

最近の研究から

ユビキチン鎖伸長の構造的基盤

坂田絵理¹, 佐藤匡史², 山口芳樹², 若槻壮市³, 加藤晃一⁴

¹ マックス-プランク生化学研究所, 分子構造生物学分野,

² 理化学研究所, 基幹研究所, 糖鎖構造生物学研究チーム,

³ 高エネルギー加速器研究機構, 物質構造科学研究所, フォトンファクトリー,

⁴ 自然科学研究機構, 岡崎統合バイオサイエンスセンター

Structural insights into the formation of polyubiquitin chain

Eri SAKATA¹, Tadashi SATOH², Yoshiki YAMAGUCHI², Soichi WAKATSUKI³, Koichi KATO⁴

¹Department of Molecular Structural Biology, Max-Planck-Institute of Biochemistry,

²Structural Glycobiology Team, RIKEN Advanced Science Institute,

³Institute of Materials Structure Science, Photon Factory, KEK

⁴Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences.

1. はじめに

ユビキチンは76残基のアミノ酸からなる分子量約8,500のタンパク質であり, すべての真核生物においてほぼ共通のアミノ酸配列を有している。本タンパク質は他のタンパク質の修飾分子として働き, そのC末端のGly残基を用いて基質のリシン残基とイソペプチド結合を形成する。さらにユビキチン分子同士もイソペプチド結合を介して連結しユビキチン鎖を形成する。こうして形成されたユビキチン鎖は細胞内において様々なシグナルとして機能していることが知られている [1]。例えば, 基質にユビキチンが1分子だけ結合したモノユビキチン修飾はエンドサイトーシス, 転写制御, DNA修復に関与する。一方, Lys48を介して形成されたポリユビキチン鎖は26Sプロテアソームによるタンパク質分解のシグナルに, またLys63を介したユビキチン鎖はDNA損傷応答の活性化, 転写制御, また免疫や炎症に関わるシグナル伝達などに用いられることが知られている。

ユビキチン化反応は, ユビキチン活性化酵素 (E1), ユビキチン結合酵素 (E2), ユビキチンリガーゼ (E3) の3種類の酵素によって触媒される。ユビキチンのC末端のカルボキシル基はE1によって活性化されたのち, E2の活性化システイン残基に転移され, E2~ユビキチンチオエステル結合中間体を形成する。その後ユビキチンは基質認識機能を有するE3の媒介により, E2から標的タンパク質のリシン残基に転移される。この一連のサイクルを繰り返すことによりポリユビキチン鎖が形成される。

ユビキチンのβシートの分子表面には, Leu8, Ile44とVal70からなる疎水性パッチが形成され, 多くのユビキチン結合タンパク質がこの分子表面を用いて相互作用することが明らかにされている [2]。ユビキチン分子間の連結様式の違いはユビキチン鎖のコンフォメーションに影響し, この疎水性パッチの露出も異なってくる。たとえば,

Lys48結合型ポリユビキチン鎖は, 疎水性パッチが分子間相互作用により分子内部に遮蔽されたコンパクトな構造を形成しているため, RAD23などのUBAドメインとの結合において有利となる [3,4]。一方, Lys63結合型のユビキチン鎖およびC末端がN末端にペプチド結合を介して連結した直鎖型のユビキチン鎖は, 疎水性パッチが分子表面に露出した伸びた構造を形成することからNEMOなどのユビキチン結合ドメインとの相互作用に適している [5]。このように, ユビキチン鎖の連結様式により相互作用の相手となる分子が異なることが示されている。

