

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2016

課題番号：24687012

研究課題名(和文) LUBACによる直鎖型ポリユビキチン鎖形成メカニズムの構造的基盤

研究課題名(英文) The structural basis for specific synthesis of Met1-linked polyubiquitin chains by LUBAC

研究代表者

佐藤 裕介 (Sato, Yusuke)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50568061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Met1結合型ユビキチン(Ub)鎖特異的な合成を行うUbリガーゼ複合体 LUBACの結晶構造決定を目指していたが、2013年にKatrin Rittingerらのグループに先を越され、我々は研究計画の変更を余儀なくされた。

一方、LUBACの研究の過程で得られた酵素を利用し、これまで難しかったLys6結合型、Lys29結合型、Lys33結合型Ub鎖の大量調製に成功した。また、CYLDとMet1結合型Ub鎖の複合体、CYLDとLys63結合型Ub鎖の複合体、FAAP20とLys63結合型Ub鎖の複合体、USP30とLys6結合型Ub鎖の複合体の結晶構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the crystal structure of the ubiquitin (Ub) ligase complex LUBAC that specifically synthesizes Met1-linked Ub chain. However, the structure of LUBAC in complex with Ub was determined by the group of Katrin Rittinger in 2013, and therefore we had to change our research theme.

On the other hand, we purified several kinds of enzymes for Ub chain synthesis in the process of LUBAC research. With these enzymes, we succeeded in large-scale preparation of Lys6-, Lys29- and Lys33-linked Ub chains which were difficult to be obtained. In addition, we determined the crystal structures of CYLD in complex with Met1-linked diUb, CYLD in complex with Lys63-linked diUb, FAAP20 in complex with Lys63-linked diUb and USP30 in complex with Lys 6-linked diUb.

研究分野：タンパク質X線結晶構造解析

キーワード：ユビキチン 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、Ub が鎖状に複数個繋がった Ub 鎖が様々な分子シグナリングにおいて重要であることが明らかになりつつある。Ub に存在する 7 つのリジン残基 (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63) に加え、N 末端メチオニン残基 (Met1) を用いて Ub 鎖は形成されるため、構造と機能の異なる 8 種類の Ub 鎖が存在する。この Ub 鎖は様々なタンパク質によって種類ごとに特異的に認識されるが、このメカニズムの解明は Ub 鎖の機能を解き明かす上で非常に重要である。

(2) Met1 結合型 Ub 鎖は HOIP、HOIL-1L、SHARPIN からなるユビキチンリガーゼ複合体「LUBAC」により合成される。LUBAC は TNF- α などの炎症性サイトカイン刺激に応じて IKK の制御サブユニットである NEMO を Met1 結合型 Ub 鎖修飾し、古典的 NF- κ B シグナル伝達経路を活性化する。NF- κ B は Rel ファミリータンパク質のホモ、またはヘテロ二量体からなる転写因子で、免疫・炎症反応の過程で刺激誘導される多くの遺伝子発現の発現誘導に関わっている。このため、NF- κ B 伝達経路の異常は癌、リウマチ、アトピー性皮膚炎などを引き起こし、臨床や創薬の面からも大きな注目を集めている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は LUBAC の結晶構造を決定し、複合体形成機構、活性化制御機構、基質認識機構、Met1 結合型 Ub 鎖特異的合成メカニズムを明らかにすることを目的としてスタートした。しかし、2013 年に Katrin Rittinger らのグループにより LUBAC と Ub の複合体の結晶構造が決定されたため、我々の研究目的は変更を余儀なくされた。そこで我々は、LUBAC 以外の Ub 鎖による生命現象制御メカニズムの解明のため、脱 Ub 化反応や Ub 認識に関わる CYLD、FAAP20、USP30 というタンパク質の構造解析を新たな目的とした。

(2) Met1 結合型 Ub 鎖に加えて、Lys63 結合型 Ub 鎖が NF- κ B の活性化に必須である事が知られている。一方、癌原因遺伝子産物の CYLD は Met1 結合型 Ub 鎖と Lys63 結合型 Ub 鎖を特異的に切断することで、NF- κ B の過剰な活性化を抑制する。そこで、CYLD と Met1 結合型 Ub 鎖、および Lys63 結合型 Ub 鎖との複合体の結晶構造を決定し、その特異的な切断メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(3) ファンconi 貧血の原因遺伝子として見つかった Fanconi anemia (FA) タンパク質群は、DNA 損傷の 1 つである DNA 鎖間架橋を修復する。DNA 損傷が生じるとその近傍に Lys63 結合型 Ub 鎖が形成されるが、FAAP20 がこの

