

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06496

研究課題名(和文) pHで制御される核酸依存的K63Ub鎖形成促進機構の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of pH- and nucleic acid-dependent K63Ub chain elongation

研究代表者

黒川 裕美子 (Kurokawa, Yumiko)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：10381633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：E2酵素Ubc13/Mms2複合体が促進するK63Ub鎖の形成や伸長の分子メカニズム、K63Ub鎖が関わる標的蛋白質・E3酵素・細胞内機構の大部分は未解明の部分が多い。これまでの解析で、*in vitro*においてpH依存的に核酸(RNAやssDNA)がK63Ub鎖形成促進効果を有することを発見した。pHで制御される促進反応のメカニズムについて、Ubc13/Mms2の構造変化や核酸結合部位探索、高速AFMを用いた核酸結合解析を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たなE2活性化メカニズムの発見と理解はユビキチン研究分野の発展につながる。核酸やpHによる酵素反応促進メカニズムの概念は、蛋白質科学全体に大きなインパクトを与えるだろう。細胞内でどれほどのpH環境の変化が存在するか、またそれに伴う活性制御機構のほとんどを我々は知らない。本研究で得られた高速AFMを含めた解析手法や結果は学術的にも独自性が高く、核酸に関連した生命機構全体においてブレークスルーの可能性を有しており、今後も創造性の高い発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of K63Ub chain formation and elongation promoted by the E2 enzyme Ubc13/Mms2 complex, the target proteins, E3 enzymes, and cellular mechanisms involving K63Ub chains are largely unresolved. In our previous analysis, we found that nucleic acids (RNA and ssDNA) have a pH-dependent effect on K63Ub chain formation *in vitro*. The mechanism of the pH-regulated promotion reaction is investigated by analyzing the conformational changes of Ubc13/Mms2, screening for nucleic acid binding sites, and nucleic acid binding analysis using high-speed AFM.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン DNA RNA K63 pH Ubc13 Mms2 高速AFM

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

E2 酵素 Ubc13/Mms2 (酵母の場合) によって形成される K63Ub 鎖は DNA 修復やシグナル伝達などに関わり、短時間のうちに局所的に伸長促進されることが知られている。標的蛋白質の K63Ub 化を促進する E3 酵素もいくつか同定されているが、E3 酵素がどのように E2 を介して K63Ub 鎖形成を促進制御するのかはまだ議論の中である。また K63Ub 鎖が DNA ダメージ後に形成促進され、損傷シグナルとして機能するという報告もある。細胞内における K63Ub 鎖形成能が活性化される制御メカニズムを理解するため、分裂酵母を材料に *in vitro* で K63Ub 鎖形成を促進する新たな因子や反応条件を探索した。これまでに、核酸 (RNA や ssDNA) が pH 依存的に K63Ub 鎖形成促進効果を有することを発見している (E3 非依存的)。反応メカニズムの解析の結果、弱酸性条件下で Ubc13/Mms2 が核酸に結合し集合体を形成することが明らかになっている。しかし、どのように K63Ub 鎖の形成が進むのか、細胞内でも同じ反応機構が機能しているのか、についてはこれまで明らかにできていない。

### 2. 研究の目的

「pH に依存した核酸促進型 K63Ub 鎖形成促進反応」の分子メカニズム解明と、それに基づいた「細胞内 pH 環境による核酸促進型 K63Ub 鎖形成機構の存在と理解」を本研究の目的とした。ユビキチン化反応を促進するものは「E3 蛋白質」と認識されていた。しかし核酸 (RNA や ssDNA) が弱酸性条件下において K63Ub 鎖形成を促進することを発見したことは、これまでに知られていない新たな E2 活性化メカニズムの存在を意味しており、学術的にも独自性が高い。そこで本研究では活性制御メカニズムとしての「pH 依存性」に着目した。弱酸性というのは決して極端な環境ではなく、例えば一般的に使用されている分裂酵母用液体培地は弱酸性である。細胞内 pH は感染やがん化によっても酸性側へシフトすることが知られているし、またストレス顆粒は細胞をヒートショックや過酸化水素で処理することでも形成されるが、その顆粒には RNA が含まれていることが報告されている。このような場面でも pH や核酸、K63Ub 鎖が関係する可能性がある。生化学的・細胞学的・遺伝学的手法を駆使し、「pH で制御される核酸依存的 K63Ub 鎖形成反応の分子メカニズムの理解 (*in vitro*)」から、将来的に「細胞内で pH 制御される核酸依存的 K63Ub 鎖形成機構の探索 (*in vivo*)」につなげたい。

