

蛋白質の選別輸送に関わる Hrs-UIM の二つのユビキチン結合部位

平野聡¹, 川崎政人¹, 宇良秀明¹, 加藤龍一¹, Harald Stenmark², 若槻壮市¹

¹ 高エネ研・物構研・構造生物学研究センター

² オスロ大学・ノルウェーラジウム病院研究所・生化学部門

Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in protein sorting

Satoshi Hirano¹, Masato Kawasaki¹, Hideaki Ura¹, Ryuichi Kato¹, Harald Stenmark² & Soichi Wakatsuki¹

¹Structural Biology Research Center, Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization, ²Department of Biochemistry, Faculty Division of the Norwegian Radium Hospital, the University of Oslo

1. 生体内における様々な標識としてのユビキチン

ユビキチン (ubiquitin) は 76 残基よりなる小さな蛋白質で、名前が示すとおり、酵母から哺乳類にいたる、あらゆる真核生物のあらゆる生体組織に遍在している。ユビキチンは自身のカルボキシル末端 (COOH) が、標的蛋白質のリジン残基にイソペプチド結合することで標的蛋白質を修飾する。同時に、ユビキチン間でも共有結合を繰り返して、ユビキチンが数多く繋がったポリユビキチン鎖を形成する (ポリユビキチン化, polyubiquitination)。ユビキチンの 48 番目の残基であるリジンを介したポリユビキチン化はプロテアソームが関わる分解標識として知られ、このようなポリユビキチンが付加した蛋白質は、プロテアソームに送られ分解される。これ以外にもユビキチンは様々な生体標識として使われ、たとえば 63 番目のリジンを介したポリユビキチン化は DNA 修復やシグナル伝達に関わっていることが知られている。また最近、ポリユビキチンではなく、ユビキチン 1 分子の付加 (モノユビキチン化, monoubiquitination), あるいは標的分子の複数の部位のモノユビキチン化 (マルチ-モノユビキチン化, multi-monoubiquitination) がエンドサイトーシス過程の細胞内輸送に関わることが知られてきた [1]。

2. エンドサイトーシス過程におけるモノユビキチン化蛋白質の選別

エンドサイトーシス過程において、栄養物受容体は一度細胞内に取り込まれたあと細胞膜表面に再び戻されリサイクルされるが、成長因子受容体は細胞内に取り込まれるとリソソームに送られ分解される。この過程では、成長因子受容体は (マルチ-)モノユビキチン化しており、これが選別の標識となっている (Fig. 1)[2]。モノユビキチン化蛋白質は、Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) などからなる選別複合体によって取り込まれた後、ESCRT I, ESCRT II, ESCRT III といった蛋白質複合体の作用により MVB (multivesicular body) に送られ、最終的にはリソソームに送られる (Fig. 1)。

この選別過程で最も重要な役割を果たしている蛋白質の一つが Hrs である。Hrs は UIM (Ubiquitin interacting motif) と呼ばれる 20 残基ほどの領域をもち、この領域がユビキチンと相互作用することがモノユビキチン化蛋白質の正常な選別に必要であることが知られている [3]。Hrs-UIM とユビキチンとの相互作用は一連の選別過程の最初の段階にあたり、この相互作用機構を明らかにすることがモノユビキチン化蛋白質の選別機構の理解のために重要である。高エネ研・物構研・構造生物学研究センターの若槻壮市教授のグループは、ノルウェーラジウム病院研究所の Harald Stenmark 教授のグループとの共同研究で、Hrs-UIM とユビキチンの複合体の結晶構造解析に成功した [4]。本稿では、引用文献 [4] では述べられることの無かった結晶が得られるまでの経緯などを紹介し、Hrs-UIM とユビキチンのユニークな相互作用形式について紹介する。

