

脱ユビキチン化酵素 AMSH-LP と K63 結合型 ユビキチン二量体との複合体の結晶構造解析

佐藤裕介^{1,2}, 吉川梓^{1,2}, 山形敦史¹, 三村久敏¹, 山下雅美^{1,3}

大方香代子², 濡木理², 岩井一宏⁴, 駒田雅之², 深井周也^{1,3}

(¹東大・放射光, ²東工大・生命理工, ³東大・メディカルゲノム, ⁴阪大・医学)

ユビキチン (Ub) 鎖の付加と脱離は様々な生命現象において重要な役割を担っている。K63 結合型ポリ Ub 鎖はエンドサイトーシスによって取り込まれた受容体のリソソームへの選別輸送シグナルとして働く。亜鉛依存性の脱ユビキチン化酵素 (DUB) である AMSH と AMSH-LP は、受容体から K63 結合型ポリユビキチン鎖を選択的に切断して除去し、受容体の細胞膜へのリサイクルを促進する。本研究ではヒト由来の AMSH-LP と K63 結合型ジユビキチン (K63-Ub₂) 複合体の結晶構造解析、さらに変異体を用いた切断活性の速度論的解析を行うことで、AMSH ファミリーによる K63 結合型ポリ Ub 鎖の認識、および切断活性の機構を明らかにした。

今回我々は、K63-Ub₂ に対する結合能は有したまま完全に活性を失った AMSH-LP E292A 変異体と、K63-Ub₂ 複合体の X 線結晶構造解析により、1.6 Å 分解能で結晶構造の決定に成功した。以降、K63-Ub₂ の二つの Ub のうち、ポリ Ub 鎖を形成したとき基質により近いほうの Ub を基部の Ub、基質からより遠い Ub を先端部の Ub と記述する。AMSH-LP のコア領域はどちらの Ub とも相互作用していたが、AMSH ファミリーに特有の 2 つの挿入領域のうち Ins-1 は主に先端部の Ub と、Ins-2 は主に基部の Ub と相互作用していた。また、最もよく研究された亜鉛プロテアーゼであるサーモリシンの反応中間体の結晶構造と比較したところ、1 次配列上は相同性が無いにも関わらず、亜鉛とその配位子、切断を受ける共有結合の配置がよく一致した。このことから、AMSH による脱 Ub 化反応はサーモリシンと同様、亜鉛によって活性化を受けた水分子がグリシンの炭素原子に対する求核攻撃を行うというメカニズムであることが示唆された。

続いて、AMSH-LP・K63-Ub₂ 複合体の結晶構造からポリ Ub 鎖との相互作用や DUB 活性に重要であると考えられる AMSH-LP の残基を一つ一つアラニンに置換した点変異体を用いて、AMSH-LP 変異体による K63-Ub₂ 切断活性の速度論的解析を行った。その結果、先端部の Ub との相互作用がポリ Ub 鎖との結合に重要である一方、基部の Ub との相互作用はポリ Ub 鎖との結合よりも、その DUB 活性自体に関わってくるということが明らかとなった。また、Ins-2 の構造を保持するのに重要であると考えられる Cys402 をセリンに置換した点変異体は、K63-Ub₂ に対する活性の k_{cat} が野生型と比べて 400 倍程度減少したのに対し、Lys48 結合型ポリ Ub 鎖に対する切断活性は野生型よりも上昇した。このことから、Ins-2 は基部の Ub との相互作用に関わってくる領域なので基部の Ub との相互作用によってポリ Ub 鎖の識別を行うということが明らかとなった。