UbcH5bは細胞質に主に存在するE2であり, SCF (Skp1-Cullin-F-box) 複合体などのCullin型E3をはじめとしてBRCA1, E6APなど複数のE3と結合し基質をユビキチン化することが知られている。UbcH5bは約170残基の活性化システインを含む触媒ドメインのみから構成されている。これまでの研究により, 本酵素のホモログであるUbcH5cは活性化システインとは逆側の, いわゆる“backside”の分子表面を用いて非共有結合によりユビキチンと相互作用し, ユビキチン化反応を促進することが報告されていた [6]。一方, 筆者らはUbcH5bがユビキチン様タンパク質Nedd8とやはりbacksideの分子表面を用いて相互作用することを明らかにしてきた。そして, この相互作用によりCullin型E3であるSCF複合体が活性化されユビキチン鎖の伸長を促進することを報告した [7]。

筆者らはUbcH5bのNedd8による活性化機構について構造生物学的研究を展開していた過程で一つの疑問に直面した。E3を介したユビキチン転移反応は, E2, E2に結合したユビキチン分子, 受容体である基質もしくはユビキチン分子, およびE3の4者が適切な複合体を形成することで起こる。その一方で, E3とE2との複合体の立体構造解析は, E2の活性化システインから基質まで約50Åの隔たりがあることが明らかにされている [8]。また, ユビキ

Table 1 Data collection and refinement statistics of UbcH5b~Ub and cyclic K48-linked Ub₄

	UbcH5b~Ub	Cyclic K48-linked Ub ₄
PDB ID	3A33	3ALB
Crystallographic data		
Space group	<i>P</i> 6 ₁ 22	<i>C</i> 222 ₁
Unit cell <i>a/b/c</i> (Å)	72.5/72.5/176.6	59.1/77.4/135.1
Data processing statistics		
Beam line	PF BL-5A	PF-AR NW12A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000
Resolution (Å)	50-2.20 (2.28-2.20)	50-1.85 (1.92-1.85)
Total/Unique reflections	177153/14779	189610/26663
Completeness (%)	99.6 (97.2)	99.8 (99.7)
<i>R</i> _{merge} (%)	7.0 (27.8)	8.3 (41.4)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	47.1 (4.6)	40.2 (4.6)
Refinement statistics		
Resolution (Å)	20-2.20	20.0-1.85
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	23.1/28.0	19.4/23.9
R.m.s. deviations from ideal		
Bond lengths (Å)	0.013	0.015
Bond angles (°)	1.46	1.56
Ramachandran plot (%)		
Favored	90.6	99.3
Allowed	8.9	0.7
Average <i>B</i> -factors (Å ²)		
Protein (E2/Ub or Ub1/Ub2/Ub3/Ub4)	36.5/33.9	26.4/28.1/25.7/26.2
Water	37.6	47.4

チン化サイトとなるリシン残基と E2 との距離は、ポリユビキチン鎖が伸長するに従って広がっていくものと予想される。遠ざかるユビキチン化サイトに対して E3 – E2 複合体はどのようにしてユビキチンを転移しているのだろうか？ユビキチン転移反応の構造的基盤を明らかにするため、本研究では UbcH5b ~ユビキチン連結体と Lys48 結合型のポリユビキチン鎖の結晶化を試みた [9,10]。

2. X線結晶構造解析により明らかになった UbcH5b ~ユビキチン連結体の 3次元構造

UbcH5b は活性化システインである Cys85 を用いて、ユビキチンの C 末端のカルボキシル基と UbcH5b ~ユビキチンチオエステル結合中間体を形成する。UbcH5b ~ユビキチン連結体は不安定な反応中間体であるため結晶化に適さないことから、Cys85 をセリン残基に 1 残基置換した UbcH5b (C85S) 変異体を用い、酵素反応によりユビキチンとエステル結合を介した連結体を作成した 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.1、2.0 M 塩化ナトリウムを結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法により作成した結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリーの BL-5A ビームライン ($\lambda = 1.0000$ Å) を用

いて、2.20 Å の分解能、7.0% の *R*_{merge} の精度で回折強度データの収集を行った (Table 1)。本結晶は、六方晶系で空間群 *P*6₁22 に属し、格子定数は *a* = *b* = 72.5, *c* = 176.6 Å であった。アポ型の UbcH5b およびユビキチンの結晶構造 (PDB コード: 2ESK (UbcH5b) および 1UBQ (ユビキチン)) を鋳型とした分子置換法により解析を行い、非対称単位中に 1 分子の UbcH5b ~ユビキチン連結体を見出した。分子モデルの構築は COOT を用い、構造精密化には REFMAC5 を使用した。