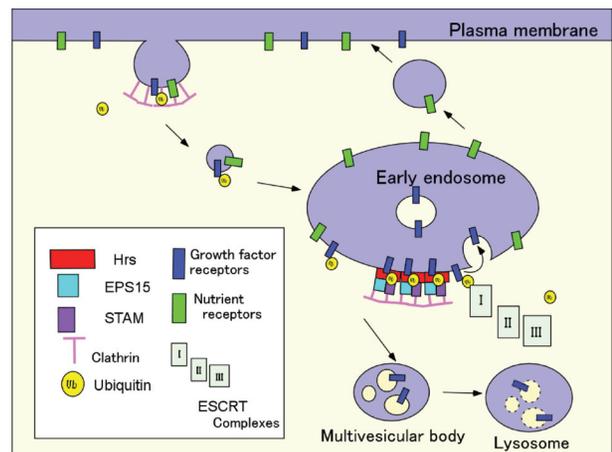


Figure 1

Degradative protein sorting on early endosome. Monoubiquitinated growth-factor receptors are internalized and sent to early endosome by endocytosis. A sorting complex, which consists of Hrs, STAM and Eps15, recognizes the ubiquitin and sorts the ubiquitinated receptors. The sorted receptors are sent to lysosome through multivesicular body, and then degraded.

チンと相互作用することがモノユビキチン化蛋白質の正常な選別に必要であることが知られている [3]。Hrs-UIM とユビキチンとの相互作用は一連の選別過程の最初の段階にあたり、この相互作用機構を明らかにすることがモノユビキチン化蛋白質の選別機構の理解のために重要である。高エネ研・物構研・構造生物学研究センターの若槻壮市教授のグループは、ノルウェーラジウム病院研究所の Harald Stenmark 教授のグループとの共同研究で、Hrs-UIM とユビキチンの複合体の結晶構造解析に成功した [4]。本稿では、引用文献 [4] では述べられることの無かった結晶が得られるまでの経緯などを紹介し、Hrs-UIM とユビキチンのユニークな相互作用形式について紹介する。

3. Hrs-UIM/ユビキチン複合体の結晶化

結晶化サンプルとして、市販のユビキチン (Sigma-Aldrich 社, 純度 90% 以上) と Hrs-UIM の合成ペプチド (Hrs のアミノ酸配列で 257-277 残基に相当: LQEEEEELQLALALSQSEAEK, 東レリサーチセンター社, 純度 95% 以上) を更なる精製を行なうことなしに用いた。



Figure 2
Crystals of the complex of Hrs-UIM-Ubiquitin. *Left panel:* the first crystals were found in the plate which had been left for 5 months after mixing. *Center panel:* the crystal from which we could collect the first data set. *Right panel:* the crystal used for the final structural analysis. A black bar in the left panel indicates 0.1mm.

Hrs-UIM とユビキチンの複合体の結晶化の検索は、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。蛋白質溶液 (Hrs-UIM 7.1 mM, ユビキチン 2.3 mM) と市販の結晶化キットの沈殿剤を混合しドロップを作成した後、結晶化プレートに 20℃で静置し観察を続けた。結晶が現れるのには時間がかかり、混合から 5 ヶ月後に、Fig. 2 (left panel) のような蛋白質の結晶を発見した。この条件を元に結晶化条件の最適化を行ったところ Fig. 2 (center panel) のような結晶を得ることができ、結晶構造解析を行うことが可能になっ

た。この結晶化の沈殿剤濃度 (58% PEG600, 0.145M CHES pH9.5) は、検索時に用いた沈殿剤濃度 (40% PEG 600, 0.1 M CHES pH 9.5) よりも 45% も高く、長期間の静置により母液とドロップの蒸発が進んだことが、結晶を得る原因になったと思われる。更に条件検討を重ね、最終的に 64% PEG 400, 0.145 M CHES pH 9.5 の沈殿剤条件で Fig.2 (right panel) のような、回折実験に十分な大きさの結晶を得ることができるようになった。

4. 回折データ収集と構造決定

X線回折データの収集は高エネ研 (KEK) 放射光科学研究施設 (PF) の BL-6A, AR-NW12A を用いて行なった。当初得られた Hrs-UIM とユビキチンの複合体結晶は Fig. 2 (center panel) のように非常に薄いため歪みやすく、質のよい回折データを得ることは困難であった。しかし、結晶化条件を検討し、最終的に Fig. 2 (right panel) のような比較的厚い結晶が得られるようになり、これらの結晶から良い回折データが得られる結晶を探した結果、最終的に PF AR-NW12A で分解能 1.7Å, R-merge 5.1%, completeness 99.9%, mosaicity 0.478° と質のよい回折データを得ること

