

HECT

型ユビキチンリガーゼに保存されているヒンジループ領域がタンパク質動態およびユビキチン翻訳後修飾に与える影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-05-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 史典, Kobayashi, Fuminori メールアドレス: 所属: 金沢大学, 金沢大学, 金沢大学
URL	http://hdl.handle.net/2297/00051487

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博士論文

HECT 型ユビキチンリガーゼに保存されているヒンジループ領域が
タンパク質動態 およびユビキチン翻訳後修飾に与える影響

The effect of hinge loop region preserved in HECT-type ubiquitin
ligase on protein dynamics and post-translational modification of
ubiquitination

金沢大学大学院自然科学研究科

自然システム学専攻

学 籍 番 号 1524062006

氏 名 小林 史典

主任指導教員名 紺野 宏記

提 出 年 月 2018 年 1 月 4 日

目次

略語リスト	1
要旨	2
第 1 章 序論	
1-1 背景・研究目的.....	4
1-2 Ub と Ub 化修飾	7
1-3 Ub 化システム	9
1-4 HECT 型ユビキチンリガーゼ(HECT 型 E3)	12
1-5 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)	16
第 2 章 E6AP^{HECT} の高速 AFM 観察と C-lobe の動態の解析	
2-1 概要.....	18
2-2 材料と方法	
2-2-1 E6AP ^{HECT} の高速 AFM (HS-AFM) 観察.....	20
2-2-2 AFM 画像解析	20
2-2-3 His-E6AP ^{HECT} _{Wt} =Ub の単離条件の検討.....	21
2-2-4 His-E6AP ^{HECT} _{Wt} ~Ub の単離	22
2-3 結果	
2-3-1 野生型 HECT ドメイン(E6AP ^{HECT} _{Wt})の HS-AFM 観察と解析	23
2-3-2 AFM シミュレーション像の作製.....	24
2-3-3 E6AP ^{HECT} _{Wt} C-lobe の移動距離の経時変化.....	24
2-3-4 ヒンジループ柔軟性阻害変異体(E6AP ^{HECT} _{PPPP})の HS-AFM 観察	25
2-3-5 His-E6AP ^{HECT} _{Wt} =Ub の単離条件の検討.....	25
2-3-6 His-E6AP ^{HECT} _{Wt} ~Ub の単離	27
2-3-7 His-E6AP ^{HECT} _{Wt} ~Ub の HS-AFM 観察.....	28

2-4 考察	
2-4-1 E6AP ^{HECT} のHS-AFM観察とC-lobeの動態の解析.....	29
2-4-2 Ub化されたE6AP ^{HECT} の分離.....	31
2-5 図表.....	33

第3章 E6AP^{HECT}のヒンジループのUb化活性への影響の検証

3-1 概要.....	48
3-2 材料と方法	
3-2-1 各種タンパク質のクローニング・発現および精製	
3-2-1-1 E6AP ^{HECT} _{Wt} , E6AP ^{HECT} _{PPPP} のクローニング、発現および精製 ...	51
3-2-1-2 UBE1(E1)のクローニング、発現および精製.....	52
3-2-1-3 UbcH7(E2)のクローニング、発現および精製.....	53
3-2-1-4 各種Ubのクローニング、発現および精製.....	54
3-2-2 UbcH7(E2)~Ubの分離.....	56
3-2-3 In vitro Ub化反応.....	56
3-3 結果	
3-3-1 各種Ub化酵素と各種Ubのクローニング・発現及び精製	
3-3-1-1 UBE1(E1)の精製.....	58
3-3-1-2 UbcH7(E2)の精製.....	58
3-3-1-3 His-E6AP ^{HECT} _{WT} およびHis-E6AP ^{HECT} _{PPPP} の精製.....	59
3-3-1-4 各種Ub (Ub ^{Wt} , Ub ^{G76C} , Ub ^{K48R} , Ub ^{K-less} , His-Ub ^{K-less})の精製.....	60
3-3-2 UbcH7(E2)~Ubの分離.....	61
3-3-3 His-tagのUb化活性への影響の検証.....	61
3-3-4 His-E6AP ^{HECT} _{WT} とHis-E6AP ^{HECT} _{PPPP} のUb転移の活性比較.....	62

3-3-5	各種 Ub 変異体を用いた Ub ₂ の結合部位の同定	62
3-3-6	His-E6AP ^{HECT} による Ub ₂ の形成機構	64
3-3-7	全長 E6AP と His-E6AP ^{HECT} の Ub 化活性比較	66
3-4	考察	
3-4-1	His-E6AP ^{HECT} _{WT} と His-E6AP ^{HECT} _{PPPP} の Ub 化活性比較	68
3-4-2	E6AP ^{HECT} による Ub ₂ の形成機構	68
3-4-3	E6AP ^{HECT} によって形成される Ub ₂ の結合部位の同定	70
3-4-4	全長 E6AP の Ub 化活性 Ub ₂ 形成の検証	71
3-5	図表	73
第 4 章	考察・総括	91
参考文献	93
謝辞	98
試薬リスト	99

略語リスト

Ub : ubiquitin (ユビキチン)

Ub 化 : ubiquitination(ユビキチン化)

E1 : Ubiquitin activating enzyme (ユビキチン活性化酵素)

E2 : Ubiquitin conjugating enzyme (ユビキチン結合酵素)

E3 : Ubiquitin protein ligase (ユビキチンリガーゼ)

HECT : Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus

UBE1: Human Ubiquitin Activating Enzyme

UbcH7: [遺伝子名 : UBE2L3(Ubiquitin conjugating enzyme E2L 3)]

E6AP : E6-Associated Protein [遺伝子名 : UBE3A(Ubiquitin protein ligase E3A)]

E1~Ub : E1-Ub チオエステル複合体

E2~Ub : E2-Ub チオエステル複合体

E6AP^{HECT}_Wt : E6AP の野生型 HECT ドメイン

E6AP^{HECT}_PPPP : E6AP の変異型 HECT ドメイン(ヒンジループ柔軟性阻害変異体)

E6AP^{HECT}~Ub : E6AP^{HECT}-Ub チオエステル複合体

E6AP^{HECT}=Ub : E6AP^{HECT}-Ub 架橋複合体

AFM : Atomic Force Microscope (原子間力顕微鏡)

要旨

タンパク質の翻訳後修飾の1つであるユビキチン化は、ユビキチン(Ub)をユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ(E3) の順に転移させ、最終的に基質タンパク質へと付加する反応系である。基質タンパク質への Ub の付加は、Ub の C 末端グリシン(Gly)のカルボキシ基と基質タンパク質上のリジン(Lys)の ϵ -アミノ基間のイソペプチド結合によって生じる。さらに、基質タンパク質上に付加された Ub の Lys 残基は、他の Ub の C 末端 Gly 残基との間でもイソペプチド結合によって連結するため、最終的に基質タンパク質上に Ub がいくつか連なったポリ Ub 鎖が形成される。また、Ub は 7 つの Lys 残基を持っているため、これらの内のどの Lys 残基を使用するかによって様々な形状のポリ Ub 鎖が形成される。このように、Ub 化はポリ Ub 鎖の構造的多様性を利用することで、タンパク質分解、DNA 修復、シグナル伝達などの生体内の多くの反応を制御している。

E3 は、Ub 化される基質タンパク質を選択し、さらに基質タンパク質上に形成するポリ Ub 鎖の鎖型も決定する最も重要な因子であり、基質の Ub 化修飾の方法の違いから大きく 2 つに分類される。その 1 つである HECT 型 E3 は、C 末端に HECT ドメインを有し、E2 ~Ub チオエステル複合体から Ub を一旦 HECT ドメイン内の触媒システイン(Cys)残基に受け取り、その後に基質タンパク質に付加する特徴的な酵素である。この HECT 型 E3 の活性中心である HECT ドメインは、E2 結合部位を有する N-lobe 領域、Ub 結合部位を有する C-lobe 領域、これら 2 つの lobe を連結している Hinge loop から構成されている。

これまでの構造生物学的解析から、HECT 型 E3 による Ub 転移には、Hinge loop の柔軟性による大きな構造的再配置が必要であるという仮説が導かれている。しかし、Ub 化における HECT ドメインの動的な分子メカニズムは未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、タンパク質の構造とダイナミクスを同時に観察できる高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いて、野生型 E6AP HECT ドメイン(E6AP^{HECT-Wt})と Hinge loop のアミノ酸配列を GSRN から PPPP へ置換したヒンジループ柔軟性阻害変異型 E6AP

HECT ドメイン(E6AP^{HECT_PPPP})を観察し、Hinge loop の柔軟性の阻害が HECT ドメインの動態と Ub 化活性に与える影響を明らかにすることを試みた。

今回、高速 AFM を用いたリアルタイム観察により、E6AP^{HECT_Wt} の N-lobe の周りの C-lobe の動的移動を初めて実証するとともに、E6AP^{HECT_PPPP} の液中における構造状態も明らかにした。さらに、In vitro Ub 化分析から、E6AP^{HECT_Wt} と E6AP^{HECT_PPPP} の両方で Ub₂ が形成され、Ub₂ の形成効率に HECT ドメインの Hinge loop の柔軟性が大きく関与していることも明らかにした。また、Ub 変異体を用いた Ub₂ 鎖型特異性の検証から、Ub₂ 鎖型特異性のために全長 E6AP の N 末端領域の重要性も実証した。

第 1 章 序論

1-1 背景・研究目的

ユビキチン (Ub) は、76 アミノ酸からなる真核生物において高度に保存されたタンパク質であり、タンパク質の重要な翻訳後修飾の 1 つであるユビキチン化(Ub 化)に用いられている[1]。標的タンパク質の Ub 化は、Ub 活性化酵素 (E1)、Ub 結合酵素 (E2)、および Ub リガーゼ (E3) を含む一連の酵素カスケードが、標的タンパク質上の Lys の ϵ -アミノ基と Ub の C 末端 Gly 残基のカルボキシ基間のイソペプチド結合を形成させることで達成される[2-5]。

さらに、これらの酵素反応系は、標的タンパク質上に様々な構造のポリ Ub 鎖を形成させる[6-7]。形成されるポリ Ub 鎖の構造の違いは、Ub 間のイソペプチド結合に Ub 内の 7 つの Lys 残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) または Ub の N 末端 Met 残基(M1) のいずれかが使用されることで生じる[6-8]。形成された様々な Ub 鎖は、それぞれ異なる細胞内プロセスに関連していることが明らかになっている[6-13]。例えば、K48-ポリ Ub 鎖は基質をプロテアソームによるタンパク質分解に導き[12]、K63-ポリ Ub 鎖は DNA 修復およびシグナル伝達に関与し[13]、さらに直鎖状ポリ Ub 鎖(M1 鎖)は NF- κ B 活性に関与している[7-11]。

E3 は、標的基質タンパク質を選択し、基質上に形成する Ub 鎖型を決定する最も重要な因子である[14,15]。E3 は Ub 化修飾機構の違いによって、HECT 型 E3 と RING 型 E3 に大きく分類される。RING 型 E3 は、E2 から基質タンパク質に直接的に Ub を付加するための足場として機能している[16]。一方、HECT 型 E3 は標的タンパク質に Ub を転移させる前に、Ub の C 末端 Gly 残基のカルボキシ基と HECT 型 E3 内の触媒性 Cys 残基との間にチオエステル結合を形成する[17,18]。

HECT 型 E3 は、N 末端に基質認識部位を有し、C 末端に HECT ドメインを有している。

N 末端領域は多様であり、その N 末端ドメインの構造に基づいて 3 つのグループに分類されている [WW ドメインを含む Nedd4 ファミリー、RDL(RCC1 様 domain)を含む HERC(HECT and RCC1-like domain)ファミリー、その他の HECT 型 E3] [19]。また、C 末端の HECT(homologous of E6AP carboxyl-terminus)ドメインは、Ub とチオエステル結合する触媒性 Cys 残基を含む約 350 アミノ酸からなるドメインとして定義され、すべての HECT 型 E3 に高度に保存されている。「他の」 HECT 型 E3 の一つである E6AP(E6-associated protein)は、発癌性ヒトパピローマウイルス(HPV16/18)に由来する E6 タンパク質と相互作用して、がん抑制因子 p53 を Ub 化し、プロテアソーム分解系へと導く [40-43]。また、E6AP の機能不全は神経変性疾患であるアンジェルマン症候群に関与することが知られている [20]。

HECT ドメインは、E2 結合部位を含む N-lobe と Ub とチオエステル結合を形成する触媒性 Cys 残基を含む C-lobe からなり、これらの 2 つの lobe は柔軟なヒンジループによって連結されている。現在、構造生物学的解析から E2 から HECT ドメインへの Ub 転移機構を理解することに関連した 2 つの知見が報告されている。1 つ目は、3 つの HECT ドメインの結晶構造を比較すると、E2 の触媒性 Cys 残基と HECT ドメインの触媒性 Cys 間の距離が、それぞれ E6AP(L 字型)は約 4.1 nm、WWP1(逆 T 字型)は約 1.6 nm、Nedd4(触媒構造)は 0.8 nm 以内であり、E2 から Ub を受け取れるように C-lobe が接近している [21-23]。2 つ目は、N-lobe と C-lobe を連結しているヒンジループに、柔軟性を制限するような変異を導入すると、標的タンパク質への Ub 転移が消失する [22]。これらの結果から、HECT 型 E3 による Ub 転移には、2 つの lobe を連結する柔軟性ヒンジループを介した大きな構造的再配置が必須であるという仮説が導かれている。したがって、HECT 型 E3 の動態に関する詳細な結果は、それらの機能メカニズムのより詳細な理解を得るために必要である。しかし、HECT 型 E3 の構造変化のダイナミクスは未だに解明されておらず、N-lobe 周辺の C-lobe の大きな動きの直接的な証拠はない。

そこで本研究では、HECT 型 E3 の動的な分子メカニズムを明らかにするために、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いた。HS-AFM は、高い空間的および時間的分解能を持ち、タンパク質の分子形状およびその動的挙動をリアルタイムで同時に観察することができる [24-27]。また、観察試料として、E6AP の HECT ドメインを選択した。E6AP は、最も一般的な HECT 型 E3 であるとともに、これまでに E6AP に関する多くの生物学的情報が報告されていることから、AFM 観察の結果を考察するのに役立つと考えた。さらに、GSRN の PPPP への置換したヒンジループ柔軟性阻害体(E6AP^{HECT_PPPP})を作製して、HECT ドメインの動態及び Ub 化活性を比較した。これらから、HECT 型 E3 のヒンジループ領域が、タンパク質動態と Ub 化活性に与える影響を明らかにするのを試みた。

1-2 Ub と Ub 化修飾

ユビキチン(Ub)は、76 アミノ酸からなるタンパク質であり、標的タンパク質に共有結合する翻訳後修飾分子として作用する。Ub は進化的な保存性が高く、すべての真核生物でほとんど同じ配列を持つが、原核生物には存在しない。また、長短 2 個の α ヘリックス構造と 5 個の β シート構造が $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ の順に配位した安定な構造を持っているため[28]、熱・pH・有機溶媒などの極端な条件下でも完全に変性することなく高い安定性を持つ。

また、Ub 化システム(1-3 で後述)によって、Ub は標的タンパク質を Ub 化する。Ub 化には、モノ Ub 化修飾とポリ Ub 化修飾がある(Fig.1-1B)。

ポリ Ub 化修飾では、Ub 内の 7 つの Lys 残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) または N 末端 Met 残基(M1)のいずれかの特定の残基を介して様々な構造のポリ Ub 鎖が形成される[6-8] (Fig.1-1A)。構造的に異なるポリ Ub 鎖は、それぞれ異なる細胞内プロセスに関連していることが明らかになっている[6-13]。例えば、K48-ポリ Ub 鎖は基質をプロテアソームによるタンパク質分解に導き[12]、K63-ポリ Ub 鎖は DNA 修復およびシグナル伝達に関与し[13]、さらに直鎖状ポリ Ub 鎖(M1 鎖)は NF- κ B 活性に関与している[7-11](Fig.1-1C)。以上のように、ポリ Ub 鎖の細胞内における生理学的機能との関連が徐々に明らかになってきているが詳細は明らかになっていない。

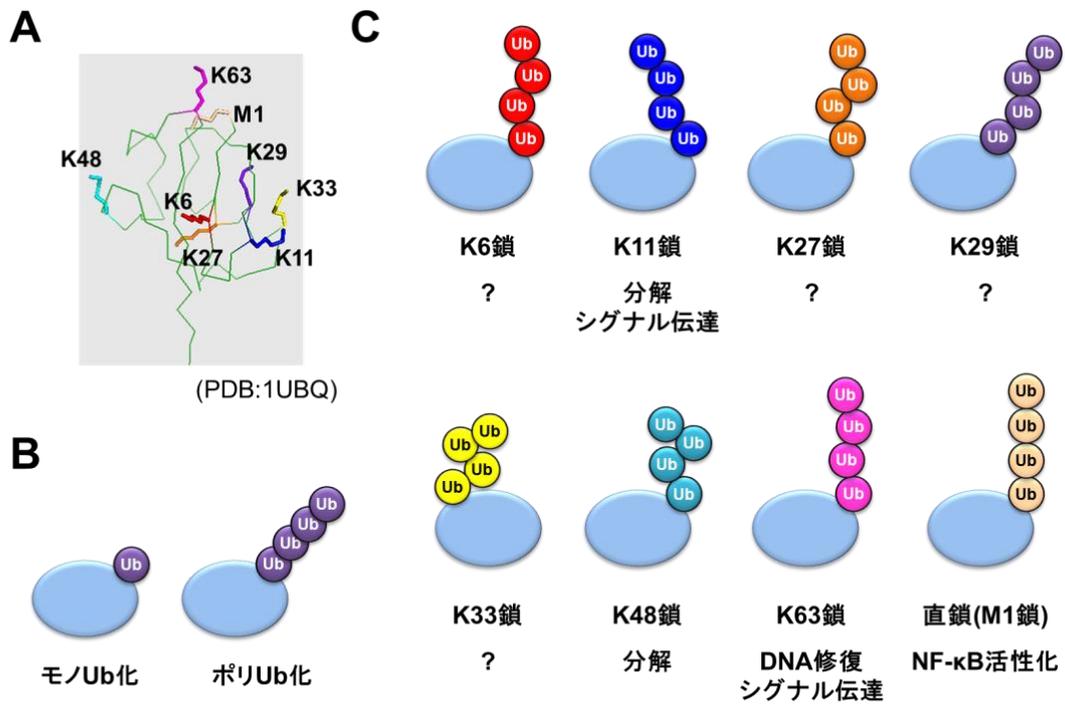


Fig.1-1 ユビキチン修飾の多様性とその機能

A : Ub の結晶構造(PDB:1UBQ[28])。B : Ub 化修飾。C : Ub 内の 7 つの Lys 残基または N 末端 Met 残基(M1)を介して形成されるポリ Ub 鎖と生理的機能をそれぞれ示す。?は機能が解明されていないことを示す。

1-3 Ub 化システム

タンパク質の翻訳後修飾の1つであるユビキチン(Ub)化は、Ub 活性化酵素(E1)、Ub 結合酵素(E2)、および Ub リガーゼ(E3)から構成された複合酵素系によって行われる[2-5]。まず、E1はATP 依存的なアデニル化を介して Ub と高エネルギーチオエステル結合を形成し、Ub を活性化する。活性化された Ub は E2 へ転移し、最終的に E3 を介して Ub の C 末端 Gly 残基のカルボキシ基と標的タンパク質のリジンの ε-アミノ基との間にイソペプチド結合が形成される。さらに、標的タンパク質に結合した Ub 内のリジン残基と新しい Ub 分子の C 末端カルボキシ基間でイソペプチド結合が繰り返されることにより、ポリ Ub 鎖が形成される(Fig.1-2)。

E3 は、標的基質タンパク質を識別するため、Ub 化反応における最も重要な酵素として位置づけられている[14,15]。E3 はヒトにおいて約 1000 種類存在することが推定されており、Ub 化修飾機構の違いによって、HECT 型 E3 と RING 型 E3 に大きく分類される。

RING 型 E3 は、Weissman らによって提唱され、現在 60 種類以上報告されている[29]。RING 型 E3 は、Zn²⁺を配位した構造で E2 結合ドメインとして機能する RING フィンガードドメインを持つことで特徴づけられる。RING 型 E3 には、単量体型と複合体型にさらに分類される。単量体型は、分子内に RING フィンガードドメインの他に基質結合ドメインを持つ。代表的な例として、チロシンキナーゼ型レセプターをリガンド依存的に Ub 化する c-Cbl があげられる[30]。一方、複合体型は、主に RING フィンガータンパク質、足場タンパク質、アダプタータンパク質、基質認識タンパク質の 4 つの複合体からなる。基質認識タンパク質を置き換えることにより、基質認識の多様性を獲得している。代表的な例としては、シグナル伝達や細胞周期に関与する SCF 複合体、細胞周期に関与する APC/C 複合体などがあげられる[31,32] (Fig.1-3)。HECT 型 E3 については、1-4 で後述する。

本研究では、E6AP(HECT 型 E3)に対応する Ub 化酵素として、UBE1(E1)、UbcH7(E2)を選択している。E1 は、すべての真核生物に 1 種類しか存在しないため、本研究では UBE1

を選択した。E2 は、現在ヒトで 40 種類報告されている。すべての E2 は、触媒性 Cys 残基を含む約 150 アミノ酸残基からなる Ub 結合ドメイン(UBC)を持ち、E3 と若干の特異性を示す。HECT 型 E3 は、主に UbcH7 や UbcH5 ファミリーの E2 と相互作用することが知られている[33-35]。さらに、UbcH7-E6AP の結晶構造が報告されている[21]。したがって本研究では E6AP に対応する E2 として UbcH7 を選択した。

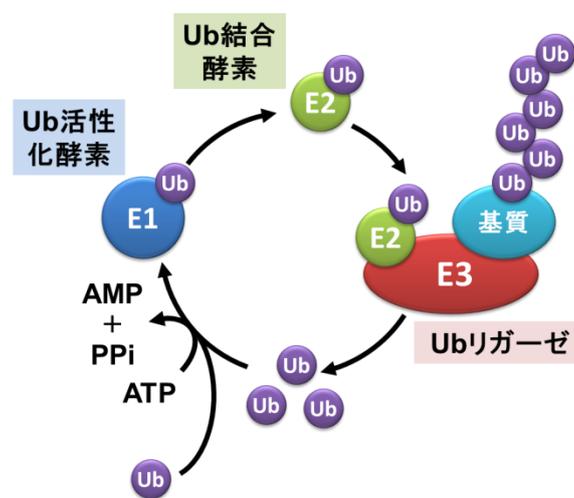


Fig.1-2 Ub 化システムの概略図

タンパク質の翻訳後修飾の 1 つであるユビキチン(Ub)化は、Ub 活性化酵素(E1)、Ub 結合酵素(E2)、および Ub リガーゼ(E3)から構成された複合酵素系によって行われる[2-5]。まず、E1 は ATP 依存的なアデニル化を介して Ub と高エネルギーチオエステル結合を形成し、Ub を活性化する。活性化された Ub は E2 へ転移し、最終的に E3 を介して Ub の C 末端 Gly 残基のカルボキシ基と標的タンパク質のリジンの ε-アミノ基との間にイソペプチド結合が形成される。さらに、標的タンパク質に結合した Ub 内のリジン残基と新しい Ub 分子の C 末端カルボキシ基間でイソペプチド結合が繰り返されることにより、ポリ Ub 鎖が形成される。

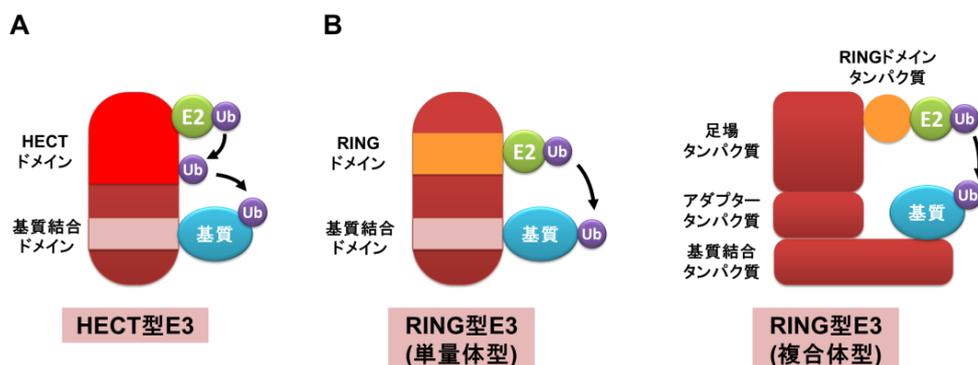


Fig.1-3 E3のUb化の模式図

HECT型E3は、N末端に基質認識部位を有し、C末端にHECTドメインを有している。HECT型E3は標的タンパク質にUbを転移させる前に、UbのC末端Gly残基のカルボキシ基とHECT型E3内の触媒性Cys残基との間にチオエステル結合を形成する。RING型E3は、E2から基質タンパク質に直接的にUbを付加するための足場として機能する。単量体型RING型E3は、分子内にRINGフィンガードメインと基質結合ドメインを持つ。複合体型RING型E3は、主にRINGフィンガータンパク質、足場タンパク質、アダプタータンパク質、基質認識タンパク質の4つの複合体からなる。

1-4 HECT型ユビキチンリガーゼ(HECT型E3)

HECT型E3は、E6APのC末端に相同な約350アミノ酸のC末端領域であるHECT(homologous of E6AP carboxyl-terminus)ドメインをもつことで定義される。現在、HECT型E3は、*Saccharomyces cerevisiae*で5種類、ヒトで28種類報告されており、分子量は約80~500kDaの範囲である。

HECT型E3の基質特異性は、主にHECTドメインより上流のN末端領域によって決定される。N末端領域の多様なドメイン配列に基づいて、ヒトHECT型E3は3つのグループにさらに分類される[①: C2ドメインと2~4つのWWドメインを持つNedd4ファミリー、②: RLD(RCC1-Like Domains)を持つHERCファミリー、③: RLDやWWドメインを持たない「他の」HECT型E3] [19] (Fig.1-4)。

HECT型E3の活性は、2つのレベルで調節されている。1つは、HECTドメインのN末端に位置している特定のタンパク質-タンパク質間相互作用ドメイン/モチーフによるHECT型E3と基質タンパク質間の相互作用である。もう1つは、E2とHECTドメインの相互作用である。Ub化活性において、それぞれのHECT型E3に対応するE2がある。HECT型E3は、主にUbcH7とUbcH5のサブファミリーのE2と相互作用する[33-35]。これらから、HECT型E3の活性は、E3分子内及びUb化酵素間の相互作用によって調節され、標的タンパク質の適切なUb化を保証している。基質上のポリUb鎖形成において、HECT型E3もそれぞれ異なる鎖型のポリUb鎖を形成することが示されている。例えば、E6APは主にK48-ポリUb鎖を形成する。また、Nedd4ファミリーはK48-ポリUb鎖も形成できるが、優先的にK63鎖を形成する。これらのHECT型E3によるポリUb鎖の鎖型の決定は、HECTドメインのC-lobeによって行われることが知られている[36,37]。

