

特集：次世代シグナル伝達研究—先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開—

ユビキチンシグナルの構造生物学

西 増 弘 志, 石 谷 隆 一 郎, 濡 木 理

ユビキチンは76残基からなる小さなタンパク質で、七つのリシン残基、および、N末端のメチオニン残基を介して連結することで8種類のポリユビキチン鎖を形成する。ポリユビキチン鎖はそれぞれ特定のタンパク質によって選択的に認識され、さまざまな生命現象にかかわる。本稿では、直鎖状ポリユビキチン鎖の関与するNF- κ B経路を中心にユビキチンシグナルに関する構造生物学研究の最近の進展について紹介する。

1. はじめに

ユビキチンは真核生物に高度に保存されたタンパク質で、タンパク質分解へと導く標識分子として発見された。ユビキチンは76残基からなり、七つのリシン残基(Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63)をもつ。ユビキチン分子のリシン残基の ϵ アミノ基は別のユビキチン分子のC末端グリシン残基のカルボキシ基とイソペプチド結合を形成し分岐鎖状ポリユビキチン鎖を形成する。また、ユビキチン分子のN末端メチオニン残基の α アミノ基は別のユビキチン分子のC末端グリシン残基とペプチド結合を形成し直鎖状ポリユビキチン鎖を形成する。さらに、ポリユビキチン鎖のC末端グリシン残基は標的タンパク質の特定のリシン残基とイソペプチド結合を形成することで、標的タンパク質はポリユビキチン化される。8種類のポリユビキチン鎖はさまざまなユビキチン結合ドメイン(UBD)によって選択的に認識され、タンパク質分解、DNA修復、シグナル伝達など多岐にわたる生命現象にかかわる¹⁾。

2. NF- κ Bシグナル伝達経路

NF- κ Bは腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン1 β (IL-1 β)などの炎症性サイトカイン、Toll様受容体リガンドなどの刺激によって活性化される転写因子で、炎症応答や免疫制御、細胞の増殖、アポトーシスなどにかかわる遺伝子の発現を調節する²⁾(図1)。NF- κ Bは阻害タンパク質であるI κ B(inhibitor of κ B)と結合し細胞質に存在する。細胞が刺激されると、IKK α (I κ B kinase α)、IKK β (I κ B kinase β)、および、活性調節サブユニットであるNEMO(NF- κ B essential modulator)からなるIKK複合体が活性化され、I κ B α をリン酸化する。リン酸化されたI κ B α はK48型ポリユビキチン化され、プロテアソームにより分解される。I κ B α が分解されると、NF- κ Bは核に移行し、さまざまな遺伝子の発現を亢進させる。刺激依存的なIKK複合体の活性化にはK63型ポリユビキチン鎖がかかわると考えられてきたが³⁾、近年、ユビキチンリガーゼLUBAC(linear ubiquitin assembly complex)により形成される直鎖状ポリユビキチン鎖がIKK複合体の活性化に重要な役割をはたすことが明らかになってきた⁴⁻⁷⁾。

3. IKK複合体

1) NEMO

NEMOは二つのヘリカルドメイン(HLX1, HLX2)、二つのCC(coiled-coil)ドメイン(CC1, CC2)、LZ(leucine zipper)ドメイン、ZF(zinc finger)ドメインからなり、様々なタンパク質と相互作用することでNF- κ Bを活性化する⁸⁾(図2A)。近年、NEMOの各ドメインの結晶構造が相次い

東京大学理学系研究科生物化学専攻(〒113-0032 東京都文京区弥生2-11-16)

Structural biology of ubiquitin signaling

Hiroshi Nishimasu, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki
(Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2-11-16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032)