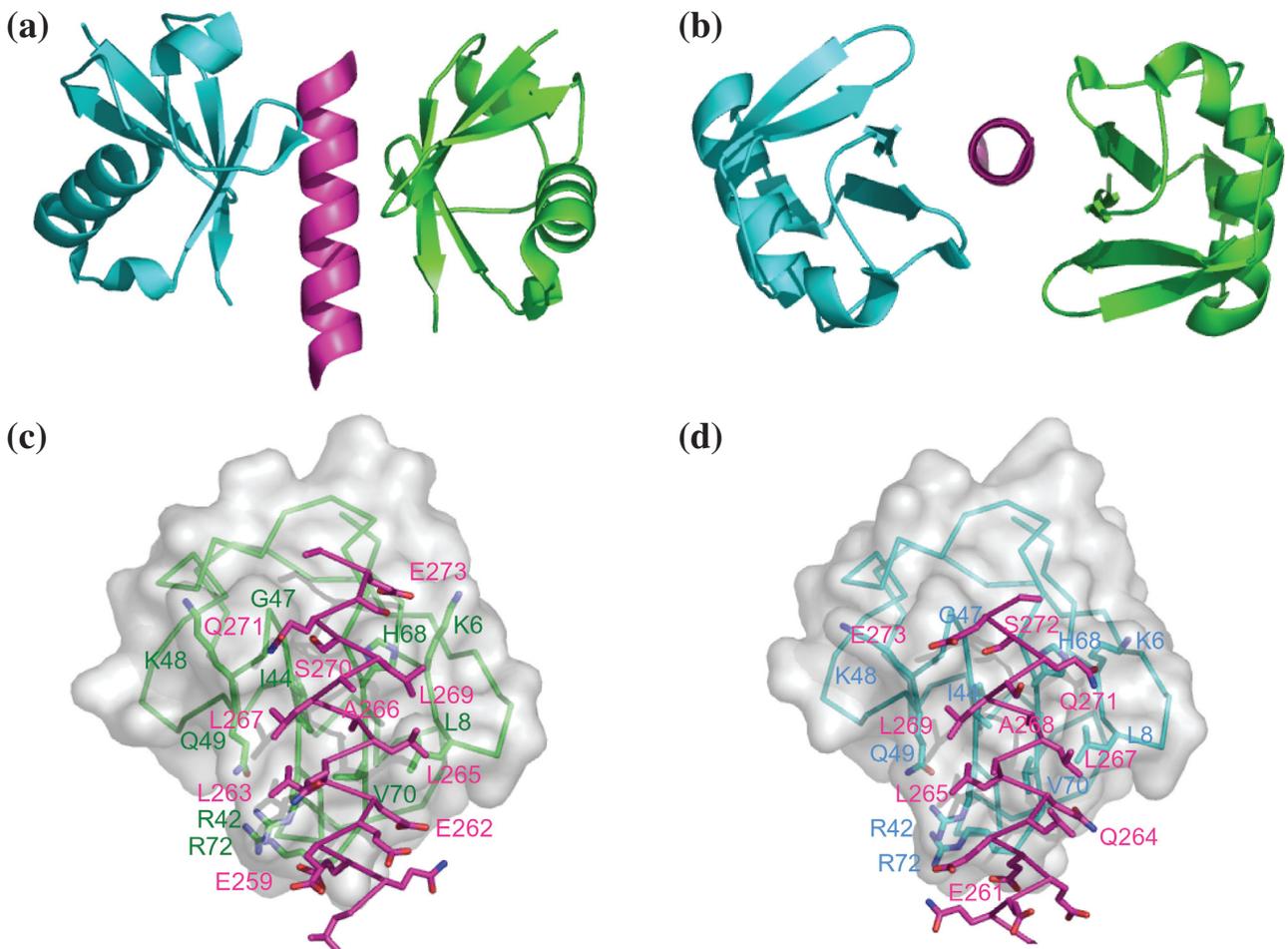


Figure 3
Structure of the Hrs-UIM-ubiquitin complex. (a,b) Overall structure of the complex between Hrs-UIM and two ubiquitin molecules. *Green*, ubiquitin molecule A; *sky blue*, molecule B; *pink*, UIM. Shown are side view (a) and top view (b). (c,d) Sites of interactions between Hrs-UIM and ubiquitin molecules A (c) and B (d). Residues involved in binding of ubiquitin molecules to Hrs-UIM are indicated. Coloring is as in (a) and (b). *Red* and *blue* indicate oxygen and nitrogen atoms, respectively.