Lys63 結合型 Ub 鎖を認識し、FA タンパク質群を損傷箇所へと集積させるという研究報告があった。そこで、FAAP20 と Lys63 結合型 Ub 鎖との複合体の結晶構造を決定し、FAAP20 による Lys63 結合型 Ub 鎖認識メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(4) 損傷したミトコンドリアの蓄積は細胞の変性を引き起こすため、機能低下したミトコンドリアはマイトファジーによって選択的に分解される。このミトコンドリアの分解シグナルは、Ub キナーゼ PINK1 と Ub リガーゼ Parkin による、Ub のリン酸化とポリ Ub 化であることが明らかになっている。一方、ミトコンドリアに局在する脱 Ub 化酵素 USP30 は、ミトコンドリア外膜上の Ub 鎖を切断してマイトファジーを抑制する。USP30 は Lys6 鎖に対して強い活性を持つことが知られている。そこで、USP30 と Lys6 結合型 Ub 鎖との複合体の結晶構造を決定し、USP30 による Lys6 鎖結合型 Ub 鎖特異的切断メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト CYLD の USP ドメイン単体の結晶構造は研究開始前にすでに決定されていた (Komander, et al., 2008)。しかし、ヒト CYLD の性質が若干不安定であるため、また、切断活性に関与しない B-box ドメインが結晶成長を阻害するため、B-box ドメインを除去したゼブラフィッシュ CYLD (zCYLD) を大腸菌発現系により大量に調製した。さらに、Met1 結合型 Ub 鎖は大腸菌の発現系を利用し、Lys63 結合型 Ub 鎖は酵素 (Ubc13/MMS2) を利用して調製した。これら調製した試料から結晶を作り、zCYLD-Met1Ub 鎖と zCYLD-Lys63Ub 鎖の結晶構造を決定した。得られた結晶構造から、切断活性に必要な残基に変異を導入し、この変異体による切断反応の速度論的解析を行った。また、ヒト細胞内で変異体 CYLD が NF- κ B に与える影響を共同研究で解析した (大阪市立・徳永教授、東大・井上教授、東大・武川教授)。

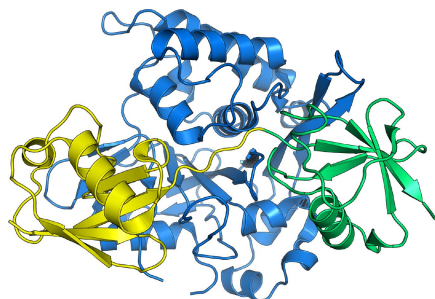
(2) ヒト FAAP20 の UBZ ドメインを大腸菌発現系により大量に調製し、FAAP20 と Lys63 結合型 Ub 鎖の結晶構造を決定した。また、ヒト細胞内で変異体 FAAP20 が DNA 修復に与える影響を共同研究で解析した (広大・田代教授)。

(3) ゼブラフィッシュ USP30 の USP ドメインを大腸菌発現系により大量に調製した。また、Lys6 結合型 Ub 鎖は酵素 (UbcH7, NleL, OTUB1) を利用して調製した。これら調製した試料から結晶を作り、USP30-Lys6 結合型 Ub 鎖の結晶構造を決定した。得られた結晶構造から、切断活性に必要な残基に変異を導入し、この変異体による切断反応の速度論的解析を行った。また、変異体 USP30 がミトコ

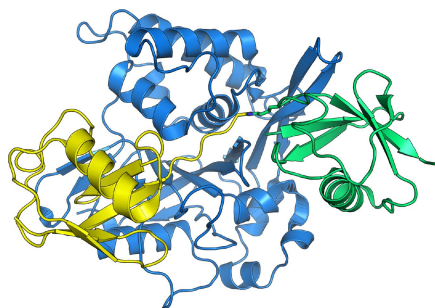
ンドリア上の Ub 鎖に与える影響を共同研究で解析した(東京都医学総合研・田中所長)