その結果、UbcH5b ~ユビキチン連結体の立体構造が 2.20 Å の分解能で明らかにすることができた (Fig. 1) [9]。UbcH5b は、N 末端側の α ヘリックスとそれに続く 4 本の β ストランド、さらに活性化システインを含むループ領域をはさんだ 4 本の α ヘリックスから形成されている。また、UbcH5b とユビキチンのエステル結合についても明確な電子密度像を得ることができた (Fig. 1)。

3. UbcH5b によるユビキチン転移反応と自己集合の構造的基盤

アポ型の UbcH5b およびユビキチンの構造と我々が決定した UbcH5b ~ユビキチン連結体の構造との間で各分

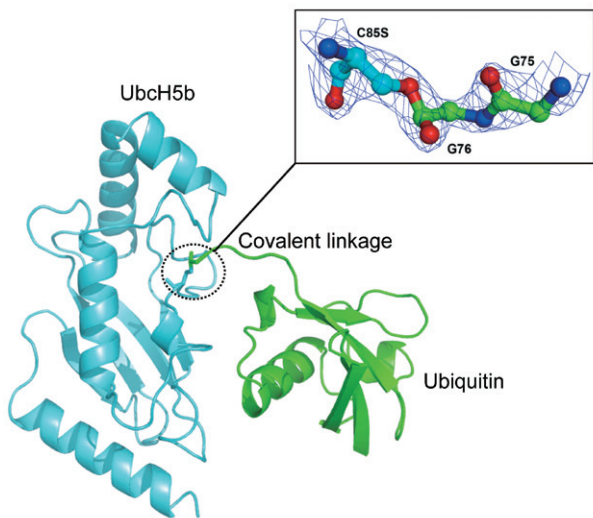


Figure 1
2.20-Å crystal structure of the UbcH5b~Ub conjugate, in which the density map of the ester linkage was clearly observed.

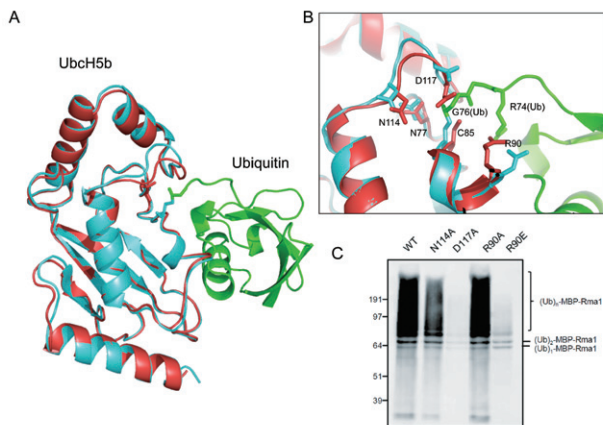


Figure 2
(A) Superposition of apo UbcH5b (red, PDB: 2ESK) and ubiquitin-conjugated UbcH5b (cyan). The loop containing Asn114 and Asp117, in close proximity to the catalytic residue, exhibits conformational change upon the ubiquitin-conjugation (B). (C) *In vitro* ubiquitination of MBP-Rma1 with UbcH5b mutants, with kind permission from Elsevier. Single mutations in this loop resulted in a significant defect in ubiquitination.

