

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 癌・パーキンソン病の解明を目指したユビキチンリガーゼ複合体の結晶構造に関する基礎的研究

2 研究者氏名: 水島 恒裕

3 研究の狙い:

ユビキチン - プロテアソームタンパク質分解経路は生体内において立体構造異常タンパク質や細胞周期において役割を終えた制御タンパク質を特異的に分解することにより細胞を維持する役割を担っている。この反応経路は分解すべきタンパク質に分解の目印としてユビキチンを付加するユビキチン経路とユビキチンの付加された標的タンパク質を分解するプロテアソームから構成されており、ユビキチン経路において分解すべきタンパク質を選び出しユビキチンを付加する役割を担うのがユビキチンリガーゼである。そして、生体内には標的タンパク質に対応した多くのユビキチンリガーゼが存在している。その中の SCF<sup>Fbs1</sup> は複合体を形成することにより獲得した合理的なシステムによりタンパク質の品質管理の役割を担い、Parkin は常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症候群に参与している。本研究ではこれらユビキチンリガーゼを生体内で機能する状態で立体構造を決定することにより、タンパク質分解における標的タンパク質の認識機構の解明を目指した。

4 研究成果:

(1) 糖鎖認識ユビキチンリガーゼ複合体 SCF<sup>Fbs1</sup> における糖鎖認識部位の X 線結晶構造解析

SCF<sup>Fbs1</sup> はユビキチン - プロテアソームタンパク質分解経路において糖鎖を目印として分解すべき標的タンパク質にシグナル分子であるユビキチンを付加する役割を担っている。そして、この糖鎖をタンパク質分解の目印とする生体機能はこれまでにない新しい糖鎖の役割であり、ユビキチンリガーゼにおける新規の標識であった。本研究では SCF<sup>Fbs1</sup> の糖鎖認識サブユニットである Fbs1 の糖鎖認識領域を欠失した変異体を作製することにより決定し、X 線結晶構造解析により糖鎖認識部位単独および糖鎖との複合体として立体構造を決定した。

Fbs1 糖鎖認識部位の全体構造は 10 本の逆平行 シートからなる サンドイッチ構造であり、この構造はこれまでに知られていたレクチンと類似したものであった。しかし、Fbs1 ではこれまでに立体構造の知られたレクチンが シートで糖鎖と結合していたのに対し、分子先端のループ領域で糖鎖と結合しており糖鎖認識は異なるものであった。また、糖鎖との複合体構造より Fbs1 糖鎖認識部位は疎水性のポケットにより糖蛋白質の根元部分に当たるキトビオースを特異的に識別していることが明らかになった。そして、この結果は糖鎖結合部位を変異させたタンパク質を用いた結合実験と活性測定からも確認された。さらに、この特異的なキトビオースとの結合は水素結合により厳密に決定付けられており、Fbs1 は糖タンパク質の糖鎖の根元を厳密に認識し結合することにより標的となる糖蛋白質をユビキチン付加のために固定、配向させていることを明らかにした。

(2) SCF<sup>Fbs1</sup> ユビキチンリガーゼにおける Skp1-Fbs1 複合体の X 線結晶構造解析

SCF<sup>Fbs1</sup> は Skp1-Cullin1-Fbs1-Rbx1 から構成された 4 分子複合体であり、Fbs1 は Skp1 を介して複合体の骨格である Cullin1、Rbx1、ユビキチン結合酵素と複合体を形成することにより、ユビキチンリガーゼとして機能している。これまでに Skp1-Cullin1-Rbx1-Fbox の立体構造が報告されていることから SCF<sup>Fbs1</sup> の生体内における複合体様式を理解するため Skp1-Fbs1 複合体の X 線結晶構造解析を行い立体構造を決定した。

Skp1-Fbs1 は L 字型の全体構造をとり、この立体構造を基にした SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体モデルの作製により糖タンパク質をユビキチン化するための機構を明らかにした。

## 5 自己評価:

ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Fbs1</sup> の X 線結晶構造解析により、高分解能での糖鎖認識部位の立体構造、糖鎖との複合体構造を決定すると共に Skp1-Fbs1 複合体の立体構造を決定したことは、新しい糖鎖の役割を理解する上で重要な成果であった。また、これまでに立体構造が報告された他の SCF 型ユビキチンリガーゼでは活性に関与する領域などを抽出し不安定と考えられる部分を除いた状態で構造解析を行っていたのに対し、本研究による Skp1-Fbs1 複合体の構造解析では完全な状態で行った。しかし、当初の研究計画であった SCF ユビキチンリガーゼの完全な複合体状態の立体構造解析は構造決定には至らず、他のグループの結果を基にしたモデル構築となった。

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症候群に関与するユビキチンリガーゼである Parkin の構造解析では、タンパク質の発現や安定性の問題などから結晶化が行えず当初計画した立体構造解析および機能解析は行えなかった。しかし、Parkin では当初困難であった大腸菌による大量発現系をタンパク質の融合や共発現により確立した。そして、この結果は Parkin の機能解析において利用することができた。

さきがけ研究の一番の目標とした SCF<sup>Fbs1</sup> ユビキチンリガーゼの生体内で機能する完全な状態での立体構造を決定し、複合体形成により獲得した機能に迫るといった目的は達成できなかったが、糖鎖認識部位と共に Skp1-Fbs1 複合体の立体構造を決定できたことは大きな成果であった。今後はさきがけ研究の経験を生かし、複合体や通常の方法では構造解析の困難なタンパク質の大量発現系構築および構造解析を行い、生体内で機能する完全な状態での立体構造を決定し機能の理解を進めていきたい。

## 6 研究総括の見解:

ユビキチンリガーゼ複合体の糖鎖認識機構領域の構造決定に成功し、糖鎖認識機構を明らかにした。X線結晶構造解析により直接蛋白質の構造を決定して、構造形成の仕組みを明らかにするという本領域の当初の構想における代表的成果と評価する。今後生体内での完全な状態での立体構造決定に挑戦してほしい。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Mizushima T, Hirao T, Yoshida Y, Lee S J, Chiba T, Iwai K, Yamaguchi Y, Kato K, Tsukihara T, Tanaka K, Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 365-370, 2004

### 出版物

1. Mizushima T, Tsukihara T, The Proteasome as a Drug Target. *Protein Crystallography in Drug Discovery. Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, **20**, 83-98, 2003
2. ユビキチンリガーゼの構造生物学 水島恒裕, 実験医学, 羊土社 **22**, 29-36, 2004
3. ユビキチンシステムの構造生物学 水島恒裕, 医学のあゆみ, **211**, 17-22, 2004

### 招待講演

1. 水島恒裕 ユビキチン-プロテアソームシステムの構造機能と新しい創薬研究 名古屋大学超小型放射光シンポジウム, 名古屋, 2003年6月5日
2. 水島恒裕, Lee Soo Jae, 千葉智樹, 吉田雪子, 月原富武, 田中啓二 ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Fbx2</sup> における糖鎖認識の構造学的理解 日本蛋白質科学会, 北海道, 2003年6月25日

### 学会発表等

6件