

癌・パーキンソン病の解明を目指した ユビキチンリガーゼ複合体の結晶構造に関する基礎的研究

研究者 水島 恒裕
名古屋大学

概要：

ユビキチン蛋白質分解系は細胞周期調節因子や不要蛋白質を分解することで生体機能を維持する働きを持ち、パーキンソン病など病気とも深く関係しています。ユビキチンリガーゼはこの反応経路において、分解されるべき蛋白質を選び出し標識する役割を担っており、本研究では糖蛋白質を分解する働きを持った新しいユビキチンリガーゼの立体構造を決定し、その反応機構を解明しました。

1. はじめに

ユビキチン-プロテアソーム系は高度に制御された蛋白質分解機構であり細胞周期の制御など様々な生体反応に関与している(図1)。この系は一連の酵素群からなり、そのうちのユビキチンリガーゼは分解すべき蛋白質を認識し、その蛋白質にユビキチンを付加する酵素の総称である。この経路によってユビキチンが付加された蛋白質はプロテアソームによって分解される。ユビキチンリガーゼのひとつである SCF 複合体は共通の3種のサブユニットと1つの可変サブユニットにより複合体を形成することで、多様な標的蛋白質にユビキチン化を行う超分子複合体である。そして、ユビキチンリガーゼは生体内においてβ-カテニン、IκBα等様々な調節因子や立体構造形成に失敗した構造異常蛋白質などの分解に関与しており、ユビキチンリガーゼのひとつ Parkin は常染色体劣勢若年性パーキンソン病の原因遺伝子産物であり、SCF^{Fbs1} は小胞体関連分解において蛋白質分解のために糖鎖をシグナルとして利用する働きを持っている。

生体内においてリボソームより合成された蛋白質には、多くの折りたたみ異常が発生する。これら異常蛋白質が細胞外へ分泌されたり、細胞内に蓄積したりすることは細胞に様々な異常を引き起こす。小胞体内では異常蛋白質を積極的に小胞体内から取り除き、細胞

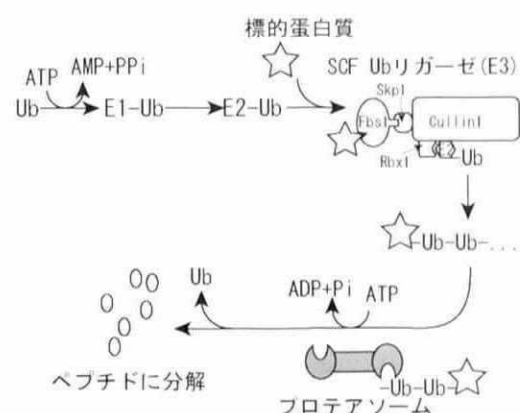


図1 ユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解経路

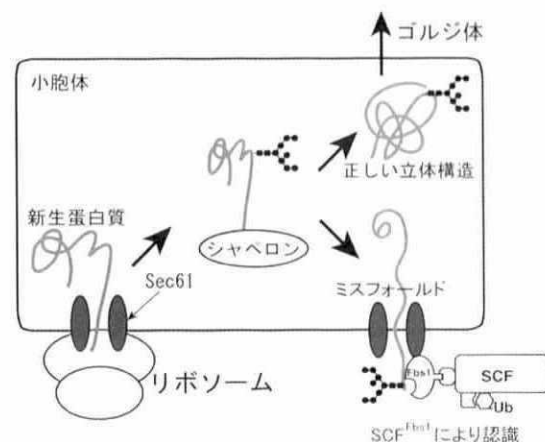


図2 小胞体関連分解の概略図

質に逆行輸送した後、プロテアソームが分解するシステムが存在する。これは小胞体関連分解(ERAD)とよばれ、小胞体では厳格な蛋白質の品質管理により異常蛋白質の細胞外への分泌を防いでいる(図2)。ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs1}(SCF型ユビキチンリガーゼは Skp1-Cullin1-F-box 蛋白質-Rbx1/Roc1 から構成された4分子複合体であり、標的識別サブユニットである F-box を変換することによって多様性を確保した酵素である。SCF^{Fbs1}はF-box蛋白質がFbs1のものを示す。)はERADにおいて細胞質に逆行輸送された糖蛋白質に分解シグナルであるユビキチンを付加する役割を担っている。そしてSCF^{Fbs1}は分解すべき糖蛋白質の認識を行う際にN型糖鎖を目印にしており、蛋白質分解のために糖鎖を利用するという点でこれまでにない新しいタイプのユビキチンリガーゼであった。このように、SCF^{Fbs1}は生体内環境維持のため細胞質に戻された異常な糖蛋白質を、その糖鎖を目印として認識し分解シグナルユビキチンを付加することで分解へ導く酵素である。そしてこの新しく見つかった糖鎖の役割は細胞内環境を維持するために非常に重要であるだけでなく、その反応機構もこれまでに構造の知られているレクチンとは異なり糖鎖の根元部分を認識し結合していた。

