

- Hill, C.P. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 37371–37382.
- 9) Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., & Tanaka, K. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 228–236.
- 10) Nakamura, Y., Umehara, T., Tanaka, A., Horikoshi, M., Padmanabhan, B., & Yokoyama, S. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**, 503–509.
- 11) Kim, S., Saeki, Y., Fukunaga, K., Suzuki, A., Takagi, K., Yamane, T., Tanaka, K., Mizushima, T., & Kato, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 15159–15166.
- 12) Takagi, K., Kim, S., Yukii, H., Ueno, M., Morishita, R., Endo, Y., Kato, K., Tanaka, K., Saeki, Y., & Mizushima, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 12172–12182.
- 13) Kim, S., Nishide, A., Saeki, Y., Takagi, K., Tanaka, K., Kato, K., & Mizushima, T. (2012) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68**, 517–521.
- 14) Tomko, R.J., Jr., Funakoshi, M., Schneider, K., Wang, J., & Hochstrasser, M. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 393–403.

高木 賢治, 水島 恒裕
 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科
 ピコバイオロジー研究所)

Structure and functional mechanisms of proteasome dedicated chaperones

Kenji Takagi and Tsunehiro Mizushima (Department of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Akoh, Hyogo 678-1297, Japan)

構造が解き明かすがんおよび自己免疫疾患に関わるユビキチンリガーゼ Cbl のリン酸化による活性化機構

1. ユビキチン修飾系

ユビキチン修飾系は、ユビキチン活性化酵素 (E1), ユビキチン結合酵素 (E2), ユビキチン転移酵素 (E3) の3種の酵素群により、ユビキチンをATP依存的に標的タンパク質に結合させる翻訳後修飾系である。最初に、E1によってATP依存的にユビキチンのC末端が活性化される。次に、活性化されたユビキチンがE1からE2に移動する。最後に、E3によってユビキチンが標的タンパク質に受け渡される。ユビキチン化は多くの場合連続的に起こり、標的タンパク質はポリユビキチン化される。ポリユビキチン鎖はプロテアソームによる分解の識別シグナルとなっており、ポリユビキチン化された標的タンパク質は選

択的に分解される。

E1, E2, E3の一連の酵素群の中で、標的タンパク質を認識するのは最も下流に位置するE3であり、E3がユビキチン修飾系の中核を担う。E3はそのドメイン構造から、HECT型とRING/U-box型に大別される。HECT型E3はユビキチンと直接チオエステル結合を形成した後に基質へユビキチンを受け渡す。一方、RING/U-box型E3はユビキチンとは直接結合せず、E2および基質の両方に結合することでユビキチン化における足場として働く。

2. Cblの機能と構造

Cblは、がん遺伝子 *v-Cbl* のがん原遺伝子として同定された。その産物であるCblタンパク質は、RING型E3の一種である。Cblタンパク質にはc-Cbl, Cbl-b, Cbl3の3つのパラログ遺伝子産物が存在する。c-CblとCbl-bのN末端領域の配列相同性は高く(アミノ酸の完全一致で86%)、この領域に存在するTyrosine Kinase Binding (TKB) ドメイン, Helix linker およびRINGドメインがE3としての機能に重要な役割を果たす(図1a)。TKBドメインは、リン酸化チロシンを認識して標的タンパク質と結合する。一方、Helix linker上には二つのチロシン残基が存在しており、これらのうちc-CblではY371, Cbl-bではY363がリン酸化されることでE3としての機能が活性化され¹⁾、RINGドメインはE2と結合し、基質のユビキチン化を促進する。

Cblタンパク質はチロシンリン酸化により活性化されたEGFR(上皮成長因子受容体), PDGFR(血小板由来成長因子受容体)をはじめとする成長因子受容体をユビキチン化し、その分解を促すことでシグナル伝達を負に制御している²⁾。そのため、Cblタンパク質のE3機能の欠如はがんの発症に関与していることが知られている³⁻⁵⁾。実際、*v-Cbl*におけるドメイン欠損や、N末領域におけるCblの変異はがん変異として報告されている。