子の主鎖の根平均 2 乗変位 (r.m.s.d.) はそれぞれ 0.60 Å と 0.36 Å であった (Fig. 2A)。すなわち、ユビキチンと UbcH5b は、共有結合の形成に際して主鎖の大きなコンフォメーション変化を伴わないことが明らかとなった。ただし、UbcH5b の活性部位近傍に存在する Asn77 と Asp117 を含むループについてはユビキチンの連結に伴ってコンフォメーションの変化を生じていた (Fig. 2B)。ユビキチンの転移反応においては、受容体である基質のリシン残基の ε アミノ基が E2 とユビキチンを結ぶチオエステル結合のカルボニル炭素を求核攻撃し、4 面中間体を形成すると考えられている。この際、活性化システインの近傍に存在する Asn77 がユビキチンの C 末端 Gly76 とオキシアニオン中間体を形成し、4 面中間体の安定化に寄与するものと考えられている [11]。興味深いことに我々の結晶構造中では、Asn77 はユビキチン Gly76 と水素結合を形成していること

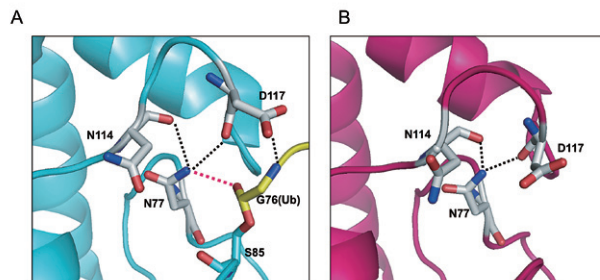


Figure 3
Molecular detail of apo UbcH5b (A) and UbcH5b~Ub conjugate (B). Dashed lines indicate potential hydrogen-bond interactions.

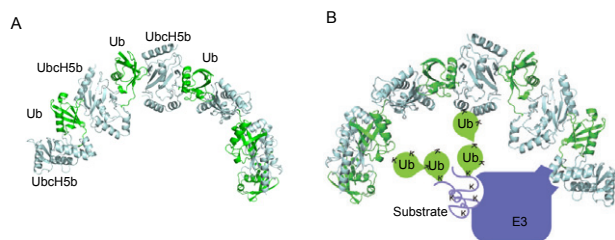


Figure 4
(A) Formation of the self-assembly complex of the UbcH5b~Ub conjugate. (B) Schematic model of the function of the self-assembled E2~Ub conjugates coupled with the E3.

が確認された (Fig. 3A and B)。Asn77 のみならず活性化システイン周辺に存在するアミノ酸残基の 1 残基置換はユビキチン化反応の触媒能を失っていた (Fig. 2C)。すなわち、我々の決定した構造はユビキチン転移反応の中間体を捉えたことになる。

一方、UbcH5b は活性部位とは逆側の分子表面にある α1-β1 ループ領域を用いて結晶中において隣接するユビキチンの Ile44 を含む疎水性パッチと相互作用していることが明らかとなった。NMR を用いた相互作用解析により水溶液中においてもこの相互作用が確認された。また、UbcH5c とユビキチンも同様の部位を用いて相互作用することがやはり NMR によって示されていた [6]。本研究により、活性部位を介してユビキチンと共有結合した UbcH5b は、ユビキチンと非共有結合性の分子間相互作用を介し、自己集合した多量体を形成し得ることが明らかとなった (Fig. 4)。こうして形成された超分子構造が E3 と基質の間の隔たりを埋め、ユビキチンの転移を促進していることを、立体構造情報に基づいて作成した複数の変異体を組み合わせて行った活性評価を通じて我々は実証している [9]。

4. Lys48 結合型環状ユビキチン 4 量体の 3 次元構造

連結されたユビキチンの立体構造は Pickart らが酵素反応的にユビキチン 2 量体を作成し、結晶化したことにより初めて明らかにされた [3]。その後、Pickart らのグループは 2 番目と 4 番目のユビキチンの Lys48 をチアリンおよびアルギニンに置換した人工型のユビキチン 4 量体の構造

