

京都大学	博士 (工 学)	氏名	関 山 直 孝
論文題目	STRUCTURAL ANALYSIS OF UBIQUITIN AND UBIQUITIN-LIKE PROTEIN RECEPTORS (ユビキチンおよびユビキチン様蛋白質受容体の構造学的研究)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、ユビキチン様蛋白質の多様な分子認識機構の構造生物学的な研究に関して記述している。本論文は三部三章から構成されている 第一章は序論であり、真核生物が外部環境の変動に適応するためにユビキチン様蛋白質による機能制御が重要であることを述べている。つまり、DNA 修復という複雑な細胞機構は、ユビキチンや SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) といったユビキチン様蛋白質の翻訳後修飾により制御されており、相互作用する下流因子による分子認識を解明することが重要であることを示し、本論文の導入としている。 第二部第一章では、ユビキチン様蛋白質のひとつである SUMO 蛋白質の分子認識機構について述べられている。SUMO の使い分けには、SUMO-1 および SUMO-2/3 に結合するアミノ酸配列のモチーフ (SIM: SUMO-interacting motif) が重要であると考えられている。ある種の SIM が如何にして SUMO-1 と SUMO-2/3 を識別するかは、SUMO family の機能性の差異を理解する上で必要不可欠である。SUMO 化を受けたメチル化 DNA 結合タンパク質 MBD1 と結合する事で転写抑制化機構に関与する MCAF1 (MBD1-containing chromatin-associated factor 1) は、SUMO-1 よりも SUMO-2/3 に対する親和性が高い。本研究では MCAF1 に存在する SIM の SUMO-2/3 認識機構を解明することを目的とした。MCAF1 に存在する SIM (SIM_{MCAF1}) の SUMO-1, SUMO-2/3 に対する親和性を等温滴定カロリーメトリー (ITC : Isothermal Titration Calorimetry) により定量的に測定した結果、SUMO-1 (K_d = 13.9 μM) よりも SUMO-3 (K_d = 1.3 μM) に対する親和性が 10 倍程度大きいことがわかった。SUMO-3 と SIM_{MCAF1} の複合体の立体構造を NMR により決定したところ、SIM_{MCAF1} は SUMO-3 のβ2-strand とα1-helix の間にはまり込むように結合しており、SIM_{MCAF1} の N 末端部分に存在する疎水性残基が、SUMO-3 の疎水性のパッチと相互作用していた。さらに SIM_{MCAF1} の C 末端に存在する ⁹⁷²DDEE⁹⁷⁵ といった負電荷を持った残基が SUMO-3 の正電荷を帯びた表面と長距離の静電的相互作用をしていることがわかった。この静電的相互作用の重要性を検証するため、SIM_{MCAF1} と SUMO-3 変異体の ITC 測定を行ったところ、SIM_{MCAF1} の SUMO-3 特異的な結合は静電的相互作用によるものであることが確認した。SUMO サブタイプに対する選択結合が明確な SIM と SUMO の複合体の構造解析は本研究が初めてと思われ、SUMO-2/3 に対する特異性が SIM の酸性残基に起因していることを示した点に特色と重要な意義がある。 第二部第二章では、SUMO のアミノ酸配列と類似性の高い SUMO-like domains (SLDs) の構造生物学的な研究について述べている。SLD を複数持つ蛋白質は RENi family と呼ばれ、連動した SUMO およびユビキチンによる翻訳後修飾を制御する事で、DNA 修復への関与が示唆されている。しかし、詳細な分子機構は不明であった。SLDs の機能を解明するため、RENi family の一つである Nip45 の SLDs について構造学的研究を行った。Nip45 の C 末端に存在する SLD2 の X 線結晶構造解析を行った。位相決定はセレンの異常分散効果を利用した多波長異常分散法 (MAD) を用いて行い、野生型結晶の散乱強度データを基に構造の精密化を行った。決定された構造から、SLD2 は SUMO と共通の蛋白質フォールドを持つことが明らかとなった。さらに SUMO との分子、表面の比較から SLD2 は SIM 結合表面の保存性は低いが、SUMO 化 E2 酵素である Ubc9 と相互作用する可能性が示唆された。NMR および ITC による結合実験の結果、SLD2 はすでに SUMO と結合することが知られている SIM とは結合せず、Ubc9 と非常に強い親和性 (K_d = 2.81 μM) で結合することを見出した。SLD2:Ubc9 複合体の結晶構造解析にも成功し、SLD2 は polySUMO 化に関与する Ubc9 の表面と相互作用していることを明らかにした。つまり、SLD2 は SUMO と競合的に Ubc9 と結合することで、Ubc9 表面上で起こる polySUMO 化を抑制する働きが示唆された。そこで SLD2 存在下で <i>in vitro</i> SUMO 化反応を行ったところ、実際に polySUMO 化が抑制された。以上の結果より、SLD2 は SUMO に類似した様式で Ubc9 と結合し、細胞内の polySUMO の存在量を調節している可能性考えられる。SLD2:Ubc9 複合体の構造解			