Cblタンパク質の中でもCbl-bはT細胞のシグナル伝達にも関与しており、TCRやZAP-70をユビキチン化することでT細胞アネルギーを制御している⁶⁾。Cbl-bのノックアウトマウスは全身性の自己免疫疾患を発症することが明らかになっている⁷⁾。また、ヒトにおいてもCbl-bの変異とI型糖尿病との関連が明らかになっている⁸⁾。

c-CblのTKB-Helix linker-RING領域の非リン酸化体の立体構造は、E2であるUbcH7および基質であるZAP-70のCbl結合領域のペプチドとの三者複合体としてZhengらにより決定された⁹⁾。しかし、この立体構造中では活性化に

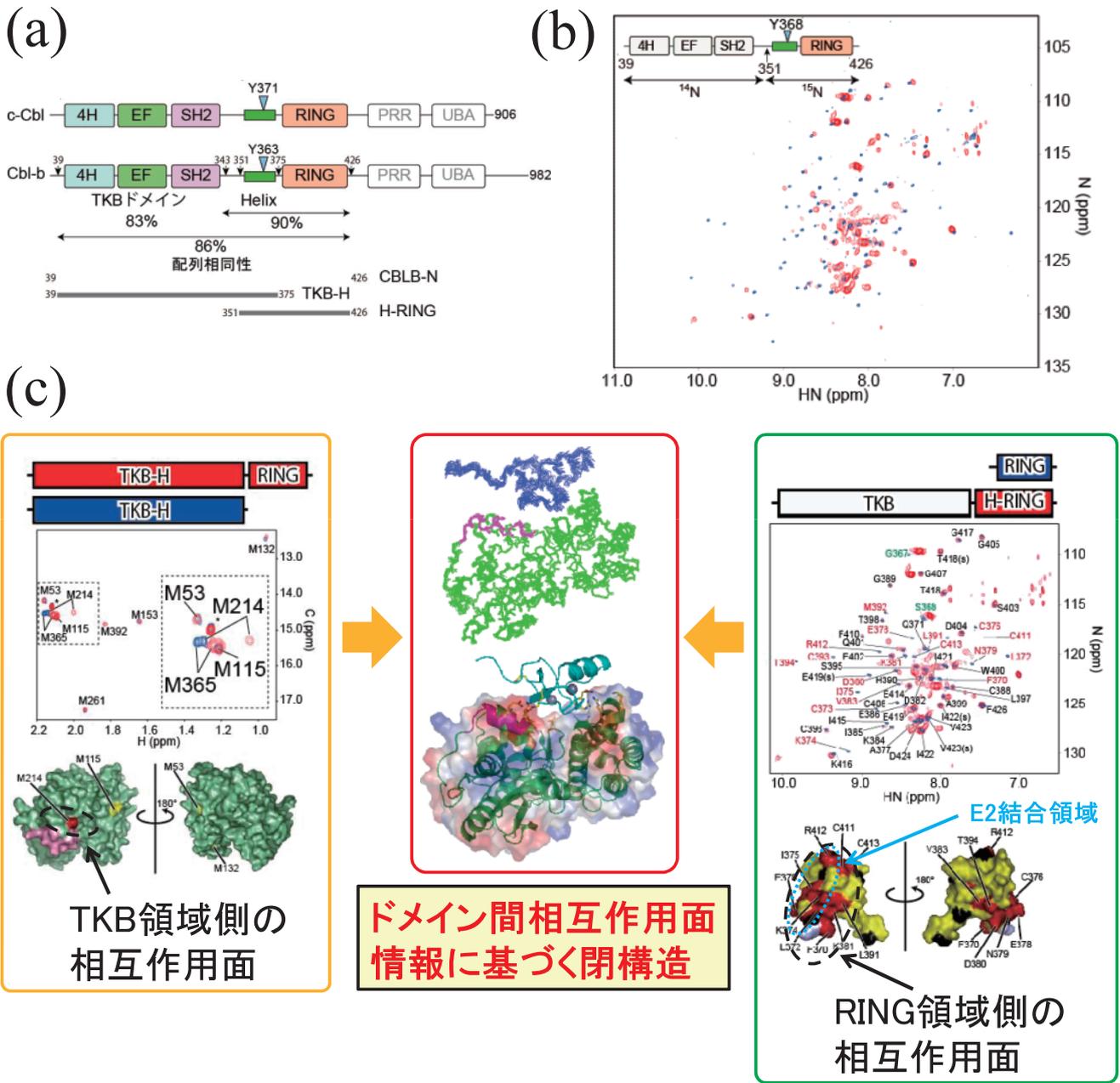


図1 CBLB-Nの選択的安定同位体標識試料のNMRスペクトル

(a) Cblタンパク質のドメイン構造, (b) H-RING 選択的安定同位体標識 CBLB-N の非リン酸化体 (赤) とリン酸化体 (青) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ, (c) NMR スペクトルの重ね合わせによる非リン酸化 CBLB-N の閉状態の構造モデルの構築

重要な残基 Y371 がタンパク質内部に埋もれており, Y371 のリン酸化による活性化メカニズムはこの構造からは説明できない. また, Cbl の E3 活性は, 非リン酸化状態では TKB ドメインにより抑制されることも明らかになっているが¹⁰⁾, Zheng らの構造⁹⁾からは阻害メカニズムについても明らかにはされていない. 最近, 非リン酸化状態および

リン酸化状態の Cbl タンパク質の立体構造および動的挙動が我々 (NMR) および Huang らのグループ (X 線結晶構造解析) により明らかにされた^{11,12)}. 本稿ではこれらの研究から明らかにされた Cbl タンパク質のリン酸化を介した活性制御の構造メカニズムについて概説する.

3. Cbl タンパク質のリン酸化に伴う全体構造変化