を報告した [12]。しかしながら、2 番目と 3 番目のユビキチンを天然型の Lys48 ~ Gly76 イソペプチド結合を介して連結したユビキチン 4 量体の構造情報はこれまでに得られていなかった。そこで、我々は天然型の単量体ユビキチンのみを用い、試験管内におけるユビキチン化酵素反応によりユビキチン 4 量体鎖を調製し、結晶構造解析を行った。この反応には、E1 および E2-25 K の組み換えタンパク質を用いた。E2-25 K は分子内に UBA ドメインを有しており、E3 非依存的にポリユビキチン鎖を伸長する活性を持つユニークな E2 として知られている。酵素反応を行った後、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて連結数の異なるユビキチン鎖の分離を行った。ユビキチン 4 量体分画は 2 つのピークからなり、主要なピークは、SDS-PAGE において鎖状ユビキチン 4 量体と比較して、バンドが若干低分子量側にシフトしていた。以前の報告から、このようなバンドのシフトが環状化ユビキチン 3 量体、ユビキチン 4 量体について観測されていたことから、得られた主要な生成物は、環状化したユビキチン 4 量体であることが推測された。我々はこの主要生成物について結晶構造解析を行った。

20% ポリエチレングリコール 3,350, 0.2 M 硫酸アンモニウム, pH4.6 を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法により作成した結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリーの AR NW12A ビームライン ($\lambda = 1.0000 \text{ \AA}$) において、1.85 \AA の分解能、8.3% の R_{merge} の精度で収集した (Table 1)。本結晶は、斜方晶系で空間群 $C22_1$ に属し、格子定数は $a = 59.1$, $b = 77.4$, $c = 135.1 \text{ \AA}$ であった。アポ型のユビキチンの結晶構造 (PDB コード: 1UBQ) を鋳型とした分子置換法による解析の結果、非対称単位中に 1 分子のユビキチン 4 量体が存在していることが判明した。Table 1 に結晶学的データ、回折データおよび精密化の統計値を示した。

構造精密化の結果、全てのユビキチン分子の Lys48 が隣接するユビキチン分子の C 末端とイソペプチド結合を形成した環状型ユビキチン 4 量体であることが示された (Fig. 5A) [10]。これまでに報告されている Lys48 結合型のユビキチン 2 量体およびユビキチン 4 量体の結晶構造はそれぞれのユビキチンユニットの Ile44 を中心とする疎水性パッチを内部に遮蔽したコンパクトな構造を形成している [3]。環状型ユビキチン 4 量体は、非環状型のものと同様に 2 つのコンパクトなユビキチン 2 量体繋がった構造を形成しており、両者の主鎖の rmsd は 0.47 \AA であった。すなわち、環状化に伴う主鎖の大きなコンフォメーション変化は認められなかった。ところが詳細にみると、ユビキチン 2 量体ユニットを繋ぐ 2 番目と 3 番目のユビキチンを繋ぐイソペプチド結合を含む周辺のループ構造は、環状型と非環状型のもので大きく異なっていた (Fig. 5B)。ユビキチンとほとんどのユビキチン結合ドメインとの相互作用は、ユビキチンの Ile44 を中心とした疎水性パッチを介して達成される [13]。相互作用の際には Lys48 結合型のポリユビキチン鎖は、pH の変化などを引き金にして、コンパクトな構造

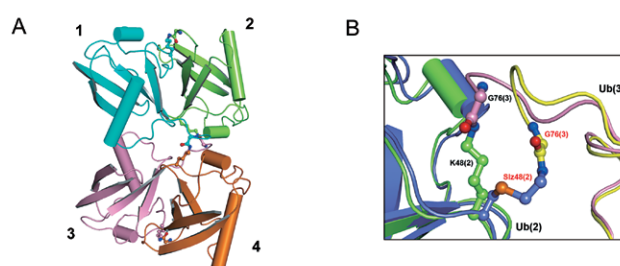


Figure 5

(A) 1.85- \AA crystal structure of cyclic tetraubiquitin, in which all Lys48 residues are conjugated to the C-terminal Gly76. (B) The superimposition of the engineered and cyclic tetraubiquitin. In the engineered tetraubiquitin, Lys48 of the second ubiquitin is substituted by thialysine (Slz). The conformation of the Lys48(2)-Gly76(3) native isopeptide bond is significantly different from that of the thialysine Slz48(2)-Gly76(3) linkage.