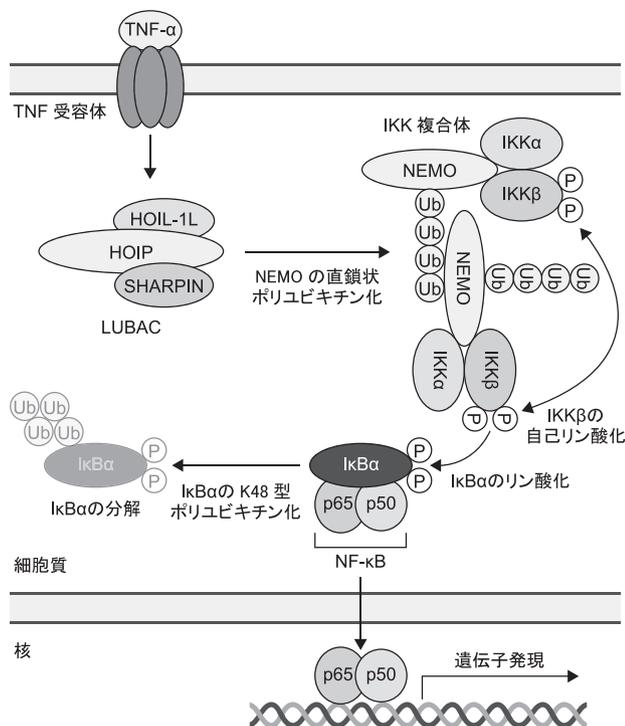


図1 LUBACにより誘導されるNF-κBシグナル伝達経路

で報告され、NEMOが様々なタンパク質と相互作用し、NF-κBを活性化に導く分子機構が明らかになってきた。

NEMOのHLX1とCC1はキナーゼ結合ドメインを形成し、IKKβのNEMO結合ドメインと相互作用する。2008年、IKKβのNEMO結合ドメインとNEMOのキナーゼ結合ドメインとの複合体の結晶構造が報告され、IKKβのNEMO結合ドメインとNEMOのキナーゼ結合ドメインは四つのαヘリックスからなるヘリックスバンドル構造をとることが明らかとなった⁹⁾(図2B)。NEMOのキナーゼ結合ドメインは湾曲したαヘリックス構造をとり二量体を形成していた。IKKβのNEMO結合ドメインはαヘリックス構造をとり、NEMOと相互作用していた。

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスに由来するvFLIPタンパク質はNEMO HLX2に結合し、NF-κBの恒常的な活性化を引き起こす。2008年、NEMO HLX2とvFLIPとの複合体の結晶構造が報告された¹⁰⁾(図2B)。NEMO HLX2はコイルドコイル構造の二量体を形成しており、その両側に2分子のvFLIPが対称的に結合していた。vFLIP分子は両方のNEMO分子と相互作用しており、vFLIPの結合によってNEMO二量体が安定化されることでNF-κBの活性化を引き起こす可能性が示唆された。

NEMOのCC2とLZからなる領域はUBAN (ubiquitin binding in ABIN and NEMO proteins)ドメインと呼ばれ、ユビキチンとの結合にかかわることが報告されていたが、その機能の詳細は不明だった。NEMO UBANは直鎖状ジ

ユビキチンと強く結合する一方、よく似た構造をもつK63結合型ジユビキチンとの結合は弱い¹¹⁾。2009年、NEMO UBANの単体、および、直鎖状ジユビキチンとの複合体の立体構造が決定され、NEMOが直鎖状ポリユビキチン鎖を認識する分子機構が解明された^{11,12)}(図2B)。NEMO UBANはコイルドコイル構造の二量体を形成しており、その両側に二つの直鎖状ジユビキチンが対称的に結合していた。遠位ユビキチンは主にIle44パッチとC末端領域を介してNEMOと相互作用していた一方、近位ユビキチンは主にPhe4パッチを介してNEMOと相互作用していた(ジユビキチン分子中の二つのユビキチン分子のうち、標的タンパク質に近いユビキチン分子を近位ユビキチン、遠いユビキチン分子を遠位ユビキチンと呼ぶ)。K63型ジユビキチン中の二つのユビキチン分子は同時にNEMO UBANと相互作用できないために、NEMO UBANはK63型ジユビキチンと強く結合できないと考えられた。実際、NEMO UBANとK63型ジユビキチンとの複合体構造中でNEMO UBANはK63型ジユビキチンの遠位ユビキチンとのみ結合していた¹³⁾。

2008年、NEMO ZFドメインの溶液構造が報告された¹⁴⁾(図2B)。NEMO ZFは他のユビキチン結合タンパク質と同様にユビキチンのIle44疎水性パッチと相互作用し、NF-κBの活性化にかかわることが示唆された。NEMO ZFとユビキチンとの結合は弱いことから、NEMO ZFはNEMO UBANとポリユビキチン鎖との間の結合を補助する役割をもつと考えられた。最近、NEMO ZFはIκBαと結合することでIKKβの基質特異性を制御することが報告された¹⁵⁾。

二次構造予測から、NEMOのHLX1からLZはひとつづきのコイルドコイル構造をとっており、LZとZFは柔軟なループでつながっていると推測される。各ドメインの結晶構造からもNEMOは長いコイルドコイル構造をとっていることが示唆される。このような非常に単純な分子構造をもつNEMOが複雑なシグナル伝達経路をたくみに制御し生命の維持に必須な役割をはたしているのは実に興味深い。

