みにれびゆう

応機構の解明にとってますます重要となってくるであろう.

ここで紹介した筆者らの研究は、香川大学希少糖研究センター何森教授らの研究グループとの共同研究である.X線回折データ収集は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory、および SPring-8 にて行った.

- Granström, T.B., Takata, G., Tokuda, M., & Izumori, K. (2004) J. Biosci. Bioeng., 97, 89–94.
- Itoh, H., Okaya, H., Khan, A.R., Tajima, S., Hayakawa, S., & Izumori, K. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2168–2171.
- Kim, K., Kim, H.-J., Oh, D.-K., Cha, S.-S., & Rhee, S. (2006) J. Mol. Biol., 361, 920–931.
- Yoshida, H., Yamada, M., Nishitani, Y., Takada, G., Izumori, K., & Kamitori, S. (2007) J. Mol. Biol., 374, 443–453.
- Leang, K., Takada, G., Fukai, Y., Morimoto, Y., Granstrom, T. B., & Izumori, K. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, 1674, 68– 77.
- Yoshida, H., Yamada, M., Ohyama, Y., Takada, G., Izumori, K., & Kamitori, S. (2007) J. Mol. Biol., 365, 1505–1516.
- Fenn, T.D., Ringe, D., & Petsko, G.A. (2004) Biochemistry, 43, 6464–6474.
- Takeda, K., Yoshida, H., Takada, G., Izumori, K., & Kamitori, S. (2008) Acta Crystallogr. Sect. F, 64, 945–948.
- Seemann, J.E. & Schulz, G.E. (1997) J. Mol. Biol., 273, 256– 268.
- 10) Kovalevsky, A.Y., Katz, A.K., Carrell, H.L., Hanson, L., Mustyakimov, M., Fisher, S., Coates, L., Schoenborn, B.P., Bunick, G.J., Glusker, J.P., & Langan, P. (2008) *Biochemistry*, 47, 7595–7597.

吉田 裕美,神鳥 成弘 (香川大学総合生命科学研究センター)

Catalytic reaction mechanisms of the enzymes producing rare sugars based on X-ray structures

Hiromi Yoshida and Shigehiro Kamitori (Life Science Research Center & Faculty of Medicine, Kagawa University, 1750–1 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761–0793, Japan)

K63 結合型ポリユビキチン鎖選択的な脱ユ ビキチン化機構

## 1. ユビキチンとユビキチン鎖

ユビキチン (Ub) はタンパク質分解のシグナルとして

知られる<sup>1)</sup>.分解される基質タンパク質には,鎖状に繋 がった複数個のUbが共有結合により付加される.それを 目印として認識したプロテアソームは,基質タンパク質を 分解する.このUb-プロテアソームによるタンパク質分解 システムは,真核細胞に必須のシステムであり,その発見 に対して2004年にノーベル化学賞が授与されている.近 年では,タンパク質分解以外にも様々な細胞内プロセスを 制御するシグナル分子としてUbが機能することも明らか になってきており,その重要性はますます注目されている.

通常, Ubは、自身のC末端に保存されたグリシン残基 と分解される基質タンパク質のリジン残基とのイソペプチ ド結合を介して基質タンパク質に付加されるが、自身のリ ジン残基を介して連続的に繋がることにより、ポリ Ub 鎖 と呼ばれるポリマーを形成する.実際には、七つのリジン 残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) に加えて, N末端のアミノ基を介して直鎖状に繋がることもできるた め、結合に使われるリジン残基やアミノ基の違いによっ て、形と機能の異なる8種類のポリUb鎖が合成され る<sup>2,3)</sup>. 生体内で最も豊富に存在するのは、プロテアソーム による分解シグナルとして働く K48 結合型のポリ Ub 鎖で あるが,それ以外の結合型のポリ Ub 鎖については.完全 にその機能が理解されているわけではない.しかしなが ら、K63 結合型ポリ Ub 鎖については、DNA 修復や受容 体の下方制御などにおいて重要なシグナルとして機能する ことが報告されている<sup>2,4,5)</sup> (図1A).