HECTドメインは、E2結合部位を持つN-lobeと触媒性Cys残基を持つC-lobeの2つのlobeからなる。また、これらのlobeは柔軟性のあるヒンジループ領域で連結されている(Fig.1-5)。現在、全長のHECT型E3の結晶構造は明らかにされていないが、7つのHECT

ドメイン(E6AP, WWP1, NEDD4L など)の結晶構造が解明され、構造生物学的解析が行われている[21-23,38,39]。これらの構造生物学的解析から E2 から HECT ドメインへの Ub 転移機構を理解することに関連した 2 つの知見が報告されている。1 つ目は、3 つの HECT ドメインの結晶構造を比較すると、E2 の触媒性 Cys 残基と HECT ドメインの触媒性 Cys 間の距離が、それぞれ E6AP(L 字型)は約 4.1 nm、WWP1(逆 T 字型)は約 1.6 nm、Nedd4(触媒構造)は 0.8 nm 以内であり、E2 から Ub を受け取れるように C-lobe が接近している。2 つ目は、N-lobe と C-lobe を連結しているヒンジループに、柔軟性を制限するような変異を導入すると、標的タンパク質への Ub 転移が消失している[22]。これらの結果から、HECT 型 E3 による Ub 転移には、2 つの lobe を連結する柔軟性ヒンジループを介した大きな構造的再配置が必須であるという仮説が導かれている。

本研究で選択した E6AP(E6-associated protein)は、HECT ドメインを定義している最も一般的な HECT 型 E3 であり、「他の」HECT 型 E3 に分類される。

E6AP は、ヒトの 15 番染色体 13 番染色体上[15q11-13 領域]の UBE3A 遺伝子によってコードされ、子宮頸癌、AS および自閉症スペクトル障害 (ASD) の 3 つの異なる疾患に関与している[20,40-43]。子宮頸癌において、E6AP はハイリスク型のヒトパピローマウイルス(HPV16/18 など)の E6 タンパク質と相互作用して酵素複合体を形成し、がん抑制因子である p53 を Ub 化して、K48-ポリ Ub 鎖を形成する。Ub 化された p53 は、プロテアソームに認識されて分解される。これによって、子宮頸がんを誘発する[40-42]。多因子との相互作用による E6AP の活性化が子宮頸癌を誘発するのとは対照的に、アンジェルマン症候群 (AS)は、母性 15 番染色体の異常によって、E6AP の不活性化されることで生じる[20]。さらに、E6AP 活性の調節欠失により、E6AP 活性の上昇が ASD に寄与していることも示している[43]。その他に、E6AP の潜在的基質として、HHR23A/HHR23B、AIB1、PML、 α -シヌクレイン、Ring1b、ARC が報告されているが、詳細は未だに明らかにされていない。

NEDD4 family (9種類)



HERC family (6種類)

Small HERCs



Large HERCs



「他の」HECT型E3 (13種類)

E6AP



Fig.1-4 N末端領域ドメインに基づいた HECT 型 E3 の分類

HECT 型 E3 は、ヒトで 28 種類報告されており、N 末端領域の多様なドメイン配列に基づいて、ヒト HECT 型 E3 は 3 つのグループにさらに分類される。

9 種類からなる Nedd4 ファミリーは、連続した C2-WW-HECT ドメインのモジュール構造を含んでいる。C2 ドメインは、カルシウム依存性脂質結合ドメインであり、WW ドメインはタンパク質-タンパク質相互作用ドメインである。6 種類からなる HERC ファミリーは、分子量に基づいてさらに Large HERC と Small HERC に分けられる。HERC ファミリーメンバーは、1 つ以上(最大 3 つ)の RLD を持つことで特徴づけられる。標準的な RLD は、長さが 50~70 アミノ酸の 7 つのリピートで構成されている。RLD や WW ドメインを持たない「他の」HECT 型 E3 は 13 種類あり、最も一般的な HECT 型 E3 として E6AP が含まれる。

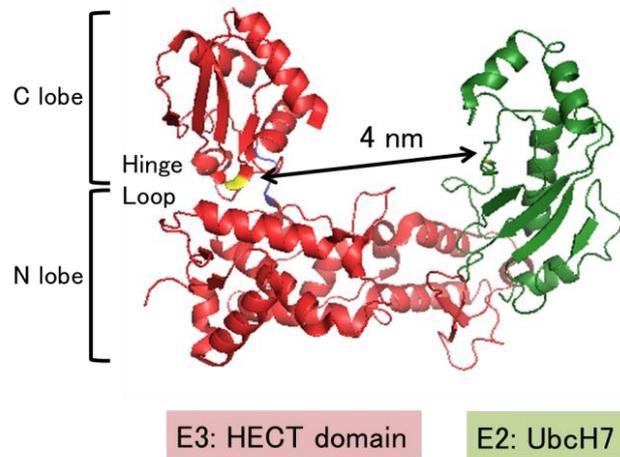


Fig.1-5 HECT ドメイン(E6AP)と E2(UbcH7)の結晶構造 [PDB:1C4Z]

E6AP の HECT ドメインと UbcH7(E2)の結晶構造を示す[21]。HECT ドメインは赤色、UbcH7 は緑色でそれぞれ示している。Ub とチオエステル結合する活性中心 Cys は黄色、Hinge loop は青色で示す。2 つの酵素間の Ub 結合部位の距離が約 4nm 離れている。

1-5 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)

原子間力顕微鏡(AFM : Atomic Force Microscope)は、走査型プローブ顕微鏡(SPM : Scanning Probe Microscope)の 1 種であり、カンチレバー(Cantilever)と呼ばれる非常に先端が細いプローブを用いて、試料表面の凹凸を可視化する。AFM の最大の特徴は、電子顕微鏡に匹敵する空間分解能で溶液中の観察対象を比較的容易に観察できることである。しかし、従来の AFM では走査速度が遅すぎるため、水溶液中で動くタンパク質の映像を捉えるのは困難であった。

金沢大学の安藤敏夫教授らの研究グループによって、(i)高い共振周波数、小さいばね定数を持つ微小カンチレバー、(ii)微小カンチレバーの検出のための光テコ光学系、(iii)高速スキャナ、(iv)高速振幅計測装置、(v)動的 PID 制御法、(vi)カンチレバーの励振効率のドリフト補償の開発を経て高速化が実現され、高い空間分解能・時間分解能を持つことでタンパク質の分子形状と動的ダイナミクスを同時に観察することが可能になった[24-27]。現在では、タンパク質 1 分子の構造と動的プロセスを 10~20 フレーム/秒(fps)で撮影できる。AFM にはいくつかの走査方式があるが、当研究室で用いている高速 AFM は Tapping モードを用いている。Tapping モードは、カンチレバーを上下に振動させ、その振幅を用いてフィードバック制御を行う走査方式である。この走査方式は、XY 走査中にカンチレバー試料へ横方向の力をほとんど与えることがなく、試料を破壊しないやさしいイメージングを可能にしているため、生体分子の観察に最も適している。Fig.1-5 に高速 AFM の全体図を示す[27]。Tapping モードによる高速 AFM 画像の取得は、まず、励振ピエゾを用いてカンチレバーを共振周波数で励振させる。カンチレバーの変位計測には、光テコ法を用いている。カンチレバーに半導体レーザー光を当て、その反射光を 2 分割フォトダイオード(SPD)に導く。カンチレバーのたわみによって生じる 2 つのフォトダイオードからの出力の変化でカンチレバーの変位を計測し、RMS-DC コンバーターを通して振幅値を出力する。この振幅値はフィードバック制御装置入力される。フィードバック制御装置は、入力された振

幅値と設定値(セットポイント)との差がなくなるように試料ステージを Z 方向に変位させて、振幅を一定(探針-試料間にかかる力が一定)に保つように制御している。このフィードバック制御を、試料ステージを XY 方向に走査しながら行くと、試料ステージは試料の凹凸をなぞる運動を行うことになる。したがって、試料ステージを XYZ 方向に走査する信号をパソコンで読み取ることで、3次元の試料形状がパソコン内に再現される。

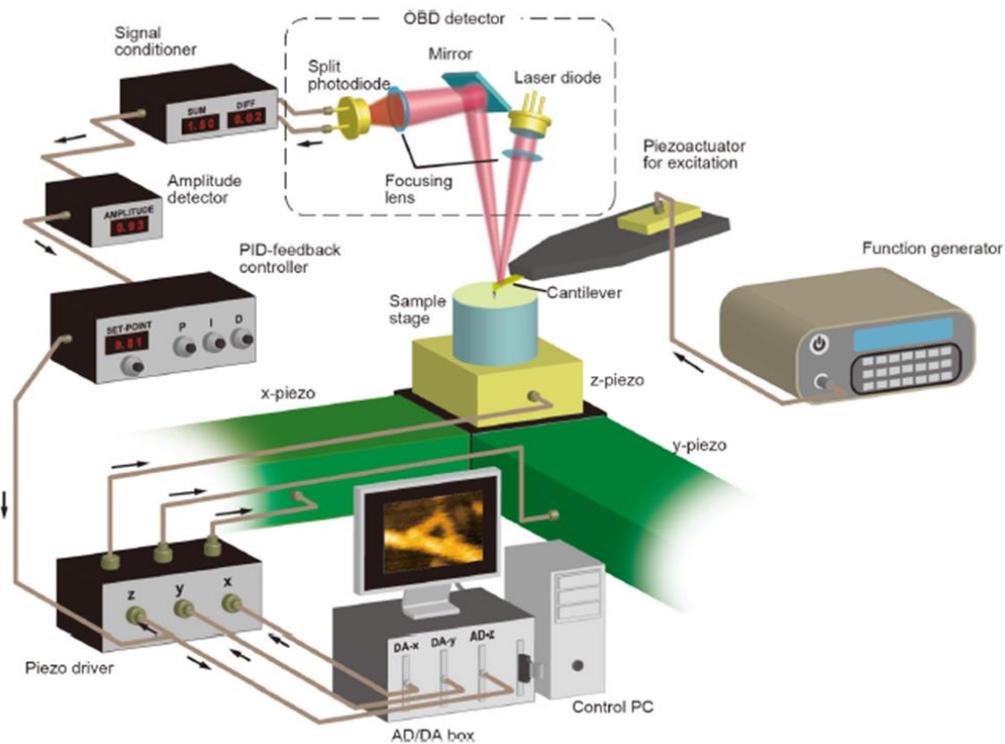


Fig.1-5 高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)の全体図 (参考文献[27]の図 xx を引用)

第2章 E6AP^{HECT}の高速AFM観察とC-lobeの動態の解析

2-1 概要

これまでの構造生物学的解析から、HECT型E3によるUb転移には、Hinge loopの柔軟性による大きな構造的再配置が必要であるという仮説が導かれている[21-23]。Ub化におけるHECTドメインの動的な分子メカニズムを明らかにするために、HS-AFMを用いて野生型E6APのHECTドメイン(E6AP^{HECT-Wt})と野生型のGSRN配列をPPPPで置換したヒンジループ柔軟性阻害変異体(E6AP^{HECT-PPPP})の構造およびダイナミクスを観察し、ヒンジループのHECTドメインの動態に与える影響を評価することを試みた。

基板上に固定されたE6AP^{HECT-Wt}の配向を揃えるために、E6AP^{HECT}のN末端側のHisタグとmica上のNiとの相互作用を利用した。HS-AFM観察の結果、E6AP^{HECT}の構造とC-lobeのNローブへの動的な動きをリアルタイムで視覚化できた。C-lobeは結晶構造解析から推測されている動きと同様に、N-lobeの周囲を動いていた。

ここでは、E6AP^{HECT-Wt}とE6AP^{HECT-PPPP}のAFM画像解析と結晶構造に基づいたAFMシミュレーション解析によって、HECTドメインのC-lobeが、E2およびUbの非存在下でN-lobeのE2結合部位に近い位置に位置して触媒状態の構造をとり、柔軟性ヒンジループの阻害はC-lobeの動きを制限することを示した。さらに、E6AP^{HECT-Wt}のC-lobeの移動距離の解析からHECTドメインのC-lobeの移動距離が、Ub転移に必要な距離を十分に満たすことも示した。

HECT型E3による基質のUb化は、E2-HECTドメイン間とHECTドメイン-基質間の2段階で行われる[5]。結晶構造解析からHECTドメインは、E2~UbからUbを受け取る際に、C-lobeが大きく移動することが予測されている[21-23]。また、HECTドメインはUbを受け取った後に、標的タンパク質上のリジン残基のε-アミノ基にUbのカルボキシ基が近接できるようにC-lobeを移動させることが示されている。よって、HECTドメインの

C-lobe は E2 に接近し Ub を受け取った後に、E2 結合領域の方向から基質方向へ Ub が付加された C-lobe を移動させなければならない。HS-AFM 観察で、Ub が付加された C-lobe の大きな動きを確認できれば、E6AP^{HECT}_{Wt} と E6AP^{HECT}_{PPPP} の HS-AFM 観察結果と合わせて、HECT ドメインの Ub 化におけるヒンジループの役割をさらに考察できると考えた。そこで、Ub 化された HECT ドメインを調製・分離することにした。

まず、通常の Ub 化反応溶液から Ni-NTA クロマトグラフィーを利用して HECT~Ub を単離することを試みた。Ni-NTA クロマトグラフィーによる分離の結果、E6AP^{HECT}~Ub を Ub 化反応溶液中から単離することができた。しかし、分離した His-E6AP^{HECT}~Ub の HS-AFM 観察で、N-lobe と C-lobe を識別できる分子は確認できたが、Ub が付加された C-lobe をもつ分子を確認できなかった。E6AP^{HECT} と Ub 間の高エネルギーチオエステル結合は反応性が高いことから、HS-AFM 観察中に Ub がすばやく解離しているのではないかと考えた。よって、単離した E6AP^{HECT}~Ub の安定性を検証した。安定性の検証の結果、観察温度での長時間のインキュベーションおよび、保存時の凍結融解によって単離した E6AP^{HECT}~Ub が減少していることを確認した。

これらの結果から、E6AP^{HECT}~Ub では、Ub 解離の可能性を完全に排除できないため、E6AP^{HECT}=Ub 複合体を作製することを試みた。HECT=Ub 複合体は、Ub の C 末端グリジン残基をシステイン(Cys)に置換した Ub(G76C)と HECT ドメイン触媒 Cys 間をジスルフィド結合で不可逆的に架橋させた複合体で、HECT ドメインと Ub がチオエステル結合で結合している HECT~Ub 複合体よりも安定性が高い。また、先行研究においても、Nedd4^{HECT}=Ub (HECT ドメイン=Ub 架橋複合体)が作製され、結晶構造解析に使用されている[38]。

しかし、E6AP^{HECT} と Ub(G76C)間の架橋反応で、E6AP^{HECT}=Ub は形成されたが、形成効率が低いためゲル濾過クロマトグラフィーを用いた方法での単離は困難であった。よって、E6AP^{HECT}=Ub を分離するために、さらなる条件検討が必要である。

2-2 材料と方法

2-2-1 E6AP^{HECT}の高速 AFM (HS-AFM) 観察

溶液中の E6AP^{HECT} の AFM イメージングは、以前に記載された方法[24-26]に従って、実験室で構築された高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)[27]を使用して行った。観察に用いた His-E6AP^{HECT} の精製は次章(3-3-1-3)で述べる。2 μ l の 20 nM His-E6AP^{HECT} を Ni 被覆マイカ (Ni-mica) 上において、室温(22~28°C)で 10 分間インキュベートした。基板上に固定されていない His-E6AP^{HECT} 分子は、観察用バッファー [50 mM HEPES-NaOH (pH7.0), 100 mM NaCl] で洗浄して除去した。イメージングは、カンチレバー (BL-AC10DS-A2 または特注製 BL-AC7DS-KU4 : オリンパス)を使用してタッピングモードで行った。カンチレバーの自由振動振幅は、~1.5nm であり、設定点振幅は自由振動振幅の 80~90%になるように設定した。画像化速度、スキャンサイズ、およびフィードバックパラメーターは、最小の力で試料を視覚化できるように最適化して観察した。

2-2-2 AFM 画像解析

AFM イメージング像は、フリーソフトウェア ImageJ(National Health Institute)によって処理および分析された。得られた数値を Origin TM 8.0(OriginLab Co.)により統計的に分析した。AFM イメージング像は、32 bit の float tiff 画像としてロードされ、続いて x、y、z スキャナからの熱ドリフト補正を行った。z - スキャナのドリフトを補正するために、sliding ball algorithm(“Subtract Background” plugin)によって画像の背景を除去した。

次に、x-スキャナと y-スキャナのドリフトを補正するため、画像を template matching algorithm に基づく “Align slices” plugin (<https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin> から入手可能)を使用した。重心座標、N ローブの縦軸および横軸に対する角度は、処理された AFM 画像から決定された。E6AP^{HECT} の C ローブの動きは、Centroid モードで MTrackJ plugin を

使用することによって追跡された。Nローブへの相対的なCローブの動きを評価するために、各フレームのCローブ重心座標をNローブの重心上のNローブの縦軸の角度だけ回転させた。

2-2-3 His-E6AP^{HECT}-Wt=Ub の単離条件の検討

E6AP^{HECT}-Wt=Ub の形成のために、5 μ M His-E6AP^{HECT}-Wt, 20 μ M Ub(G76C)を、反応溶液 [50 mM Tris-Cl(pH7.5), 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 25 μ M CuCl₂,] 中で混合し、37°C、3時間プレインキュベートし、E6AP^{HECT}-Wt=Ub 複合体を形成させた。反応溶液を、Amicon® Ultra 30000 MWCO (Millipore)で濃縮した後、遠心(10000 xg, 10 min, 4°C)し、ランニングバッファー[50 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT]で平衡化した Superdex 75 10/300GL (GE HealthCare)にロードした。流速は 0.5 ml/min で行った。280nm でモニターして、溶出ピーク(18~37分)を分取し、各溶出画分を SDS-PAGE で確認した。

E6AP^{HECT}-Wt=Ub の形成効率の改善のために条件検討では、2種類の CuCl₂ 濃度の反応溶液[50 mM Tris-Cl (pH7.5), 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 μ M or 100 μ M CuCl₂]中で反応させた。E6AP^{HECT} と Ub の最適な濃度比率を検討する条件では、3 μ M E6AP^{HECT} に対して、各 Ub(G76C)濃度(6 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M)で、反応溶液中に混合し、37°Cで6時間反応させた。また、E6AP^{HECT} と Ub 間の架橋反応の反応時間を検討する条件では、3 μ M E6AP^{HECT}, 10 μ M Ub(G76C)のタンパク質濃度で、37°Cで各反応時間(0.5h, 1h, 3h, 6h, 14h, 28h, 48h)で反応させた。反応は還元剤を含まない 5×サンプルバッファーを添加して停止させた。反応溶液中のタンパク質は、SDS-PAGE で 12%Wide-range gel (Nacalai Tesque)に展開し、SERVA Blue G 染色して検出した。

2-2-4 His-E6AP^{HECT}-Wt~Ub の単離

E6AP^{HECT}-Wt~Ub の単離のために、100 nM UBE1, 4.5 μM UbcH7, 9 μM Ub を、反応溶液 [25 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 100 mM NaCl, 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂] 中で混合し、37°C、1 時間プレインキュベートし、E2~Ub 複合体を形成させた。プレインキュベーション後、試料を 25°C に移し、10 分間インキュベートした。3 μM E6AP^{HECT} になるように、His-E6AP^{HECT} を反応溶液に添加して、25°C で 15 分間反応させ、E6AP^{HECT}~Ub 複合体を形成させた。Ub 化反応溶液を、平衡化バッファー [20 mM MOPS-KOH(pH7.0), 300 mM NaCl] で平衡化した Ni-NTA super flow カラムにアプライした。洗浄バッファー [20 mM MOPS-KOH(pH7.0), 300 mM NaCl, 50 mM imidazole-Cl] で洗浄した後、溶出バッファー [20 mM MOPS-KOH(pH7.0), 300 mM NaCl および 200 mM imidazole-Cl] で His-E6AP^{HECT}-Wt~Ub 複合体を溶出した。溶出した His-E6AP^{HECT}-Wt~Ub 濃度を Bradford (Bio-rad)法を用いて定量し、使用するまで -80°C で保存した。

2-3 結果

2-3-1 野生型 HECT ドメイン(E6AP^{HECT-Wt})の高速 AFM 観察と解析

HS-AFM を用いて、野生型 E6AP の HECT ドメイン(E6AP^{HECT-Wt})の構造およびダイナミクスを観察した。基板上に固定された E6AP^{HECT-Wt} の配向を揃えるために、E6AP^{HECT-Wt} の N 末端に導入されている His タグと mica 表面上に撒いた Ni(Ni-mica 基板)との相互作用を利用した。Ni-mica 基板上で、233 個の E6AP^{HECT-Wt} 分子が観察され(Fig.2-1B)、そのうち 57 個が 2 つの lobe 構造が識別できる形状(Fig.2-1A : 赤色)、176 個が 2 つの lobe 構造が識別できない形状(Fig.2-1A : 青色)だった(表 1)。また、Ni-mica 基板上で観測された E6AP^{HECT-Wt} の高さを計測したところ、 3.62 ± 0.02 nm だった(Fig.2-1C)。さらに、E6AP^{HECT} の C-lobe の N ロープへの動的な動きをリアルタイムで視覚化できた。C-lobe は結晶構造解析から推測されている動きと同様に、N-lobe の周囲を動いていた。HECT ドメイン内の 2 つの lobe の位置関係を解析するために、材料と方法の項で述べた方法に従って解析を行った。表 1 中の 2 つの lobe 構造を観察できた分子の中には、カンチレバーによるタッピングによって N-lobe が揺らいでいる分子や C-lobe の観察時間が短い分子も含まれている。よって、本研究では E6AP^{HECT} の N-lobe が基板上に一定の方向で固定化され、C-lobe の動きを 70 フレーム以上観察できた分子を用いることにして、計 15 分子を解析した。

観察分子間で N-lobe の長軸と重心を一致させるため、追跡した C-lobe の重心を回転・平行移動させた。また、N-lobe の長軸と短軸をそれぞれ x 軸と y 軸、さらに N-lobe の重心を原点とした(Fig.2-1E)。そして、解析した 15 分子のうち、7 分子の C-lobe の重心の分布を散布図で示した(Fig.2-1F)。15 分子それぞれの C-lobe の重心の散布図と N-lobe に対する角度は SupFig.1 に示した。原点である N-lobe の重心(青点)と、追跡された各フレームの C-lobe の重心(赤丸)との間の距離をそれぞれ計算した。これらの距離をヒストグラムで表して、ガウス関数でピークフィッティングした。ピークフィッティングによって、約 6.1nm の値を得て、この値を半径(r)とした。次に、C-lobe の位置を、N-lobe の長軸に対する角度(θ)とし

て求めた。これらの角度は、ヒストグラムで示されて、2つのピークが確認された。2つのピークを、ガウス関数を使ってピークフィットし、2つの角度($\theta_1 = 48.9 \pm 1.61^\circ$, $\theta_2 = 71.6 \pm 27.1^\circ$)が得られた。2つの角度と上述した半径(r)を用いて、C-lobe 間の距離を求め、2.4 nm の値を得た(Fig.2-1G)。

2-3-2 AFM シミュレーション像の作製

先行研究で、HECT ドメインの結晶構造が複数報告されており、HECT ドメインによる Ub 転移過程で3つの形状がある;1) Ub 転移状態[23]、2) 逆 T 字構造[22]、3) L 字構造[21]。これらの3つの状態の結晶構造から、AFM 像の解析ソフト(FalconViewer)を用いて、AFM シミュレーション像を作製した。AFM シミュレーション像には、Nedd4L(Ub 転移状態)、WWP1(逆 T 字構造)、E6AP(L 字構造)の3つの結晶構造を使用した(Fig.2-3 上段)。E6AP の結晶構造から作製した AFM シミュレーション像は、N-、C-lobe の2つの lobe が区別できたのに対して、Nedd4L と WWP1 から作製した AFM シミュレーション像は、2つの lobe 構造が区別できず、一つの球状のような形状だった(Fig.2-3 下段)。

2-3-3 E6AP^{HECT-Wt} C-lobe の移動距離の経時変化

E6AP^{HECT-Wt} の C ロープの移動距離の時間経過を分析した。Fig.2-4A は、C-lobe の動きを観察できた15分子中の4つを示した。C-lobe が時間経過とともに動いていることを確認できた。さらに、AFM シミュレーションによって作成した E6AP^{HECT} の N-、C-lobe の重心間の直線を軸として、各 C-lobe 間の角度の差を求め、Fig.2-1F から求めた r を使って、移動距離を求めた。

動いていない分子においても解析上ドリフトが生じるため、それを除くために、AFM 観察で動きが見られない粒子を使って、C-lobe 解析と同様の方法で解析した。X、Y 方向の移動距離(Fig.2-4B,C)から求めた動きが見られない分子の揺らぎは、0.41 nm だった。この移

動距離以下は、HECT^{E6AP}の C-lobe が動いていないとして C-lobe の移動距離から除き、C-lobe の移動距離のヒストグラムを作製した。ヒストグラムのガウシアンフィットから、 1.09 ± 0.41 nm の値が得られた。これから約 1.1 nm 動きが多く、さらに、Ub 転移反応に必要な 4 nm 以上の動きも確認できた。また、全観察時間における 4 nm 以上の動きの頻度を求めたところ、約 6 回/秒の頻度で起こっていた (Fig.2-4D)。

2-3-4 ヒンジループ柔軟性阻害変異体 (E6AP^{HECT_PPPP}) の高速 AFM 観察

ヒンジループの役割を評価するために、野生型の GSRN 配列を PPPP で置換したヒンジループ柔軟性阻害変異体 (E6AP^{HECT_PPPP}) の構造およびダイナミクスを HS-AFM で観察した。Ni-mica 基板上で、190 個の E6AP^{HECT_PPPP} 分子が観察された (Fig.2-5A)。しかし、E6AP^{HECT_Wt} とは異なり、C-ローブに対応する部分は E6AP^{HECT_PPPP} で観察されず、ほとんどが球状の分子だった (Fig.2-5B) (表 2)。また、観察時間を延ばしても、C-lobe は確認できず、球状の形のままだった (Fig.2-5C)。野生型の E6AP^{HECT_Wt} と同様に、Ni-mica 基板上で観測された E6AP^{HECT_PPPP} の高さを計測したところ、 3.22 ± 1.66 nm だった (Fig.2-5D)。