から疎水性パッチが分子表面に露出した伸びた構造へ転移することが示唆されている [4]。このように、我々が今回明らかにしたイソペプチド結合の自由度の高さは、Lys48 結合型のポリユビキチン鎖構造の活性型への転移に寄与していることが推測された [10]。

5. おわりに

筆者らの一連の研究は、どのようにユビキチン鎖が形成されるのかという疑問に対し構造生物学的手法により 1 つの答えを与えた。UbcH5b ~ ユビキチン連結体の結晶構造解析により、ユビキチンを連結した UbcH5b は、それとは反対側の分子表面を用いて隣接するユビキチンと非共有結合を介した相互作用を行っていることを明らかにした。この超分子構造の中で UbcH5b と連結するユビキチンは基質のリシン残基の ϵ アミノ基が求核攻撃を行うのに適した中間体構造を形成していた。このように、ユビキチンと連結した E2 はあたかも肩車を組むように多数集合して E3 上で複合体を形成しており、これによって、E3 が捕捉している標的上のリシン残基へのアクセスを可能にし、ユビキチンを効率的に転移しているという新しい反応モデルを明らかにした。また、環状ユビキチン 4 量体の結晶構造解析によりユビキチン間のイソペプチド結合が高い自由度を有することを明らかにした。こうした柔軟性はユビキチン鎖の伸長過程において E2 からのユビキチン分子の受容の効率化に寄与している可能性がある。ユビキチン鎖の伸長においては、E3 の構造の柔軟性がユビキチンの転移を円滑化しているという報告がある [14]。それに加えて我々の提示した E2 ~ ユビキチン連結体の非共有結合による自己集合体の形成、さらにはユビキチン鎖自身の柔軟性によって、遠ざかるアクセプター部位に対し効率的にユビキチンが転移されているものと考えられる。

謝辞

本研究における X 線回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリーの BL-5A および AR NW12A ビームラインを用いて行われたものです。

本研究は山本俊輔氏、矢木真穂博士、栗本英治博士、住吉晃氏（名古屋市立大学・大学院薬学研究科）との共同研究であり、文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金、ターゲットタンパク研究プログラムの支援を受けて実施されたものです。ここに謝意を表します。

引用文献

- [1] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425 (1998).
- [2] R. Varadan, M. Assfalg, A. Haririnia, S. Raasi, C. Pickart, D. Fushman, *J. Biol. Chem.* **279**, 7055 (2004).
- [3] W.J. Cook, L.C. Jeffrey, M. Carson, Z. Chen, C.M. Pickart, *J. Biol. Chem.* **267**, 16467 (1992).
- [4] R. Varadan, O. Walker, C. Pickart, D. Fushman, *J. Mol. Biol.* **324**, 637 (2002).
- [5] S. Rahighi, F. Ikeda, M. Kawasaki, M. Akutsu, N. Suzuki, R. Kato, T. Kensche, T. Uejima, S. Bloor, D. Komander, F. Randow, S. Wakatsuki, I. Dikic, *Cell* **136**, 1098 (2009).
- [6] P.S. Brzovic, A. Lissounov, D.E. Christensen, D.W. Hoyt, R.E. Klevit, *Mol. Cell* **21**, 873 (2006).
- [7] E. Sakata, Y. Yamaguchi, Y. Miyauchi, K. Iwai, T. Chiba, Y. Saeki, N. Matsuda, K. Tanaka, K. Kato, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 167 (2007).
- [8] N. Zheng, B.A. Schulman, L. Song, J.J. Miller, P.D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D.M. Koepp, S.J. Elledge, M. Pagano, R.C. Conaway, J.W. Conaway, J.W. Harper, N.P. Pavletich, *Nature* **416**, 703 (2002).
- [9] E. Sakata, T. Satoh, S. Yamamoto, Y. Yamaguchi, M. Yagi-Utsumi, E. Kurimoto, K. Tanaka, S. Wakatsuki, K. Kato, *Structure* **18**, 138 (2010).
- [10] T. Satoh, E. Sakata, S. Yamamoto, Y. Yamaguchi, A. Sumiyoshi, S. Wakatsuki, K. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 329 (2010).
- [11] P.Y. Wu, M. Hanlon, M. Eddins, C. Tsui, R.S. Rogers, J.P. Jensen, M.J. Matunis, A.M. Weissman, C. Wolberger, C.M. Pickart, *EMBO J.* **22**, 5241 (2003).
- [12] W.J. Cook, L.C. Jeffrey, E. Kasperik, C.M. Pickart, *J. Mol. Biol.* **236**, 601 (1994).
- [13] I. Dikic, S. Wakatsuki, K.J. Walters, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 659 (2009).
- [14] D.M. Duda, L.A. Borg, D.C. Scott, H.W. Hunt, M. Hammel, B.A. Schulman, *Cell* **134**, 995 (2008).