著者らは Cbl タンパク質の中でも Cbl-b の N 末端にある TKB-Helix linker-RING 領域 (以下 CBLB-N とする) に着目して研究を行った。この領域の残基数は約 390 残基、分子量は約 47,000 である。また、複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質である。マルチドメインタンパク質では、それぞれのドメインがコンパクトにまとまった閉構造と開いた開構造の平衡にあり、リン酸化等の翻訳後修飾により、閉構造から開構造へと変化することで機能が制御されている場合が多い。Cbl タンパク質についても同様であると推測された。Cbl タンパク質の活性制御機構を理解するためには、閉じた構造だけではなく、開いた構造についての構造情報の取得が必要である。X 線結晶構造解析では分子間のパッキングにより、必ずしも生理的条件を反映した開構造が得られるとは限らない。そこで、溶液中における構造情報の取得を行った。溶液中でのリン酸化による大まかな構造変化に関する情報を得るために X 線小角散乱 (SAXS) の測定を行い、溶液中での分子の広がり の指標である慣性半径を求めた。その結果、非リン酸化状態における CBLB-N の慣性半径が 24 Å 程度であるのに対してリン酸化状態では 26.7 Å であり、非リン酸化体の方がリン酸化体比べてコンパクトな構造を有することが明らかとなった。

より詳細な溶液構造情報の取得を目的として、溶液 NMR による解析を試みた。最初に、RING ドメインの構造および動的挙動に関する情報を取得した。そのための方法としてセグメント選択的同位体標識法を利用した。これは同位体標識および非標識の二つのセグメントを別々に発現させた後にタンパク質ライゲーションの手法により連結させることで、タンパク質の特定のセグメントのみを選択的に同位体標識を行う方法である。著者らは Sortase A というトランスペプチダーゼを用いてタンパク質ライゲーションを行った^{13,14)}。この方法により TKB 領域は非標識、Helix linker-RING 領域 (以下 H-RING) は¹⁵N で標識された試料を作製し、リン酸化体と非リン酸化体において¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。非リン酸化体では広幅なシグナルが観測された (図 1b) のに対し、リン酸化体では先鋭なシグナルが観測された。リン酸化体についてのシグナルは H-RING 領域のみからなるコンストラクトの NMR スペクトルともほぼ重なっており、非リン酸化体では H-RING 領域が他の領域と相互作用することでコンパクトな構造を有し、リン酸化体では独立して挙動すること