2) IKKβ

2011年、IKKβの結晶構造が解明され、IKKβはキナーゼドメイン、UBL (ubiquitin-like)ドメイン、二量体化ドメイン、NEMO結合ドメインからなることが明らかとなった¹⁶⁾(図2A, B)。二つのIKKβ分子は6本のαヘリックスからなる二量体化ドメインを介して二量体を形成していた。キナーゼドメイン、UBLドメイン、二量体化ドメインは互いに相互作用していた。IKKαとIKKβはホモ/ヘテロ二量体の両方を形成することができることと一致して、二量体化にかかわるアミノ酸残基はIKKαとIKKβの間で高度に保存されていた。IKKβのUBLドメイ

ンと二量体化ドメインは I κ B α の C 末端と相互作用することで、I κ B α の N 末端をキナーゼドメインの活性部位に適切に配置する役割をもつことが示唆された。二量体化ドメインは IKK β の酵素活性には必要ではなかったが、NEMO との相互作用、および、自己リン酸化活性に重要だった。NF- κ B の活性化には NEMO の直鎖状ポリユビキチン化、および、NEMO による直鎖状ポリユビキチン鎖の認識の両方が必要である^{4,11}。これらの結果から、IKK 複合体中の NEMO に付加した直鎖状ポリユビキチン鎖が他の IKK 複合体中の NEMO によって認識され、IKK 複合体中の IKK β 同士が近接することにより IKK 複合体の活性化 (IKK β の自己リン酸化) が促進する可能性が考えられる。

4. LUBAC

LUBAC は HOIP, HOIL-1L, SHARPIN からなる約 600 kDa の E3 ユビキチンリガーゼ複合体で、NEMO や RIP1 に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することにより NF- κ B 経路を活性化する^{4-7,17}。HOIP は ZF, 二つの NZF (Npl4 zinc finger), UBA (ubiquitin-associated), 二つの RING (really interesting new gene), IBR (in between RING fingers) の七つのドメインからなる (図 2C)。HOIL-1L は UBL, NZF, 二つの RING, IBR の五つのドメインからなり、SHARPIN は PH (pleckstrin homology), UBL, NZF の三つのドメインからなる (図 2C)。直鎖状ポリユビキチン鎖形成活性は HOIP の RING-IBR-RING からなる RBR (RING in between RING) 領域が担っている。HOIP UBA は HOIL-1L UBL, SHARPIN UBL と相互作用し、三者複合体を形成する⁷。さらに、HOIP NZF2 は SHARPIN UBL と相互作用する⁶。HOIL-1L や SHARPIN は HOIP の安定化に寄与する。

HOIL-1L の NZF ドメインは直鎖状ポリユビキチン鎖を特異的に認識する¹⁸。2011 年、HOIL-1L NZF と直鎖状ジユビキチンとの複合体構造が報告された¹⁸ (図 2D)。HOIL-1L NZF はコア領域とテイル領域からなり、コア領域は近位ユビキチンの Phe4 付近の疎水性表面、および、遠位ユビキチンの Ile44 付近の疎水性表面と相互作用していた。テイル領域は近位ユビキチンと相互作用していた。近位ユビキチンの Lys63 の ϵ アミノ基は遠位ユビキチンの Gly76 とは離れており、HOIL-1L NZF は K63 型ポリユビキチン鎖中の隣接した二つのユビキチン分子とは同時に相互作用することはできないと考えられた。これらの結果から、HOIL-1L は直鎖状ポリユビキチン鎖中の隣接した二つのユビキチン分子と同時に相互作用することにより、直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に認識していると考えられた。HOIL-1L と直鎖状ポリユビキチン鎖との結合は LUBAC の酵素活性には影響しないが、NF- κ B の活性化に重要であった。したがって、NEMO や RIP1 に付加された直鎖状ポリユビキチン鎖と HOIL-1L NZF との相互作用を

介して LUBAC が TNF シグナル伝達複合体に集合することが効率的な直鎖状ポリユビキチン鎖形成に重要と考えられた。

2012 年、HOIP UBA と HOIL-1L UBL との複合体構造が報告された¹⁹ (図 2E)。結晶化に用いられた HOIP (残基 480~636) は九つの α ヘリックスからなっていた。HOIP UBA は既知の UBA と同様なヘリックスバンドル ($\alpha 6 \sim \alpha 8$) を形成していたが、HOIP UBA-HOIL-1L UBL 間の相互作用様式は、既知の UBA-UBL とは異なることが明らかとなった。