が出来た。

ユビキチンの単体の結晶構造は、すでに明らかにされており、ユビキチン (76 残基) は Hrs-UIM (21 残基) よりも十分大きいので、位相の決定はユビキチン (PDB entry 1UBQ) をサーチモデルとした分子置換法で行い、非対称単位中に 2 分子のユビキチン分子を見出した。分子動力学を利用した構造精密化を行い、電子密度を確認したところ、ユビキチンに相当する電子密度以外に Hrs-UIM に相当する電子密度があることを確認した。そこで Hrs-UIM 分子の初期構造を、モデル構築プログラムを用いて作成し、その後手動のモデルの修正、構造精密化を行うことで最終的なモデルを得た。精密化後の結晶学的 R-work 値は 19.7%、R-free は 22.7% であった。

5. Hrs-UIM とユビキチンの複合体構造

結晶の非対称単位中には、2 分子のユビキチンと 1 分子の Hrs-UIM が含まれていた。ユビキチンと Hrs-UIM の複合体の全体構造を Fig. 3a, b に示す。Hrs-UIM は 1 本の α ヘリックス構造をとっており、UIM を挟み込むように 2 つのユビキチンが結合している。2 つのユビキチン分子は、UIM の α ヘリックスを "擬似のらせん軸" として関係付けられている。すなわち、Fig. 3a, b 中の緑色のユビキチン分子 (ユビキチン A) は UIM のヘリックスを軸として 208° 回転させ、2.8 Å 平行移動させることで水色のユビキチン分子に重ね合わせることができる。これまでにも Hrs 以外の UIM の幾つかで、ユビキチン (あるいはユビキチン様ドメイン UbL) との複合体構造が報告されてきたが [5,6], それらの結合は 1 対 1 の結合であり、今回のような 1 つの UIM に対し 2 つのユビキチンが結合している例は報告されていなかった。

Hrs-UIM とユビキチンの二つの結合面を Fig. 3c, d に示す。ユビキチン A, ユビキチン B とともに 44 番目のイソロイシン (I44) 70 番目のバリン (V70), 8 番目のロイシン (L8) を中心とした "I44 surface" と呼ばれる疎水性領域を用いて Hrs-UIM と結合しており、これまで報告されている UIM に対するユビキチンの結合面と同じであった [5,6]。また、結合面のみならず結合様式についても、これまで報告されているユビキチンのものと同様であった。ユビキチン A, B とともに、ユビキチンの I44 surface は、Hrs-UIM のアラニン残基 (ユビキチン A とは A266, ユビキチン B とは A268) 及びロイシン残基 (L265, L267, L269) などで形成される疎水性領域と相互作用していた。また両方のユビキチンの 47 番目のグリシン残基の (G47) 主鎖の NH 基は、Hrs-UIM のセリン残基 (ユビキチン A とは S270, ユビキチン B とは S272) の側鎖と水素結合しており、ユビキチンの 42 番目のアルギニン残基 (R42) の側鎖は UIM のグルタミン酸残基 (ユビキチン A とは E259, ユビキチン B とは E261) の側鎖と静電的相互作用していた。また、Hrs-UIM の残基のうち L265, L267, L269, Q271, E273 らの残基は両方のユビキチン分子と相互作用していた。