2-3-5 His-E6AP^{HECT_Wt}=Ub のゲル濾過クロマトグラフィーによる単離

結晶構造解析から HECT ドメインは、E2~Ub から Ub を受け取る際に、C-lobe が大きく移動することが予測されている [21-23]。また、HECT ドメインは Ub を受け取った後に、標的タンパク質上のリジン残基の ϵ -アミノ基に Ub のカルボキシ基が近接できるように C-lobe を移動させる。今回、Ub 化された HECT ドメインを高速 AFM で観察し、Ub 化前後で E6AP^{HECT} の C-lobe の動きに変化が見られるかを明らかにしようと試みた。

しかし、HECT~Ub は反応性が高いため、Ub を HECT ドメインの触媒 Cys 上に維持するのが難しい。そこで、結晶構造解析では HECT-Ub 架橋複合体 (HECT=Ub) が用いられている [38]。HECT=Ub 複合体は、Ub の C 末端グリジン残基をシステイン (Cys) に置換し

た Ub(G76C)と HECT ドメイン触媒 Cys 間をジスルフィド結合で不可逆的に架橋させた複合体で、HECT ドメインと Ub がチオエステル結合で結合している HECT~Ub 複合体よりも安定性が高い。そこで、今回 E6AP^{HECT}=Ub 複合体を調製し、単離することを試みた。

まず、Ub の C 末端 Gly 残基を Cys に置換した Ub G76C 変異体を精製した（精製方法は 3 章の材料・方法に後述）。Ub G76C と E6AP^{HECT}-Wt を反応溶液中で、塩化銅を用いて酸化反応させ、SDS-PAGE で確認した(Fig.2-6A)。SDS-PAGE の結果から、反応前後で His-E6AP^{HECT} のバンドが消失し、His-E6AP^{HECT}-Wt=Ub が形成を確認できた。しかし、大部分が His-E6AP^{HECT} 分子同士で連結しており、His-E6AP^{HECT}=Ub の形成効率は良くなかった。形成効率は良くないものの、His-E6AP^{HECT}=Ub が形成されているので、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、His-E6AP^{HECT}=Ub が分離できるか検証した。ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマト図では、7.5~15 ml にかけて、横幅が大きいピークが確認できたほか、G76C Ub₂、G76C Ub のピークも確認できた(Fig.2-6B)。さらに、分取したそれぞれのピーク領域を、SDS-PAGE で確認し(Fig.2-6C)、E6AP^{HECT}=Ub と他の高分子量産物が分離されていないことを確認した。

架橋反応における E6AP^{HECT}=Ub の形成効率が良くないため、E6AP^{HECT}=Ub の分離が難しいのではないかと考え、E6AP^{HECT}=Ub の形成効率を向上させる条件を検討した。

Ub(G76C)濃度依存性の結果では、形成された E6AP^{HECT}=Ub の量に大きな差が見られなかった。Ub 濃度に依存して、75kDa 以上に形成された高分子量産物の量が減少したが、Ub(G76C)間で形成された Ub₂ の量が増加した(Fig.2-7 上段)。反応時間に対する結果では、反応時間が 3 時間以上になると最終的に形成された E6AP^{HECT}=Ub の量に大きな差は見られなかったが、塩化銅の濃度が高い方が、E6AP^{HECT}=Ub の形成が速かった(Fig.2-6 下段)。

2-3-6 His-E6AP^{HECT}~Ub の単離

E6AP^{HECT}=Ub 複合体の分離は、反応によって E6AP^{HECT}=Ub 以外の産物が多量に形成されて形成効率が悪く、分離も難しかった。そこで、Ub 化反応溶液中から E6AP^{HECT}~Ub を分離することを試みた。

His-E6AP^{HECT}~Ub の安定性は E6AP^{HECT}=Ub より低いものの、本来の Ub 化反応によって形成されるため、ほぼすべての E6AP^{HECT} が Ub 化され、E6AP^{HECT}~Ub の形成効率が良い。さらに、E6AP^{HECT} に His タグが導入されているため、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて反応溶液中から His-E6AP^{HECT}~Ub を分離できると予測した。よって、His タグを利用した His-E6AP^{HECT}~Ub の分離を試みた。Ub 化反応後、反応溶液を Ni-NTA super flow カラムにアプライして、イミダゾールによる段階溶出を行い、溶出画分を分取し、溶出画分を SDS-PAGE で確認した。SDS-PAGE の結果、Ub 化反応後に His-E6AP^{HECT} のバンドがシフトし、E6AP^{HECT}~Ub を形成していることが確認された。さらに、反応溶液中に存在していた他の Ub 化酵素や未反応の Ub を、Ni-NTA クロマトグラフィーを行うことで除き、E6AP^{HECT}~Ub を単離することができた(Fig.2-8A)。

Ni-NTA カラムによる単離後の His-E6AP^{HECT}~Ub の安定性を検証した。まず、高速 AFM 観察は室温で行うため、単離した His-E6AP^{HECT}~Ub を 25°C で 0~10 時間インキュベーションし、His-E6AP^{HECT}~Ub の状態が維持される時間を確認した。また、単離後に観察する時まで、液体窒素で凍結し、-80°C で保存するため、凍結融解による His-E6AP^{HECT}~Ub の安定性への影響を確認した。SDS-PAGE で、0h と各条件を比較したところ、1 回の凍結融解後では、His-E6AP~Ub のバンドに差は見られなかった。しかし、2 回目の凍結融解後で His-E6AP~Ub が減少し、E6AP^{HECT}が増加した。また、1 時間のインキュベーション以降 E6AP^{HECT}~Ub のバンドがわずかに上側にシフトしていた(Fig.2-8B)。

2-3-7 E6AP^{HECT}_Wt~Ub の HS-AFM 観察

Ub 化前後で E6AP^{HECT} の C-lobe に動きに変化が見られるかを検証するために、単離された E6AP^{HECT}_Wt~Ub を HS-AFM で観察した。HS-AFM 観察で、E6AP^{HECT}~Ub の N-lobe と C-lobe を識別できる分子は確認でき、C-lobe のリアルタイムの動きも捉えることができた。(Fig.2-9)。

Ub は C-lobe とほぼ同じ大きさであるが、得られた AFM 像からは Ub を確認できず、Ub が付加された C-lobe の動きを判断するのが困難であった(Fig.2-9)。

2-4 考察

2-4-1 E6AP^{HECT} の HS-AFM 観察と C-lobe の動態の解析

これまでの構造生物学的解析から、HECT 型 E3 による Ub 転移には、Hinge loop の柔軟性による大きな構造的再配置が必要であるという仮説が導かれている[21-23]。Ub 化における HECT ドメインの動的な分子メカニズムを明らかにするために、HS-AFM を用いて野生型 E6AP の HECT ドメイン(E6AP^{HECT_Wt})の構造およびダイナミクスを観察した。HS-AFM 観察の結果、2 つの lobe 構造が識別できる形状(N-C 構造)の他に識別できない形状(particle)の形状が多く観察された(Fig.2-1A-C)。

HS-AFM 観察によって得られた E6AP^{HECT_Wt} 分子の高さを測定したところ、 3.62 ± 0.02 nm であった(Fig.2-1C)。以前の結晶構造解析から、E6AP^{HECT_Wt} が観察基板上に垂直方向に配向された場合は約 6 nm、水平方向に配向された場合は約 3 nm の高さになることを推定した[21]。よって、今回観察された E6AP^{HECT_Wt} は基板に水平に配向し、粒子の大きい部分と小さい部分が N-lobe と C-lobe にそれぞれ対応していると結論づけた。

N-lobe と C-lobe が区別できない球状の分子が存在する理由として、C-lobe が N-lobe の近くに配置されていて、カンチレバーの探針で分子の凹凸を検知できない可能性が考えられる。C-lobe が N-lobe に最も近接して位置している構造状態が、E2-E3 間の Ub 転移の触媒構造状態であることを示している[23]。そこで、HECT ドメインの結晶構造を用いて AFM シミュレーション解析を行った(Fig.2-3)。HECT ドメインの Ub 転移における 3 つの構造状態の AFM シミュレーション解析結果、L 字型の構造以外の逆 T 字型および触媒状態の構造で N-lobe と C-lobe の区別が困難であることを確認した。以上のことから、HECT ドメインの C-lobe は、E2 および Ub の非存在下で N-lobe の E2 結合部位に近い位置に位置し、触媒状態の構造をとっていると考えられる。

また、結晶構造解析から、HECT ドメインの C-lobe の触媒性 Cys と E2 の触媒性 Cys 間の距離が最も離れている E6AP で、約 4 nm であることが示されている[21]。このことから、

HECT ドメインの C-lobe は Ub 転移のために 4 nm 以上の動きが必要であることが推測されている。N-lobe の長軸に対する C-lobe の角度(θ)の分布から、2つのピーク($\theta_1=48.9\pm 1.61^\circ$, $\theta_2=71.6\pm 27.1^\circ$)を確認された(Fig.2-1G)。AFM シミュレーション解析と比較して、この θ_1 と θ_2 の 2つの角度は、L字構造と逆 T字構造それぞれに対応していると考えられる。この 2つの角度の差と半径(r)を用いて C-lobe 間の距離を求めると 2.4 nm の値を得た(Fig.2-1G)。この結果では、Ub 転移に必要なとされる C-lobe の移動距離を満たさない。

しかし、Fig.2-1G の方法では、C-lobe の 1回あたりの動きが反映されていないことを考慮して、C-lobe 移動距離を各フレーム間の C-lobe の位置から求めて、経時変化を確認した(Fig.2-4)。N-lobe の長軸に対する C-lobe の角度と半径(r)からフレーム間の C-lobe 移動距離を求めたところ、約 1 nm の動きが最も多かったが、4 nm 以上の動きも多数確認できた(Fig.2-4D)。この結果は、HECT ドメインの C-lobe の移動距離が、Ub 転移に必要な距離を十分に満たすことを示した。

次に、ヒンジループの役割を評価するために、野生型の GSRN 配列を PPPP で置換したヒンジループ柔軟性阻害変異体(E6AP^{HECT_PPPP})の構造およびダイナミクスを HS-AFM 観察した。E6AP^{HECT_Wt}とは異なってほとんどが球状の分子だったため、C-ローブに対応する部分を観察できなかった(Fig.2-5B)(表 2)。また、観察時間を延ばしても、C-lobe は確認できず、球状の形のままだった(Fig.2-5C)。観察基板への E6AP^{HECT_PPPP}の固定は、E6AP^{HECT_PPPP}の N 末端 His タグと Ni-マイカ基質との間の相互作用に基づいているが、ヒンジループの変異による E6AP^{HECT_PPPP}の固定方向に対する影響や C-lobe の動態の観察を困難にしているかを判断することは難しい。

しかし、E6AP^{HECT_PPPP}の高さは 3.22 ± 1.66 nm であったので、E6AP^{HECT_Wt}の高さ分析に関して上述したように、E6AP^{HECT_PPPP}が垂直に配向して C-lobe が N-lobe の下または上にある可能性は無視することができる(Fig.2-5D)。そのため、E6AP^{HECT_PPPP}は E6AP^{HECT_Wt}と同様に基板に水平に配向されていると考えられる。また、球状の分子形状

(Fig.2-5B)と AFM シミュレーション(Fig.2-3)から E6AP^{HECT_PPPP} は触媒状態の構造をとり、C-lobe は N-lobe の近くに位置していると考えた。

E6AP^{HECT_Wt} および E6AP^{HECT_PPPP} の AFM 観察で、HECT ドメインの C-lobe の動きが E6AP^{HECT_Wt} で捉えられるのに対し、E6AP^{HECT_PPPP} でみられないのは柔軟性ヒンジループの変異によるものであり、柔軟性ヒンジループの制限は C-lobe の動きを制限すると考える。

2-4-2 Ub 化された E6AP^{HECT} の分離

今回、E6AP^{HECT} の Ub 化された C-lobe の動態を高速 AFM 観察することを目的にし、Ub 化された E6AP^{HECT} の調製・分離を行った。最初に、通常の Ub 化反応溶液から HECT~Ub を単離することを試みた。ここでは、HECT ドメインに導入された His タグを利用することにした。HECT ドメイン以外には、His タグが付加されていないタンパク質を反応に用いることで、Ni-NTA クロマトグラフィーで HECT~Ub を単離することができるのではないかと考えた。

Ub 化反応によって、ほぼすべての His-E6AP^{HECT} に Ub が付加され His-E6AP^{HECT}~Ub が形成され、Ni-NTA クロマトグラフィーを用いて、His-E6AP^{HECT}~Ub を Ub 化反応溶液中から分離することができた(Fig.2-8A)。C-lobe と Ub のサイズはほぼ同じであるため、Ub 付加後の C-lobe は Ub 付加前の C-lobe より大きくなっていることが期待される。しかし、分離した His-E6AP^{HECT}~Ub の高速 AFM 観察で、N-lobe と C-lobe を識別できる分子は確認できたが、Ub が付加された C-lobe をもつ分子を確認できなかった(Fig.2-9)。このことは、E6AP^{HECT}~Ub の Ub が解離している可能性を示唆している。そこで、単離した E6AP^{HECT}~Ub の安定性を検証した。25°Cで1時間以上のインキュベーションまたは2回の凍結融解で、E6AP^{HECT}~Ub が減少していた(Fig.2-8B)。これは、HECT~Ub は反応性が高いため、Ni-NTA クロマトグラフィー後の HECT~Ub 濃度が高い環境下で、HECT~Ub 同士で Ub を受け渡しているためだと考えられる。

したがって、 $E6AP^{HECT}\sim Ub$ では、 Ub 解離の可能性を完全に排除できない。そこで、 $E6AP^{HECT}=Ub$ 複合体を作製することを試みた。 $HECT=Ub$ 複合体は、 Ub の C 末端グリジン残基をシステイン(Cys)に置換した $Ub(G76C)$ と $HECT$ ドメイン触媒 Cys 間をジスルフィド結合で不可逆的に架橋させた複合体で、 $HECT$ ドメインと Ub がチオエステル結合で結合している $HECT\sim Ub$ 複合体よりも安定性が高い。先行研究においても、 $Nedd4^{HECT}=Ub$ ($HECT$ ドメイン= Ub 架橋複合体)が作製され、結晶構造解析に使用されている [38]。

架橋反応後、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた $E6AP^{HECT}=Ub$ の分離において、低分子量のタンパク質を除くことができたが、高分子量産物を除くことができず、 $E6AP^{HECT}=Ub$ を反応溶液中から分離できなかつた(Fig.2-6B,C)。今回、ゲル濾過クロマトグラフィーのカラムとして Superdex75 10/300GL を使用している。形成された $E6AP^{HECT}=Ub$ の分子量は約 50kDa であるので、Superdex75 10/300GL のブロード領域のピークと $E6AP^{HECT}=Ub$ のピークが近接するため、高分子量産物と $E6AP^{HECT}=Ub$ が分離できなかったのではないかと推測される。そのため、Superdex75 10/300GL で低分量を除いた後に、Superdex200 10/300GL などの別のカラムを利用して、高分子量タンパク質を除けばよいが、現在架橋反応によって形成される $E6AP^{HECT}=Ub$ の割合で、カラムを複数通すと最終的に回収できる $E6AP^{HECT}=Ub$ の量が大きく減少してしまうと考えられる。また、 $E6AP^{HECT}=Ub$ の形成効率を向上させるための条件検討結果(Fig.2-7)から、高 Ub 濃度で反応を行えば、分離できない高分子量タンパク質の割合を減らすことができるが、 $E6AP^{HECT}=Ub$ の分子量の近くに新たな産物が形成されているため、これらをゲル濾過クロマトグラフィーで除くのは難しいと考えられる。先行研究の $Nedd4^{HECT}=Ub$ の分離は、陰イオン交換クロマトグラフィーを利用している [38]。よって、 $E6AP^{HECT}=Ub$ の分離においても先行研究と同様に陰イオン交換クロマトグラフィーを用いれば、 $E6AP^{HECT}=Ub$ を単離できる可能性があるが、さらなる条件検討が必要である。

2-5 図表

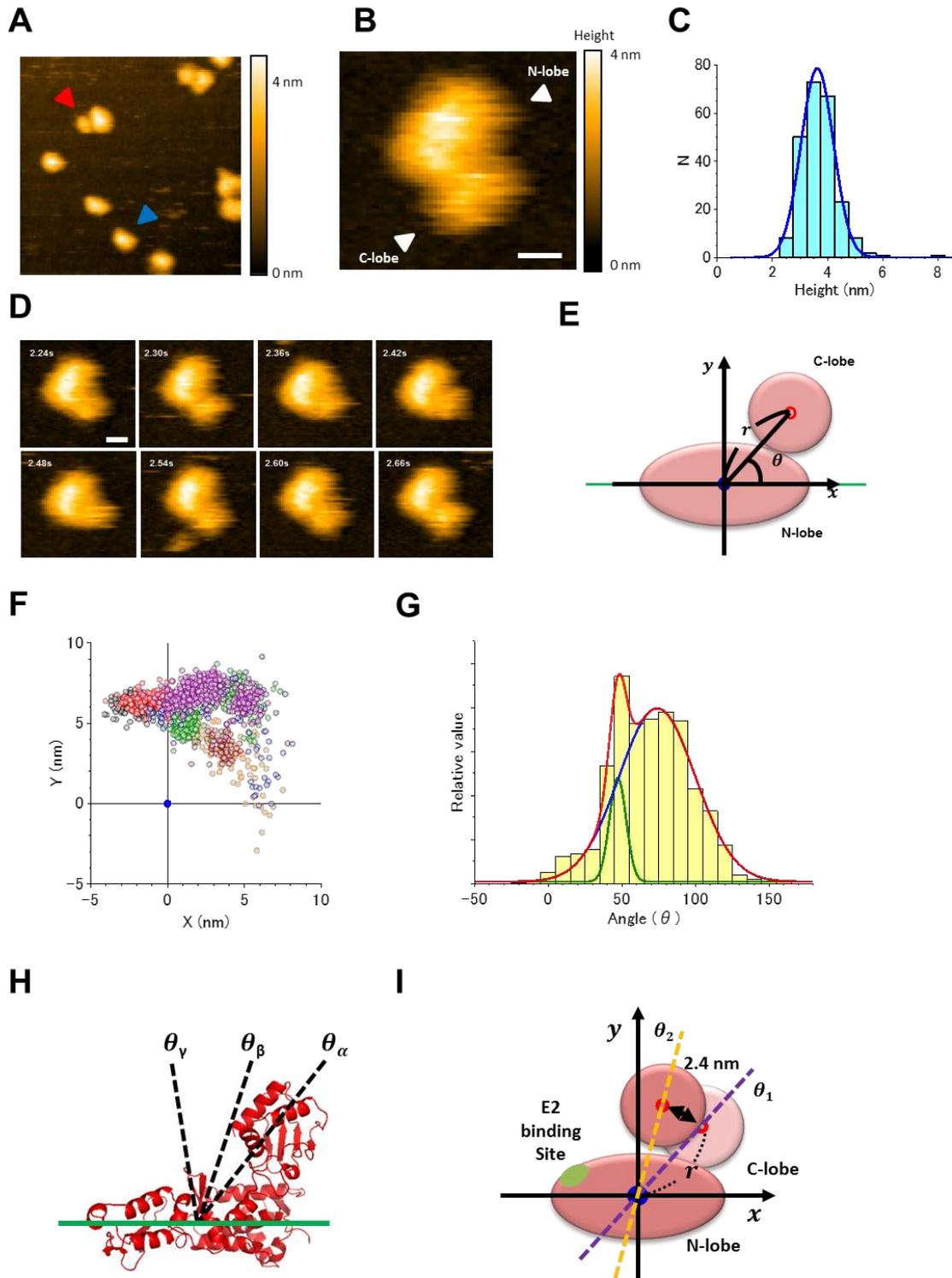


Fig.2-1 hE6AP^{HECT-Wt} の HS-AFM 像と C-lobe の重心位置の解析

(A) hE6AP^{HECT-Wt} の AFM 像 : Scan range : 100×100 nm(100×100 pixel)、Scan speed : 150 ms/frame、z-scale : 4 nm。三角形は 2 つの lobe が識別できる分子(赤色)と識別が困難な分子(青色)の形状の E6AP^{HECT} をそれぞれ示す。(B) hE6AP^{HECT-Wt} の AFM 像の拡大図 : Scan range : 50×50 nm (100×100 pixel) 、 Scan speed : 60 ms/frame、z-scale : 4 nm。三角形はそれぞれ N-lobe と C-lobe をそれぞれ示す。(C) E6AP^{HECT-Wt} の高さのヒストグラム。青線は、シングルガウスフィッティング曲線 (3.62 ± 0.02 nm; N = 233) を表す。(D) hE6AP^{HECT-Wt} の AFM 動画(B)を切り取った。(E) C ロープの重心位置の解析モデル。最初に、N-lobe の重心(青点)と追跡された C-lobe の重心(赤丸)間の距離を計算した。これらの距離を、ヒストグラムに表してガウス関数によってピークフィットした。ピークフィッティングにより約 6.1 nm の値を得て、この距離を半径 (r) とした。(F) 分析に使用した 7 分子からの C-lobe の重心分布。(G) 15 分子からの C-lobe の重心の角度分布。 C-lobe の位置は、N ロープの長軸に対する角度(θ)として得られた。これらの角度はヒストグラムを示し、2 つのピークはダブルガウスフィッティングカーブ(赤線)を使用してピークフィッティングした。 2 つのピークの角度は、それぞれ $\theta_1 = 48.9 \pm 1.61^\circ$ および $\theta_2 = 71.6 \pm 27.1^\circ$ であった。(H) 3 つの異なる構造状態における N-ローブの長軸に対する C-lobe の角度を結晶構造情報から推定した(Fig.2-3 を参照)。 $\theta_a = 52^\circ$ 、L 字形状に対応する。 $\theta_b = 72^\circ$ 、T 形状の立体配座に対応する。 $\theta_c = 99^\circ$ 、触媒立体配座に対応する。(I) HECT ドメインの C-lobe の安定位置をまとめた図。 Fig.1G の 2 つのピーク(θ_1 および θ_2)の角度を示した。 2 つの準安定な C-lobe 位置間の距離 2.4nm は、角度(θ)および半径(r)を用いて得られた。

表 1 : E6AP^{HECT-Wt} の分子形状の観察分子数と割合

	WT
total (N)	233
N-C (N)	57
particle (N)	176
N-C (%)	24.5
particle (%)	75.5

N-C : HECT ドメイン内の N-lobe と C-lobe を識別できる分子。Particle : HECT ドメイン内の N-lobe と C-lobe を識別できない分子。

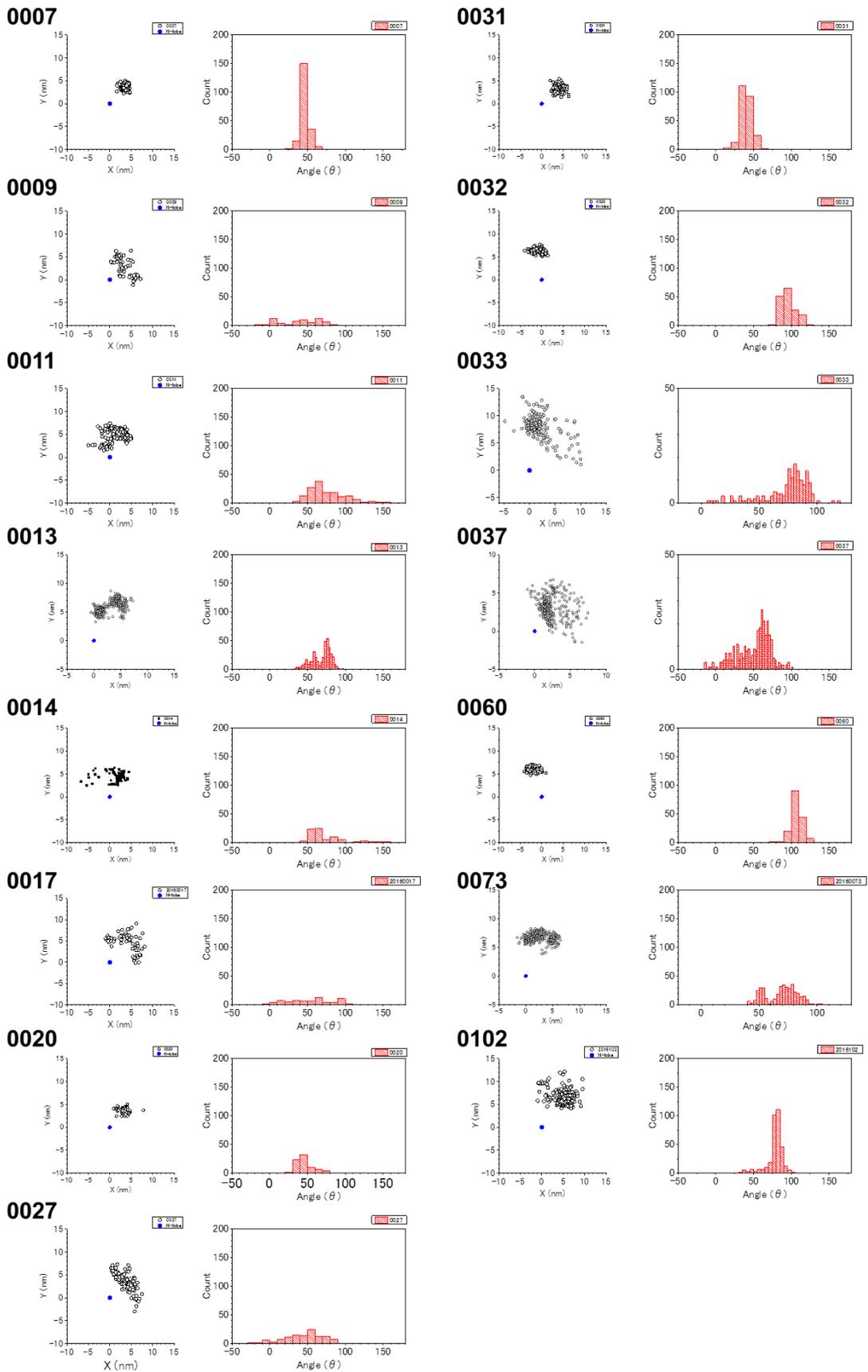


Fig.2-2 解析に使用した C-lobe の重心の位置と角度

AFM 画像解析の方法(2-2-2)に従って、解析に使用した E6AP^{HECT} C-lobe の重心の位置を求めて、分子ごとに散布図(右)、N-lobe の長軸に対する角度のヒストグラム(左)として示した。