が明らかとなった。

4. Cbl タンパク質の自己阻害機構

非リン酸化状態では CBLB-N は閉じた構造を有することが明らかとなった。そこで、ドメイン間相互作用面に関する情報の取得を試みた。それぞれのドメインを別々に発現させた試料とドメインが連結された試料の NMR スペクトルの重ね合わせより、ドメイン間相互作用面の情報を得ることができる。この際にアミノ酸選択標識試料やドメイン選択標識試料を用いることで、NMR 信号の重なりが軽減され、解析が容易に行える。TKB については 300 残基程度と大きいため、アミノ酸選択標識試料を用いて相互作用面の情報を得た。RING 側についてはドメイン選択標識試料を用いた。二セットの NMR スペクトルの重ね合わせから双方のドメインの接触面を決定した (図 1c)。TKB から Helix linker までを含むコンストラクト (TKB-H) と CBLB-N の ϵ -¹³CH₃-methionine 標識試料の¹H-¹³C HMQC スペクトルにおいてドメイン化により M214 のシグナルがシフトし、かつ先鋭化が観測された。これより、M214 がドメイン間の界面に存在すると考えられる (図 1c 左)。その後報告された c-Cbl の N 末端領域の結晶構造¹²⁾の結果もこれを支持していた。RING 側についてもドメイン選択標識体 (連結体) とドメイン化体の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの重ね合わせを行った (図 1c 右)。連結体では一部のシグナルが消失しており、シグナルが消失した領域をドメイン間の接触領域と推定した。この領域の一部は E2 との結合面であり、TKB 領域が E2 との結合を妨げていることが示唆される。また、シグナルの移動ではなく消失として観測されていることより、CBLB-N が単なる閉構造として存在するのではなく、開構造と閉構造の間の動的平衡状態にあることが示唆される。これは X 線結晶構造解析からは得られない、NMR 特有の情報である。最後に、これらの接触面情報に基づき HADDOCK¹⁵⁾ というソフトウェアを用いることで閉状態のモデル構造を得た (図 1c 中央)。多数のドメイン間相互作用 (主に静電相互作用) により閉構造が安定化されていることが示唆され、変異体を用いた *in vitro* のユビキチン化実験もこれを支持していた。

5. Cbl タンパク質のリン酸化による活性化機構

上記のように H-RING 領域がリン酸化体においては TKB 領域と独立して挙動することが明らかとなった。そこで、H-RING 領域のリン酸化体 (以下 pY H-RING) について溶液構造を NMR により決定した (図 2a 左)。RING

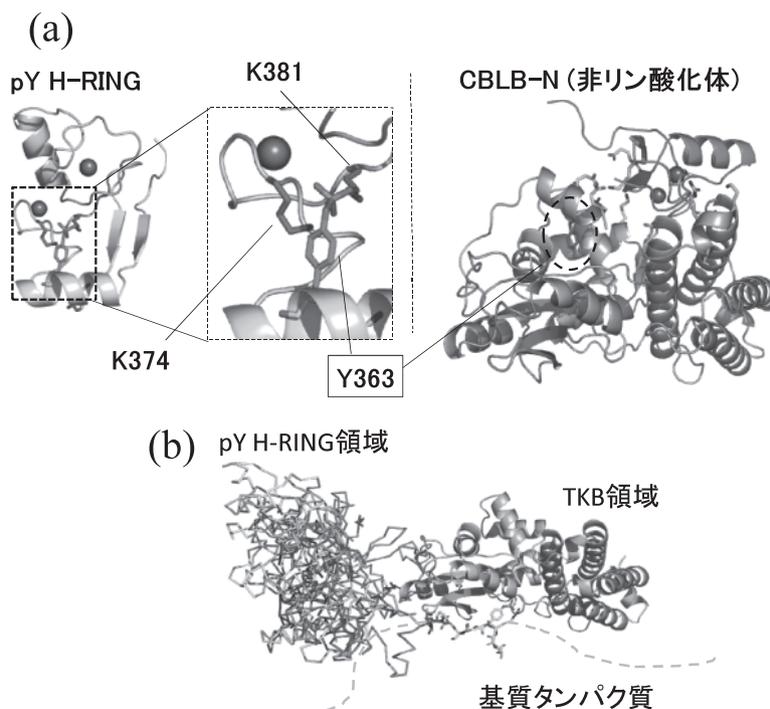


図2 CBLB-Nのリン酸化による構造変化
 (a) リン酸化H-RINGの溶液構造(左)と非リン酸化CBLB-N(右)の構造比較, (b) リン酸化CBLB-Nのモデル構造