6. 変異体を用いた結合実験

結晶中で確認された Hrs-UIM の二つの結合部位を確かめるために、表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサー (Biacore 2000, Biacore 社) を用いた結合実験を行った。Hrs-UIM の A266 と A268 は、それぞれ、ユビキチン A とユビキチン B の相互作用面に埋もれている (Fig. 3c,d)。これらのアラニン残基の周辺の空間が狭いことが結晶構造解析により明らかであったので、それぞれのアラニン残基をより大きな親水性の残基に置換することで、それぞれの結合部位の結合能力が失われることが期待された。そこで、それぞれのアラニンをグルタミンに置換した変異体と (A266Q と A268Q), 両方のアラニンをグルタミンに置換した変異体 (A266Q A268Q) を作成した。結合実験の結果を Fig. 4 に示す。野生型の Hrs-UIM のユビキチンに対する解離定数 (K_d) はおよそ 190 μM と、これまで報告されている Hrs-UIM の解離定数 (230-300 μM) とほぼ同じであった [3,7]。野生型と比べると両方のアラニンをグルタミンに置換した変異体はユビキチンに対する結合が非常に弱く、今回の実験では結合は確認されなかった。これに対して、2 つのアラニンのうち 1 つをグルタミンに置換した変異体は、野生型よりも解離定数はやや大きいものの (~ 500 μM) 有意な結合が確認できた。また、これら変異体の RU_{max} (センサーチップ上の Hrs-UIM に結合しうるユビキチンの最大の値) は野生型のほぼ半分程度であった。A266Q や A268Q の変異体の RU_{max} が野生型の半分であるということは、これら変異体は野生型と比較して半分の数ユビキチンしか結合することが出来ないことを示す。これら結合実験の結果は、Hrs-UIM が 2 つのユビキチン結合部位を持つという結晶構造の結果を強く支持している。

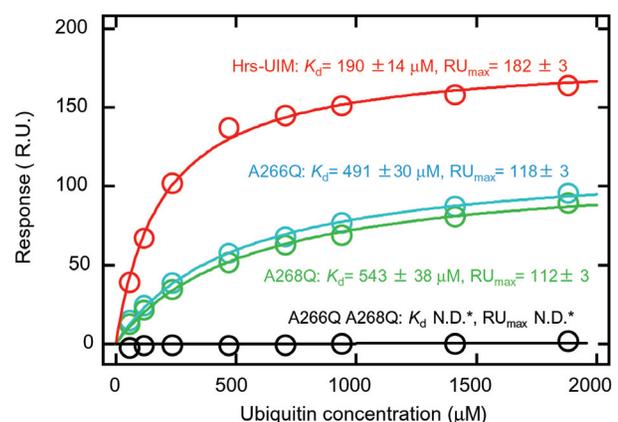


Figure 4

Surface plasmon resonance biosensor assay of the Hrs-UIM/ubiquitin interaction. For each experiment, GST-fused Hrs-UIM was immobilized on an anti-GST antibody-coated surface, over which ubiquitin was injected as analyte at the indicated concentrations. Circles and curves in red, sky blue, green and black indicate wild type Hrs-UIM, A266Q, A268Q and A266Q A268Q mutants, respectively. Estimated binding affinities and saturated values of the response change are given. N.D.: Not detected.