#### 2. 特定のユビキチン鎖を見分ける機構

生体内には繋がり方の異なるポリ Ub 鎖が存在している が、Ub 鎖とそれを認識するタンパク質との複合体の立体 構造の情報はほとんど無い.数少ない例の一つとして,K63 結合型ポリ Ub 鎖の合成を行う Ub 連結酵素(E2)である Ubc13・Mms2 複合体の例があげられる<sup>6</sup>. Ubc13・Mms2 複合体とUbとの複合体の結晶構造解析では、Ubc13・ Mms2 複合体に結合した Ub 分子の C 末端 G76 が,結晶内 で隣に接触している Ub 分子の K63 の近傍に位置してい た.したがって、この隣のUb分子とUbc13・Mms2複合 体との相互作用は、選択的に K63 結合型 Ub 鎖を合成する 際に起きている状況と同様であると解釈できた.また, Ub-associated (UBA) ドメインと K48 結合型 Ub 二量体と の複合体の結合モデルが予測されていたが<sup>7,8</sup>, K63 結合型 Ub 鎖と結合タンパク質との複合体の構造決定の例は報告 されておらず K63 結合型 Ub 鎖を特異的に認識するメカニ ズムはほとんど解明されていなかった.







(A) K48 結合型と K63 結合型のユビキチン鎖 (B) AMSH-LP 単体の結晶構造 (C) AMSH-LP と K63-Ub<sub>2</sub> との複合体の結晶構造

## 3. 脱 Ub 化 酵素

脱 Ub 化酵素は、Ub の C 末端のカルボキシル基を介し て形成されるペプチド結合あるいはイソペプチド結合を加 水分解により切断するプロテアーゼである. 脱 Ub 化酵素 は、アミノ酸配列の相同性に基づいて、Ub-specific protease (USP), Ub C-terminal hydrolase (UCH), otubain protease (OTU), Machado-Joseph disease protease (MJD), JAB1/ MPN/Mov34 metalloenzyme (JAMM)の5種類のファミリー に分類される<sup>®</sup>. このうち, USP, UCH, OTU, MJD の4 種類は、活性残基としてシステイン残基を利用するシステ インプロテアーゼであるのに対して, JAMM は活性に Zn<sup>2+</sup>を必要とする亜鉛プロテアーゼである.これまでに, 4種のシステインプロテアーゼ様脱 Ub 化酵素の結晶構造 は決定されていたが(このうち MJD 以外の3種類は Ub との複合体として決定されている), JAMM の立体構造は

決定されていなかった. JAMMには、今回私たちが構造 決定に成功した AMSH (associated molecule with the SH3 domain of STAM) ファミリー (AMSH および AMSH-LP), 26S プロテアソーム上で Ub 鎖を切断する Rpn11/POH1 や ヒストン H2B の脱 Ub 化を行う MYSM1, 乳がん関連遺伝 子産物 BRCA1 と共に働く BRCC36 などの重要なタンパク 質が含まれており、その立体構造と切断機構の解明が待た れていた.

## 4. 脱 Ub 化酵素 AMSH と AMSH-LP

チロシンキナーゼ様受容体などの受容体は、リガンドと 結合して活性化した後に、細胞内領域に K63 結合型のポ リ Ub 鎖が付加され、エンドサイトーシスにより細胞内に 取り込まれる5,100.取り込まれた受容体は、エンドソーム を経て、多胞体と呼ばれる特徴的な構造体を形成し、最終 的にリソソームに取り込まれて分解される. この輸送過程

#### 

みにれびゆう

において, AMSH とそのホモログである AMSH-LP は, ポ リ Ub 化された受容体から K63 結合型のポリ Ub 鎖をエン ドソーム上で除去することにより, 受容体を再び細胞膜上 にリサイクルする役割を担う. 私たちは, K63 結合型のポ リ Ub 鎖を選択的に切断する脱 Ub 化酵素である AMSH ファミリーに注目し, その結晶構造を決定することによっ て, K63 結合ポリ Ub 鎖選択的な認識・切断機構を解明す ることに成功した<sup>III</sup>.