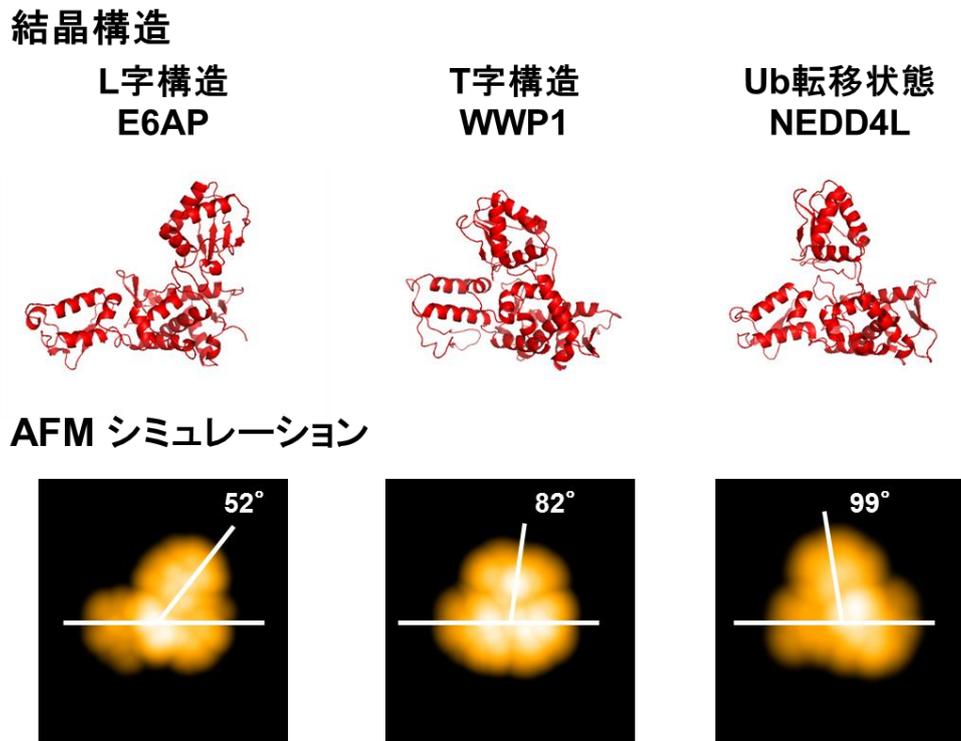
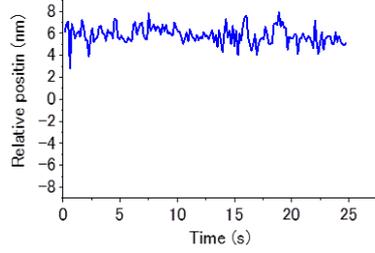


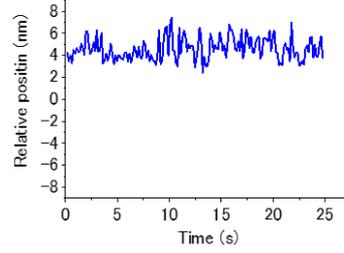
Fig.2-3 各立体配座における HECT ドメイン結晶構造の AFM シミュレーション像

Ub 転移過程 HECT ドメインにおける 3つの立体配座の AFM シミュレーション像をそれぞれ示す。L 字構造には E6AP(PDB : 1C4Z)、逆 T 字構造には WWP1(PDB : 1ND7)、Ub 転移状態には NEDD4L(PDB : 3JVZ)を用い、結晶構造(上段)と結晶構造を基に作製した AFM シミュレーション像(下段)をそれぞれ示す。また、N-lobe の長軸に対する C-lobe の重心の角度を AFM シミュレーション中に示す。

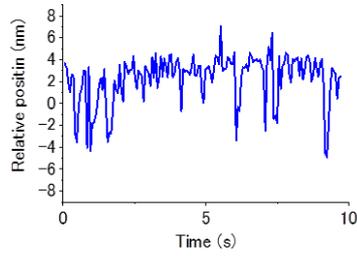
A 分子 1



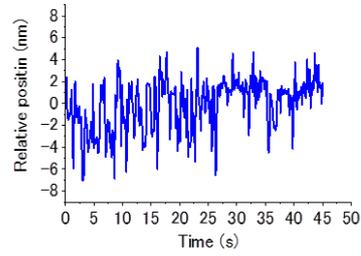
分子 2



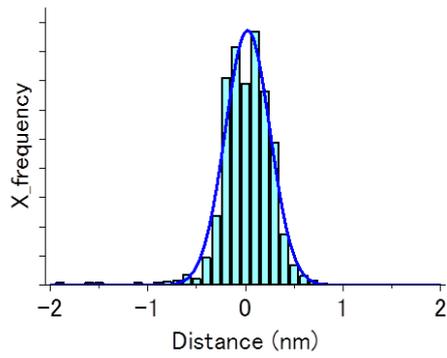
分子 3



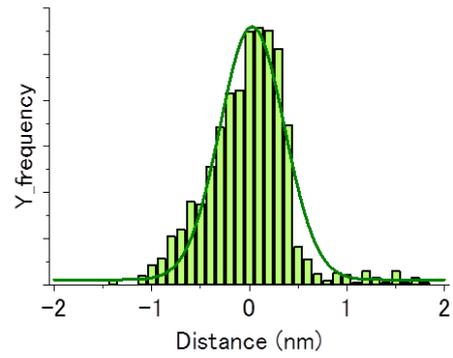
分子 4



B



C



D

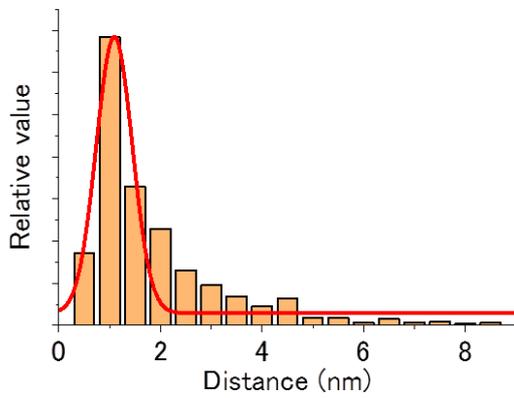


Fig.2-4 E6AP^{HECT-Wt}の C-lobe の移動の経時変化

(A) E6AP の結晶構造から作製した AFM シミュレーション像の C-lobe の位置を基準にして、各フレームの E6AP^{HECT-Wt} の N-lobe の中心に向かう C-lobe の移動距離の経時変化を示した 4 分子の例。移動距離は、角度差と半径(r)に基づいて計算された。(B) 静止した分子の X 方向の距離のゆらぎを示したヒストグラム。青線はシングルガウシアンフィッティング曲線を表し、 0.02 ± 0.23 nm の値を得た。(C) 静止した分子の Y 方向の距離のゆらぎを示したヒストグラム。緑線はシングルガウシアンフィッティング曲線を表し、 0.03 ± 0.34 nm の値を得た。(D) N-lobe の中心に向かう C-lobe 移動距離のヒストグラム。0.41nm 未満の距離は、静止していると考え除外した。0.41nm は静的粒子の x、y 位置の標準偏差(B,C)であった。赤線はシングルガウシアンフィッティング曲線を表し、 1.09 ± 0.41 nm の値を得た。4nm 以上の動きは、毎秒 0.17 回発生した。

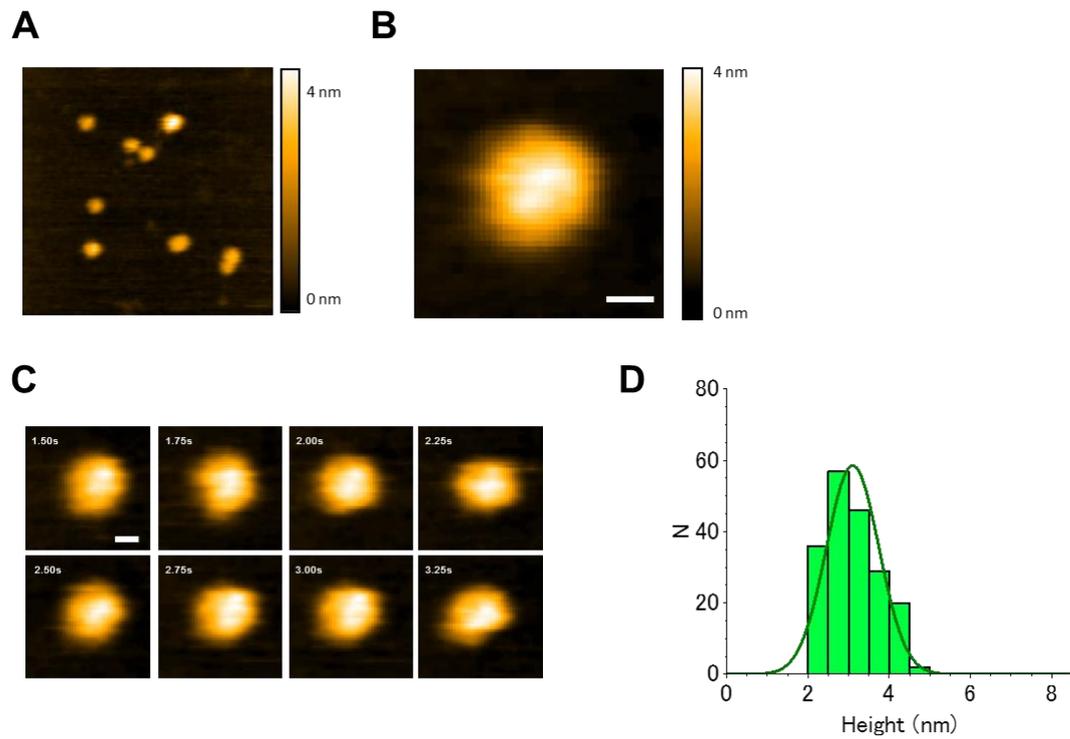


Fig.2-5 E6AP^{HECT}-PPPP の HS-AFM 観察

(A) hE6AP^{HECT}-PPPP の AFM 像 : Scan range : 200×200 nm(120×120 pixel)、Scan speed : 600 ms/frame、z-scale : 4 nm。(B) hE6AP^{HECT}-PPPP の AFM 像の拡大図 : Scan range : 30×30 nm(100×100 pixel)、Scan speed : 250 ms/frame、z-scale : 4 nm、Scale Bar : 5 nm。(C) hE6AP^{HECT}-PPPP の AFM 動画(A)を切り取った。(D) hE6AP^{HECT}-PPPP の高さのヒストグラム。青線は、シングルガウスフィッティング曲線(3.22±1.66 nm; N=199)を表す。

表 2 : E6AP^{HECT_PPPP} の分子形状の観察分子数と割合

	Mt
total (N)	190
N-C (N)	2
particle (N)	188
N-C (%)	1.1
particle (%)	98.9

N-C : HECT ドメイン内の N-lobe と C-lobe を識別できる分子。Particle : HECT ドメイン内の N-lobe と C-lobe を識別できない分子。

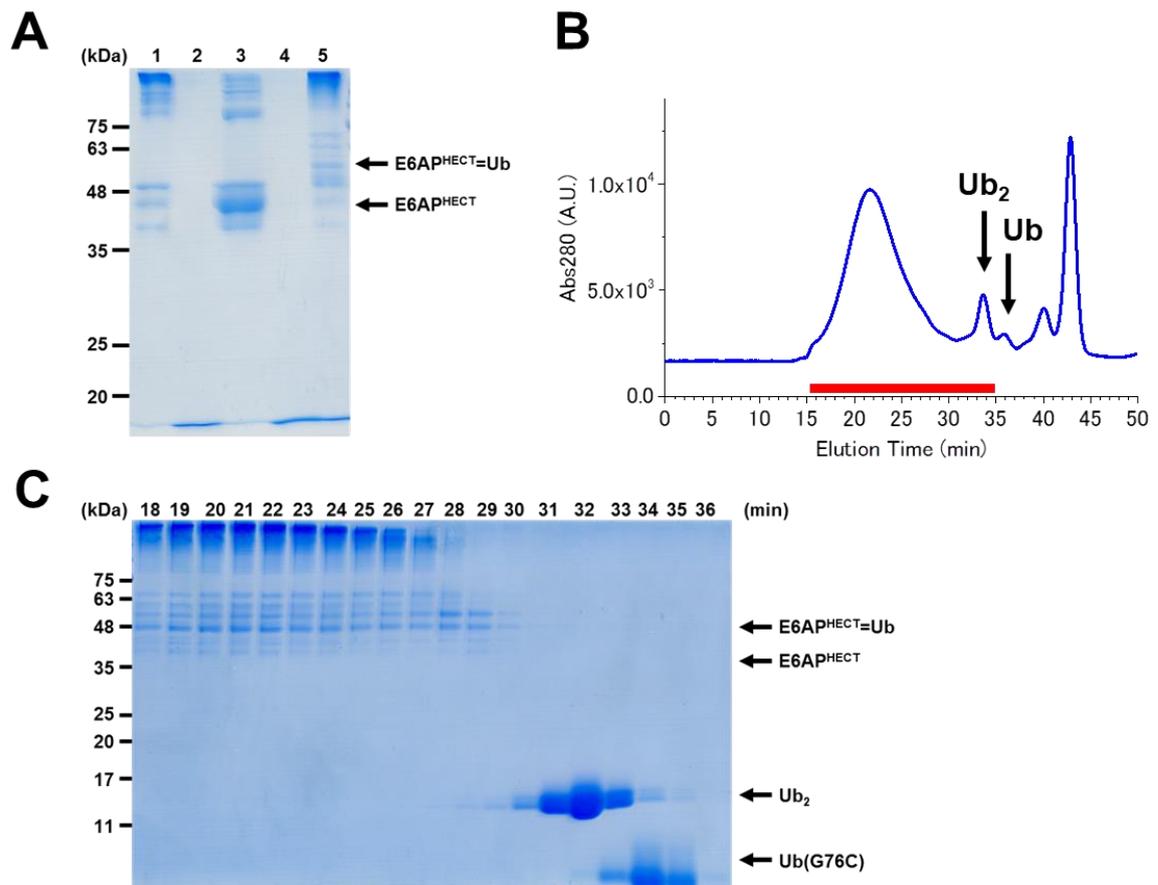
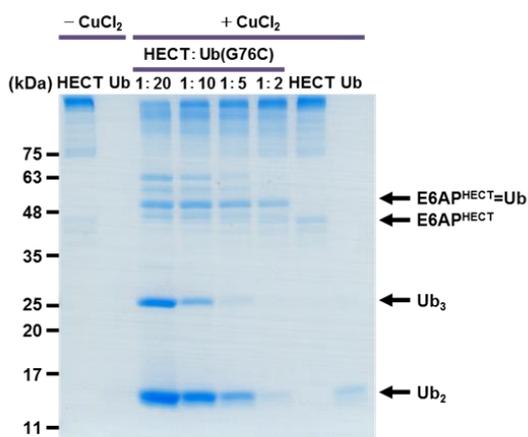


Fig.2-6 E6AP^{HECT}=Ub の分離

(A) E6AP^{HECT}=Ub の形成確認。12% Wide-range gel。lane 1 : E6AP^{HECT} 架橋形成、 lane 2 : Ub(G76C)架橋形成、 lane 3 : E6AP^{HECT}、 lane 4 : Ub(G76C)、 lane 5 : E6AP^{HECT}=Ub 架橋形成。(B) E6AP^{HECT}=Ub のゲル濾過クロマトグラフィーによる分離のクロマト図。矢印は、それぞれのタンパク質の溶出ピークを示す。赤線は回収領域を示す。(C) E6AP^{HECT}=Ub のゲル濾過クロマトグラフィーによる分離の SDS-PAGE 結果。12% Wide-range gel。18~37 分を 1 分ずつ分取し、SDS-PAGE で確認した。各 lane はそれぞれの溶出時間に対応する。また、矢印はそれぞれのタンパク質を示す。

20 μM CuCl_2



100 μM CuCl_2

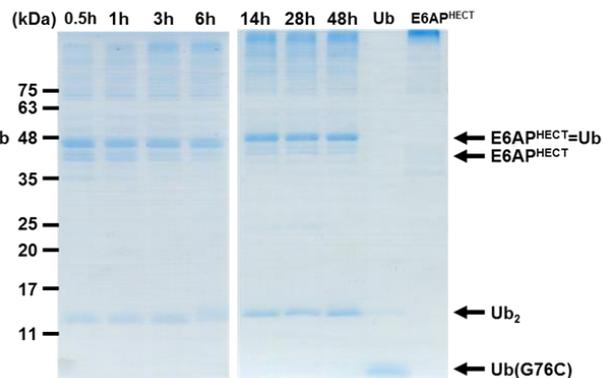
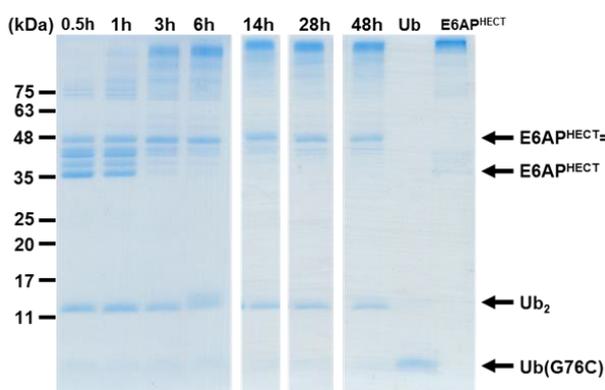
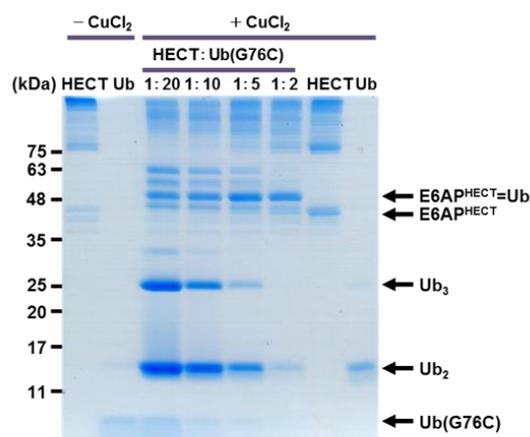


Fig.2-7 $\text{E6AP}^{\text{HECT}}=\text{Ub}$ 形成効率の条件検討

$\text{E6AP}^{\text{HECT}}=\text{Ub}$ の形成効率の条件検討の結果を示す。2つの CuCl_2 濃度(20 μM : 右、100 μM : 左)で、架橋形成させた。 $\text{E6AP}^{\text{HECT}}$ (3 μM)に対する G76C (6~60 μM)の濃度を変えて $\text{E6AP}^{\text{HECT}}=\text{Ub}$ 架橋形成させた SDS-PAGE 結果(上段)。12% Wide-range gel。反応時間は 6h で行った。反応時間(0.5~48h)に対する $\text{E6AP}^{\text{HECT}}=\text{Ub}$ の形成効率の SDS-PAGE 結果。 Ub(G76C) 濃度は、10 μM で行った。矢印はそれぞれのタンパク質示す。

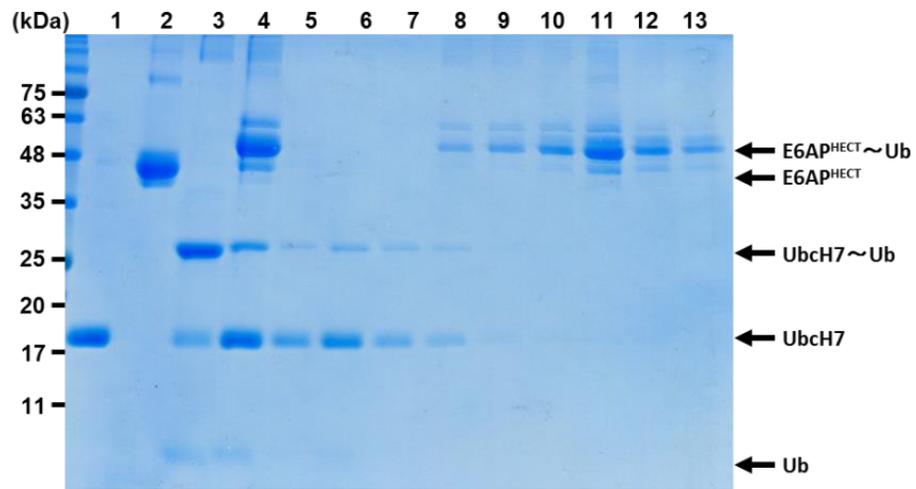
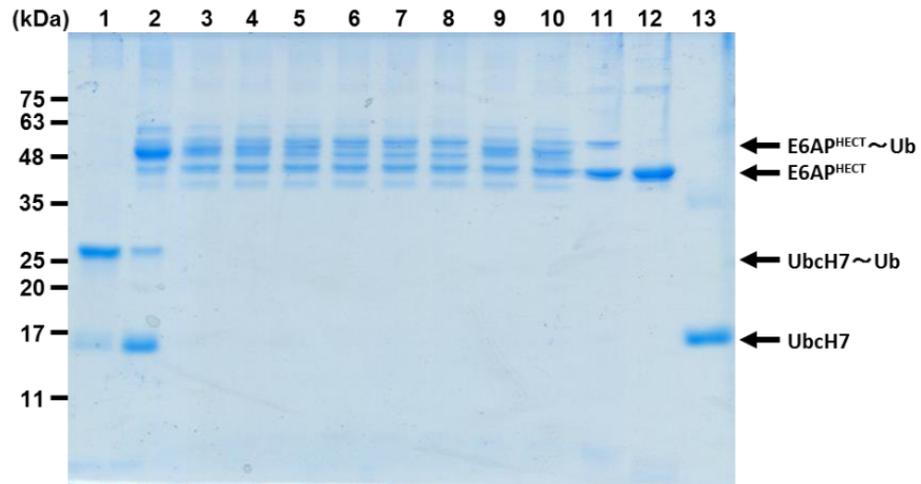
A**B**

Fig.2-8 E6AP^{HECT}~Ub の分離と安定性の検証

(A) Ni-NTA クロマトグラフィーによる E6AP^{HECT}~Ub の分離の SDS-PAGE 結果を示す。12%Wide-range gel。lane 1 : UbcH7(E2)、lane 2 : His-E6AP^{HECT}、lane 3 : プレインインキュベーション後(UbcH7~Ub 形成確認)、lane4 : His-E6AP^{HECT} 追加後(His-E6AP^{HECT}~Ub 形成確認)、lane 5 : 素通り画分、lane 6,7 : 0 mM imidazole 洗浄画分、lane 8-9 : 50 mM imidazole 洗浄画分、lane 10-13 : 200 mM imidazole 溶出画分。

(B) 分離した E6AP^{HECT}~Ub の安定性の検証結果を示す。12%Wide-range gel。プレインインキュベーション後の Ub 化反応溶液で、UbcH7~Ub の形成を確認した(lane 1)。His-E6AP^{HECT} 追加後の Ub 化反応溶液で、His-E6AP^{HECT}~Ub の形成を確認した(lane 2)。Ni-NTA クロマトグラフィーの溶出画分(lane 3)。25°Cでインキュベートし、His-E6AP^{HECT}~Ub の安定性を確認した (lane 4 : 0.5h、lane 5 : 1h、lane 6 : 2h、lane 7 : 4h、lane 8 : 10h)。凍結融解をして、His-E6AP^{HECT}~Ub の安定性を確認した(lane 9 : 凍結融解 1 回、lane 10 : 凍結融解 2 回)。単離後の His-E6AP^{HECT}~Ub に DTT を加えて、His-E6AP^{HECT} と Ub の結合がチオエステル結合であることを確認した(lane 11)。Ub 化反応に使用した His-E6AP^{HECT}(lane 12)。Ub 化反応に使用した UbcH7(lane 13)。

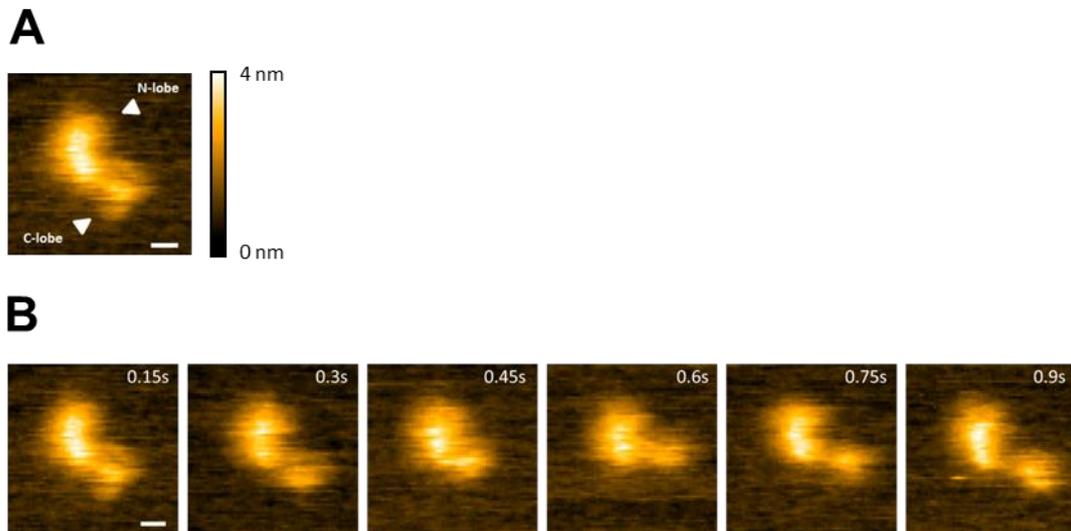


Fig.2-9 E6AP^{HECT-Wt~Ub} の HS-AFM 観察結果

(A) hE6AP^{HECT-Wt~Ub} の AFM 像 : Scan range : 50×50 nm (100×100 pixel)、Scan speed : 150 ms/frame、z-scale : 4 nm、Scale Bar : 5 nm。(B) hE6AP^{HECT-Wt~Ub} の AFM 動画(A)を切り取った。

第3章 E6AP^{HECT}のヒンジループのUb化活性への影響の検証

3-1 概要

HECT ドメインのヒンジループの柔軟性の阻害は、HECT 型 E3 による基質の Ub 化反応を阻害することが明らかにされている[22]。しかし、HECT ドメインを介した E2 から基質への Ub 転移の分子詳細は未だ明らかになっていない。

第2章の E6AP^{HECT} の HS-AFM 観察で、E6AP^{HECT}_{Wt} の構造およびダイナミクスと E6AP^{HECT}_{PPPP} の構造を観察して比較したところ、ヒンジループの柔軟性の阻害によって、E6AP^{HECT} C-lobe が N-lobe 上の E2 結合部位領域に近くに位置していた。このことから、HECT ドメインのヒンジループの柔軟性が阻害されても、E2 から HECT ドメイン上の触媒 Cys 残基へ Ub を転移できるのではないかと予測した。それを検証するために、E6AP^{HECT}_{Wt} と E6AP^{HECT}_{PPPP} の Ub 化活性を比較することにした。

本章では、最初に、Ub 化反応に必要な E3 HECT ドメインの他に、Ub 化酵素[UBE1(E1)、UbcH7(E2)]、各種 Ub [Ub^{Wt}, Ub^{k-less}, His-Ub^{k-less}, Ub^{K48R}]を大腸菌発現系で発現させ、様々なカラムを用いて精製した。次に、精製した各種タンパク質を用いて Ub 化反応を行って、His-E6AP^{HECT}_{Wt} と His-E6AP^{HECT}_{PPPP} の Ub 化活性を比較した。また、E6AP^{HECT} の N 末端への His タグの導入で、Ub 化活性に影響を与えないかも調べた。