7. 2つのユビキチン結合部位を生み出す Hrs-UIM の繰り返し配列

このような2つのユビキチン結合部位を持つためには、Hrs-UIM の特徴的なアミノ酸配列が重要な役割を果たしているのではないかと考えた。Hrs-UIM の配列とユビキチンとの結合に関わる残基を Fig. 5 に示す。この図の上段の緑色で示した部分は1つ目のユビキチン認識に関わる領域であり、下段の水色で示した部分が2つ目のユビキチン認識に関わる領域である。結合に重要な残基を網付きで表した。水色の配列は、緑色の配列から2残基分後ろの位置にある。アミノ酸間の類似性を考慮に入れて青色と緑色の配列を比べると、これら2つの配列がほぼ同じであることがわかる。 α ヘリックス上において、残基2つのずれは、 200° の回転と 3.0 \AA の平行移動に相当する。この値は先に述べたユビキチンAとBがUIMヘリックスに対して 208° の回転と 2.8 \AA の平行移動で関係付けられることと良く対応する。つまり、Hrs-UIMの配列上では、2残基ずれた位置関係で2つの結合モチーフがあるために、ヘリックスを挟んで2つ結合部位ができ、これによりHrs-UIMが2つのユビキチン分子を結合することを可能にしている。Hrs-UIMのような繰り返し配列は、すべてのUIMについて当てはまるわけではない。これまで提唱されてきた通常のUIMのモチーフはe-e-x-x- ϕ -x-x-A- ϕ -x-e/ ϕ -S-z-x-e (e 負電荷を持つ残基, ϕ 疎水性残基, z かさ高い疎水性残基あるいは極性残基, x 任意の残基)であり[5], Fig. 5の緑色に相当するモチーフは持つが[5,8], 水色に相当する2つ目のモチーフを持たない。このような通常のUIMを片面結合型UIMと呼ぶとすればHrs-UIMのような配列をもつUIMは両面結合型UIMといえる。構造解析の結果などを元に、我々はUIMの新しいサブクラスとして両面結合型UIM (double-sided UIM)を提唱し、そのモチーフ:e-x-e-x- ϕ -x- ϕ -A- ϕ -A-z-S-z/S/A-eを提案した。

8. なぜ Hrs-UIM は 2 つのユビキチン結合部位を持つのか

本研究で見出したHrs-UIMの2つのユビキチン結合部位が、実際にモノユビキチン化蛋白質の効率的な選別に必要であることは *in vivo* の実験で確かめられた[4]。しかし、Hrs-UIMの2つのユビキチン結合部位が生体内でどのように使われているのかについては、まだ明らかにさ



Figure 5
Repeating sequence of Hrs-UIM. Middle line shows the sequence of Hrs-UIM; top and bottom lines show motifs binding ubiquitin molecule A (green) and molecule B (sky blue). Shaded letters indicate important residues for each binding site in particular. Italic letters indicate residues not observed in the electron density map. The two motifs are shifted by two residues relative to each other.

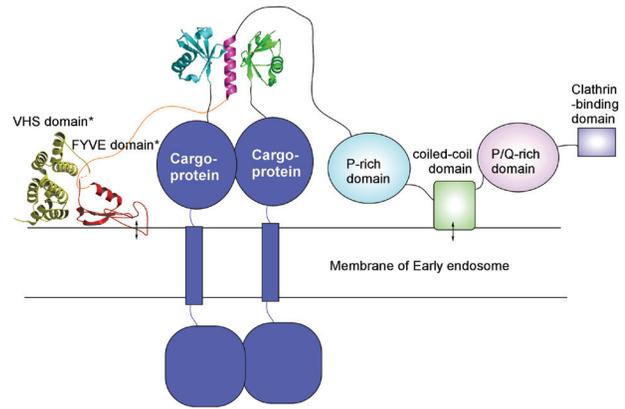


Figure 6
A possible model of the interaction between ubiquitinated cargo proteins and Hrs. Ubiquitinated proteins are normally monoubiquitinated at more than two sites (multi-monoubiquitinated). The two ubiquitin molecules linked to the same cargo bind to Hrs-UIM at the same time, resulting in a stronger affinity of Hrs to multi-monoubiquitinated cargo. (*) Crystal structure of VHS-FYVE [9]

れていない。ただし、UIMとユビキチンの相互作用は他のユビキチン結合ドメインと同様に解離定数で数百 μM と非常に弱いため、1:1の結合だけではHrsによる選別が効率よく行なうには不十分であることが指摘されている[2]。またHrs-UIMが認識する対象蛋白質はマルチ-モノユビキチン化されて多くのユビキチンを持つことから[2], Hrs-UIMが同時に2つのユビキチンと相互作用することにより (Fig. 6), 対象分子との相互作用を増して選別を行いやすくしているのではと考えられる。

効率的に蛋白質を選別するためには、選別を担う蛋白質は効率的に対象蛋白質と結合する必要があると同時に、次の選別過程に送るため選別対象蛋白質と効率的に解離しなければならない。Hrsなどのユビキチン化蛋白質選別蛋白質は、弱い結合部位を複数持つことで強い結合を獲得し、条件に応じて弱い結合と強い結合を使い分けているのではないかと考えている。最近、ユビキチン結合蛋白質 (ユビキチン結合ドメイン) が複数のユビキチン認識部位を持つという報告が相次ぎ、注目を集めている[10,11,12]。これら複数のユビキチン認識部位の生物学的意味について今後の研究の進展が期待される。