## 5. AMSH-LP の立体構造

前述の JAMM ファミリーの脱 Ub 化酵素と相同性はあ るが,脱 Ub 化活性を持たないタンパク質は,古細菌から ヒトまでいくつか存在し,それらの結晶構造から JAMM コアと呼ばれる基本骨格の立体構造は明らかになってい た<sup>9)</sup>. AMSH-LP の触媒ドメインは,この JAMM コア構造 と 2 箇所の AMSH ファミリーに特徴的な挿入領域(Ins-1 と Ins-2) によって構成されている(図 1B). Ins-1 が一組 の逆平行  $\beta$  シートとそれに続く  $\alpha$  ヘリックスから構成さ れているのに対して, Ins-2 は 1 本の  $\alpha$  ヘリックスとそれ に続く長いループ構造から構成されている.そのループ構 造上にある Cys402, His408, His410 は, JAMM コア上の His362 と共に Zn<sup>2+</sup>を配位して, Ins-2 の構造を安定化して いる.

#### 6. Ins-2と触媒コアによる近傍側の Ub 分子の認識

私たちは、AMSH-LPの基質である K63 結合型 Ub 二量 体(K63-Ub<sub>2</sub>)を酵素学的に合成し、AMSH-LPとK63-Ub<sub>2</sub> との複合体の結晶構造を決定した<sup>11)</sup>(図1C). K63 結合型 Ub 鎖の認識には、(Ub 化されたタンパク質から見て)近 傍側のUbの認識が必要である. AMSH-LPの触媒ドメイ ンと K63-Ub<sub>2</sub> 複合体の結晶構造では, 近傍側の Ub は, Ins-2 の Zn<sup>2+</sup>を配位したループ部分と触媒ドメインの His349 か ら Leu356 までのループによって形成される窪みに収まる ように結合している (図 2A). Ub の Gln62 と Glu64 の側 鎖は、Thr353 および Ser358 と水素結合を形成することで 認識され、さらに、UbのLys63の側鎖のメチレン基は、 AMSH-LPの Phe355と Phe407 によって挟まれる. 脱 Ub 化反応におけるこれらの相互作用の役割を調べるため, Thr353, Ser358, Phe355, Phe407をアラニン残基に, ま た、Cys402をセリン残基に置換した変異体を作成し、反 応速度論的解析を行った(表1).その結果,全ての変異 体で,結合の強さを表す Km 値は野生型と変わらないか, あるいは、わずかに減少したのに対して、反応の速さを表

表 1	AMSH-LP	変異体の速度論的解析
10.1	AMDIT-LI	文六件*ノ①/2 12 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11

	AMSH-LP	$K_{\rm m}(\mu { m M})$	$k_{\rm cat} \times 10^{-3} ({\rm s}^{-1})$
	wt	$71.8 \pm 6.3$	$860 \pm 65.4$
近 傍 側 Ubと の 相互作用	T353A F355A S358A C402S F407A	76.8 $\pm$ 11.7 58.9 $\pm$ 10.4 75.1 $\pm$ 8.2 33.9 $\pm$ 2.4 30.2 $\pm$ 4.6	$\begin{array}{c} 46.3 \pm 3.7 \\ 5.33 \pm 0.30 \\ 82.8 \pm 5.3 \\ 2.14 \pm 0.12 \\ 24.9 \pm 1.7 \end{array}$
先 端 側 Ub と の 相互作用	F332A M370A	$897 \pm 25.8$ $1277 \pm 110.4$	$528 \pm 60.9$ $487 \pm 50.8$

す kaa 値は大きく減少した.この結果から,近傍側の Ub との相互作用によって,Lys63 を介して結合した Ub だけ が適切に配置・配向し,選択的に切断されることが確かめ られた.