その結果、His-E6AP^{HECT}_{Wt} と His-E6AP^{HECT}_{PPPP} の両方で、E2~Ub から Ub が転移し、E6AP^{HECT}~Ub を形成した。さらに、この Ub 化反応で Ub₂ も形成され、His-E6AP^{HECT}_{Wt} よりも His-E6AP^{HECT}_{PPPP} の方が Ub₂ の形成効率が低いことを明らかにした。また、His タグの有無によって Ub₂ の形成に影響しないことも確認した。

現在、Ub₂ の生理学的機能として、直鎖状ポリ Ub 鎖を形成する LUBAC の中心的な触媒因子である HOIP の活性に影響を与えることが報告されているが[44]、Ub₂ の生理学的機能の多くは未だ明らかになっていない。E6AP^{HECT} によって形成された Ub₂ の形成メカニズムや

鎖型特異性の詳細を明らかにすることは、Ub 翻訳後修飾系の理解をより深めるためにも有用である。先行研究で、Wang らが Ub₂ の形成機構として、3 つのメカニズムが提案し[22]、生化学的解析から E2 / E3 ヘテロ二量体モデルが最も有望な機構であると示唆している。しかし、Wang らが使用した HECT 型 E3 は WWP1 であり、HECT ドメイン上流の N 末端領域が E6AP とは異なるとともに、ポリ Ub 鎖形成メカニズムも異なると示唆されている[22]。よって、最初に E6AP^{HECT}_PPPP による Ub₂ の形成メカニズムを明らかにすることを試みた。

Ub₂ 形成に影響を及ぼす因子を明らかにするために、E2 濃度と His-E6AP^{HECT}_PPPP 濃度を変えて Ub 化反応を行った。Ub₂ 形成効率は、各 E2 濃度において大きな違いがみられなかったが、E3 HECT ドメイン濃度に強く依存して増加した。以上のことから、Ub₂ の形成には HECT ドメインが大きく関与している可能性が示唆された。

しかし、本研究の Ub 化反応系では、E2~Ub の再生が常に行われている。そのため、単離した E2~Ub を用いて、Ub 化反応を行った。単離した E2~Ub を HECT ドメインと等量で反応させることで、E2 への Ub の再充填を防ぐことができるほか、E2~Ub のすべての Ub が HECT 上の触媒 Cys に転移することによって、HECT~Ub のみの状況を作り出せると考えた。Ub 化反応の結果、ほとんどの E2~Ub が消失して、HECT~Ub のみになったときから、Ub₂ 形成の大きな増加が見られた。このことから、Ub₂ は HECT~Ub の分子間相互作用によって形成されることを示唆した。

次に、Ub₂ の鎖型特異性を明らかにすることを試みた。ポリ Ub 鎖は、Ub 内の 7 つのリジン残基または N 末端メチオニン残基(M1)を介した結合によって形成される。そこで、本研究ではまず、8 種類の Ub 変異体(Ub^{K-less} K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R)を用いて Ub 化反応を行った。この Ub 化反応の結果、どの Ub 変異体を用いても E6AP^{HECT}によって、Ub₂ が形成された。また、Ub の N 末端に His タグを導入することで、M1 を介した結合が阻害されていることが報告されている[8]。そこで、N 末端 M1 を介した結合を

検証するために、His-Ub^{K-less}を用いて Ub 化反応を行った。Ub 化反応の結果、E6AP^{HECT} は His-Ub^{K-less} でも Ub₂ を形成する能力を示した。しかし、Ub 変異体の鎖形成結果のみを用いて Ub₂ の結合部位を調べるのが困難であった。そこで、質量分析法で Ub 間の結合部位を同定することを試みた。質量分析の結果、トリプシンペプチドの質量スペクトル分析は、野生型および変異型 Ub₂ 鎖が、Lys または Met のアミノ残基を用いて結合されていないことを示唆したが、一致スコアは十分に高くはなかった(データ図示は示していない)。

最後に、HECT 型 E3 リガーゼが、基質タンパク質上に特異的な Ub 鎖を形成するほか、基質タンパク質の非存在下で鎖型特異性を有する遊離 Ub 鎖 (主に Ub₂) を形成することも知られている[37]。HECT 型 E3 の WWP1 は、Nedd4 ファミリーに分類され、基質タンパク質上に K63-ポリ Ub 鎖を形成する。さらに、Ub₂ アッセイにおいて、HECT ドメイン領域のみでも Ub₂ の形成で鎖型特異性を維持している[37]。

K48-ポリ Ub 鎖を基質上に形成する E6AP の HECT ドメインは、K48R Ub₂ を形成し、鎖型特異性が見られなかった。E6AP は Nedd4 ファミリーとは異なるポリ Ub 鎖形成のモデルが予測されている[23]。そのため、Ub₂ 形成においても Nedd4 ファミリーとは異なる結果をもたらしたと予測した。全長 E6AP においても Ub₂ を形成し、鎖型特異性が維持されるかを検証した。

Ub 化反応の結果、E6AP^{HECT} の Ub₂ 鎖形成速度が全長 E6AP のものよりわずかに速かった。次に、E6AP の Ub₂ 鎖型特異性を調べるために、Ub^{K48R}を用いて Ub₂ 解析を行った。全長 E6AP と Ub^{K48R}を用いた Ub₂ アッセイで、E6AP^{HECT} とは対照的に、Ub^{K48R} の Ub₂ を合成しなかった。このことから、HECT ドメインの C 末端領域が Ub 鎖型特異性を決定するために重要であることが示されているが、本研究では E6AP^{HECT} ドメインの上流の N 末端領域も鎖型特異性の決定に関与していることを示した。

3-2 材料と方法

3-2-1 各種タンパク質のクローニング・発現および精製

3-2-1-1 野生型 E6AP HECT ドメイン(E6AP^{HECT}-wt)およびヒンジループ柔軟性 阻害変異体(E6AP^{HECT}-PPPP)のクローニング、発現および精製

E6AP の C 末端 350 アミノ酸をコードする DNA 断片をコドン最適化人工遺伝子 (GenScript)として合成した。人工合成した遺伝子産物を NdeI および BamHI 制限酵素を用いて、pET28a ベクターに挿入し、pET28a-E6AP^{HECT}-wt とした。 pET28a-E6AP^{HECT}-wt 発現プラスミドを有する BL21(DE3) *Escherichia coli* (New England Biolabs)を、0.1 mg/mL ampicillin を含む 2×YT 培地で、OD₆₀₀ が 0.6-0.8 になるまで 25°C で培養し、0.1 mM IPTG, 4h, 25°C 条件で発現誘導した。

菌体を遠心分離により回収し、溶解バッファー [20 mM MOPS-KOH (pH7.0) , 150 mM NaCl, 5 mM 2-ME] に懸濁し、フレンチプレスを用いて破碎した。菌体破碎液を遠心分離 (17,800 x g, 10 min, 4°C)し、得られた上清を平衡化バッファー[20 mM MOPS-KOH(pH7.0)、150 mM NaCl、5 mM 2-ME]で平衡化した Toyopearl DEAE-650M(Tosoh)カラムにロードした。カラムを洗浄バッファー[20 mM MOPS-KOH(pH7.0), 150 mM NaCl, 5 mM 2-ME]で洗浄しつつ、細かく分取した。分取した洗浄画分を SDS-PAGE で確認し、高純度の E6AP^{HECT} の溶出画分を回収した。回収した画分を 20 mM MOPS-KOH(pH7.0), 300 mM NaCl, 5 mM 2-ME で平衡化した Ni-NTA super flow (QIAGEN)にロードした。カラムを洗浄バッファー[20 mM MOPS-KOH(pH7.0), 300 mM NaCl, 100 mM imidazole-Cl, 5mM 2-ME]で洗浄した。その後、溶出バッファー[20 mM MOPS-KOH(pH7.0), 300 mM NaCl, 200 mM imidazole-Cl, 5 mM 2-ME]を流して His-E6AP^{HECT} を溶出した。溶出画分を Amicon Ultra Centrifugal Filters 30,000 MWCO(Millipore)で濃縮した。濃縮試料を遠心(10,000 x g, 10 min, 4°C)し、ランニングバッファー[50 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT]で平衡化した Superdex

75 10/300GL(GE HealthCare)にロードした。流速は 0.5 ml/min で行った。280nm でモニターして、His-E6AP^{HECT} の溶出ピークを分取し、各溶出画分を SDS-PAGE で確認した。溶出した E6AP^{HECT} の濃度は、Bradford (Bio-rad) 法で定量し、使用するまで-80°Cで保存した。ヒンジループ柔軟性阻害変異体(E6AP^{HECT}_PPPP)は、5'-CTGTCCGCCACCACCGCTGGATTTCCAGGC-3 '(Fw)および 5'-ATCAGCAGTTTCGATTTCTTCGGGACGAAAG-3'(Rev)のプライマーと KOD - Plus - Mutagenesis Kit (TOYOBO)を用いて E6AP^{HECT}_Wt のヒンジループ領域のアミノ酸配列を GSRN から PPPP に置換した。E6AP^{HECT}_PPPP の発現・精製法は、E6AP^{HECT}_Wt と同様に行った。

3-2-1-2 UBE1(E1)のクローニング、発現および精製

発現プラスミド (pET23a-pPal-UBE1)を BL21(DE3) *Escherichia coli* (NEB)に形質転換した。発現プラスミドを有する大腸菌を、0.1 mg/mL ampicillin 含有 2×YT 培地で OD₆₀₀ が 0.6~0.8 になるまで 37°Cで培養し、コールドショックを与えるために氷中で 30 分間インキュベートした。発現誘導は、18°C, 16h, 0.5mM IPTG の条件で行った。

菌体を遠心分離により回収し、溶解バッファー[100 mM NaPi(pH 8.0), 150 mM Na₂SO₄, 20 mM imidazole-Cl, 5 mM 2-ME]に懸濁し、フレンチプレスを用いて破碎した。菌体破碎液を遠心(17800 xg, 10 min, 4°C)し、得られた上清を平衡化バッファー[100 mM NaPi(pH 8.0), 150 mM Na₂SO₄, 20 mM imidazole-Cl, 5 mM 2-ME]で平衡化した Ni-NTA super flow カラム(QIAGEN)にロードした。カラムを 2 種類の洗浄バッファー[100 mM NaPi (pH 8.0), 150 mM Na₂SO₄, 50 mM imidazole, 5 mM 2-ME および 100 mM NaPi (pH 8.0), 150 mM Na₂SO₄, 200 mM imidazole, 5 mM 2-ME]で段階的に洗浄した。その後、溶出バッファー[100 mM NaPi (pH 8.0), 150 mM Na₂SO₄, 200 mM imidazole, 5 mM 2-ME]を流して、pPal-hUBE1-His6 を溶出した。溶出画分を Amicon ® Ultra Centrifugal Filters

100,000MWCO(Millipore)で濃縮した。濃縮試料を、PD10 カラム(GE Healthcare)を用いて平衡化バッファー[100 mM NaPi(pH7.2), 1 mM EDTA, 1mM DTT]に溶液交換し、同じバッファーで平衡化した Profinity eXact™ purification resin (Bio-rad)にロードした。カラムを室温で 30 分間インキュベートした。カラムに溶出バッファー[100 mM NaPi(pH7.2), 100 mM NaF, 1 mM EDTA,1 mM DTT]を流して、UBE1-His6 を溶出した。溶出画分を再び Amicon® Ultra Centrifugal Filters 100,000MWCO(Millipore)で濃縮した。濃縮試料を遠心(10,000 x g,10 min,4°C)し、ランニングバッファー[50 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT]で平衡化した Superdex 200 10/300GL(GE HealthCare)にロードした。流速は 0.5 ml/min で行った。280nm でモニターして、UBE1-His6 の溶出ピークを分取後、各フラクションを SDS-PAGE で確認した。溶出した UBE1-His6 の濃度は、Bradford(Bio-rad)法で定量し、使用するまで-80°Cで保存した。

3-2-1-3 UbcH7(E2)のクローニング、発現および精製

UbcH7 DNA 断片を、PrimeScript® High Fidelity RT-PCR キット(TAKARA)と 2 種類のプライマー(5'-CATGCCATGGATGGCGGCCAGCAGGAGG-3' (NcoI), 5'-GTGCGGCCGCAAGCTTTTAGTCCACAGGTCGCTTTTCCCC-3' (HindIII))を用いて、human brain total RNA(Clontech)から逆転写した cDNA を鋳型として PCR 法で増幅した。増幅した UbcH7 産物を上記の制限酵素で pET23d ベクターに連結し、BL21 codon Plus (DE3) RIPL *Escherichia coli* (Agilent Technologies)に形質転換した。発現プラスミドを有する大腸菌を抗生物質(0.1 mg/ml ampicillin, 0.05 mg/mL chloramphenicol)含有 2×YT 培地で OD₆₀₀ が 0.6~0.8 になるまで、37°Cで培養し、1 mM IPTG, 3h, 37°Cの条件で発現誘導した。菌体を遠心分離により回収し、溶解・平衡化バッファー[20 mM MOPS-KOH(pH6.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT]に懸濁してフレンチプレスを用いて破碎した。菌体破碎液を遠心分離(17,800 x g, 10 min, 4°C)し、得られた上清を溶解・平衡化バッ

ファーで平衡化した Toyopearl CM-650M (Tosoh)カラムにロードした。カラムを洗浄バッファー[20 mM MOPS-KOH(pH6.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT]で洗浄し、UbcH7 を 0-300 mM NaCl の直線勾配で溶出し、SDS-PAGE で確認した。高純度の UbcH7 溶出画分を Amicon Ultra Centrifugal Filters 10,000 MWCO (Millipore)で濃縮した。濃縮試料を遠心(10,000 x g, 10 min, 4°C)し、ランニングバッファー[50 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT]で平衡化した Superdex 75 10/300GL (GE HealthCare) にロードした。流速は 0.5 ml/min で行った。280nm でモニターして、UbcH7 の溶出ピークを分取し、各溶出画分を SDS-PAGE で確認した。溶出した UbcH7 の濃度は、NANODROP2000 で吸光度(280 nm)を測定し、モル吸光係数 $[\epsilon_{\text{UbcH7}} = 18450 \text{ (l/mol} \cdot \text{cm)}]$ から求めた。精製タンパク質は、液体窒素で凍結後、 -80°C で使用するまで保存した。

3-2-1-4 Ub^{Wt}, Ub^{K48R}, Ub^{K-less}, His-Ub^{K-less} のクローニング、発現および精製

Ub^{Wt} DNA 断片を、PrimeScript®High Fidelity RT-PCR キット (TAKARA) と 2 つのプライマー [5'-GGCGGGCATATGCAGATCTTCGTGAAGAC-3'(NdeI), 5'-CCCGCCAAGCTTTACCCACCTCTGAGACG-3' (HindIII)]を用いて、HEK293T total RNA から逆転写した cDNA を鋳型として PCR 法で増幅した。増幅した Ub^{Wt} 遺伝子産物を上記の制限酵素で pET23a ベクターに連結した。また、K-less Ub 変異体(Ub^{K-less})DNA 断片と K48R Ub 変異体(Ub^{K48R}) DNA 断片は、コドン最適化人工遺伝子として合成され、上記の 2 つの制限酵素を用いて pET23a ベクターに連結された。これらの発現プラスミド (pET23a-Ub^{Wt}, pET23a-Ub^{K-less}, pET23a-Ub^{K-less})をそれぞれ BL21 codon Plus (DE3) RIPL *Escherichia coli* (Agilent Technologies)に形質転換した。発現プラスミドを有する大腸菌を、抗生物質(0.1 mg/ml ampicillin, 0.05 mg/mL chloramphenicol)含有 2×YT 培地で OD₆₀₀ が 0.6~0.8 になるまで、37°Cで培養し、1 mM IPTG, 3h, 37°Cの条件で発現誘導した。菌体を遠心分離により回収し、溶解バッファー[50 mM CH₃COONa(pH7.0), 1 mM EDTA,

1 mM DTT]で懸濁し、フレンチプレスを用いて破碎した。菌体破碎液を遠心分離(17,800 x g, 10 min, 4°C)し、得られた上清に CH₃COOH を加えて、pH4.5 に調整した。pH 調整後、再び遠心分離(17,800 xg, 10 min, 4°C)を行って上清を回収し、平衡化バッファー[50 mM CH₃COOH / CH₃COONa(pH4.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT]で平衡化した Toyopearl SP-550M(Tosoh)カラムにロードし、平衡化バッファーで洗浄した。Ub を 0-500 mM NaCl の直線勾配をかけて溶出し、溶出画分を SDS-PAGE で確認した。高純度の Ub の溶出画分を回収し、Amicon® Ultra Centrifugal Filters 10,000 MWCO(Millipore)で濃縮した。濃縮試料を遠心(10,000 x g,10 min,4°C)し、ランニングバッファー[50 mM HEPES-NaOH (pH7.0) , 100 mM NaCl, 1 mM DTT]で平衡化した Superdex 75 10/300GL (GE HealthCare)にロードした。流速は 0.5 ml/min で行った。280nm でモニターして、Ub の溶出ピークを分取し、各溶出画分を SDS-PAGE で確認した。Ub の濃度は、NANODROP2000 で吸光度(280nm)を測定し、モル吸光係数[$\epsilon_{Ub} = 1254 \text{ (l/mol} \cdot \text{cm)}$]から求めた。精製タンパク質は、液体窒素で凍結後、-80°Cで使用まで保存した。Ub 変異体 (Ub^{K-less}, Ub^{K48R})も Ub^{Wt}と同様の方法で精製した。

His-Ub^{K-less} は、コドン最適化人工遺伝子(Eurofins genomics)として合成された K-less Ub 変異体 (Ub^{K-less}) DNA 断片を、NdeI および HindIII の制限酵素で pET28a ベクターに連結した。pET28a-Ub^{K-less} 発現プラスミドを BL21 codon Plus (DE3) RIPL *Escherichia coli* (Agilent Technologies)に形質転換した。発現プラスミドを有する大腸菌を、抗生物質 (0.1 mg/ml ampicillin, 0.05 mg/mL chloramphenicol)含有 2×YT 培地で OD₆₀₀ が 0.6~0.8 になるまで、37°Cで培養し、1 mM IPTG, 3h, 37°Cの条件で発現誘導した。菌体を遠心分離により回収し、溶解・平衡化バッファー[20 mM Tris-Cl(pH8.0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole-Cl, 5 mM 2-ME]で懸濁し、フレンチプレスを用いて破碎した。菌体破碎液を遠心(17,800 x g, 10 min, 4°C)し、得られた上清を溶解・平衡化バッファーで平衡化した Ni-NTA superflow(QIAGEN)カラムにロードした。カラムを洗浄バッファー[20 mM

Tris-Cl(pH8.0), 300 mM NaCl, 50 mM imidazole-Cl, 5 mM 2-ME)で洗浄し、溶出バッファー[20 mM Tris-Cl(pH8.0), 300 mM NaCl, 200 mM imidazole-Cl, 5 mM 2-ME]を流して His-Ub^{K-less} を溶出した。溶出画分を Amicon® Ultra Centrifugal Filters 10,000 MWCO(Millipore)で濃縮した。濃縮試料を遠心(10,000 x g,10 min,4°C)し、ランニングバッファー[50 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT]で平衡化した Superdex 75 10/300GL (GE HealthCare)にロードした。流速は 0.5 ml/min で行った。280nm でモニターして、His-Ub^{K-less} の溶出ピークを分取し、各溶出画分を SDS-PAGE で確認した。His-Ub^{K-less} の濃度は、Bradford(Bio-Rad)法で定量し、使用するまで-80°Cで保存した。その他の Ub 変異体(K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K63R)は、LifeSensors から購入し、使用した。

3-2-2 UbcH7(E2)~Ub 複合体の分離

タンパク質濃度が、0.50 μ M UBE1(E1), 10 μ M UbcH7(E2), 15 μ M Ub になるように、反応溶液[25 mM HEPES-NaOH(pH7.0), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM ATP]中に加え、37°Cで 60 分間反応させた。その後、反応溶液を Amicon® Ultra 10,000 MWCO (Millipore)で濃縮した。濃縮試料を遠心(10,000 x g,10 min,4°C)し、Running Buffer [50mM HEPES-NaOH(pH7.0), 100mM NaCl] で平衡化した Superdex 75 10 /300 GL (GE HealthCare)へロードした。流速は 0.5 ml/min で行った。11.5~12.5 ml のピーク領域を分取して、E2~Ub を分離した。分取した溶出画分を SDS-PAGE で確認し、Bradford(Bio-rad)法で E2~Ub 濃度を定量した。液体窒素で凍結し、使用するまで-80°Cで保存した。

3-2-3 In vitro ユビキチン化反応

E2~Ub チオエステル複合体を形成するために、100 nM UBE1, 6 μ M UbcH7, 9 μ M Ub になるように、反応溶液 [25 mM HEPES-NaOH(pH7.0),150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10

mM ATP] 中に混合し、37°Cで60分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、反応溶液を25°Cで10分間インキュベーションした。その後、3 μ M E6AP^{HECT}-Wt または3 μ M E6AP^{HECT}-PPPP になるように反応溶液中に加え、25°Cで0~60分間反応させた。

反応溶液に 5×SDS-PAGE sample Buffer(-DTT)[50%(w/v) Glycerol, 10%(w/v) SDS, 0.25 M Tris-Cl (pH6.8), 0.25%(w/v) Bromophenol Blue] を加えて、反応を停止させた。反応溶液を 12% Wide-Range gel (Nacalai Tesque)で分離し、SERVA Blue G 染色または抗 Ub 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。

ウエスタンブロットは以下の方法で行った。ポリアクリルアミド1枚につき、濾紙6枚とPVDF膜(Immun-Blot PVDF membrane Tur Protein Blotting : Bio-Rad)を用意し、Transfer Buffer [25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% (v/v) MeOH] に浸した。PVDF膜は疎水性があるため、メタノールに浸してから Transfer Buffer に移した。SDS-PAGE は 12% WIDE-Range gel で行った。SDS-PAGE で分離したタンパク質を PVDF 膜に、セミドライブロットティング装置 (Bio-rad) を用いて転写し (100 mA/1h ~ 1.5h)、Blocking Buffer[Tween-PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.05 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1%(v/v) Tween 20), 0.3%(w/v) スキムミルク, 0.02%(v/v) NaN₃] でブロッキングした。Tween-PBS[137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.05 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1%(v/v) Tween 20] で希釈した一次抗体(Anti-Ub 抗体,ポリクロナール抗体)と室温で一晩反応させた。Tween-PBS で洗浄後(10分×3回)、Tween-PBS で希釈した二次抗体 (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked F(ab)₂ fragment (from donkey) : GE HealthCare)と室温で1時間反応させた。再び Tween-PBS で洗浄後(5分×3回)、DW で10分間洗浄した。AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE HealthCare)を用いて化学発光させて、AE-9300 Ez-Capture MG (ATTO)で検出した。

3-3 結果

3-3-1 各種 Ub 化酵素と各種 Ub のクローニング・発現及び精製

Ub 化反応を行うために、UBE1(E1)、UbcH7(E2)、His-E6AP^{HECT} (E3 : HECT ドメイン)の3つの Ub 化酵素と野生型(Ub^{wt})と各種 Ub 変異体(Ub^{K-less}, Ub^{K48R}, His-Ub^{K-less})を上述べた方法に従って精製した(3-2 材料と方法を参照)。それぞれの詳細を以下に述べる。

3-3-1-1 UBE1(E1)のクローニング・発現及び精製

UBE1 を大腸菌発現系で発現させるために、まず N 末端に eXact タグ(pPal)、C 末端に His タグを導入した発現プラスミド(pET23a-pPal-UBE1-His6) を作製した(Fig.3-1A)。次に、上述した方法に従って発現誘導して、UBE1 が過剰発現していることを確認した(Fig.3-1B)。精製は、最初に Ni-NTA super flow カラムを用いて細胞破碎液から UBE1 を粗精製した。次に、eXact タグの切断を行うために Profinity eXactTM purification 樹脂を用いて、UBE1 の純度をさらに高めた。バッファー交換と不純分をさらに除くために、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。クロマトグラムで、12~14 mL の領域に UBE1 のシングルピークを確認できた(Fig.3-1C)。各精製段階における純度を SDS-PAGE で確認し、生化学解析に十分な純度で UBE1 を調製したことを確認した(Fig.3-1D)。

3-3-1-2 UbcH7(E2)のクローニング・発現及び精製

UbcH7 を大腸菌発現系で発現させるために、まず、発現プラスミド(pET23d-hUbcH7) を作製した(Fig.3-2A)。次に、上述した方法に従って、発現誘導を行って hUbcH7 が過剰発現していることを確認した(Fig.3-2B)。精製は、UbcH7 にアフィニティータグを導入していないため、弱陽イオン交換体(CM 樹脂)を用いて精製を行った。弱陽イオン交換体は、アミノ酸配列から求めた UbcH7 の等電点が PI=8.68 であることと、UbcH7-E6AP の結晶構造解析の先行研究の文献で、UbcH7 の精製に陽イオン交換体を使用していたことから

選択した。CM クロマトグラフィーでの直線勾配による溶出で、高純度で UbcH7 を回収できた。さらに、純度を上げることとバッファー交換を兼ねてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。クロマト図から、12~14 mL の領域にシングルピークを確認できた(Fig.3-2C)。各精製段階における純度を SDS-PAGE で確認し、生化学分析に十分な純度で UbcH7 を調製したことを確認した(Fig.3-2D)。

3-3-1-3 His-E6AP^{HECT-Wt} および His-E6AP^{HECT-PPPP} のクローニング・発現及び精製

His-E6AP^{HECT-Wt} を大腸菌発現系で発現させるために、まず、N 末端に His タグを導入した発現プラスミド(pET28a-hE6AP^{HECT-Wt})を作製した(Fig.3-3A)。次に、上述した方法に従って、発現誘導を行って hE6AP^{HECT-Wt} が過剰発現していることを確認した(Fig.3-3B)。精製は、最初に DEAE クロマトグラフィーを行って細胞破碎液から His-hE6AP^{HECT-Wt} を粗精製した。次に、Ni-NTA superflow カラムを用いて His-hE6AP^{HECT-Wt} の純度を高めた。バッファー交換と不純分を除くために、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。クロマト図から、10~12 mL の領域に His-hE6AP^{HECT-Wt} のシングルピークを確認できた(Fig.3-3C)。各精製段階における純度を SDS-PAGE で確認し生化学分析に十分な純度で His-hE6AP^{HECT-Wt} 調製したことを確認した(Fig.3-3D)。His タグは高速 AFM 観察の際に、基板上に固定するために用いるために、切断しなかった。

