

京都大学	博士 (工学)	氏名	徳永 暉
論文題目	Structural Basis for Linear Polyubiquitination (直鎖型ポリユビキチン化の構造基盤)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、翻訳後修飾機構・直鎖型ポリユビキチン化の酵素タンパク質 LUBAC と直鎖型ポリユビキチン鎖の立体構造に関する研究成果をまとめたものであり、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論であり、前半では翻訳後修飾の一つであるポリユビキチン修飾の概要と、直鎖型ポリユビキチン化の生理学的役割について解説している。直鎖型ポリユビキチン化は、免疫応答などに関与する古典的 NF-κB シグナル伝達経路の調整において必須な反応である。この反応を触媒する唯一の E3 リガーゼである LUBAC と、修飾分子自身である直鎖型ポリユビキチン鎖が、シグナル伝達において担う役割をまとめ、本章の導入としている。また、章の後半では、本章で用いた主要な構造解析手法について記述している。</p> <p>第2章では、第3章で用いる LUBAC 三者複合体の試料調製方法について論じている。LUBAC は、触媒タンパク質 HOIP とアクセサリタンパク質 HOIL-1L および SHARPIN から構成されている。この章では、3つの分子間の相互作用領域のみを、大腸菌系により大量に調製する方法を記述している。ここでは特に、HOIP—HOIL-1L 複合体と SHARPIN を別個の大腸菌内で発現させ、精製途中で混合することで単離後の凝集を防ぎ、安定かつ化学量論的な三者複合体の精製に成功している。さらに、HOIL-1L と SHARPIN が、HOIP との相互作用部位よりも N 末端側のアミノ酸領域に、相同性の高い配列を持つことを発見している。</p> <p>第3章では、LUBAC の複合体安定化機構について論述している。細胞を用いた実験や表面プラズモン共鳴により、HOIP は HOIL-1L と SHARPIN が共存する条件下において、物理的に安定であることを示している。この安定化機構を解明するため、第2章で確立した方法で三者複合体試料を調製し、X線結晶構造解析を行っている。この立体構造から、HOIL-1L と SHARPIN は、三者複合体においても既知の結晶構造と同様の様式で、HOIP と部位特異的に相互作用することを示している。また、第2章で発見した2つのアクセサリタンパク質の配列相同領域は、互いに類似した構造モチーフ LUBAC tethering motif (LTM) を形成することを初めて明らかにしている。これらの2つの LTM は、互いに相互作用し合うことで、一つのドメインを形成している。この相互作用が3つのサブユニット間の複合体形成を強固にし、LUBAC の細胞内安定性を維持していることを種々の生化学実験により示している。さらに、LUBAC の不安定化を作用機序とするリンパ腫治療を目的とし、SHARPIN LTM の1番目の α-ヘリックスを模倣したペプチド薬剤をアメリカのグループと共同で開発している。試験管内および細胞を用いた実験により、この薬剤が LUBAC を不安定化させるとともにリンパ腫の増殖を抑制することを示し、LUBAC が抗がん剤の有望な標的分子であることを実証している。</p> <p>第4章では、修飾分子である直鎖型ポリユビキチン鎖の構造を様々な鎖長について解析した結果を記述している。核磁気共鳴により、二重合体では N 末端側ユビキチンユニットのリンカー領域と、C 末端側ユニットの連結部位周辺同士が非特異的に接触または相互作用していることを明らかにしている。また、X線小角散乱により、二重合体および三重合体は溶液内で直線状に伸びたような構造だけでなく、分子内のユビ</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	徳永 暉
<p>キチンユニット同士が近接したコンパクトな構造との平衡状態にあることを示している。また、高速原子間力顕微鏡により、基板上の四重合体から二十三重合体までの長鎖の直鎖型ポリユビキチン鎖を観察している。それらの分子は総じて4または5個のユビキチンユニットが一塊となる'beads-on-a-string'構造を形成することを実証している。このようなユビキチンの塊は、X線小角散乱で見られたコンパクトなコンフォメーションが足がかりとなるために、離れたユビキチンユニット同士が特異的に相互作用することでできると推測される。</p> <p>第5章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。本論文で得られた知見は、触媒タンパク質 LUBAC と修飾分子に対して新たな構造学的洞察を与えるものであり、直鎖型ポリユビキチン化の分子基盤の理解の一助になると期待できる。</p>			

氏名	徳永暉
----	-----

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、翻訳後修飾機構・直鎖型ポリユビキチン化の触媒タンパク質 LUBAC と直鎖型ポリユビキチン鎖自身の構造に関する研究成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 直鎖型ポリユビキチン化の触媒タンパク質 LUBAC の三者複合体形成領域の大腸菌系による大量調製方法を確立した。2つのサブユニットの二者複合体を残りのサブユニットと別個に発現・精製し、精製カラム上で混合することで、安定かつ純度の高い三者複合体試料を調製することに成功した。この方法によりヒトとマウスの二種類の試料を結晶構造解析に向けて大量に調製した。
2. LUBAC の複合体安定化機構を解明した。今回初めて三者複合体形成領域の結晶構造を明らかにし、2つのアクセサリタンパク質 SHARPIN と HOIL-1L が今まで知られていなかった類似の構造モチーフを持つことを実証した。これらの構造モチーフは互いに強固な相互作用をしており、このことが LUBAC の安定性を維持する上で極めて重要であることを示した。さらに、SHARPIN の部分構造を模倣して開発したペプチドは、LUBAC の不安定化とそれに伴うリンパ腫の細胞死誘導に効果的であることを示した。
3. 直鎖型ポリユビキチン鎖の鎖長により異なる構造を明らかにした。二重合体中のユビキチンユニット間には非特異的な接触または相互作用が働いていることが分かった。また、二重合体および三重合体は直線状に伸びたコンフォメーションだけでなく、ユビキチンユニット同士が近接したコンパクトなものとの平衡状態にあることを示した。さらに、原子間力顕微鏡による観察から、四重合体以上の長鎖になると4または5個のユビキチンユニットが一塊となった全く新しい形状をとることが明らかになった。

以上、本論文は、LUBAC と直鎖型ポリユビキチン鎖について、極めて新しい構造学的知見を明らかにした。本論文の内容はユビキチンの研究だけでなく創薬研究の観点からも応用性の高い成果であり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。