領域と Helix linker 領域が相互作用することでこの領域はコンパクトな構造を有していた。pY363のリン酸基がRING領域内にあるK374とK381により形成される塩基性領域と塩橋を形成することでコンパクトな構造が安定化されるからである。一方、非リン酸化状態においてY363はTKB領域に突き刺さっていた(図2b右)。Helix linker領域内のY363およびRING領域内のK374およびK381からなる塩基性領域はY363のリン酸化に伴い相互作用相手を切り替えることで開構造を安定化している。

次に、リン酸化CBLB-N(以下pY CBLB-N)のモデル構造を構築した(図2b)。H-RING領域とTKB領域の間のリンカー長は4残基であるが、これに基づきランダム構造を発生させたところ、RINGドメインが基質側に近接することが示唆された。リン酸化CBLB-Nの結晶構造¹²⁾もこれを支持していた。一方で、動的挙動に関してはX線結晶構造解析とNMRでは大きく異なった結果が得られている。結晶構造ではRINGとTKBが相互作用することで二つのドメインの相対配置が固定されているが、NMRではこれらの二つの領域は独立して挙動するとの情報が得られている。今後さらなる検証が必要であろう。

6. Cbl タンパク質のリン酸化による活性制御モデル

NMRに基づく構造動態解析により、Cblタンパク質の制御モデルを構築した(図3)。非リン酸化状態においては閉状態と部分開状態の平衡状態にあり、平衡は閉状態に偏っている。Helix linker領域のチロシンのリン酸化により開構造へと平衡が偏る。これにより、自己阻害が解除されCblタンパク質は活性化される。

7. おわりに

NMRおよびX線結晶構造解析の結果より、Cblタンパク質の活性制御においてHelix linker領域が重要な役割を担うことが明らかとなった。この領域はc-Cblにおけるがん変異のホットスポットであることが明らかにされており、病因メカニズムの解明が進展していくと期待される。

本研究では安定同位体標識を工夫することで「見たい領域のみを見る」というNMRの利点を活用することにより、翻訳後修飾に伴う構造および動態の変化を容易にかつ高精度で検出することが可能であることを示した。本稿で述べた方法はドメイン間相互作用の動的な変化を伴う系の解析