ヒンジループの柔軟性阻害変異体(His-E6AP^{HECT-PPPP})に関しては、ヒンジループ領域の遺伝子配列に変異を加えて、アミノ酸配列を GSRN から PPPP に置換した以外は、His-hE6AP^{HECT-Wt} と同じ発現・精製条件で行い、同様の結果が得られた(データ図は示していない)。

3-3-1-4 各種 Ub (Ub^{Wt}, Ub^{K48R}, Ub^{K-less}, His-Ub^{K-less})のクローニング・発現及び精製

Ub^{Wt}と各種 Ub 変異体が大腸菌発現系で発現させるために、まず、発現プラスミドを作製した (Fig.3-4A)。次に、材料と方法に記載した方法に従って、発現誘導を行って Ub^{Wt} が過剰発現していることを SDS-PAGE で確認した (Fig.3-4B)。

Ub と Ub 変異体(Ub^{K48R}, Ub^{K-less})にはアフィニティータグを導入していないので、強陽イオン交換体を用いて精製を行った。粗精製で、Ub が低 pH 環境下でも安定して可溶性画分に存在できる性質を利用した。菌体破砕液を低 pH に調整することで、Ub 以外の大部分のタンパク質を不溶性になり、遠心除去することで、Ub の純度を高めることができた。低 pH 環境下であることを利用して、強陽イオン体カラムに Ub を結合させ、直線勾配で溶出することで不純物をさらに除くとともに、Ub 濃度を高めることができた。バッファー交換と精製純度をさらに高めることを目的に、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。クロマト図から、15~16.5 mL の領域に Ub^{Wt} のシングルピークを確認できた(Fig.3-4C)。各精製段階における純度を SDS-PAGE で確認し、生化学解析に十分な純度で Ub^{Wt} を調製したことを確認した(Fig.3-4D)。Ub 変異体(Ub^{K48R}, Ub^{K-less})も同じ方法で発現・精製を行い、同様の結果を得られた (データ図示せず)。

His-Ub^{K-less} の精製は、Ni-NTA super flow カラムを用いて行った。ステップワイズで溶出することで、His-Ub^{K-less} の純度を高めることができた。Ub^{Wt} と同様に、バッファー交換と精製純度をさらに高めることを目的に、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。クロマト図から、15~16.5 mL の領域に His-Ub^{K-less} のシングルピークを確認できた(Fig.3-4E)。各精製段階における純度を SDS-PAGE で確認し、生化学解析に十分な純度で His-Ub^{K-less} を調製できたことを確認した(Fig.3-4F)。His タグは、Ub 化反応のときに M1 鎖の形成を阻害するために導入しているので、切断しなかった。

3-3-2 UbcH7(E2)~Ub の分離

E1-E2 間の Ub 化反応後、Ub 化反応溶液をゲル濾過クロマトグラフィーによって分離した。クロマト図の結果から E2~Ub のピークが確認でき、11.5~12.5 ml の領域を細かく分離した(Fig3-5A)。ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離前後を SDS-PAGE で確認した(Fig3-5B)。ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離後、E2~Ub の割合が分離前よりも増加し、さらに未反応の Ub と UbcH7 も除くことができていることから、E2~Ub を単離することができた。

3-3-3 His-tag の Ub 化活性への影響の検証

高速 AFM 観察での観察基板上への HECT ドメインの固定のために、HECT ドメインの N 末端に His タグを導入した。His タグの有無による Ub 化活性への影響を調べるために、His タグを導入していない HECT ドメイン(E6AP^{HECT}_Wt または E6AP^{HECT}_PPPP)と His タグを導入した(His-E6AP^{HECT}_Wt または His-E6AP^{HECT}_PPPP)を用いて Ub 化反応を行った。Ub 化反応は、プレインキュベーションによる E2~Ub 形成後、E6AP^{HECT} の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 3, 7, 30, 60 分)反応させた。Ub 化反応溶液中のタンパク質は、SDS-PAGE で展開し、SERVA Blue G 染色(Fig.3-6A,6B)または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(Fig.3-6C,6D)で検出した。

SERVA Blue G 染色の結果から、His タグの有無に関係なく E6AP^{HECT} の添加後 3 分で、E2~Ub が減少し、ほぼすべての E6AP^{HECT} のバンドがシフトし、E6AP^{HECT}~Ub が形成された。さらに、His タグを導入した E6AP^{HECT} では、15 分から E6AP^{HECT}~Ub₂ の形成が確認された(Fig.3-6A,6B)。抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting の結果においても、E2~Ub の Ub が E6AP^{HECT} 上に転移していることが確認された。さらに、60 分で Ub₂ の形成が His タグの有無に関係なく双方で検出された(Fig.3-6C,6D)。

3-3-4 His-E6AP^{HECT}-Wt と His-E6AP^{HECT}-PPPP の Ub 転移の活性比較

HS-AFM 観察した His-E6AP^{HECT}-Wt と E6AP^{HECT}-PPPP の Ub 化反応を行い、Ub 化活性を比較した。Ub 化反応は、プレインキュベーションによる E2~Ub 形成後、E6AP^{HECT} の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 3, 7, 30, 60 分)反応させた。Ub 化酵素と Ub の結合はチオエステル結合であるため、還元剤を含まない 5×サンプルバッファーを添加して、Ub 化反応を停止させた。Ub 化反応溶液中のタンパク質は、SDS-PAGE でアクリルアミドゲル中に展開し、SERVA Blue G 染色(Fig.3-7A)または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(Fig.3-7B)で検出した。

SERVA Blue G 染色の結果から、5 分で、E2~Ub が減少するとともに、ほぼすべての E6AP^{HECT} のバンドがシフトし、E6AP^{HECT}~Ub が形成した(Fig.3-7A)。抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting から、E2~Ub の Ub が E6AP^{HECT} 上に転移していることを確認した。そして、E6AP^{HECT}-Ub のバンドにおいて、ヒンジループの柔軟性を制限した E6AP^{HECT}-PPPP~Ub のシグナルは、野生型の E6AP^{HECT}-Wt~Ub のシグナルよりも弱かった。さらに、変異体と野生型の双方で、反応時間の経過とともに Ub₂ が形成された。また、ImageJ を使ったシグナル強度の比較から、変異体の方が野生型よりも Ub₂ の形成効率が高く、Ub₂ の形成量も多かった(Fig.3-7B)。

3-3-5 各種 Ub 変異体を用いた Ub₂ の結合部位の同定

His-E6AP^{HECT}-Wt または His-E6AP^{HECT}-PPPP の Ub 化反応によって Ub₂ が形成されることが明らかになった。Ub₂ の Ub 間の結合部位を同定するために各種 Ub 変異体(Ub^{K-less} K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R, His- Ub^{K-less})を用いて Ub 化反応を行った。Ub 化反応は、プレインキュベーションによる E2~Ub 形成後、His-E6AP^{HECT} の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 5, 15, 30, 60 分)反応させた。Ub 化反応溶液中のタンパク質は、SDS-PAGE で展開し、SERVA Blue G 染色(Fig.3-8-10 左)または抗 Ub 抗体を用いた

Western Blotting(Fig.3-8-10 右)で検出した。

Fig.3-8-10 は、LifeSensors から購入した各種 Ub 変異体 (K-less, K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R) を用いて、Ub 化反応を行った結果をそれぞれ示す。SERVA Blue G 染色 (左) の結果から、すべての Ub 変異体は、プレインキュベーションで E2~Ub を形成していた。さらに、His-E6AP^{HECT} の添加 5 分後に、ほぼすべての His-E6AP^{HECT} のバンドがシフトし、E2~Ub から Ub を受け取っていることが確認された。抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting (右) の結果において、プレインキュベーション後(-)のレーンから、購入した各種 Ub 変異体にかんがりの量の Ub₂ が含まれていた。持ち込みの Ub₂ で Ub 化反応による Ub₂ の形成が分かりにくい、His-E6AP^{HECT}-Wt は K29R Ub を除く各 Ub 変異体でインキュベーションの時間に依存して Ub₂ の形成が増加していた。また同様に、His-E6AP^{HECT}-PPPP においてもすべての Ub 変異体で、インキュベーション時間に依存して Ub₂ の形成が増加しており、His-E6AP^{HECT}-Wt よりも Ub₂ が多く形成されていた。

次に、Ub は C 末端 Gly のカルボキシル基と他の Ub の N 末端 Met のアミノ基間のイソペプチド結合によって、Ub 内のリジンを経さずとも直鎖状の Ub 鎖 (M1 鎖) を形成する [7-11]。この Ub の Met を介した Ub 間の結合は、His タグを導入することで阻害することができることが報告されている [8]。したがって今回は His-Ub^{K-less} を用いた。Fig.3-10 下段は、His-Ub^{K-less} を用いた結果を示す。SERVA Blue G 染色と抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting の結果から、His-Ub^{K-less} においても他の Ub 変異体と同様の結果を示した。しかし、抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting の結果で、Ub 化反応によって、形成された Ub₂ のバンドの位置が、Ub を解離して生じた UbcH7 (E2) よりも上側に位置し、他の Ub 変異体で形成された Ub₂ より分子量が大きくなっていた。His タグの導入により His-Ub^{K-less} の分子量を、BioEdit でアミノ酸配列から算出したところ、10.9 kDa だった。これは、野生型 Ub (8.5kDa) よりも大きく、Ub₂ では 22 kDa になる。今回、形成された Ub₂ の位置は、この分子量とほぼ対応していた。

3-3-6 His-E6AP^{HECT}-PPPP による Ub₂ の形成機構

今回、His-E6AP^{HECT}-PPPP が多量の Ub₂ を形成し、ヒンジループの制限が Ub₂ の形成に影響を及ぼすことが示唆された。また、Wang らが Ub₂ の形成機構として、3つのメカニズムが提案している[22]。よって、Ub₂ 形成に影響を及ぼす因子を明らかにするために、E2 濃度(1 μM, 3 μM, 6 μM)と His-E6AP^{HECT}-PPPP 濃度 (1 μM, 3 μM, 6 μM)を変えて Ub 化反応を行った。Ub 化反応は、プレインキュベーションによる E2~Ub 形成後、His-E6AP^{HECT} の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 5, 15, 30, 60 分)反応させた。Ub 化反応における E2 または His-E6AP^{HECT}-PPPP の濃度は上記の濃度に合わせて行った。SERVA Blue G 染色(上段)または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(中段)で検出し、Western Blotting のシグナル強度(下段)を Image J を用いて求めた。

Fig.3-11 は、E6AP^{HECT}-PPPP の Ub₂ 形成効率の E2 濃度の影響の結果を示す。SERVA Blue G 染色(上段)の結果から、His-E6AP^{HECT} の添加 5 分後に、ほぼすべての His-E6AP^{HECT} のバンドがシフトし、プレインキュベーションによって形成された E2~Ub から Ub を受け取っていることが確認された。抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting (中段)と Image J による Ub₂ のシグナル強度(下段)の結果から、Ub 化反応で Ub₂ が形成されていることが確認された。Ub₂ のシグナル強度は、反応時間の経過に伴って増加し、30 分でシグナル強度がほぼ飽和していた。E2 濃度間での Ub₂ 形成効率に大きな違いは見られなかったが、15 分でわずかに E2 濃度が高いほど Ub₂ の形成量が多かった。

Fig.3-12 は、E6AP^{HECT}-PPPP の Ub₂ 形成効率の E3 濃度の影響の結果を示す。SERVA Blue G 染色(上段)の結果は、E2 濃度を変えた条件と同様の結果を示した。抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(中段)と Image J による Ub₂ のシグナル強度(下段)の結果では、Ub 化反応で Ub₂ が形成され、反応時間の経過に伴って Ub₂ のシグナル強度が増加していた。

E2 濃度依存性を検証した結果と異なり、E3 濃度が高い条件ほど、形成された Ub₂ のシグナル強度が反応の早い段階から強くなり、さらに形成量も多かった。

Fig.3-13 では、プレインキュベーションを行わないで Ub 化反応を行った。上記の方法では、His-E6AP^{HECT} を添加する前に、プレインキュベーションを行うことによって E2~Ub を十分量形成させていた。そのため、His-E6AP^{HECT} を加えた時に、反応開始からわずかな時間で、多量の His-E6AP^{HECT}~Ub が形成される。ここでは、反応溶液中に Ub 化酵素をすべて混合し、Ub を加えたときを反応開始とした。さらに、E1-E2 間の Ub 転移の反応時間を考慮し、反応時間を 0~120 分間に変更した。プレインキュベーションを行わないことで、E2~Ub が十分量形成されていないため、反応時間の経過とともに His-E6AP^{HECT}~Ub が増加していき、His-E6AP^{HECT}~Ub 濃度が Ub₂ 形成効率に影響しているかを検証した。

SERVA Blue G 染色(上段)と抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(下段)の結果から、プレインキュベーションした条件では、反応開始からすぐに His-E6AP^{HECT}~Ub が形成され、プレインキュベーションをしていない条件よりも反応時間全体にわたって His-E6AP^{HECT}~Ub の量が多かった。Ub₂ の形成においても、プレインキュベーションした条件では 30~60 分で Ub₂ の形成が増加しているのに対して、プレインキュベーションしていない条件では 120 分で Ub₂ の形成が見られた。また、最終的に形成された Ub₂ 量もプレインキュベーションした条件の方が多かった。

Fig.3-14 は、単離 E2~Ub を用いて Ub 化反応を行った結果である。Ub₂ 形成において、E2~Ub / E6AP^{HECT}~Ub 間または E6AP^{HECT}~Ub / E6AP^{HECT}~Ub 間の 2 つの可能性が考えられる。上記の Ub 化反応系では、過剰量の Ub 存在下で、E1 と ATP/Mg が存在していることによって E2~Ub が常に再生されている。Fig.3-12 の結果から、E6AP^{HECT} が Ub₂ の形成に影響を及ぼしていると示唆されるが、E2~Ub が常に再生されている条件下では、E2~Ub / E6AP^{HECT}~Ub 間の可能性を排除できない。したがって、プレインキュベーション溶液からゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、E1 と ATP/Mg、未反応の E2 と Ub を除いて、E2~Ub 複合体を分離して、Ub 化反応に使用した。

SERVA Blue G 染色 (上段) の結果から、His-E6AP^{HECT} の添加 5 分後に、Ub₂~Ub

が減少し、ほぼすべての His-E6AP^{HECT} のバンドがシフトし、E2~Ub から His-E6AP^{HECT} の触媒 Cys 上に Ub が転移していることが観察された。反応 15 分後には、UbcH7~Ub はほぼすべてなくなった。抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting (中段) と Image J による Ub₂ のシグナル強度 (下段) の結果から、Ub 化反応で Ub₂ が形成されていることが確認された。His-E6AP^{HECT_PPPP} によって形成された Ub₂ のシグナル強度の結果では、Ub₂ の形成量は 5 分から増加し始め、15 分以降大きく増加していた。一方、His-E6AP^{HECT_PPPP} とは異なり、E6AP^{HECT_Wt} による Ub₂ 形成の効率は経時的に増加せず、Ub₂ 形成の効率は His-E6AP^{HECT_PPPP} によって形成される効率よりもはるかに低かった。

3-3-7 全長 E6AP と His-E6AP^{HECT} の Ub 化活性比較

Ub 化反応で、E6AP^{HECT} によって Ub₂ が形成されることが明らかになった。先行研究で、先行研究で、HECT 型 E3 の WWP1 は、Nedd4 ファミリーに分類され、基質タンパク質上に K63-ポリ Ub 鎖を形成する[37]。さらに、Ub₂ アッセイにおいて、HECT ドメイン領域のみでも Ub₂ の形成で鎖型特異性維持されている[37]。これは、本研究によって E6AP^{HECT} のみで Ub₂ の鎖型特異性を失っている結果と異なっている。E6AP は、Nedd4 ファミリーとは異なるポリ Ub 鎖形成のモデルが報告されている[23]。ここでは全長 E6AP(以下 E6AP)を用いて、Ub₂ 形成及び Ub₂ の鎖型特異性が維持されるか検証した。E6AP は Boston Biochem から購入して使用した。また、Ub₂ の形成効率は、His-E6AP^{HECT_Wt} よりも His-E6AP^{HECT_PPPP} の方がいいが、購入した E6AP は野生型なので、ここでは His-E6AP^{HECT_Wt} を用いて検証した。

Ub 化反応は、プレインキュベーションによる E2~Ub 形成後、3 μM His-E6AP^{HECT_wt} または 0.5 μM E6AP になるように Ub 化反応溶液に加えた。E3 の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 5, 30, 60 分)反応させた。Ub 化反応溶液中のタンパク質は、SDS-PAGE で展開し、SERVA Blue G 染色または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting で検出した。まず、

E6AP^{HECT-Wt}(Fig.3-15A,B)および E6AP(Fig.3-15C,D)で、Ub^{Wt}を用いて Ub₂が形成されるかを調べた。SERVA 染色および抗 Ub 抗体による Western Blotting の結果から、E6AP^{HECT-Wt}では、Fig.3-7 結果と同様に、Ub₂の形成が UbcH7~Ub の時間依存的な減少と一致することが示された(Fig.3-11,3-12)。一方で、E6AP ではほんのわずかに Ub₂が形成された (Fig.3-15D)。また、E6AP^{HECT-Wt}の Ub₂鎖形成速度が E6AP のものよりわずかに速かった(Fig. 3-15C,D)。

次に、E6AP^{HECT}と E6AP で形成された Ub₂の鎖型特異性を調べるために、Ub^{K48R}を用いて同様の Ub 化反応を行い、SERVA Blue G 染色および抗 Ub 抗体による Western Blotting で検出した。E6AP^{HECT-Wt}では、Fig.3-8-10 結果と同様に、Ub₂の形成が UbcH7~Ub の時間依存的な減少と一致することが示された(Fig. 3-9E,F)。一方で、E6AP では Ub₂が形成されなかった(Fig. 3-15G,H)。

3-4 考察

3-4-1 His-E6AP^{HECT}_Wt と His-E6AP^{HECT}_PPPP の Ub 化活性比較

His-tag の導入によって His-E6AP^{HECT}~Ub₂ の形成が見られるようになったが、E2~Ub 複合体から E6AP^{HECT} 上の触媒 Cys への Ub 化転移に影響が見られなかった(Fig.3-6A,6B)。さらに、Western blotting の結果から Ub₂ の形成にも His タグの有無によって違いがみられなかった(Fig.3-6C,6D)。これらの結果から、His-tag の導入によって E2-E6AP^{HECT} 間の Ub 化活性には影響しないと考えられる。

E6AP^{HECT}_PPPP が標的タンパク質に Ub を転移させないことはすでに明らかになっているが、E2 が E6AP^{HECT}_PPPP の触媒 Cys 上に Ub を転移する可能性は未だに明らかにされていない[22]。HS-AFM 観察の結果から、E6AP^{HECT}_PPPP の C-lobe 上の触媒 Cys は E2~Ub 結合部位の近くに位置しているため、E2 から Ub を受け取ることが可能であると予測される。E6AP^{HECT}_PPPP の Ub 化活性から、5 分以内にはほぼすべての E6AP^{HECT}_PPPP が E6AP^{HECT}_Wt と同様にバンドがシフトし、E2 から Ub を自身の触媒 Cys 上に転移していることが確認された(Fig.3-7)。これらの生化学的機能分析は、E6AP^{HECT}_PPPP がヒンジループの柔軟性が制限されても、E6AP^{HECT} の C-lobe が E2 から Ub を十分に受け取る能力を維持できる構造をとり、HS-AFM 観察から予測した E6AP^{HECT}_PPPP の 2 つの lobe の構造的配置と一致する。また、Ub 化活性の結果から、E6AP^{HECT} は遊離した Ub₂ を形成し、E6AP^{HECT}_PPPP の方が、E6AP^{HECT}_Wt よりも Ub₂ の形成効率が高かった(Fig.3-7)。このことから、Ub₂ の形成効率の増加はヒンジループの柔軟性の制限によるものであると示唆される。

3-4-2 E6AP^{HECT} による Ub₂ の形成機構

現在、Ub₂ の生理学的機能として、直鎖状ポリ Ub 鎖を形成する LUBAC の中心的な触媒因子である HOIP の活性に影響を与えることが報告されているが[44]、Ub₂ の生理学的機能の多くは未だ明らかになっていない。Ub₂ の生理学的機能や形成メカニズムを明らかにする

ことは、Ub 化酵素間での Ub 転移機構への知見を得るために有用である。そのため、本研究では、Ub₂ がどのように形成されるかを検証した。Ub₂ の形成メカニズムとして、Wang らによって 3 つのメカニズムが提案されていた[22]。: 1) E3 モノマーモデル: 非共有結合した Ub (アクセプターUb) の特異的 Lys は、HECT ドメインと結合した Ub (ドナーUb) のチオエステル結合と反応し、Ub₂ を形成するモデル。2) E3 ホモ二量体モデル: HECT ドメイン上の触媒 Cys にチオエステル結合した Ub の奥意的 Lys が、もう一方の HECT~Ub の Ub-G76 を攻撃し、Ub₂ を形成するモデル。3) E2/E3 ヘテロ二量体モデル: HECT ドメイン上の触媒 Cys にチオエステル結合した Ub の特異的 Lys が、HECT ドメインの E2 結合部位に結合した E2~Ub の Ub-G76 と反応して、Ub₂ が形成されるモデル。Wang らは、生化学的解析から E2 / E3 ヘテロ二量体モデルが最も有望な機構であると示唆している。一方で、本研究における E2 または E3 HECT ドメインの濃度依存性の結果では、Ub₂ 形成効率は、各 E2 濃度において大きな違いがみられなかったが、E3 HECT ドメイン濃度に強く依存して増加した (Fig.3-11,3-12)。以上のことから、Ub₂ の形成には HECT ドメインが大きく関与している可能性が示唆された。

また、本研究における Ub 化反応は、HECT ドメイン添加 (反応開始) 前に、E1-E2 間で Ub 化反応をさせるプレインキュベーションを行っている。このプレインキュベーションによって、E2~Ub が十分量に形成され、HECT ドメインを添加直後にすばやく HECT~Ub が形成される。したがって、反応初期の段階から反応溶液中に多量の HECT~Ub が存在している。Ub₂ 形成における HECT~Ub の関与の可能性をさらに検証するために、プレインキュベーションを行わずに Ub 化反応を行い、Ub₂ の形成効率を確認した(Fig.3-13)。プレインキュベーションを行ったことと、反応初期段階における Ub 化反応溶液中の HECT~Ub 量を少なくすることができる。Fig.3-13 の結果で、HECT~Ub の形成が抑えられた方が、反応初期段階に HECT~Ub が十分に存在しているときよりも、Ub₂ 形成のタイミングが遅くなり、形成量も少なかった。このことから、HECT ドメインが Ub₂ の形

成に関与している可能性を補足する。

しかし、Ub₂形成において、HECT ドメインが大きく関与していることから、HECT ホモ二量体モデルが予測されるが、E2/E3 ヘテロ二量体モデルの可能性を完全に排除しきれない。本研究における Ub 化反応では、反応溶液中に E1 と過剰量の Ub および ATP/Mg が含まれている。これにより、E2~Ub が常に再生され続けられるため、反応溶液中に HECT~Ub と共に E2~Ub が常に存在している。HECT ホモ二量体モデルを示唆するために、HECT~Ub 単独の状況をつくり出し、Ub₂ の形成量を確認することができればいいが、反応性の高い HECT~Ub を単離・維持することは難しい。そこで、単離した E2~Ub を用いることにした。Ub 化反応で、単離した E2~Ub を HECT ドメインと等量で反応させることで、E2 への Ub の再充填を防ぐことができるほか、E2~Ub のすべての Ub が HECT 上の触媒 Cys に転移することによって、HECT~Ub のみの状況を作り出せると考えた。

単離した E2~Ub を用いた Ub 化反応の結果から、野生型 E6AP^{HECT} では、Ub₂ 形成の増加は見られなかったが、E6AP^{HECT}-PPPP ではほとんどの E2~Ub が消失して、HECT~Ub のみになったときから、Ub₂ 形成の大きな増加が見られた(Fig.3-14)。このことから、Ub₂ は HECT~Ub の分子間相互作用によって形成されることが示唆され、これは E3 ホモ二量体モデルを支持すると考える(Fig.3-16, iii)。

3-4-3 E6AP^{HECT} によって形成される Ub₂ の結合部位の同定

E3 は、Ub 内の 7 つのリジン残基を介して特異的なポリ Ub 鎖を形成している[6-8]。形成されるポリ Ub 鎖は、どのリジン残基を利用するかによって、それぞれ立体構造が異なり、生体内で様々な生理的機能に関与している[6-13]。したがって、Ub 鎖の結合部位の同定は、生体内での生理的機能を理解する上でも重要である。本研究で、E6AP^{HECT} が Ub 化反応で Ub₂ を形成し、特にヒンジループの柔軟性を制限した E6AP^{HECT}-PPPP で Ub₂ の形成効率が大きくなることが明らかになった (Fig.3-7B)。E6AP^{HECT} がどのようなタイプの Ub₂ を合

成するかを調べるために、様々な Ub 変異体 (K-less, K6R, K11R, K27R, K33R, K48R, K63R)を用いて Ub 化反応を行った。購入した Ub 変異体に持ち込みの Ub₂が含まれていて、Ub₂の増加が分かりにくいものの、E6AP^{HECT-Wt}の K29R を除くすべての E6AP^{HECT}の Ub 化で反応時間に依存して Ub₂量が増加していた (Fig.3-8-10)。このことから、E6AP^{HECT}によって形成される Ub₂は、Ub内のリジン残基を介さないで形成されていると示唆される。

次に、Ub 内のリジン残基を介さない Ub 鎖形成の可能性を検証した。RING 型 E3 の一つである LUBAC は、Ub 内のリジン残基を介さないで、直鎖状の Ub 鎖を合成することが報告されている[7-11]。この直鎖状 Ub 鎖 (M1 鎖)は、Ub の C 末端 Gly 残基のカルボキシ基と他の Ub の N 末端 Met 残基(M1)のアミノ基間のイソペプチド結合によって形成される。この直鎖状 Ub 鎖の形成は、Ub の N 末端に His タグを導入することで阻害されるため[8]、Ub 化反応に His-Ub^{K-less}を用いることにした。His-Ub^{K-less}を使用することで、現在報告されているすべてのタイプの Ub 鎖の合成を阻害できると予測した。しかし、E6AP^{HECT}は His-Ub^{K-less}の Ub₂を形成する能力を示し、Ub 内の Lys アミノ基または N 末端 Met 以外を介した Ub 鎖形成の可能性を示した (Fig.3-10 下段)。

Ub 変異体の鎖形成結果のみを用いて Ub₂の結合部位を調べるのが困難であったため、質量分析法で Ub 間の結合部位を同定することを試みた。Ub 化反応で形成された Ub₂をトリプシンで消化し、ペプチドを逆相 HPLC で分画した。トリプシンペプチドの質量スペクトル分析は、野生型および変異型 Ub₂鎖が、Lys または Met のアミノ残基を用いて結合されていないことを示唆したが、一致スコアは十分に高くはなかった(データ図は示していない)。