### 7. Ins-1と触媒コアによる先端側の Ub 分子の認識

一般的に、Ubの認識には、Ile44の周辺に形成された疎 水性の領域が重要であることが知られている. AMSH-LP の触媒ドメインと K63-Ub2 複合体においては、先端側の Ubの Ile44 を中心とする疎水領域が、AMSH-LPの Phe332 と Val328 によって認識されている(図 2B). さらに、そ の裏側にあたる分子表面にも Leu69, Ile36, Leu71 などで 形成される疎水性のポケットが存在し、この疎水性のポ ケットが、AMSH-LPのMet370によって認識されている. 脱 Ub 化反応におけるこれらの相互作用の役割を調べるた め、Phe332 と Met370 をアラニン残基に置換した変異体を 作成し、反応速度論的解析を行った(表1).その結果、 両変異体共に、kat値は野生型と変わらないが、Km値が大 きく増加した.この結果は、先端側のUbの認識がUb鎖 との親和性に強く影響していることを示しており、近傍側 の Ub の認識が反応速度に寄与しているのとは対照的で あった.

## AMSH ファミリーによるイソペプチド結合の 加水分解機構

先端側のUbの尾部(Leu73からGly76)は、Ins-1の $\beta$ シートと逆平行 $\beta$ シートを形成すると共に、触媒コア上の残基とも水素結合ネットワークを形成する.これらの認識により、切断を受けるイソペプチド結合は活性に直接関与する Zn<sup>2+</sup>の近くに正確に配置される.

亜鉛プロテアーゼによるペプチド結合の加水分解メカニ ズムは、古くから研究されており、例えば、典型的な亜鉛





図2 AMSH-LPとK63-Ub<sub>2</sub>との相互作用 (AMSH-LPの残基を黒で,Ubの残基をグレーでラベルした.)
(A) AMSH-LPと近傍側のUb分子との相互作用
(B) AMSH-LPと先端側のUb分子との相互作用
(C)サーモリシンの活性部位
(D) AMSH-LPの活性部位

プロテアーゼであるサーモリシンと反応中間体を模したリ ン酸を含むペプチドとの複合体の結晶構造が報告されてい る<sup>12</sup> (図 2C).サーモリシンと AMSH-LP は,活性に Zn<sup>2+</sup> が必要であるということ以外に共通性は無いが,Zn<sup>2+</sup>とそ の配位子が重なるように,それぞれの基質との複合体の結 晶構造を重ね合わせると,切断を受ける共有結合の配置・ 配向は一致する (図 2C).したがって,亜鉛プロテアーゼ によるペプチド結合の加水分解と AMSH などの JAMM ファミリーによるイソペプチド結合の加水分解は,同様の メカニズムで行われると考えられる.

## 9. 他の JAMM ファミリーとの比較

ヒトの JAMM タンパク質は 14 種類あると予測されてお り,そのうち AMSH, AMSH-LP, BRCC36, Rpn11/POH1, MYSM1, CSN5の6種類のタンパク質が,UbやUb様の タンパク質に対してイソペプチダーゼ活性を持つと報告さ れている<sup>9,13,14)</sup>. これらのタンパク質のアミノ酸配列は多様 であり,AMSH-LPとの比較によって基質特異性などの議 論をすることは難しい.しかし,どのタンパク質も, AMSHファミリー同様に,JAMMコアに二つの挿入領域 が付加されている.先端側のUbとの相互作用様式は, JAMMファミリーに保存されていると考えられ,AMSH-LP 同様に,先端側のUbのIle44を中心とする疎水表面と その裏側の疎水ポケットを認識し,同時に,尾部がIns-1 に対応する領域とβシートを形成して,切断されるイソ ペプチド結合を活性部位に配置する機構が備わっていると 予想される.一方,基質選択性に寄与するIns-2に対応す る領域が,他のJAMMファミリーでどのような役割を担

うのかについては,他の JAMM ファミリーの立体構造決 定を待たなくてはならない.

