

論文の内容の要旨

論文題目 ユビキチン-酵母ユビキチン加水分解酵素
複合体の動的構造平衡の解明

氏名 小笠 広起

【背景】

ユビキチン C 末端加水分解酵素 UCH は、ユビキチン C 末端のカルボキシル基が形成したペプチド結合を切断する酵素である。UCH は、C 末端にリボソーム蛋白質が付加したユビキチン前駆体からユビキチンを切り出したり、C 末端が細胞内低分子と共有結合を形成して不活性化したユビキチンを再生したりする役割を担う (Fig.1-A) 。

ユビキチンの構造ドメイン領域を除去して、C 末端領域だけ残したペプチドが、UCH と結合する速度が著しく遅いことが示されており、UCH がユビキチンの構造ドメイン領域を高い選択性で認識することが明らかとなっている。この高い基質選択性は、細胞内タンパク質の非特異的な分解を防ぐ上で重要である。

これまでに、ヒトで 4 種類 (UCH-1, UCH-3, UCH-5, BAP1)、酵母で 1 種類 (酵母ユビキチン加水分解酵素 YUH) の UCH が確認されている。BAP1 以外の結晶

構造は解かれており、いずれも良く類似した反応部位や基質認識部位を持つ。このうち、YUH と、C 末端をアルデヒド化したユビキチンが共有結合した反応中間体アナログ複合体状態 (Ubal-YUH 複合体) の結晶構造 (Fig.1-B) では、ユビキチン C 末端が活性シ

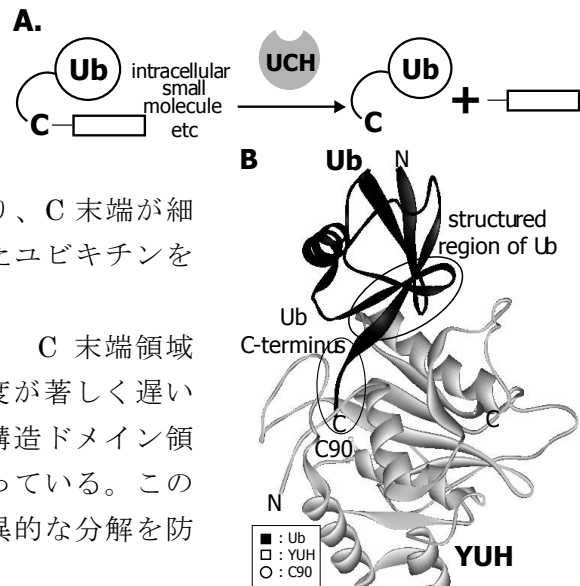


Fig.1 (A) UCH が触媒する反応の模式図。(B) Ubal-YUH 複合体の結晶構造 (PDB code : 1CMX)

ステイン 90 を含む YUH の反応部位に入り込んで結合していた。一方、基質認識に重要な構造ドメイン領域は、反応部位から離れた部位と結合していた。したがって、ユビキチン構造ドメイン領域の結合が、間接的に反応部位の構造を変化させることで、基質選択性が達成されていると考えられる。しかし、Ubal-YUH 複合体の結晶構造だけでは、ユビキチン構造ドメイン領域が反応部位の構造を変化させるメカニズムは説明できない。

一方、溶液中におけるユビキチン-YUH 複合体では、ユビキチン C 末端、および、その周囲に位置する反応部位の残基の NMR シグナルが、広幅化して観測されないことが報告されていた。このことは、反応部位と結合するユビキチン C 末端が、異なる複数の構造間の動的平衡にあることを示唆する。この動的構造平衡を解明すれば、UCH の基質認識に重要な過渡的な結合状態を検出し、その結合様式を解明できると考えた。

そこで本研究では、ユビキチン-YUH 複合体における動的構造平衡を解明することで、UCH の基質選択機構を明らかとすることを目的とした。

【方法】

[^2H , ^{15}N] ユビキチンおよび非標識 YUH を、大腸菌発現系により調製した。緩和分散実験では、 180° パルスの照射頻度を $12.5 \sim 2,000$ Hz の範囲で変動させて TROSY-CPMG 測定を行った上で、照射頻度の増大に伴う横緩和速度の減少が観測された残基について、理論式に基づくフィッティングを行った。転移 PRE 実験では、最初に、E16 にシステイン変異を導入した YUH 変異体を作成した上で、変異導入したシステイン残基に、cysteaminy-EDTA を介して常磁性金属 (Fe^{3+} or Mn^{2+} or Ni^{2+} or VO^{2+}) もしくは反磁性金属の Zn^{2+} を結合させた。次に、過剰量の [^2H , ^{15}N] ユビキチンを添加して、主鎖アミド水素原子の縦緩和速度と横緩和速度を測定した上で、反磁性金属結合時の緩和速度を差し引くことで、緩和速度増大の観測値を求めた。各条件における緩和速度増大の観測値を、緩和分散により決定した解離速度を代入した理論式にフィッティングした。