析についての報告は初めてであり、今回の結果から polySUMO 化の抑制という機能をもつことが明らかになった点に特色がある。

第二部第三章では、Rap80 の 2 つの UIM による Lys63 結合型ポリユビキチン鎖の認識機構について述べている。ユビキチンは、自身のリジン残基を介してポリユビキチン鎖を形成し、その形成パターンにより特定の機能を制御していることが知られている。ポリユビキチン鎖を特異的に認識する下流因子が存在し、ポリユビキチンの呈するシグナルを伝達すると考えられるが、ポリユビキチンの認識機構についての知見は少ない。最近 Lys63 結合型ポリユビキチンの認識を行う蛋白質として Rap80 (Receptor-associated protein 80) が同定された。Rap80 は DNA 二重鎖切断が生じた部位に形成される Lys63 結合型ポリユビキチンを認識し、様々な修復酵素をリクルートする蛋白質複合体形成の足場としての役割を担っていると考えられている。本研究では Rap80 の Lys63 結合型ポリユビキチン認識機構を構造的に解明することを目的とした。Rap80 には UIM (ubiquitin-interacting motif) と呼ばれるユビキチン結合モチーフが 2 個存在する (tUIMs)。この UIM 領域とユビキチンおよびポリユビキチン鎖との結合実験を行ったところ、Rap80 の UIM 領域は Lys63 結合型ポリユビキチン鎖に親和性 ($K_d = 9.09 \mu\text{M}$) を有することを見出した。Lys63 結合型ダイユビキチン鎖 (K63-Ub₂) の Rap80 に対する相互作用機構を検証するため、NMR による化学シフト摂動法、残余双極子相互作用、常磁性緩和法による測定を行い、さらに詳細な分子認識機構を解明するために、K63-Ub₂:tUIMs 複合体の構造モデルを計算した。NOE による距離制限に加え RDC による角度情報を考慮することで、溶液中における正確な複合体モデルの構築を目指した。その結果、tUIMs は一本のヘリックス構造をとっており、UIM1、UIM2 ともに Ub の Ile44 を中心とした疎水性表面を認識していた。tUIMs:K63-Ub₂ 複合体の溶液構造から tUIMs によるポリユビキチンの認識機構を詳細で解析し、三者複合体という複雑な分子群の動的な高次構造モデルを示した点が非常に意義深い。

第三部では、全編を通じての総括と、ユビキチンおよびユビキチン様蛋白質の構造的研究の意義を示すとともに今後の展望を議論している

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ユビキチン様蛋白質であるユビキチンと SUMO の多様な認識機構の構造生物学的な研究を記述している。この研究で得られた成果は以下の通りである。

1. 転写因子 MCAF1 の SUMO 相互作用モチーフ ($\text{SIM}_{\text{MCAF1}}$) の SUMO-3 認識機構について解明した。 SIM ($\text{SIM}_{\text{MCAF1}}$) と SUMO-3 の複合体の立体構造を NMR により決定したところ、SUMO-3 の認識には主に疎水性の相互作用が関与していることを見出した。さらに詳細な結合実験により、 $\text{SIM}_{\text{MCAF1}}$ の SUMO-3 選択的な結合には静電的相互作用によるものであることを示した。SUMO family のサブタイプに対して明確な結合特異性を持つ SIM の複合体の構造決定は本研究が初めてと思われ、SUMO-2/3 に対する特異性が SIM の酸性残基に起因することを示した点に特色と重要性を認める。
2. SUMO のアミノ酸配列と類似性の高い SUMO-like domains (SLDs) の構造学的知見を得た。最近、DNA 修復において SUMO 化がユビキチン化と連動して起こることが報告されている。DNA 修復に関与する Nip45 に含まれる SLD2 の X 線結晶構造解析を行った。これから、SLD2 は Ubc9 上の polySUMO 化に関与する SUMO 結合面と相互作用する可能性を見出し、生化学実験から polySUMO 化を抑制しうることを示した。世界に先駆けて、SLD2:Ubc9 複合体の立体構造決定し、polySUMO 化の抑制機構の仮説を提案した興味深い知見で、成果は高く評価される。
3. 連続した 2 つのユビキチン結合モチーフ (UIMs) の Lys63 結合型ポリユビキチン認識機構を解明した。NMR による化学シフト摂動法、常磁性緩和効果、残余双極子相互作用と云った種々の測定手法を用いることで、Rap80 に含まれる 2 つの連続した UIM 領域と Lys63 結合型ダイユビキチン鎖の相互作用様式を詳細に解析した。NMR の様々な情報を用いて構築した構造モデルは、複合体形成において SIM 間にある配列がランダムコイルからヘリックスへ転移するデータと共に、非常に意義深い。

以上、ユビキチンおよび SUNO の結合タンパク質に関する構造学的研究を行い、多様な分子認識機構とその細胞機能に関する知見を与えた本論文は博士（工学）の学位審査の請求に値すると認められる。学術上の意義に加えて、工学的な応用への基礎に資する意義を認めることができ、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 22 年 2 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。