ユビキチン系蛋白質分解における標的認識シグナルとして、ユビキチンリガーゼはリン酸化やプロリンの水酸化といった翻訳後修飾による構造変化を認識していることはこれまでによく知られていた。これは他の酵素とのカスケードにより、標的蛋白質を適切な時期に分解するためである。これに対して蛋白質分解のために糖鎖を利用する認識は初めてのものであり、どのように行われているのか、その認識機構はどの程度厳密に行われているか、またなぜ蛋白質部分ではなく糖鎖を認識することが合理的であるか、糖鎖を認識し糖蛋白質にどのようにユビキチンを結合するか等を、X線結晶構造解析により立体構造から明らかにすることによる理解を目指し研究を行った。

2. 試料調製および結晶化

Fbs1の糖鎖認識部位(SBD;アミノ酸残基番号117-297)は数種類の欠失変異体を作製し精製蛋白質の糖鎖結合活性が確認できたうちの最小のものを用いた。SBDはpET15bベクターを用いて大腸菌による大量発現系を構築し構造解析に使用した。結晶化に用いた試料はHisタグを利用したアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの順に精製を行い、精製した試料は透析、濃縮により蛋白質濃度約20mg/mlに調製し結晶化に用いた。Fbs1-SBDの結晶は1.7M硫酸アンモニウム、10mM塩化ニッケル、0.1%PEG400、0.1MTris-HCl(pH8.5)の条件で得られ(図3)、実験室系の測定装置RU-200(RIGAKU)、R-AXIS-IV(RIGAKU)を用いて回折実験を行い2.0Å分解能までのデータを収集した。次に、Fbs1-SBDと基質であるキトビオースとの複合体結晶はソーキングや共結晶化では得られなかったため、Fbs1-SBD C132A変異体を用いた共結晶化により作製した。Fbs1-SBD C132A変異体の結晶化は1.4M塩化ナトリウム、1.7M硫酸アンモニウム、0.1MPIPES(pH7.0)、30mMキトビオースで行い2.4Å分解能までのデータを収集した。結晶はFbs1-SBDが空間群 $P3_221$ 、格子定数 $a=b=62.4, c=117.2\text{Å}$ 、Fbs1-SBD C132Aキトビオース複合体は空間群 $P4_32_12$ 、格子定数 $a=b=63.8, c=147.8\text{Å}$ であった。



0.5mm
図3 Fbs1 SBDの結晶。

3. X線構造解析

本酵素の構造解析は重原子同型置換法により行った。重原子誘導体結晶は2種類の Hg、Au、Sm、Os の5種類を用い回折データを収集し、CCP4のプログラム MLPHARE、DMによりマップを計算した。また、基質複合体構造は Fbs1-SBD 構造をモデルとした AMORE による分子置換法で決定した。それぞれの構造は REFMAC を用いて精密化を行い Fbs1-SBD は $R=0.162$ 、 $R_{free}=0.199$ 、Fbs1-SBD C132A 基質複合体は $R=0.200$ 、 $R_{free}=0.263$ となった。

4. 全体構造

Fbs1-SBD の全体構造は楕円形で、基本構造は10本の逆平行βシートからなるβサンドイッチ構造(図4)であった。またβシート以外にN末端と、β4とβ5の間に二本のαヘリックスが存在していた。さらに、SBD 基質認識機構を理解するため行った SBD-キトビオース複合体の共結晶構造解析より、キトビオースは SBD の先端領域のループに結合していることが明らかになった。

そして、SBD の立体構造から DALI サーバーを用いた類似構造検索を行うことによりβサンドイッチ構造を持ったレクチンが見つかった。しかし、類似構造を持ったレクチンでは糖鎖の認識部位は分子の中央のβシートにできた窪みで行われており、Fbs1 で見られたβシートから突き出したループ領域での認識はこれまでのレクチンとは異なる認識機構であった。これは通常のレクチンが糖蛋白質の糖鎖の先端部分を認識しているのに対して SBD は根元部分のキトビオースを認識することから、先端のループで結合することにより糖蛋白質の蛋白質領域と余分な相互作用を避けていると考えられる。

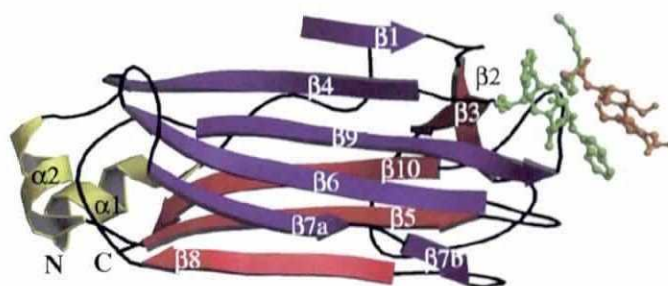


図4 Fbs1 SBDの立体構造

5. 糖鎖認識機構

SBD によるキトビオース認識の分子機構は先端のループを形成する Phe177、Tyr279、Trp280、Lys281 で行われていた(図5)。キトビオースは2分子のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)がβ1-4結合した構造を持つ2糖である。そして、キトビオースとこれらの残基の結合様式はキトビオースの片側のGlcNAc(A)がSBDのTrp280の側鎖に重なって結合し、もう一方のGlcNAc(B)はNAcのアセチル基がTyr177、Phe279、Lys281から形成された小さい疎水性のポケットに入るとい