謝辞

本研究をサポートする、*in vivo*の実験はノルウェーラジウム病院研究所のCamilla Raiborg博士に行なっていた。ここに深く感謝いたします。また本研究の一部はタンパク3000プロジェクトの研究助成により進められた。

引用文献

[1] Hicke, L. A new ticket for entry into budding vesicles—ubiquitin. *Cell* **106**, 527-530 (2001).
[2] Raiborg, C., Rusten, T.E., Stenmark, H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 446-455 (2003).

- [3] Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E. & Stenmark, H. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* **4**, 394-398 (2002).
- [4] Hirano, S., Kawasaki, M., Ura, H., Kato, R., Raiborg, C., Stenmark, H., Wakatsuki, S. Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nat Struct Mol.* **13**, 272-277 (2006).
- [5] Swanson, K.A., Kang, R.S., Stamenova, S.D., Hicke, L., Radhakrishnan, I. Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J.* **22**, 4597-4606 (2003).
- [6] Fujiwara, K., Tenno, T., Sugasawa, K., Jee, J.G., Ohki, I., Kojima, C., Tochio, H., Hiroaki, H., Hanaoka, F. & Shirakawa, M. Structure of the ubiquitin-interacting motif of S5a bound to the ubiquitin-like domain of HR23B. *J. Biol. Chem.* **279**, 4760-4767 (2004).
- [7] Fisher, R.D., Wang, B., Alam, S.L., Higginson, D.S., Robinson, H., Sundquist, W.I. & Hill, C.P. Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J. Biol. Chem.* **278**, 28976-28984 (2003).
- [8] Hofmann, K. & Falquet, L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends. Biochem. Sci.* **26**, 347-350 (2001).
- [9] Mao, Y., Nickitenko, A., Duan, X., Lloyd, T.E., Wu, M.N., Bellen, H., Quijcho, F.A. Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* **100**, 447-456(2000).
- [10] Kawasaki, M., Shiba, T., Shiba, Y., Yamaguchi, Y., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Kato, K., Nakayama, K., Wakatsuki, S.. Molecular mechanism of ubiquitin recognition by GGA3 GAT domain. *Genes Cells.* **10**, 639-654 (2005).
- [11] Akutsu, M., Kawasaki, M., Katoh, Y., Shiba, T., Yamaguchi, Y., Kato, R., Kato, K., Nakayama, K., Wakatsuki, S. Structural basis for recognition of ubiquitinated cargo by Tom1-GAT domain. *FEBS Lett.* **579**, 5385-5391 (2005).
- [12] Lee, S., Tsai, Y.C., Mattered, R., Smith, W.J., Kostelansky, M.S., Weissman, A.M., Bonifacino, J.S., Hurley, J.H. Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nat Struct Mol.* **13**, 264-271 (2006).

(原稿受付：2006年3月24日)

著者紹介

平野 聡 (Satoshi HIRANO)



〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
TEL: 029-864-5200 (内線) 3241
FAX: 029-879-6179
e-mail: satoshi.hirano@kek.jp
高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・博士研究員(産学連携)
略歴:平成10年大阪大学理学部卒業,
平成12年奈良先端科学技術大学院

大学物質創成科学研究科博士前期課程修了,平成15年同博士後期課程修了,平成15年4月より現職。博士(理学)。
最近の研究:細胞内輸送に関わる蛋白質の構造解析。

川崎政人 (Masato KAWASAKI)

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・助手, 博士(理学)。

宇良秀明 (Hideaki URA)

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・博士研究員(産学連携), 博士(理学)。

加藤龍一 (Ryuichi KATO)

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・助教授, 理学博士。

Harald Stenmark

ノルウェーラジウム病院研究所・教授, Ph.D.

若槻壮市 (Soichi WAKATSUKI)

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-879-6178

FAX: 029-879-6179

e-mail: soichi.wakatsuki@kek.jp

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・教授, Ph.D.