結晶構造から SHARPIN の N 末端は PH フォールドをもち、ホモ二量体を形成することが明らかとなった²⁰ (図 2F)。しかし、PH ドメイン同士の親和性は低く ($K_d = \sim 0.1$ mM), PH ドメインは LUBAC の直鎖状ポリユビキチン化活性には必須ではない。また、PH ドメインの NF- κ B 活性化への関与は調べられておらず、その生理的な意義は不明である。

最近、精製した組換え HOIP RBR を用いた生化学的な解析により、HOIP RBR が直鎖状ポリユビキチン鎖形成活性をもつことが報告された^{21,22}。今後、結晶構造解析により、HOIP RBR が触媒する直鎖状ポリユビキチン鎖形成反応の分子機構が解明されることが期待される。

5. A20

直鎖状/K63 型ポリユビキチン鎖はシグナル伝達因子が集合する足場としてはたらく NF- κ B 経路を活性化させる。A20 などの脱ユビキチン化酵素 (DUB) は NF- κ B の活性化に応じて発現し、ポリユビキチン鎖を分解することにより NF- κ B の活性化を抑制する。A20 は OTU ファミリーに属する DUB ドメインと七つの ZF からなる (図 2G)。A20 の OTU ドメインは RIP1 に付加した K63 型ポリユビキチン鎖を分解し、4 番目の ZF (ZF4) が RIP1 に K48 型ポリユビキチン鎖を付加することで NF- κ B を抑制する²³。

A20 の OTU ドメインの結晶構造から、OTU ドメインは他のシステインプロテアーゼとよく似ており、共通の反応機構が示唆された^{24,25} (図 2H)。活性部位の分子表面は保存性が高く、ユビキチンとの相互作用にかかわると考えられたが、OTU ドメインとユビキチンとの複合体構造は決定されておらず、A20 が K48 型/K63 型ポリユビキチンの両方を分解する分子基盤は不明である。

2010 年、ZF4 とモノユビキチンとの複合体構造が報告された²⁶ (図 2I)。結晶構造中で ZF4 は三つのユビキチン分子 (Ub1~Ub3) と相互作用しており、Ub1, Ub2 の Lys 63 の側鎖はそれぞれ Ub2, Ub3 の C 末端の近傍に位置していたことから、ZF4 は K63 型ポリユビキチン鎖を特異的に認識する可能性が示唆された。実際、ZF4 は K48 型/直鎖状ポリユビキチン鎖よりも K63 型ポリユビキチン鎖