【結果】

1. ユビキチン-YUH 複合体の構造多形の検出

複合体の NMR シグナルを高感度で検出するために、 ^{15}N 標識と重水素化を両方施したユビキチンにおける、野生型 YUH との複合体状態のスペクトルを取得した。その結果、A46 を含む結合界面上の一部の残基のシグナルが、2 つ観測された (Fig.2-A)。一方、結晶構造が解かれている、反応中間体アナログの Ubal-YUH 複合体のスペクトルでは、2 つのうち一方と化学シフトが一致するシグナルのみが観測された (Fig.2-B)。したがって、ユビキチンと YUH の複合体では、Ubal-YUH 複合体と同様の結合様式の状態に加えて、もう 1 つ別の状態が存在することが示された。以降では、前者を complex A、後者を complex B と呼ぶ。

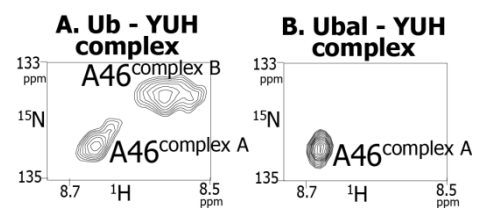


Fig.2 YUH との複合体におけるユビキチン A46 の NMR スペクトル
A) 野生型 YUH との複合体
B) Ubal-YUH 複合体

したがって、ユビキチンと YUH の複合体では、Ubal-YUH 複合体と同様の結合様式の状態に加えて、もう 1 つ別の状態が存在することが示された。以降では、前者を complex A、後者を complex B と呼ぶ。

2. complex A と complex B の複合体形成経路の決定

次に、非結合状態から complex A および complex B が形成される順序を調べるために、各状態間の解離速度を決定した。最初に、complex A と complex B の交換速度を調べるために、99 % 以上のユビキチンが複合体を形成するように、ユビキチンに対して野生型 YUH を過剰量添加した状態で、ユビキチンのシグナルを観測する緩和分散実験を行った。その結果、V70 をはじめとする、complex A と complex B のシグナルが 2 つ観測された残基において、パルス照射頻度の増大に伴う横緩和速度の減少が観測された。理論式に基づくフィッティングにより化学シフト差と速度定数を算出した結果、算出された化学シフト差は、スペクトルから実測した両状態の化学シフト差の値と一致していた。したがって、算出された速度定数 14 s^{-1} , 67 s^{-1} が、両状態の交換における値であることが示された。

次に、ユビキチンと YUH の結合・解離の交換速度を調べるために、ユビキチンが YUH に対して過剰量存在する状態で、ユビキチンのシグナルを観測する緩和分散実験を行った。その結果、A46 を含む、非結合状態と complex B で化学シフトが異なる残基において、パルス照射頻度の増大に伴う横緩和速度の減少が観測された。理論式に基づくフィッティングにより化学シフト差と速度定数を算出した結果、算出された化学シフト差は、スペクトルから実測した両状態の化学シフト差の値と一致した。したがって、算出された速度定数 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 536 s^{-1} が、両状態の交換における値であることが示された。

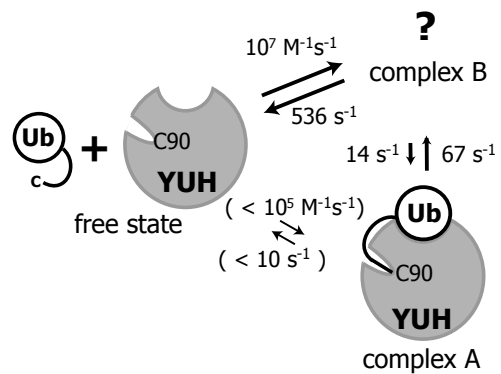


Fig.3 緩和分散実験により明らかになった、各状態の交換における速度定数。

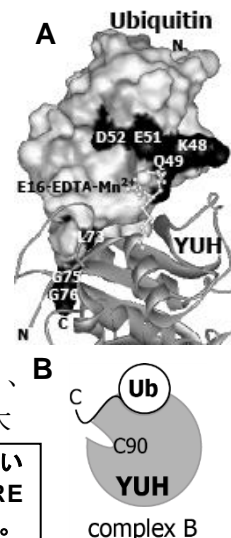
さらに、 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ ユビキチンに対して非標識野生型 YUH を滴定する実験を行った。その結果、complex A のシグナルは、YUH 添加に伴い強度が徐々に増大する、slow exchange の挙動を示した。したがって、complex A が非結合状態に解離する速度は 10 s^{-1} より遅いこと、結合速度は $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ より遅いことが示された。

以上の速度定数 (Fig.3) に基づいて、複合体形成のモンテカルロシミュレーションを行った。その結果、85 % 以上の complex A が、complex B を介して形成されることが示された。