3-4-4 全長 E6AP の Ub 化活性 Ub₂形成の検証

HECT 型 E3 が、基質タンパク質上に特異的な Ub 鎖を形成することが報告されている[36,37]。また、HECT 型 E3 は、基質タンパク質の非存在下で鎖型特異性を有する遊離 Ub

鎖 (主に Ub₂)を形成することも知られている[37]。先行研究で、HECT 型 E3 の Nedd4 ファミリーは、基質タンパク質上に K63-ポリ Ub 鎖を形成する。さらに、Ub₂ アッセイにおいて、HECT ドメイン領域のみでも Ub₂ の形成において鎖型の特異性が維持されている[37]。しかし、HECT 型 E3 の一つである E6AP は、Nedd4 ファミリーとは異なるポリ Ub 鎖形成のモデルが報告されている[23]。したがって、本研究では、E6AP においても Nedd4 ファミリーと同様に、Ub₂ 形成において鎖型特異性を維持するかを検証した。

まず、E6AP^{HECT-Wt} および E6AP と Ub^{Wt} を用いて Ub 化反応を行い、Ub₂ 形成を調べた。E6AP^{HECT-Wt} と E6AP において、Ub₂ の形成が UbcH7-Ub の時間依存的な減少と一致していた (Fig.3-15A-D)。さらに、E6AP^{HECT-Wt} の Ub₂ 鎖形成速度が E6AP のものよりわずかに速かった(Fig.3-15B,D)。

次に、E6AP^{HECT} の Ub₂ 鎖型特異性を調べるために、Ub^{K48R} を用いて Ub₂ アッセイを行った。E6AP は基質上に K48-ポリ Ub 鎖を形成することが知られているので、E6AP^{HECT} で鎖型特異性が維持されているならば、Ub^{K48R} の Ub₂ を形成しないと予測した。しかし、Ub₂ アッセイで、E6AP^{HECT} で Ub^{K48R} の Ub₂ を形成し、野生型 Ub を用いた場合と大きな差が見られなかった(Fig.3-15E,F)。これらから、E6AP^{HECT} が Ub₂ 形成能力を保持するが、鎖型特異性を欠くことを示している。Nedd4 ファミリーの知見から、HECT ドメインの C 末端領域が Ub 鎖特異性を決定することに重要な役割を果たすことが示されているが、本研究の結果は、HECT ドメインの C 末端領域でなく HECT ドメインの上流の N 末端領域も鎖型特異性に関与していることを示唆する。これを補足するように、全長 E6AP と Ub^{K48R} を用いた Ub₂ アッセイでは、E6AP^{HECT} とは対照的に、全長 E6AP は Ub^{K48R} の Ub₂ を合成しなかった(Fig.3-15G,H)。このことは、E6AP の鎖型特異性が E6AP^{HECT} の N 末端上流領域で回復することを示唆している。以上のことから、先行研究で、HECT ドメインの C 末端領域が Ub 鎖型特異性を決定するために重要であることが示されているが、本研究では E6AP^{HECT} ドメインの上流の N 末端領域も鎖型特異性の決定に関与していることを示した。

3-5 図表

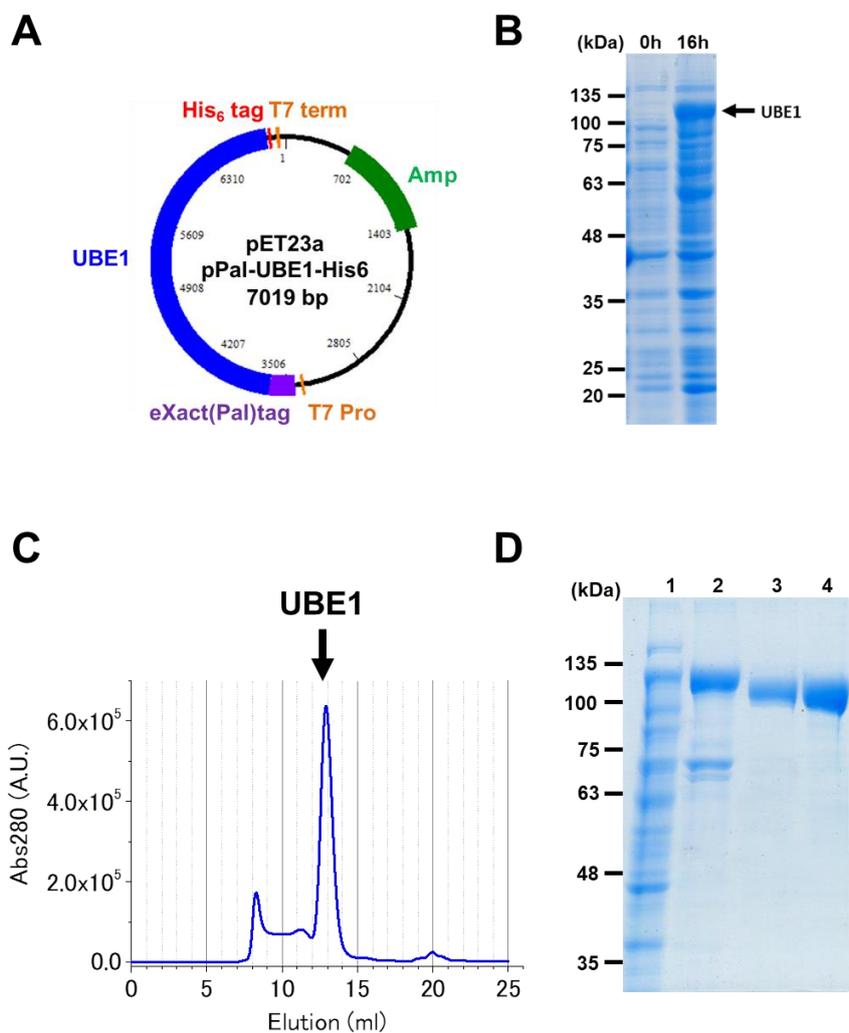


Fig.3-1 UBE1(E1)のクローニング・発現及び精製

A : UBE1 の発現プラスミド(pET23a-pPal-hUBE1-His6)マップ、 B : 大腸菌発現系における発現誘導の SDS-PAGE。10%ポリアクリルアミドゲル。矢印は hUBE1 のバンドを示す。 C : ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマト図。矢印は hUBE1 のピークを示す。 D : 各精製段階の SDS-PAGE。10%アクリルアミドゲル。3 $\mu\text{g}/\text{lane}$ 。lane 1 : フレンチプレス後可溶性画分、lane 2 : Ni-NTA 溶出画分、lane 3 : Profinity eXact™ カラム溶出画分、lane4、ゲル濾過クロマトグラフィー溶出画分。

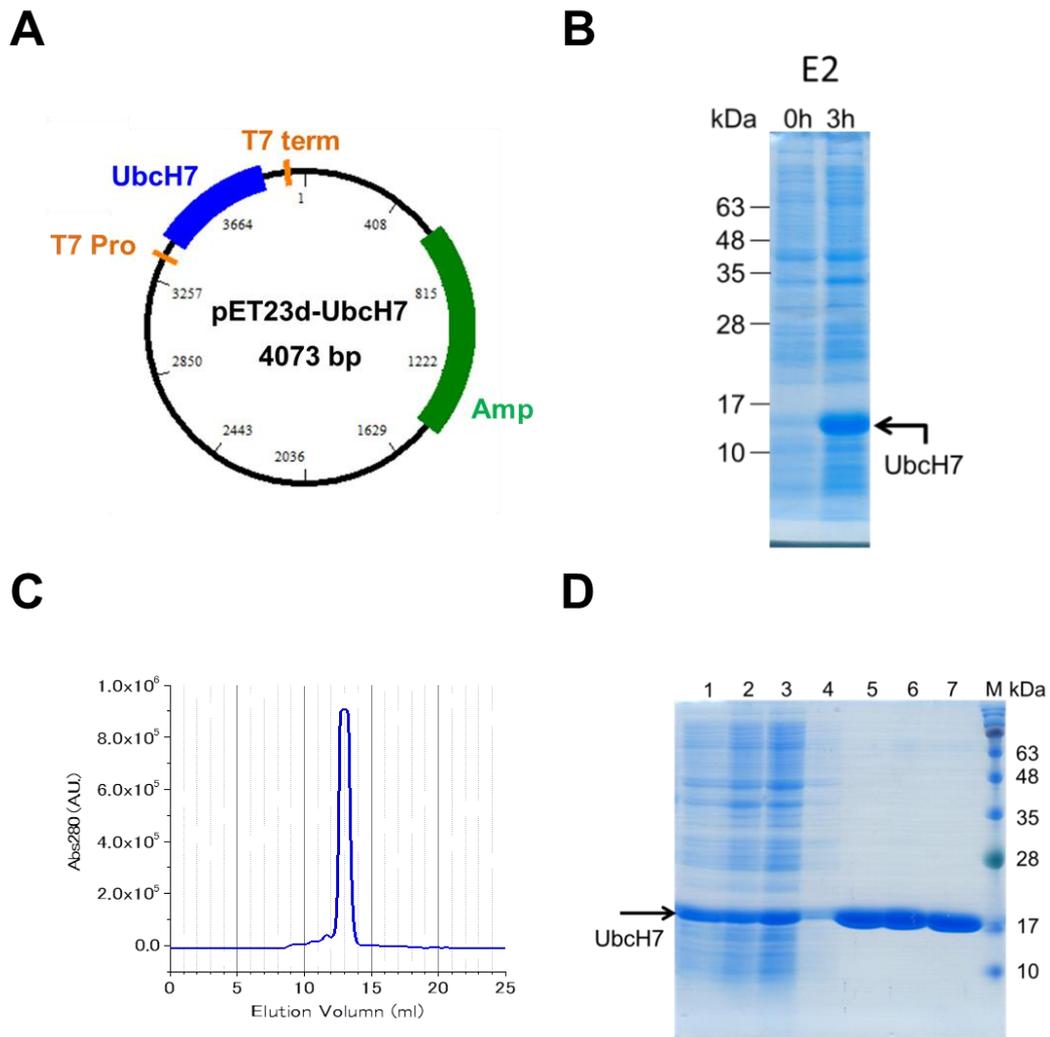


Fig.3-2 UbcH7(E2)のクローニング・発現及び精製

A : UbcH7 の発現プラスミド(pET23d-UchH7)マップ、B : 大腸菌発現系における発現誘導の SDS-PAGE。15%ポリアクリルアミドゲル。矢印は UbcH7 のバンドを示す。C : ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマト図。矢印は hUbcH7 のピーク(12~14 ml)を示す。D : 各精製段階の SDS-PAGE。15%アクリルアミドゲル。10 μ g/lane。lane 1 : フレンチプレス後可溶性画分、lane 2 : CM 素通り画分、lane 3 : CM 洗浄画分前半、lane 4 : CM 洗浄画分後半、lane 5 : CM 溶出画分、lane 6 : 限外濾過後の濃縮試料、lane : 7 ゲル濾過クロマトグラフィー溶出画分。

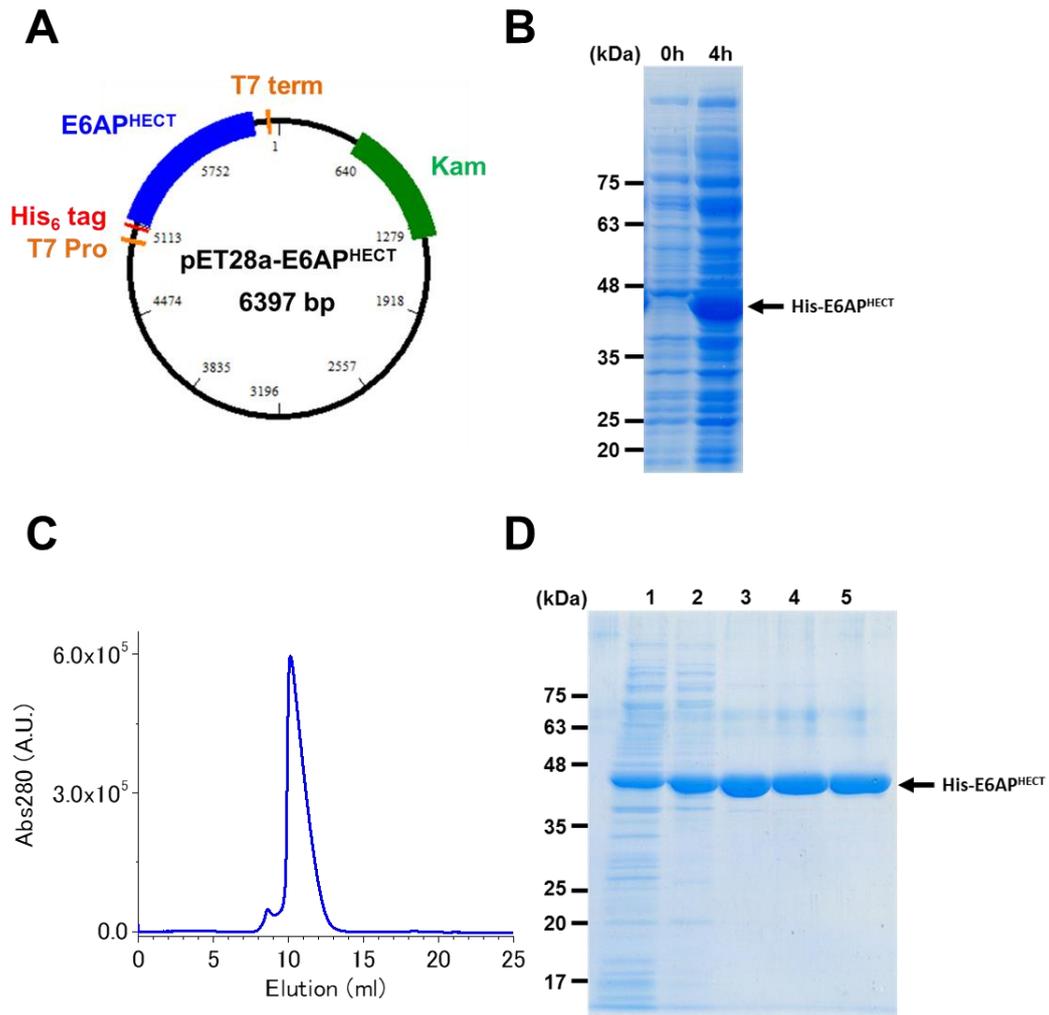


Fig.3-3 His-E6AP^{HECT}_{Wt} および His-E6AP^{HECT}_{PPPP} (E3 : HECT ドメイン)のクローニング・発現及び精製

A : His-E6AP^{HECT} の発現プラスミド(pET28a-E6AP^{HECT})マップ、 B : 大腸菌発現系における発現誘導の SDS-PAGE。12%ポリアクリルアミドゲル。矢印は His-E6AP^{HECT} のバンドを示す。 C : ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマト図。矢印は His-E6AP^{HECT} のピーク(10~12 ml)を示す。 D : 各精製段階の SDS-PAGE。12%アクリルアミドゲル。4 μ g/lane。 lane 1 : フレンチプレス後可溶性画分、 lane 2 : DEAE 溶出画分、 lane 3 : Ni-NTA 溶出画分、 lane 4 : ゲル濾過クロマトグラフィー溶出画分。

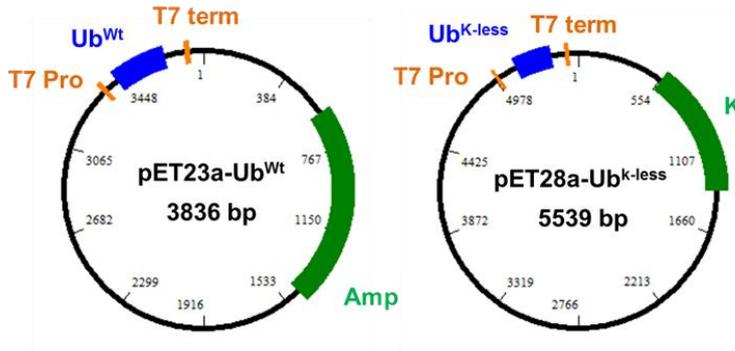
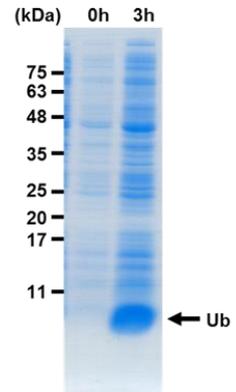
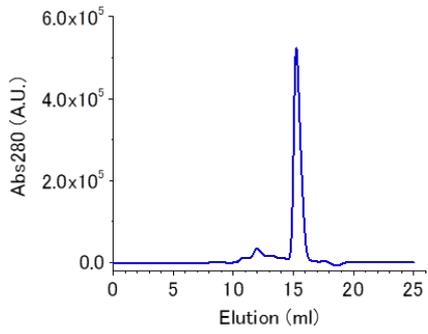
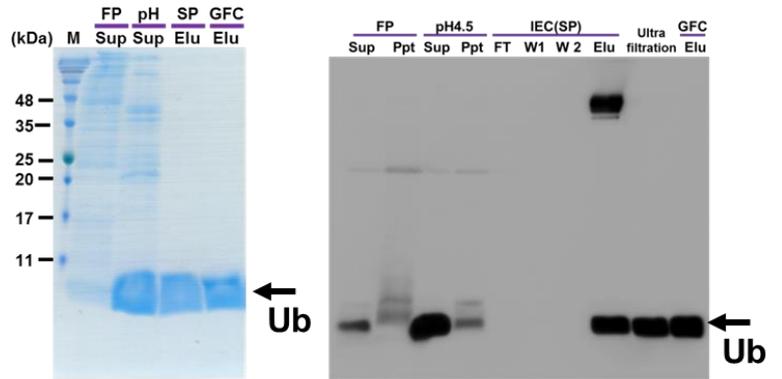
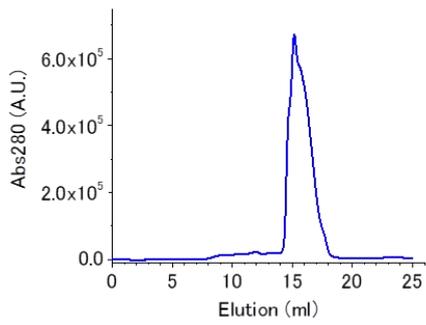
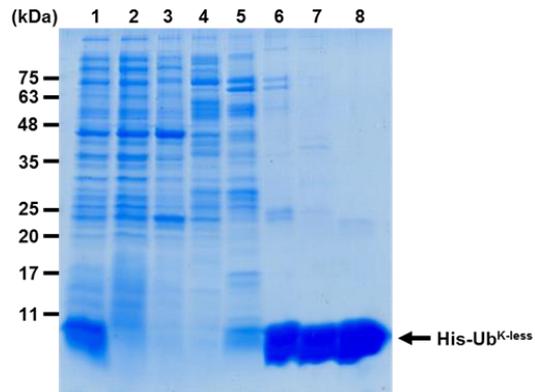
A**B****C****D****E****F**

Fig.3-4 His-E6AP^{HECT}_Wt および His-E6AP^{HECT}_PPPP のクローニング・発現及び精製

A : His-E6AP^{HECT} の発現プラスミド(pET23a-Ub^{Wt})マップ、 B : 大腸菌発現系における発現誘導の SDS-PAGE。18%ポリアクリルアミドゲル。矢印は Ub^{Wt} のバンドを示す。

C : Ub^{Wt} のゲル濾過クロマトグラフィーのクロマト図。矢印は Ub^{Wt} のピーク(15~16.5 ml)を示す。D : Ub^{Wt} の各精製段階の SDS-PAGE。18%アクリルアミドゲル。4 µg/lane。

lane 1 : フレンチプレス後可溶性画分、 lane 2 : pH 調整後(pH4.5)可溶性画分、 lane 3 : SP 溶出画分、 lane4 : ゲル濾過クロマトグラフィー溶出画分。 E : His-Ub^{k-less} のゲル濾過クロマトグラフィーのクロマト図。矢印は His-Ub^{k-less} のピーク(15~16.5 ml)を示す。

F : His-Ub^{k-less} の各精製段階の SDS-PAGE。18%アクリルアミドゲル。4 µg/lane。 lane 1 : フレンチプレス後可溶性画分、 lane 2 : Ni-NTA 素通り画分、 lane 3 : Ni-NTA 洗浄画分画分、 lane4 : Ni-NTA 溶出画分(20 mM imidazole)、 lane5 : Ni-NTA 溶出画分(50 mM imidazole)、 lane6 : Ni-NTA 溶出画分(100 mM imidazole)、 lane7 : Ni-NTA 溶出画分(200 mM imidazole)、 lane8 : ゲル濾過クロマトグラフィー溶出画分。

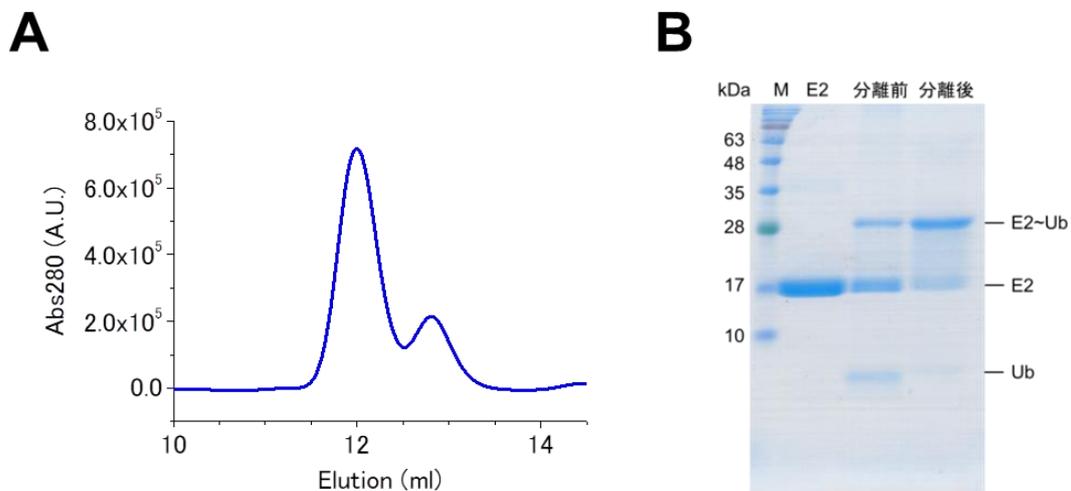


Fig.3-5 ゲル濾過クロマトグラフィーによる E2~Ub 分離

A : ゲル濾過クロマトグラフィーによる E2~Ub 分離のクロマト図。矢印は、E2~Ub(11.5~12.5 ml)、E2(12.5~13 ml)のピークをそれぞれ示している。B : ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離前後の SDS-PAGE。15%アクリルアミドゲル。lane 1 : UbcH7、lane 2 : ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離前、lane 3 : ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離後。

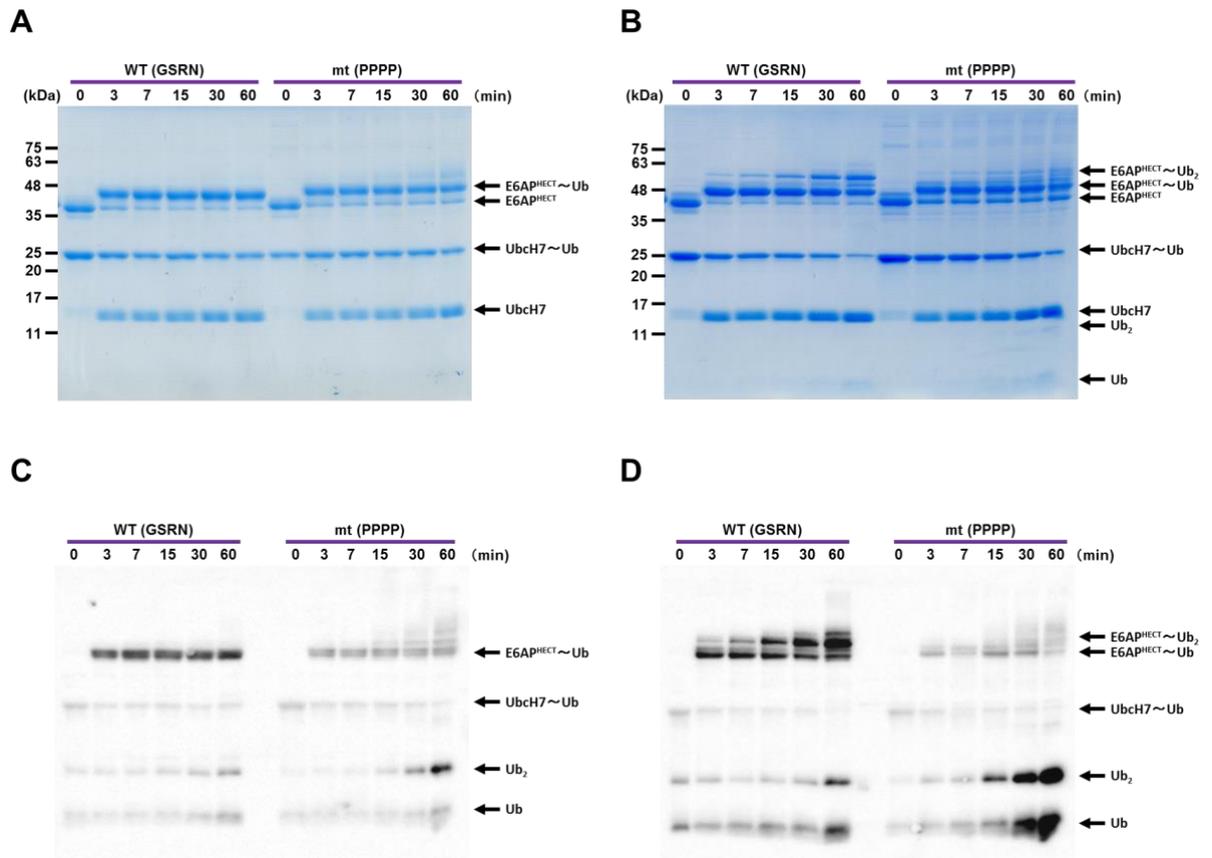


Fig.3-6 His タグの Ub 化反応への影響の検証

A : His タグを導入していない E6AP^{HECT} の SDS-PAGE 結果 (SERVA 染色)。 B : His タグを導入した His-E6AP^{HECT} の SDS-PAGE 結果 (SERVA 染色)。 C : His タグを導入していない E6AP^{HECT} の Western blotting 結果(抗 Ub 抗体)。 D : His タグを導入していない E6AP^{HECT} の Western blotting 結果(抗 Ub 抗体)。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