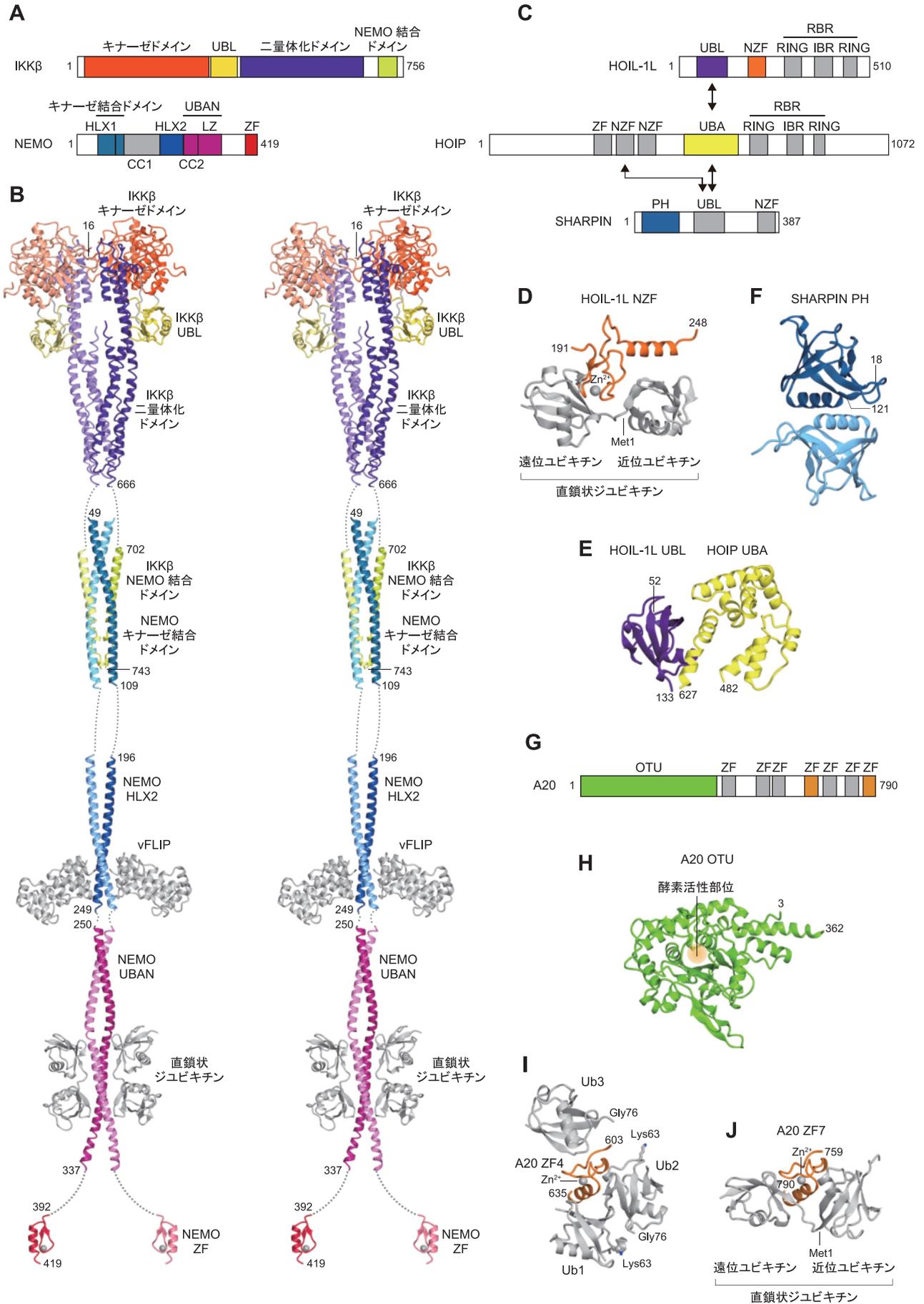


図 2

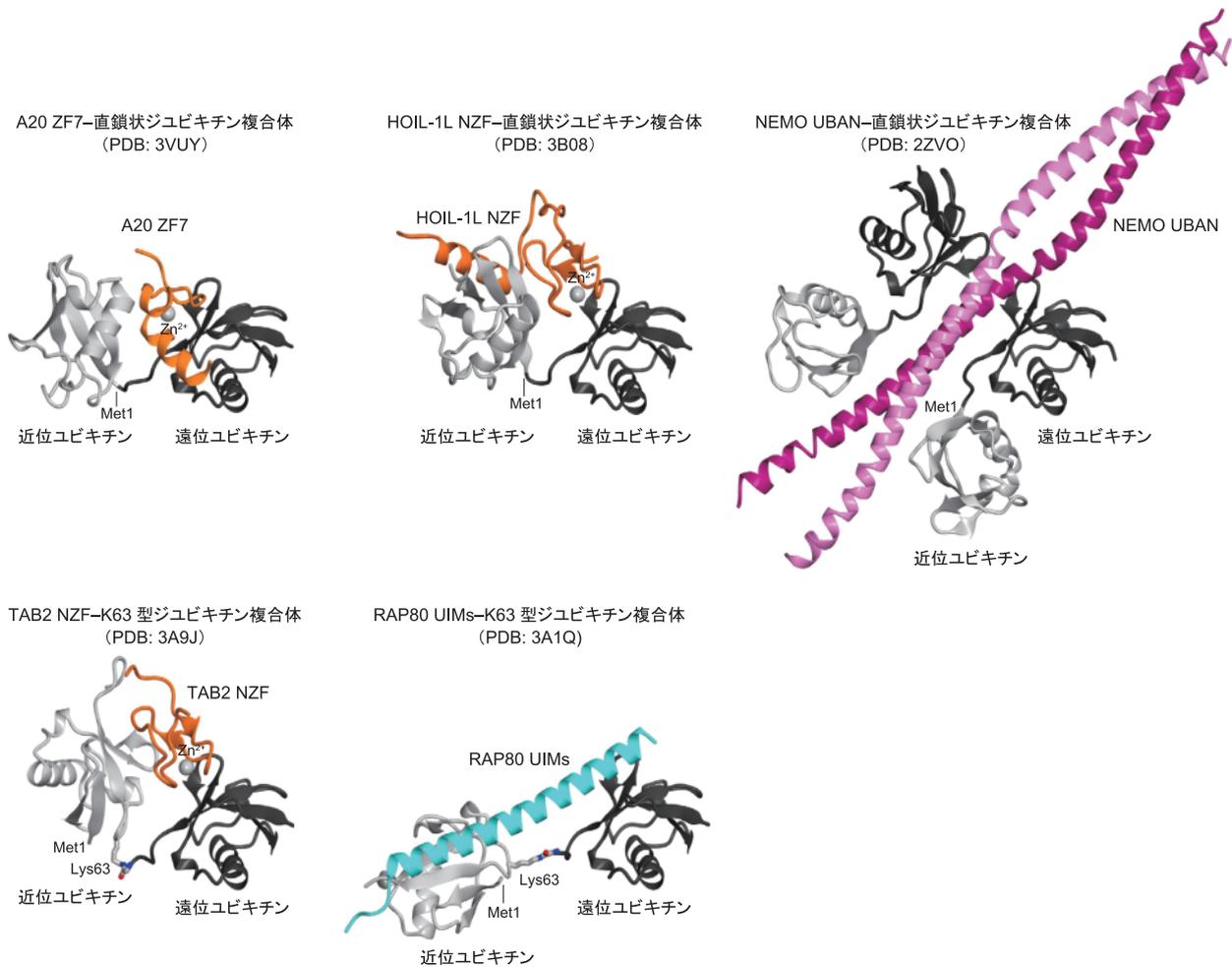


図3 UBDによる直鎖状/K63型ジユビキチンの認識機構

UBD-直鎖状/K63型ユビキチン複合体は遠位ユビキチンを基準として向きをそろえて示した。

に強く結合し、ZF4とユビキチンとの間の結合はNF- κ Bの抑制に重要だった。これらの結果から、ZF4とK63型ポリユビキチン鎖との間の相互作用を介してA20はRIP1を含むTNF受容体複合体に集合しNF- κ Bを抑制すると考えられた。しかし、ZF4とK63型トリユビキチンとの複合体の結晶構造は決定されておらず、実際にZF4が三つのユビキチン分子と同時に相互作用することでK63型ポリユビキチン鎖を選択的に認識しているかは不明である。

最近、われわれはA20が直鎖状ポリユビキチン鎖に結

合することによりNF- κ B経路を抑制することを発見した²⁷⁾。予想外なことに、NF- κ Bの抑制にはOTUドメインは関与せず、7番目のZF (ZF7)が重要だった。GSTプルダウンアッセイや等温滴定カロリーメトリーにより、ZF7はK48型/K63型ジユビキチンとは結合せず、直鎖状ジユビキチンと選択的に結合することが明らかとなった。さらに、ZF7と直鎖状ジユビキチンとの複合体構造を決定し、ZF7は二つのユビキチン分子の間にはまり込むように結合していることを明らかにした(図2J)。ZF7は近位ユビキ