4. 研究成果

(1)zCYLD-Met1 結合型 Ub 鎖(分解能 2.30 Å)、zCYLD-Lys63 結合型 Ub 鎖(分解能 3.10 Å)の結晶構造を決定した(図 1、図 2)。



■ zCYLD ■ 先端側 Ub ■ 近傍側 Ub
図 1 zCYLD-Met1-Ub 鎖の構造

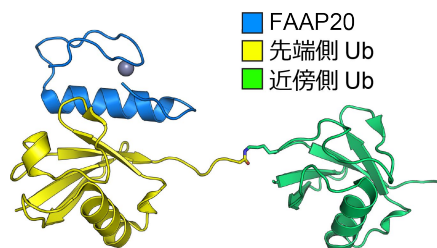


■ zCYLD ■ 先端側 Ub ■ 近傍側 Ub
図 2 zCYLD-Lys63-Ub 鎖の構造

2つ連続した Ub のうち、基質に近い方の Ub を近傍側 Ub、基質から遠い方の Ub を先端側 Ub と呼ぶ。CYLD を青、近傍側 Ub を緑、先端側 Ub を黄で示した。変異体を用いた活性測定により、先端側 Ub の認識と近傍側 Ub の認識の両方が Ub 鎖の切断に必要であることが明らかになった。また、近傍側 Ub の認識に関わる残基は Met1 鎖と Lys63 鎖への比率を大きく変化させることから、近傍側 Ub の認識が CYLD の特異性を決定することを明らかにした。さらに、同様の変異体をヒト細胞内で過剰発現させた結果、先端側 Ub の認識と近傍側 Ub の認識ともに、JNK 経路、NF-κB 経路の阻害に必要である事がわかった。(Sato Y., et al., 2015)

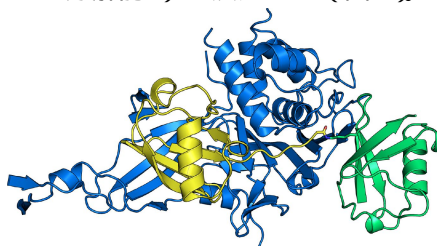
(2)FAAP20 と Lys63 結合型 Ub 鎖の複合体構造(分解能 1.90 Å)を決定した(図 3)。FAAP20 を青、近傍側 Ub を緑、先端側 Ub を黄で示した。他グループのデータにより、FAAP20 は Lys63 結合型 Ub 鎖特異的に結合する事が示唆されていたため、FAAP20 は先端側 Ub と近傍側 Ub の両者と同時に結合すると予想していたが、予想に反し FAAP20 は先端側 Ub のみと結合していた。さらに、表面プラズモン共鳴 (SPR) により FAAP20 と各種 Ub 鎖との相互作用を解析した結果、FAAP20 はこれまでの研究データとは異なり、Ub 鎖ごとの

特異性なく結合することが明らかになった。また、変異体解析により、結晶構造中で見られた FAAP20 と Ub の相互作用が Ub との結合および FAAP20 の DNA 損傷への集積に必要であることが確かめられた。(Toma A., et al., 2015)



■ FAAP20 ■ 先端側 Ub ■ 近傍側 Ub
図 3 FAAP20-Lys63-Ub 鎖の構造

(3)USP30 と Lys6 結合型 Ub 鎖の複合体構造(1.87 Å 分解能)を決定した(図 4)。



■ USP30 ■ 先端側 Ub ■ 近傍側 Ub
図 4 USP30-Lys6-Ub 鎖の構造

USP30 を青、近傍側 Ub を緑、先端側 Ub を黄で示した。変異体を用いた活性測定により、CYLD と同様に先端側 Ub の認識と近傍側 Ub の認識の両方が Ub 鎖の切断に必要であることが明らかになった。また、近傍側 Ub の認識が USP30 の特異性を決定することを明らかにした。さらに、変異体 USP30 を用いてミトコンドリア膜上の Ub 鎖への活性を質量分析計により測定した結果、膜状の Ub 鎖に対しても先端側 Ub と近傍側 Ub の認識がどちらも必要であることが確かめられた。この結果をまとめ、現在論文に投稿中である。

<引用文献>

Sato Y., et al., "Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity", *Nat Struct Mol Biol*, 22, 222-229, 2015

Toma A., et al., "Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20", *PLOS ONE*, 10, e0120887, 2015

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10件)

Chen J, Yamagata A, Kubota K, Sato Y, Goto-Ito S, Fukai S, "Crystal structure of Sec10,

a subunit of the exocyst complex", *Sci Rep*, 7, 40909, 2016 (査読有) DOI: 10.1038/srep40909.