### 3. 研究の方法

- (1) pH 依存的な分裂酵母 Ubc13/Mms2 の構造変化の検討  
pH が E2 蛋白質の構造や安定性に影響を与えた結果、Ub 鎖伸長反応が変化することは充分考えられる。Ubc13/Mms2 の pH 依存的構造変化の有無を検討するため、リアルタイム PCR 装置を用いた Thermal Shift アッセイを用いた。異なる pH の buffer に Ubc13/Mms2 を加え、GloMelt Thermal Shift Protein Stability Kit 試薬 (biotium 社) 存在下で 25 から 90 までの蛋白質の温度安定性を比較した。
- (2) Ubc13/Mms2 における核酸相互作用に重要なアミノ酸残基の同定  
すでに明らかになっている出芽酵母 Ubc13/Mms2 複合体の構造を基に、SWISS-MODEL による分子置換法で分裂酵母 Ubc13/Mms2 の構造を予測した。種保存性に加え、Lys/Arg や pH でプロトン化状態が変化しやすい His を中心に、表面に位置するアミノ酸残基候補をピックアップし、それぞれアラニンに置換した変異体蛋白質を調製した。弱酸性条件下での核酸結合アッセイ (ゲルシフト法) を行ない、核酸結合能が低下する変異体を探した。
- (3) 高速 AFM を用いた Ubc13/Mms2 の核酸結合様式の解析  
Ubc13/Mms2 が核酸にどのように結合しているのかについて、高分解能で観察できる条件を検討した。高速原子間力顕微鏡 Nano Live Vision (生体分子計測研究所) を用いた液中観察を行ない、基板はマイカを基本に、表面を APTES 処理や lipid 膜処理を行なうことでサンプリングの基板への結合力を調整した。Ubc13/Mms2-核酸複合体や Ub 化反応サンプルの観察は、反応産物を buffer で希釈し、基板にスポットしたものを AFM で観察した。

### 4. 研究成果

- (1) pH 依存的な分裂酵母 Ubc13/Mms2 の構造変化の検討

弱酸性条件が蛋白質の構造や安定性に影響を与える可能性を考え、Thermal Shift アッセイで pH 依存的な Ubc13 /Mms2 の構造変化の解析を行なった。pH5.7 と pH7.5 を比較したが、明確な差は見られなかった。温度シフト前の段階で多少の不安定なヘテロダイマーが存在しているせいか、バックグラウンドの解釈が難しい。ヘテロダイマーの調製はそれぞれ別個に精製した Ubc13 と Mms2 を等量混合する方法をとっているが、ゲル濾過カラムで分離精製するのが必要だろう。ただし、pH による劇的な構造変化の可能性は少ないと考えられる。これは直接高速 AFM での観察結果からも言える。

(2) Ubc13/Mms2 における核酸相互作用に重要なアミノ酸残基の同定

将来的に *in vivo* の解析をするためにも、核酸結合に影響を持つ変異体取得は重要である。表面アミノ酸残基のうち、弱酸性条件下において核酸結合に寄与しそうな部位をアラニン置換し、大腸菌を用いて数種類を発現精製した。pH 依存的な核酸相互作用について ssDNA を用いたゲルシフト法で検討したが、WT と比べて差はあるものの劇的に核酸結合能を損失した変異体は得られなかった。変異の影響がヘテロダイマー形成に悪影響していないかも IP で確認したが、ヘテロダイマー形成に影響が出ているものも多少あった。核酸結合にのみ影響する変異体の取得が今後も求められる。今回作成した変異体ではヘテロダイマー中にアミノ酸変異は 1 カ所ずつしか導入していないため、核酸結合能が残存している可能性がある。今回得られた変異体をさらに追加変異を加えるなどの改良によって、より効果的な変異体ができる可能性は高い。今後も引き続き検討を進めていく。

(3) 高速 AFM を用いた Ubc13/Mms2 の核酸結合様式の解析

pH 依存的な分裂酵母 Ubc13/Mms2 の核酸相互作用について、高速 AFM での構造解析ならびに動的解析手法の向上を目指した。まず、蛋白質だけで観察を行なった。弱酸性条件下でもマイカ基板上で Ubc13/Mms2 複合体はヘテロダイマーとして安定に観察できたが、pH によって蛋白質複合体に構造変化があるかについては、この分解能では明確に判断できなかった。構造変化はもしあったとしても非常に細かい部分、もしくは表面に限られるのではないかと考えられる。Ubc13/Mms2-核酸複合体の観察条件では様々な基板を用いて検討した。核酸は負電荷を帯びているため、同じく負電荷のマイカ基板への貼り付きは弱く、観察中のカンチレバーの影響でもサンプルの動きが激しくなり分解能が低下してしまう。そこで、マイカ基板を APTES 処理することで電荷を正に変化させ、核酸の貼り付きを強くしたことで観察しやすくなった。一方で、基板への貼り付きが強くなったために Ubc13/Mms2 の動きが抑えられ、最終目標の Ub 鎖伸長反応をリアルタイム観察するには不向きであった。動的観察の基板条件としてマイカ表面に lipid 膜を貼り付けた基板を検討した結果、適度なゆらぎの中で酵素反応が進めそうな感触を得た。分解能の低さ、pH による lipid 膜への影響といった点は今後も検討が必要であるが、最終目標の 1 つであった動的観察の成功にかなり近づいたと感じている。

(4) 細胞内で pH 制御される核酸依存的 K63Ub 鎖形成機構の探索 (*in vivo*)

当初予定していた *in vivo* における解析までは進むことはできなかった。効果的な変異体の取得が困難であったことが理由である。今後も引き続き進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------