図2 IKK, LUBAC, A20の立体構造

- (A) IKK β , NEMOのドメイン構造。Bの結晶構造はAと同様に着色した。
 (B) IKK複合体の立体構造(ステレオ図)。IKK β (PDB: 3QA8), IKK β NEMO結合ドメイン-NEMOキナーゼドメイン複合体 (PDB: 3BRV), NEMO HLX2-vFLIP複合体 (PDB: 3CL3), NEMO UBAN-直鎖状ジユビキチン複合体 (PDB: 2ZVO), NEMO ZF (PDB: 2JVX)を示した。立体構造が未知の部分を点線で示した。
 (C) LUBACのドメイン構造。D, E, Fの結晶構造はCと同様に着色した。
 (D) HOIL-1L-直鎖状ジユビキチン複合体の結晶構造 (PDB: 3B08)。
 (E) HOIL-1L UBL-HOIP UBA複合体の結晶構造 (PDB: 4DBG)。
 (F) SHARPIN PHドメインの結晶構造 (PDB: 4EMO)。
 (G) A20のドメイン構造。H, I, Jの結晶構造はGと同様に着色した。
 (H) A20 OTUドメインの結晶構造 (PDB: 3DKB)。
 (I) A20 ZF4-モノユビキチン複合体の結晶構造 (PDB: 3OJ3)。
 (J) A20 ZF7-直鎖状ジユビキチン複合体の結晶構造 (PDB: 3VUY)。