(原稿受付日：2010年9月28日)

著者紹介

坂田絵理 Eri SAKATA

マックス・プランク生化学研究所 Postdoctoral Fellow

TEL: +49-89-8578-2043 FAX: +49-89-8578-2641

e-mail: sakata@biochem.mpg.de

略歴：2007年名古屋市立大学大学院薬学研究科 博士課程修了，2007年東京都臨床医学総合研究所 博士研究員，

2010年現職。薬学博士。

最近の研究：26S プロテアソームの構造解析

佐藤匡史 Tadashi SATOH

理化学研究所，基幹研究所，糖鎖構造生物学研究チーム
基幹研究所研究員

TEL: 048-467-9619 FAX: 048-467-9620

e-mail: tadashisatoh@riken.jp

略歴：2003年日本大学大学院生物資源科学研究科 博士課程修了，2003年高エネルギー加速器研究機構 博士研究員，2007年 National Cancer Institute, USA Postdoctoral Fellow，2008年現職。博士（生物資源科学）

最近の研究：ユビキチン・糖鎖修飾系の構造生物学

山口芳樹 Yoshiki YAMAGUCHI

理化学研究所，基幹研究所，糖鎖構造生物学研究チーム
チームリーダー

TEL: 048-467-9619 FAX: 048-467-9620

e-mail: yyoshiki@riken.jp

略歴：1998年東京大学大学院薬学系研究科 博士課程修了，1998年東京大学薬学部 博士研究員，2001年東京大学薬学部 助手，2001年名古屋市立大学薬学部 講師，2007年現職。薬学博士

最近の研究：糖タンパク質・レクチンの構造生物学

若槻壮市 Soichi WAKATSUKI

高エネルギー加速器研究機構，物質構造科学研究所，フォトンファクトリー 施設長・教授

TEL: 029-864-5631 FAX: 029-864-2801

e-mail: soichi.wakatsuki@kek.jp

略歴：1990年米国スタンフォード大学大学院化学科修了，1990年英国オックスフォード大学生化科学科 MRC 博士研究員，1994年 ESRF ビームラインサイエンティスト，1999年同構造生物学グループリーダー，2000年高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 教授，2006年現職。Ph. D

最近の研究：細胞内タンパク質輸送系・糖鎖修飾系の構造生物学

加藤晃一 Koichi KATO

自然科学研究機構，岡崎統合バイオサイエンスセンター，生命環境研究領域 教授

TEL: 0564-59-5225 FAX: 0564-59-5224

e-mail: kkatonmr@ims.ac.jp

略歴：1991年東京大学大学院薬学系研究科 博士課程修了，1991年東京大学薬学部 助手，1997年東京大学薬学部 講師，2000年名古屋市立大学薬学部 教授，2008年現職。薬学博士

最近の研究：翻訳後に多様化するタンパク質および複合糖質の構造・動態・相互作用解析を通じた機能研究