Kimura S, Yamashita M, Yamakami-Kimura M, Sato Y, Yamagata A, Kobashigawa Y, Inagaki F, Amada T, Hase K, Iwanaga T, Ohno H, Fukai S, "Distinct Roles for the N- and C-terminal Regions of M-Sec in Plasma Membrane Deformation during Tunneling Nanotube Formation", *Sci Rep*, 6, 33548, 2016 (査読有) DOI: 10.1038/srep33548.

Sato Y, Goto E, Shibata Y, Kubota Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Inoue J, Takekawa M, Tokunaga F, Fukai S, "Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity", *Nat Struct Mol Biol*, 22, 222-229, 2015 (査読有) DOI: 10.1038/nsmb.2970

Toma A, Takahashi TS, Sato Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Nakada S, Fukuto A, Horikoshi Y, Tashiro S, Fukai S, "Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20", *PLOS ONE*, 10, e0120887, 2015 (査読有) DOI: 10.1371/journal.pone.0120887

Yamagata A, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shiroshima T, Yoshida T, Fukai S, "Structure of Slitrk2-PTP δ complex reveals mechanisms for splicing-dependent trans-synaptic adhesion", *Sci Rep*, 5, 9686, 2015 (査読有) DOI: 10.1038/srep09686

Yamagata A, Yoshida T, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shiroshima T, Iwasawa-Okamoto S, Mori H, Fukai S, "Mechanisms of splicing-dependent trans-synaptic adhesion by PTP δ -IL1RAPL1/IL1RAcP for synaptic differentiation", *Nat Commun*, 6, 6926, 2015 (査読有) DOI: 10.1038/ncomms7926

Han C, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T., Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sato Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. "Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection", *Retrovirology*, 11, 38-52, 2014 (査読有) DOI: 10.1186/1742-4690-11-38

Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A, "Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection", *Sci Rep*, 3, 3097, 2013 (査読有) DOI:10.1038/srep03097.

Sato Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Miyamoto R, Nakada S, Fukai S, "Molecular basis of Lys-63-linked polyubiquitination inhibition by the interaction between human deubiquitinating enzyme OTUB1 and ubiquitin-conjugating enzyme UBC13", *J Biol Chem*, 287 (31), 25860-25868, 2012 (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M112.364752

Kubota K, Yamagata A, Sato Y, Goto-Ito S, Fukai S, "Get1 stabilizes an open dimer conformation of get3 ATPase by binding two distinct interfaces", *J Mol Biol*, 422 (3), 366-375, 2012 (査読有) DOI: 10.1016/j.jmb.2012.05.045

〔学会発表〕(計 3 件)

佐藤裕介, "CYLD による Lys63 鎖および Met1 鎖特異的切断機構の構造的基盤", 日本薬学会、熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月

佐藤裕介, "Structural basis for specific cleavage of Met1- and Lys63-linked polyubiquitin chains by the USP domain of CYLD", International Conference on Structural Genomics 2013、京王プラザホテル札幌(北海道・札幌市)、2013 年 7 月

佐藤裕介, "Structural basis for recognition of ubiquitin by UMI domain of RNF168", THE UBIQUITIN FAMILY、Cold Spring Harbor Laboratory (New York・USA)、2013 年 5 月

〔図書〕(計 2 件)

Sato Y, "Regulation of NF- κ B Pathway by Linkage Specific Ubiquitin-Binding Domains", Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, Springer, 143-155, 2015

佐藤裕介、深井周也 「ポリユビキチン鎖選択的結合による細胞機能制御」(2012) 生化学、第 84 巻、第 9 号、776-780

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤裕介 (SATO, Yusuke)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50568061

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()