チンの α ヘリックス領域、および、遠位ユビキチンの Ile 44 付近の疎水性パッチと相互作用していた。免疫沈降実験により、ZF7 と直鎖状ポリユビキチン鎖との相互作用を介して A20 は TNF 受容体複合体に集積し、刺激依存的に TNF 受容体複合体に集積する LUBAC や IKK 複合体などの NF- κ B 活性化因子の解離を促すことにより、NF- κ B を抑制することが示唆された。ZF7 の欠損やアミノ酸変異は、B 細胞リンパ腫を引き起こすことが報告されており²⁸⁾、B 細胞リンパ腫を引き起こすアミノ酸変異 (N772K/E781D) をもつ A20 変異体は直鎖状ポリユビキチン鎖との結合が減弱していた。結晶構造から Asn772 と Glu781 はユビキチンとの相互作用にかかわることが明らかとなった。したがって、ZF7 の欠損や変異により直鎖状ポリユビキチン鎖への結合力が低下すると、A20 の TNF 受容体複合体への集積が減弱し、NF- κ B が活性化された状態が持続することで病態発症につながることを示唆された。

6. UBD による直鎖状/K63 型ポリユビキチン鎖認識機構

直鎖状ジユビキチン、および、K63 型ジユビキチンの結晶構造から、両者はよく似た伸びた構造をとることが明らかとなった²⁹⁾。隣接したユビキチン分子同士はほとんど相互作用していないことから、両者は柔軟なコンホメーションをとることが示唆された。最近の 1 分子 FRET 解析からも直鎖状/K63 型ポリユビキチン鎖は溶液中で柔軟なコンホメーションをとっていることが示されている³⁰⁾。このため、特定の UBD が直鎖状/K63 型ジユビキチンを識別し選択的に結合する分子機構は大きな謎であったが、最近決定された複数の UBD-直鎖状/K63 型ジユビキチン複合体の立体構造から、その分子機構が明らかとなってきた。NEMO UBAN-直鎖状ジユビキチン複合体¹⁾、HOIL-1L NZF-直鎖状ジユビキチン複合体¹⁸⁾、および、A20 ZF7-直鎖状ジユビキチン複合体²⁷⁾の結晶構造から、NEMO UBAN、HOIL-1L NZF、A20 ZF7 は直鎖状ジユビキチン中の近位/遠位ユビキチン連結領域 (Met1-Gly76 間のペプチド結合) を直接的に認識していないことが明らかとなった (図 3)。また、TAB2/3 NZF-K63 型ジユビキチン複合体^{31,32)}、RAP80 UIMs-K63 型ジユビキチン複合体³³⁾の結晶構造からも、TAB2/3 NZF と RAP80 UIMs は K63 型ジユビキチン中の近位/遠位ユビキチン連結領域 (Lys63-Gly76 間のイソペプチド結合) を直接的に認識していないことが明らかとなった (図 3)。注目すべきことに、これらの複合体中の直鎖状/K63 型ジユビキチンはさまざまなコンホメーションをとっていた。これらの結晶構造から、UBD は直鎖状/K63 型ジユビキチン中の連結領域を認識するのではなく、隣接した二つのユビキチン分子と同時に相互作用することにより、直鎖状/K63 型ジユビキチンがとり得る特定のコンホメーションを認識していることが示唆された。

7. おわりに

シグナル伝達研究において、分子間相互作用は免疫沈降実験などで得られるゲル上のバンドに基づいて議論されることが多いが、微妙な実験条件の違いによってもバンドの出方は変化する可能性がある。実際、一流誌に報告されているにもかかわらず、筆者ら自身が精製タンパク質を用いて検証してみると相互作用が再現しないことも少なくない。シグナル伝達経路の理解には、結晶構造、および、立体構造に基づく機能解析により、タンパク質をゲル上のバンドとしてだけでなく立体構造をもつ分子としてとらえ分子機構を解明していくことが重要であろう。

最近の研究の進展により、UBD によるポリユビキチン鎖認識機構が解明されてきたが、不明な点は多く残されている。例えば、これまでに知られている UBD は隣接する二つのユビキチン分子と同時に相互作用することによって直鎖状/K63 型ポリユビキチン鎖を識別しているが、直鎖状/K63 型ポリユビキチン鎖中の隣接した三つ以上のユビキチン分子を認識するような UBD はないのだろうか？ また、特定のコンホメーションをとった UBD-直鎖状/K63 型ポリユビキチン複合体を認識することで NF- κ B シグナル経路を制御するような因子はないのだろうか？ ユビキチンシグナル研究のさらなる進展が期待される。