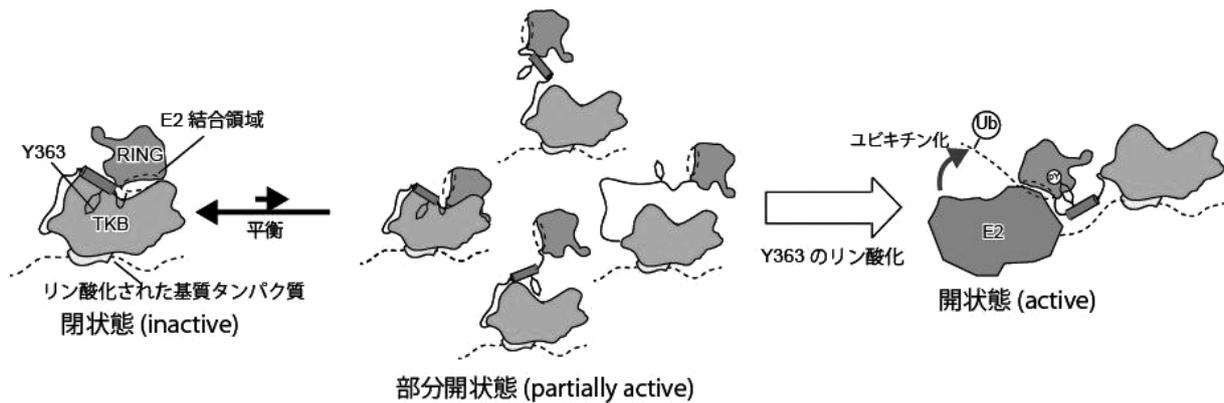


図3 Cblタンパク質の制御モデル

に有効な手法であり、今後、マルチドメインタンパク質の機能動態の解析にNMRは活用されていくであろう。

- 1) Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., & Yarden, Y. (1999) *Mol. Cell*, **4**, 1029–1040.
- 2) Thien, C.B. & Langdon, W.Y. (2005) *Biochem. J.*, **391**, 153–166.
- 3) Caligiuri, M.A., Briesewitz, R., Yu, J., Wang, L., Wei, M., Arnoczky, K.J., Marburger, T.B., Wen, J., Perrotti, D., Bloomfield, C.D., & Whitman, S.P. (2007) *Blood*, **110**, 1022–1024.
- 4) Dunbar, A.J., Gondek, L.P., O’Keefe, C.L., Makishima, H., Rataul, M.S., Szpurka, H., Sekeres, M.A., Wang, X.F., McDevitt, M.A., & Maciejewski, J.P. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 10349–10357.
- 5) Sanada, M., Suzuki, T., Shih, L.Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Oda, H., Yamagata, T., Takita, J., Gotoh, N., Nakazaki, K., Kawamata, N., Onodera, M., Nobuyoshi, M., Hayashi, Y., Harada, H., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, H., Ozawa, K., Omine, M., Hirai, H., Nakauchi, H., Koefler, H. P., & Ogawa, S. (2009) *Nature*, **460**, 904–908.
- 6) Jeon, M.S., Atfield, A., Venuprasad, K., Krawczyk, C., Sarao, R., Elly, C., Yang, C., Arya, S., Bachmaier, K., Su, L., Bouchard, D., Jones, R., Gronski, M., Ohashi, P., Wada, T., Bloom, D., Fathman, C.G., Liu, Y.C., & Penninger, J.M. (2004) *Immunity*, **21**, 167–177.
- 7) Bachmaier, K., Krawczyk, C., Koziaradzki, I., Kong, Y.Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., Le, J., Ohashi, P. S., Sarosi, I., Nishina, H., Lipkowitz, S., & Penninger, J.M. (2000) *Nature*, **403**, 211–216.
- 8) Yokoi, N., Fujiwara, Y., Wang, H.Y., Kitao, M., Hayashi, C., Someya, T., Kanamori, M., Oiso, Y., Tajima, N., Yamada, Y., Seino, Y., Ikegami, H., & Seino, S. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 37–42.
- 9) Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D., & Pavletich, N.P. (2000) *Cell*, **102**, 533–539.
- 10) Kassenbrock, C.K. & Anderson, S.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 28017–28027.
- 11) Kobashigawa, Y., Tomitaka, A., Kumeta, H., Noda, N.N., Yamaguchi, M., & Inagaki, F. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20579–20584.
- 12) Dou, H., Buetow, L., Hock, A., Sibbet, G.J., Vousden, K.H., & Huang, D.T. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 184–192.
- 13) Kobashigawa, Y., Kumeta, H., Ogura, K., & Inagaki, F. (2009) *J. Biomol. NMR*, **43**, 145–150.
- 14) Mao, H., Hart, S.A., Schink, A., & Pollok, B.A. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2670–2671.
- 15) Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A.M.J.J. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1731–1737.

小橋川 敬博[#], 稲垣 冬彦

(北海道大学大学院先端生命科学研究院,

[#]現所属: 熊本大学大学院生命科学研究部(薬))

Structural basis for phosphorylation induced regulation mechanism of human cancer and autoimmune diseases related ubiquitin ligase Cbl

Yoshihiro Kobashigawa[#] and Fuyuhiko Inagaki (Department of Structural Biology, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, N-21, W-11, Kita-ku, Sapporo 001-0021, Japan; [#]presently with Department of Analytical and Biophysical Chemistry, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 5-1 Ooe-honcho, Chuou-ku, Kumamoto, Kumamoto 862-0973, Japan)