氏名： Shimada, Ichio

所属研究機関名： 東京大学

部局名： 大学院薬学系研究科(薬学部)

職名： 教授

研究者番号(8桁)： 70196476

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。