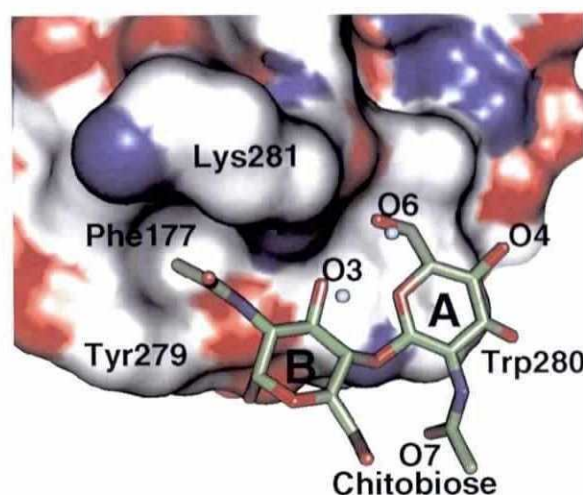


図5 SBD結合部位の立体構造

ものであった(図 5)。この分子表面の小さな疎水性ポケットは Fbs1 と糖蛋白質の結合において、マンノースと GlcNAc を識別する役割を果たしていた。また、SBD と結合しているキトビオースは水素結合を形成することにより 2 つの GlcNAc がしっかりとした状態を取っており、これにより認識される糖蛋白質の糖鎖と蛋白質の位置づけを一定に決定していた。また、Fbs1 は糖蛋白質との結合において糖鎖のキトビオース部分を認識しており、キトビオースを含まないマンノースだけでは結合しない。しかしキトビオースだけの場合よりその先に 3 分子のマンノースが結合した糖鎖のほうが SBD との親和性が強くなるのが分かっている。そのため SBD の構造中にはマンノースを認識する低親和性の糖鎖結合部位が存在し糖鎖と糖蛋白質の配向を一定にしていると考えられる。そこで、SBD を用いてキトビオースだけの場合とキトビオースにマンノースが 3 分子つながった糖鎖の場合との構造変化を NMR により測定した。その結果キトビオースだけでは構造変化をおこさず、マンノースが加わった場合のみ動きの見られたアミノ酸として Gly160, Thr215, Ala217 が見つかった。本来 SBD はキトビオースのみでも、決まった配向に結合するがこの実験結果よりマンノース部分を認識することでより厳密な結合を行うと共に糖鎖との親和性を向上させていることが考えられる。

次に Fbs1 は本来 SCF^{Fbs1} 複合体として四量体を形成して機能しており、Fbs1 の役割は標的蛋白質と間違いなく結合し、その標的蛋白質の Lys 残基にユビキチンが付加されるように、SCF^{Fbs1} と複合体を形成した E2 のユビキチンの位置に正しく標的を提示することである。これまでに SCF ユビキチンリガーゼの立体構造は Fbox 蛋白質として Skp2、Cdc4、 β -TrCP をもつものが報告されており、その結果 Fbox 蛋白質の基質結合領域と E2 の活性部位 Cys 間の距離は約 50 Å であることが示され、この空間に分解すべき標的蛋白質が位置することでユビキチン化が行われていると考えられている。今回構造を決定した SBD の立体構造では複合体を形成するために必要な Fbox ドメインを含んでいないため正確な複合体モデルを形成することはできないが、決定された SBD の立体構造よりこれらと同様に糖鎖結合部位と E2 の活性部位を約 50 Å になるように配置することができた。そして、最近の実験より Fbs1 による糖蛋白質との結合は正しく折りたたまれた蛋白質より変性させた蛋白質において強く見られることが明らかとなった。これは、糖蛋白質が変性することにより修飾された糖鎖の根元部分のキトビオースが分子表面に現れるためであると考えられる。このように Fbs1 による変性糖蛋白質を分解するための識別機構は非常に合理化されたものであることが示された。

6. おわりに

ユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解経路は生体内において細胞周期の制御や品質管理など、蛋白質を分解することでさまざまな役割を担っており、今回我々は X 線結晶構造解析により蛋白質分解のために糖鎖を利用するという新しい反応機構を構造学的に示すとともに、糖鎖を認識することにより得られる様々な合理性を明らかにした。しかし、本来 SCF ユビキチンリガーゼは複合体として機能する酵素であり、ここで示した構造では十分に理解できない部分も残っている。そのため現在複合体としての構造解析を行っており、Skp1-Fbs1 複合体状態での結晶化に成功し構造解析を進行中である。

- (1) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. [Mizushima T](#), Hirao T, Yoshida Y, Lee S J, Chiba T, Iwai K, Yamaguchi Y, Kato K, Tsukihara T, Tanaka K, *Nat Struct Biol.* **11**, 365-370. (2004)
- (2) ユビキチンシステムの構造生物学 水島恒裕, 医学のあゆみ, (2004) **211**, 17-22.