3. complex B の結合様式の解明

次に、complex B の結合様式を明らかとするために、ユビキチン-YUH 複合体において、YUH に導入した常磁性プローブにより、ユビキチン上の観測原子に誘起される常磁性緩和増大 (PRE) を観測して、プローブと観測原子の距離を決定する実験を行った。本研究では、ユビキチンが、常磁性プローブを導入した YUH と結合・解離の交換をしている時に、非結合状態のユビキチンの NMR シグナルに観測される、転移 PRE を観測した。転移 PRE では、complex A よりも解離速度が大きい、complex B だけを観測できる。

Fig.4 (A) YUH の E16 に常磁性プローブを付加した実験において、転移 PRE が観測された残基のマッピング。(B) 転移 PRE 実験により明らかになった、complex B の結合様式の模式図。



YUH 上の E16 に常磁性プローブを導入して実験を行った結果、ユビキチン C 末端の G75, G76 に 転移 PRE が観測され、プローブからの距離が 5 Å 程度と算出された。一方、Ubal-YUH 複合体の結晶構造では、G75, G76 とプローブ導入部位の距離は 20 Å 以上であった (Fig.4-A)。したがって、complex B では、Ubal-YUH 複合体の結晶構造とは異なり、ユビキチン C 末端が、YUH の反応部位に入っていないことが示された (Fig.4-B)。

また、Ubal-YUH 複合体の結晶構造において、常磁性プローブ導入部位と近接している、ユビキチンの構造ドメイン領域の K48 ~ D52 にも、転移 PRE が観測された (Fig.4-A)。この結果から、complex B では、ユビキチンの構造ドメイン領域は、Ubal-YUH 複合体と同様の部位で YUH と結合することが示された (Fig.4-B)。

【考察】

ユビキチンの構造ドメイン領域が YUH と相互作用しているが、C 末端は YUH の反応部位に入り込んでいない状態である complex

B が、C 末端が反応部位に入り込んでいる complex A に先立って一過的に形成することを、本研究により示した (Fig.5-A)。

Ubal-YUH 複合体の結晶構造において、反応部位を spacefill 表示で拡大して示すと (Fig.5-B)、YUH N 末端は、YUH の活性中心 C90 とユビキチン C 末端が結合できるように配置していた。一方、非結合状態の UCH-L3 では (Fig.5-C)、N 末端が活性中心をマスクしていた。以上より、UCH N 末端が、基質以外の分子の反応部位への接近をブロックすることで、非特異的な分解を抑制していると提唱されていた。一方、基質特異性を担うユビキチン構造ドメインは UCH N 末端と近接していないため、ユビキチン構造ドメインが、間接的に UCH N 末端の構造変化を誘起していると考えられた。しかし、結晶構造だけではどのように UCH N 末端の構造変化が誘起されているかが不明であった。

本研究で明らかとなった complex B であれば、ユビキチン C 末端と YUH N 末端が近接したまま、多様なコンフォメーションの間を交換することが可能であり、結合に適した構造を効率よく選別できる。これにより、反応可能な complex A を、高い選択性で、効率よく形成できると考えた。以上のような基質選択機構により、UCH は、ユビキチン構造ドメイン領域を持たない低分子、ペプチドなどの非特異的分解だけを抑制しつつ、ユビキチン C 末端に低分子や構造非形成ペプチドが付加した付加体だけを効率よく切断することができると提唱する。

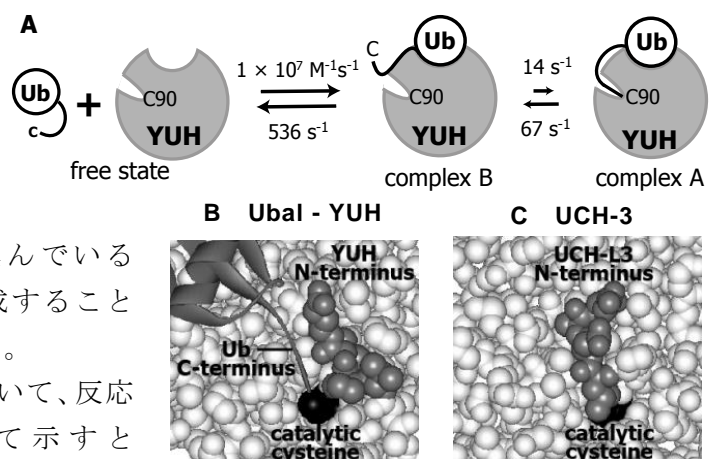


Fig.5 (A) 本研究で解明した、ユビキチンと YUH の結合様式の模式図。
(B, C) Ubal-YUH (B) と UCH-3 (C) の結晶構造における、活性部位のシステイン残基と UCH の N 末端の配置 (PDB code : 1UCH, 1CMX) 。