文 献

- 1) Kulathu, Y. & Komander, D. (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 508–523.
- 2) Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2008) *Cell*, **132**, 344–362.
- 3) Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., & Chen, Z.J. (2000) *Cell*, **103**, 351–361.
- 4) Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., & Iwai, K. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 123–132.
- 5) Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W., Nachbur, U., Gangoda, L., Warnken, U., Purcell, A.W., Silke, J., & Walczak, H. (2011) *Nature*, **471**, 591–596.
- 6) Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skanland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek, B., & Dikic, I. (2011) *Nature*, **471**, 637–641.
- 7) Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., & Iwai, K. (2011) *Nature*, **471**, 633–636.
- 8) Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., & Israel, A. (1998) *Cell*, **93**, 1231–1240.
- 9) Rushe, M., Silvian, L., Bixler, S., Chen, L.L., Cheung, A., Bowes, S., Cuervo, H., Berkowitz, S., Zheng, T., Guckian, K.,

- Pellegrini, M., & Lugovskoy, A. (2008) *Structure*, **16**, 798–808.
- 10) Bagneris, C., Ageichik, A.V., Cronin, N., Wallace, B., Collins, M., Boshoff, C., Waksman, G., & Barrett, T. (2008) *Mol. Cell*, **30**, 620–631.
- 11) Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S., & Dikic, I. (2009) *Cell*, **136**, 1098–1109.
- 12) Lo, Y.C., Lin, S.C., Rospigliosi, C.C., Conze, D.B., Wu, C.J., Ashwell, J.D., Eliezer, D., & Wu, H. (2009) *Mol. Cell*, **33**, 602–615.
- 13) Yoshikawa, A., Sato, Y., Yamashita, M., Mimura, H., Yamagata, A., & Fukai, S. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 3317–3322.
- 14) Cordier, F., Vinolo, E., Veron, M., Delepiepierre, M., & Agou, F. (2008) *J. Mol. Biol.*, **377**, 1419–1432.
- 15) Schrofelbauer, B., Polley, S., Behar, M., Ghosh, G., & Hoffmann, A. (2012) *Mol. Cell*, **47**, 111–121.
- 16) Xu, G., Lo, Y.C., Li, Q., Napolitano, G., Wu, X., Jiang, X., Dreano, M., Karin, M., & Wu, H. (2011) *Nature*, **472**, 325–330.
- 17) 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.
- 18) Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S.E., Iwai, K., & Fukai, S. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20520–20525.
- 19) Yagi, H., Ishimoto, K., Hiromoto, T., Fujita, H., Mizushima, T., Uekusa, Y., Yagi-Utsumi, M., Kurimoto, E., Noda, M., Uchiyama, S., Tokunaga, F., Iwai, K., & Kato, K. (2012) *EMBO Rep.*, **13**, 462–468.
- 20) Stieglitz, B., Haire, L.F., Dikic, I., & Rittinger, K. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 20823–20829.
- 21) Smit, J.J., Monteferrario, D., Noordermeer, S.M., van Dijk, W. J., van der Reijden, B.A., & Sixma, T.K. (2012) *EMBO J.*, **31**, 3833–3844.
- 22) Stieglitz, B., Morris-Davies, A.C., Koliopoulos, M.G., Christodoulou, E., & Rittinger, K. (2012) *EMBO Rep.*, **13**, 840–846.
- 23) Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V., & Dixit, V.M. (2004) *Nature*, **430**, 694–699.
- 24) Komander, D. & Barford, D. (2008) *Biochem. J.*, **409**, 77–85.
- 25) Lin, S.C., Chung, J.Y., Lamothe, B., Rajashankar, K., Lu, M., Lo, Y.C., Lam, A.Y., Darnay, B.G., & Wu, H. (2008) *J. Mol. Biol.*, **376**, 526–540.
- 26) Bosanac, I., Wertz, I.E., Pan, B., Yu, C., Kusam, S., Lam, C., Phu, L., Phung, Q., Maurer, B., Arnott, D., Kirkpatrick, D.S., Dixit, V.M., & Hymowitz, S.G. (2010) *Mol. Cell*, **40**, 548–557.
- 27) Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., & Nureki, O. (2012) *EMBO J.*, **31**, 3856–3870.
- 28) Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y., & Ogawa, S. (2009) *Nature*, **459**, 712–716.
- 29) Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J.D., Odenwaelder, P., Wilkinson, K.D., & Barford, D. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 466–473.
- 30) Ye, Y., Blaser, G., Horrocks, M.H., Ruedas-Rama, M.J., Ibrahim, S., Zhukov, A.A., Orte, A., Klenerman, D., Jackson, S.E., & Komander, D. (2012) *Nature*, **492**, 266–270.
- 31) Kulathu, Y., Akutsu, M., Bremm, A., Hofmann, K., & Komander, D. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1328–1330.
- 32) Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., & Fukai, S. (2009) *EMBO J.*, **28**, 3903–3909.
- 33) Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., & Fukai, S. (2009) *EMBO J.*, **28**, 2461–2468.
-