#### 10. 特定の Ub 鎖を選択的に切断する機構

特定のUb 鎖を選択的に切断する脱Ub化酵素として, K63 結合型や直鎖状のポリUb 鎖を選択的に切断する CYLD (cylindromatosis) やK48 結合型のポリUb 鎖を選択 的に切断するOTU1 などが知られている<sup>15~17)</sup>. CYLD は USPファミリーに属し,OTU1は,OTUファミリーに属 する.残念ながら,これら2種類の酵素とUb 鎖との複合 体の結晶構造は報告されていないが,切断実験や結合実験 の結果は,これら2種類の酵素も,AMSHファミリーと 同様に,主に先端側のUb との結合でアフィニティーを獲 得し,さらに近傍側のUbが特定の結合型の場合のみ適切 に配置することでイソペプチド結合を正確に活性部位に収 めるというストラテジーで結合型選択的な切断を行うこと を示唆している.このメカニズムが正しいことを明らかに するためにも,これらの脱Ub化酵素とUb 鎖との複合体 の結晶構造の決定が待たれる.

- Glickman, M.H. & Ciechanover, A. (2002) *Physiol. Rev.*, 82, 373–428.
- Wickliffe, K., Williamson, A., Jin, L., & Rape, M. (2009) Chem. Rev., 109, 1537–1548.
- 3) Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., & Iwai, K. (2006) *EMBO J.*, 25, 4877–4887.
- 4) Hofmann, K. (2009) DNA Repair (Amst), 8, 544-556.
- 5) Miranda, M. & Sorkin, A. (2007) Mol. Interv., 7, 157-167.
- Eddins, M.J., Carlile, C.M., Gomez, K.M., Pickart, C.M., & Wolberger, C. (2006) Nat. Struct. Mol. Biol., 13, 915–920.
- 7) Trempe, J.F., Brown, N.R., Lowe, E.D., Gordon, C., Campbell,

I.D., Noble, M.E., & Endicott, J.A. (2005) *EMBO J.*, 24, 3178–3189.

- Varadan, R., Assfalg, M., Raasi, S., Pickart, C., & Fushman, D. (2005) Mol. Cell, 18, 687–698.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma ,T.K., & Bernards, R. (2005) *Cell*, 123, 773–786.
- 10) Clague, M. & Urbe, S. (2006) Trends Cell Biol., 16, 551-559.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., & Fukai, S. (2008) *Nature*, 455, 358–362.
- 12) Gupta, S.P. (2007) Chem. Rev., 107, 3042-3087.

みにれびゆう

- 13) Zhu, P., Zhou, W., Wang, J., Puc, J., Ohgi, K.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Glass, C.K., & Rosenfeld, M.G. (2007) *Mol. Cell*, 27, 609–621.
- Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L. A., Xia, B., Livingston, D.M., & Greenberg, R.A. (2007) *Science*, 316, 1198–1202.
- 15) Wang, T., Yin, L., Cooper, E.M., Lai, M.Y., Dickey, S., Pickart, C.M., Fushman, D., Wilkinson, K.D., Cohen, R.E., & Wolberger, C. (2009) *J. Mol. Biol.*, 386, 1011–1023.
- 16) Komander, D., Lord, C.J., Scheel, H., Swift, S., Hofmann, K., Ashworth, A., & Barford, D. (2008) *Mol. Cell*, 29, 451–464.
- 17) Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J.D.F., Odenwaelder, P., Wilkinson, K.D., & Barford, D. (2009) *EMBO Rep.*, 10, 466–473.

# 深井 周也 (東京大学放射光連携研究機構生命科学部門/ 分子細胞生物学研究所)

Mechanism for de-ubiquitination of K 63-linked polyubiquitin chains

Shuya Fukai (Life Science Division, Synchrotron Radiation Research Organization and Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, General Research Bldg 211, 1–1–1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113–0032, Japan)