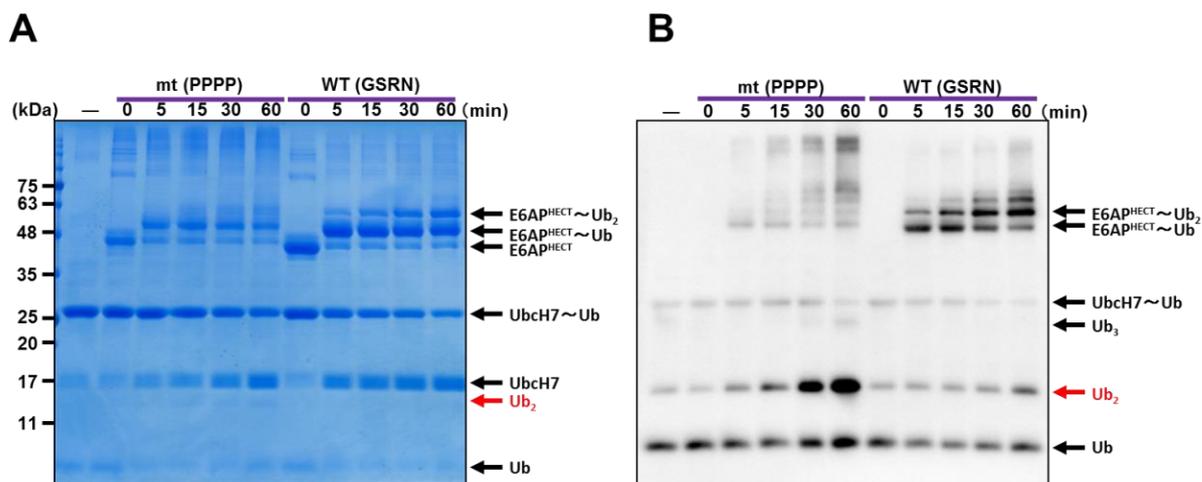
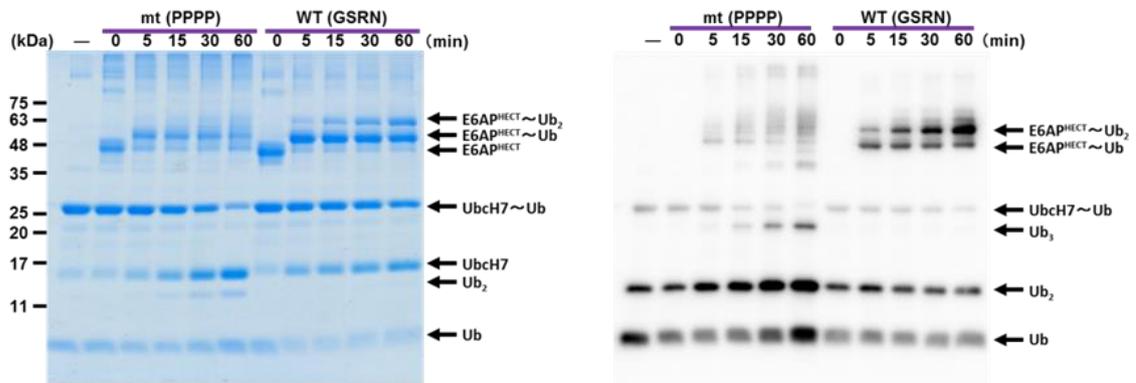


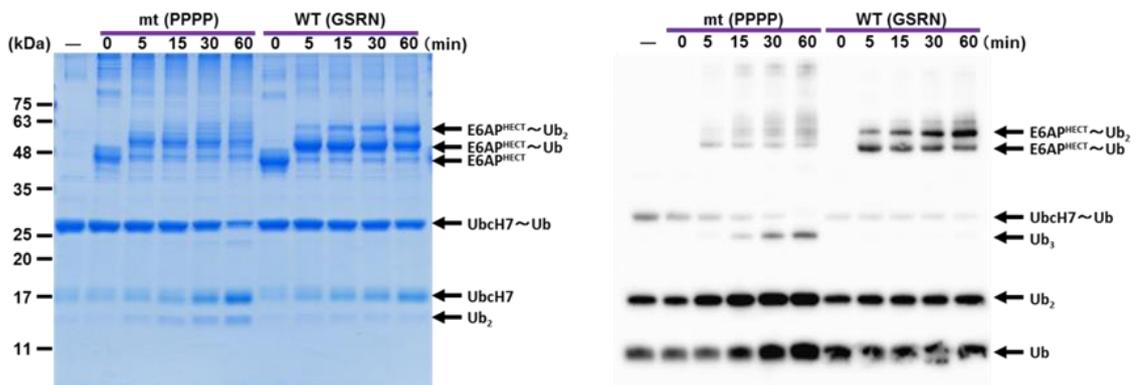
Fig.3-7 His-E6AP^{HECT}-WT と His-E6AP^{HECT}-PPPP の Ub 転移の活性比較

A: SERVA 染色による SDS-PAGE 結果。B: 抗 Ub 抗体による Western Blotting 結果。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{HECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

K-less Ub



K6R Ub



K11R Ub

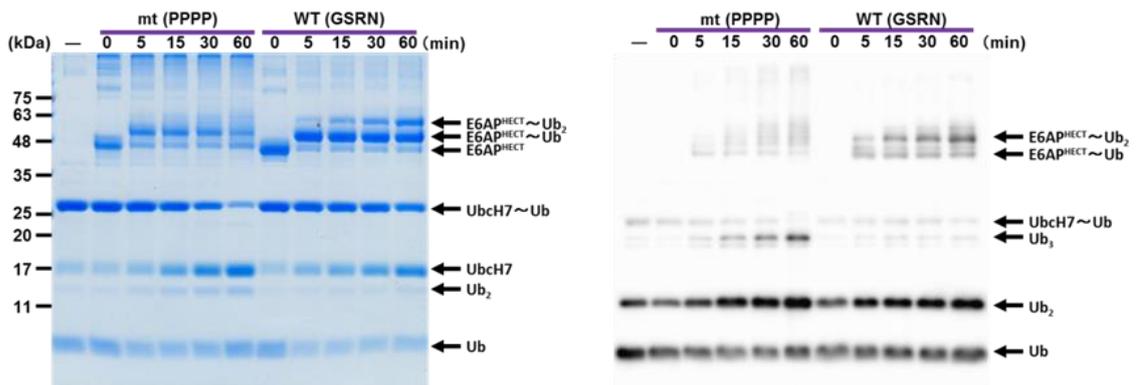
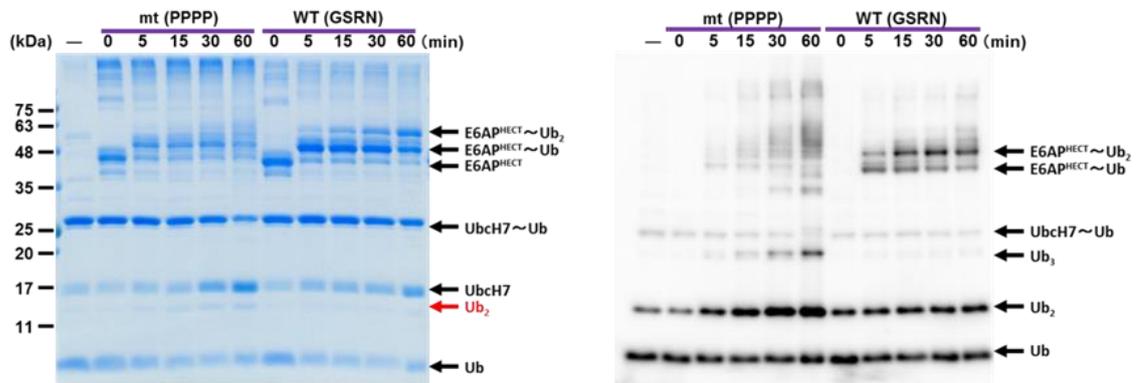


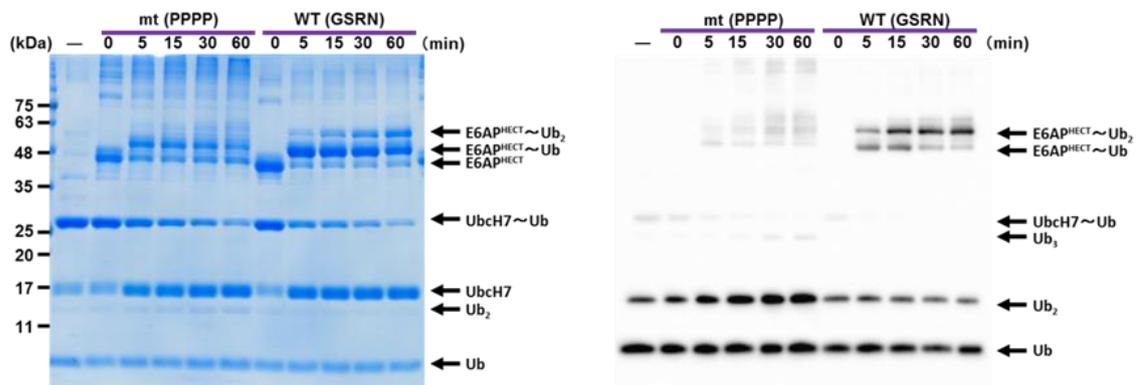
Fig.3-8 Ub 変異体(K-less,K6R, K11R)を用いた Ub 化活性

A : Ub 変異体(UbK-less K6R, K11R)による Ub 化活性の結果。左 : SERVA 染色、右 : 抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{HECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

K27R Ub



K29R Ub



K33R Ub

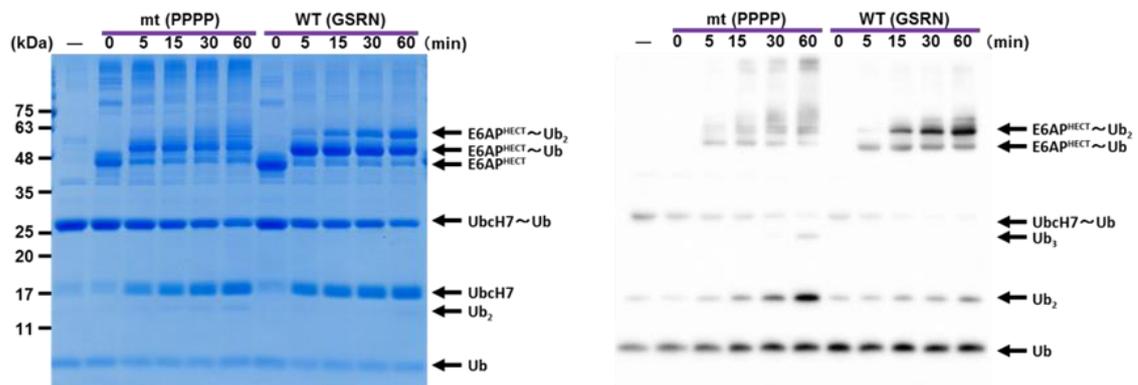
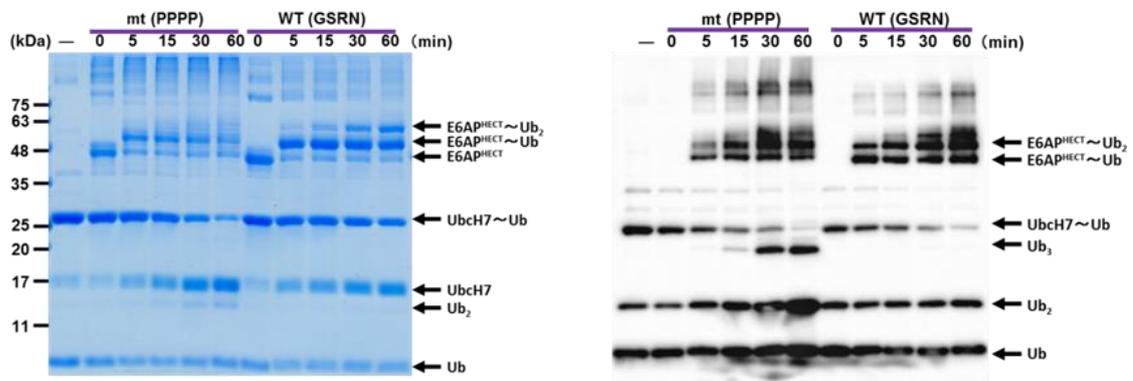


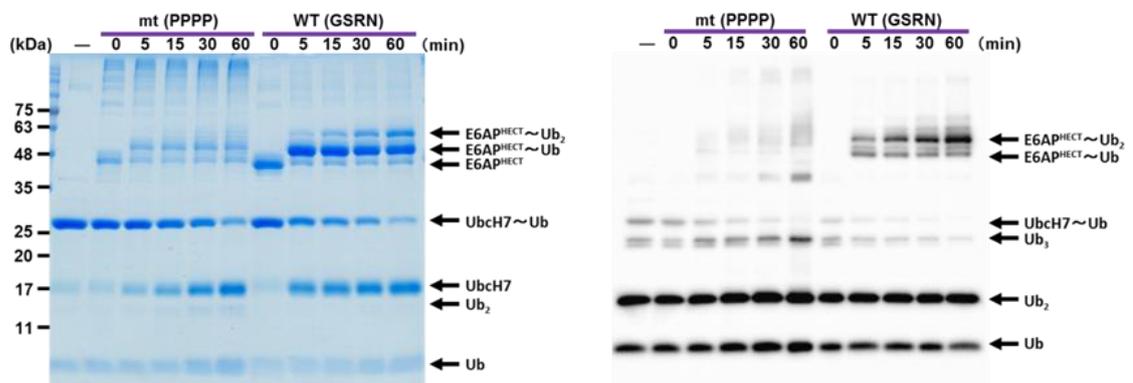
Fig.3-9 Ub 変異体(K27R, K29R, K33R)を用いた Ub 化活性

A : Ub 変異体(K27R, K29R, K33R)による Ub 化活性の結果。左 : SERVA 染色、右 : 抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。 E6AP^{HECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

K48R Ub



K63R Ub



His-Ub^{K-less}

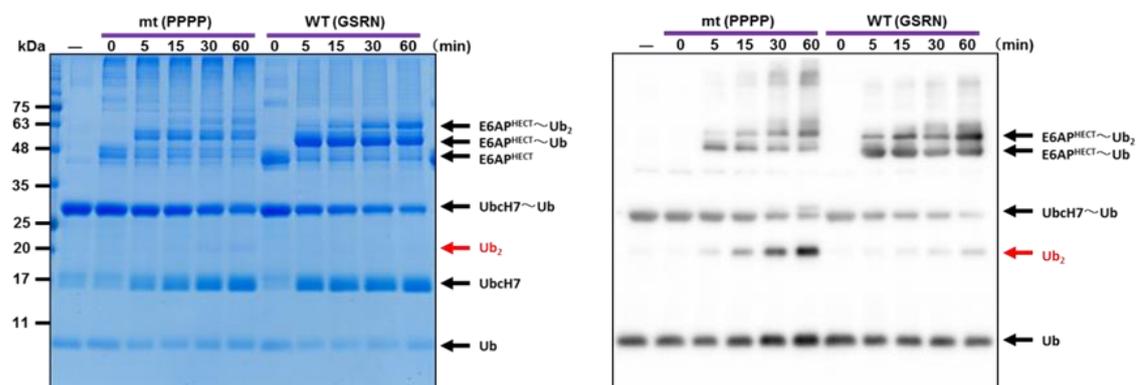


Fig.3-10 Ub 変異体(K48R, K63R, His-Ub^{K-less})を用いた Ub 化活性

A : Ub 変異体(K48R, K63R, His-Ub^{K-less})による Ub 化活性の結果。左 : SERVA 染色、右 : 抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{PH}ECT 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

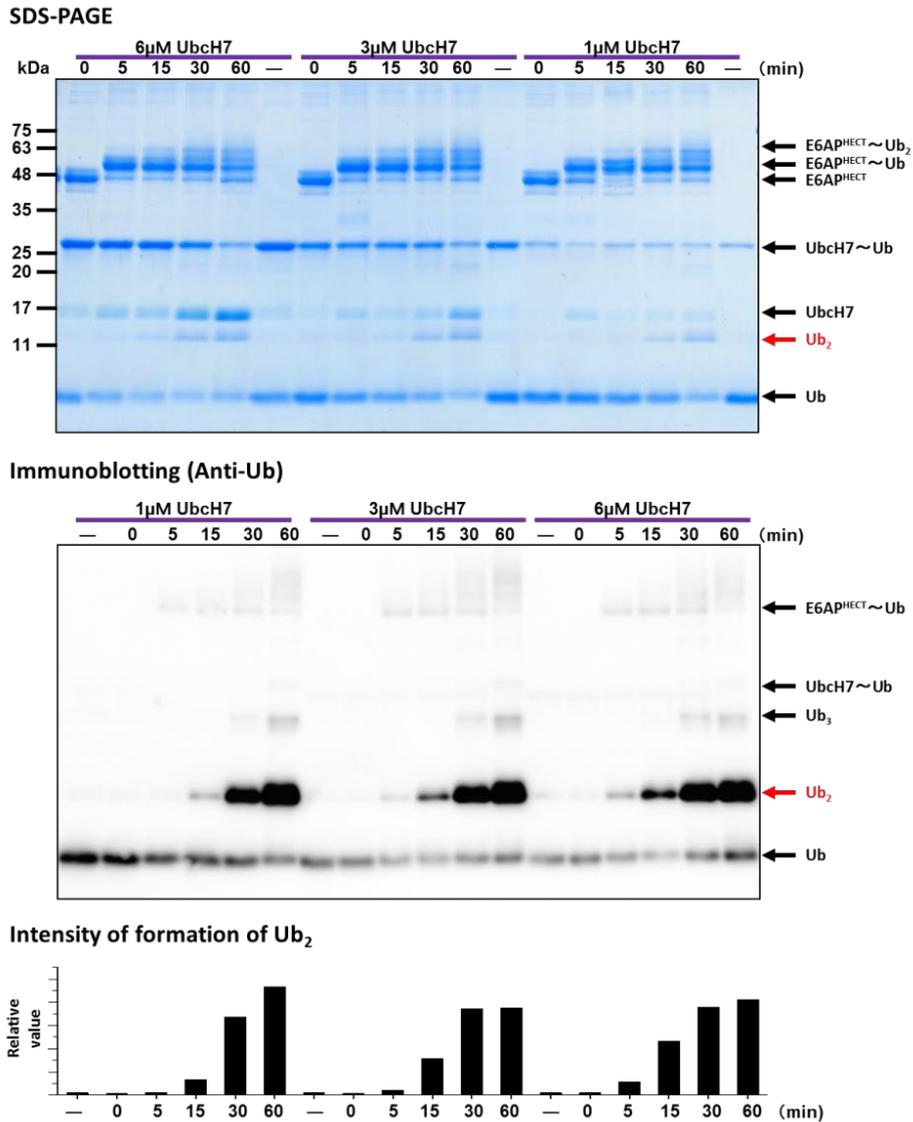


Fig.3-11 E2(UbcH7)濃度の Ub₂ 形成に与える影響の検証

各 E2 濃度(1 μM, 3 μM, 6 μM)で Ub 化反応を行った。Ub 化反応は、プレインキュベーションによる E2~Ub 形成後、His-E6AP^{HECT} の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 5, 15, 30, 60 分)反応させた。SERVA Blue G 染色(上段)または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(中段)で検出し、Western Blotting のシグナル強度(下段)を Image J を用いて求めた。各レーンには、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{HECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

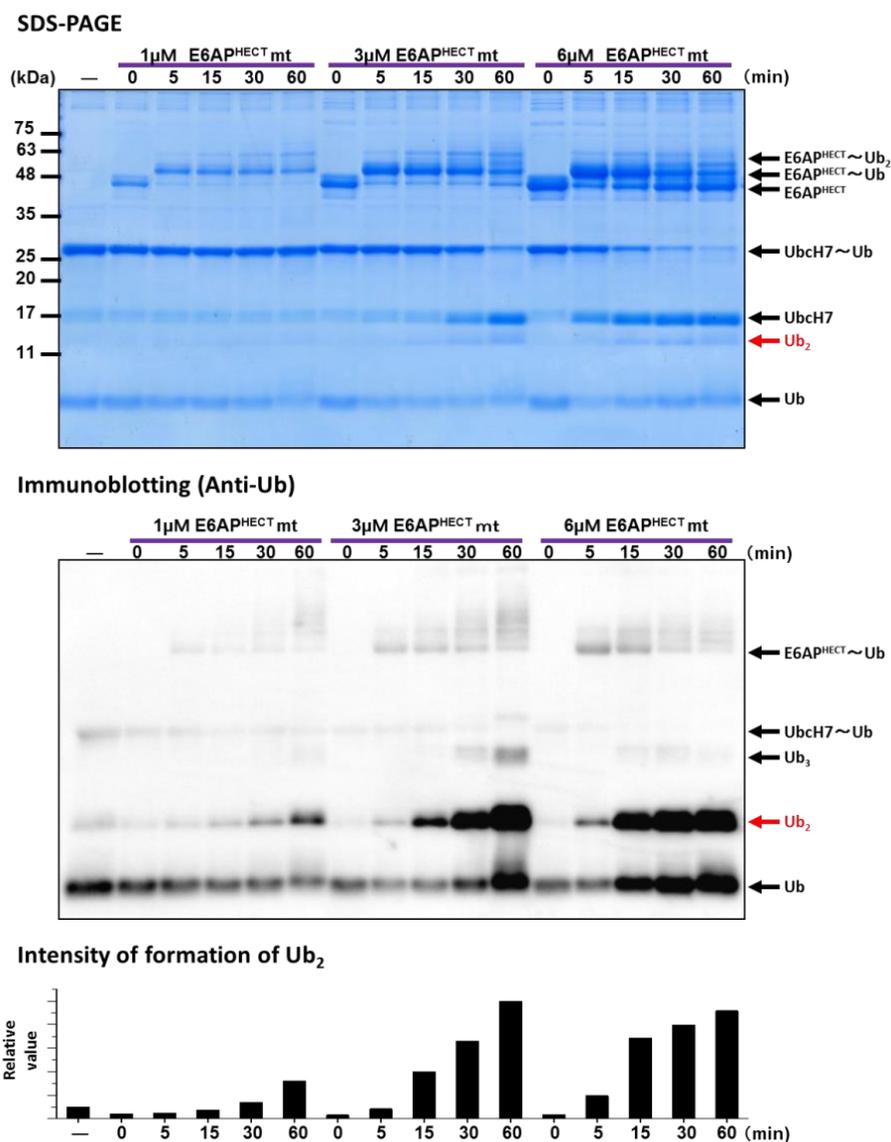


Fig.3-12 E6AP^{HECT}_PPPP 濃度の Ub₂ 形成に与える影響の検証

各 His-E6AP^{HECT}_PPPP 濃度(1 μM, 3 μM, 6 μM)で Ub 化反応を行った。Ub 化反応は、プレインキュベーションによる E2~Ub 形成後、His-E6AP^{HECT} の添加を反応開始として、0 ~60 分間(0, 5, 15, 30, 60 分)反応させた。SERVA Blue G 染色(上段)または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(中段)で検出し、Western Blotting のシグナル強度(下段)を Image J を用いて求めた。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{HECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

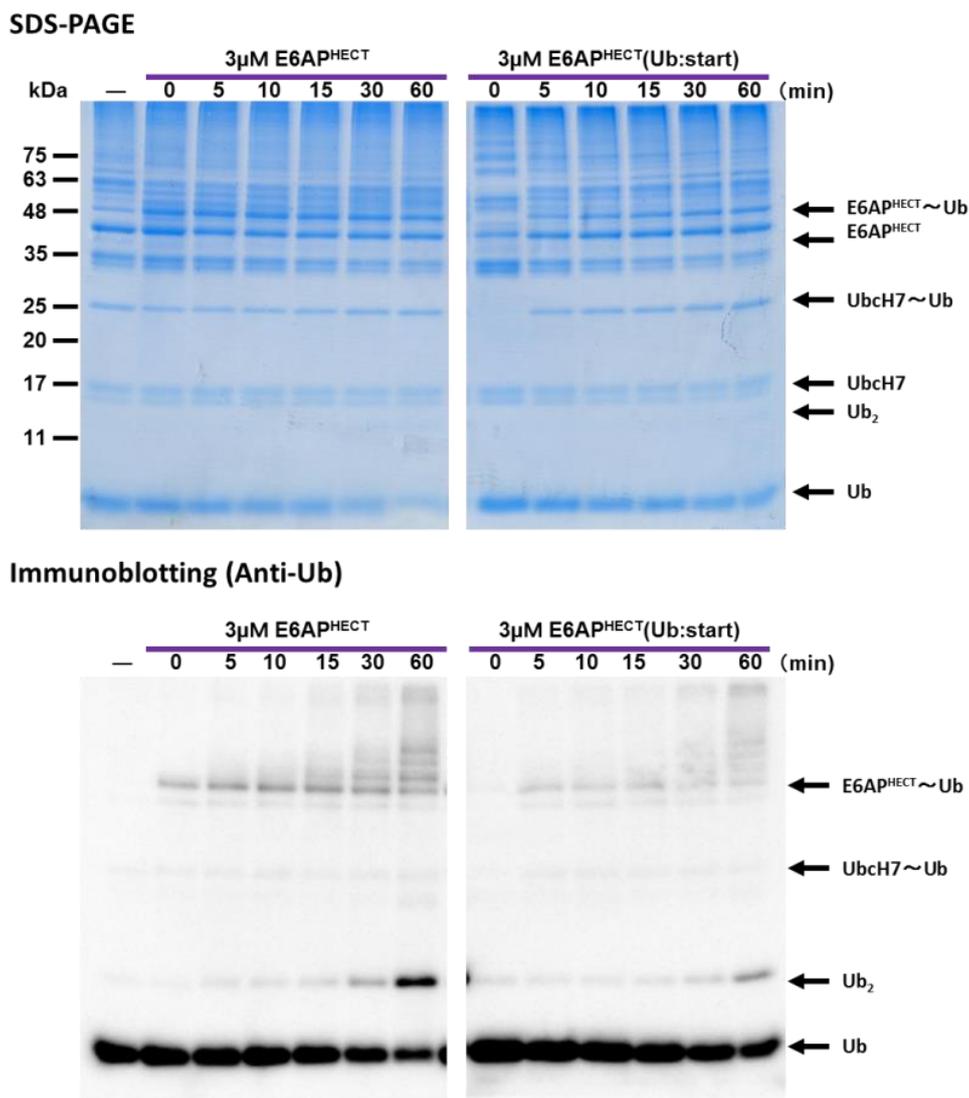


Fig.3-13 Ub 化反応における E6AP^{HECT}~Ub 量の Ub₂ 形成に与える影響の検証

E2~Ub を形成させるためのプレインキュベーションを行わずに Ub 化反応を行った。プレインキュベーションを行いことで、反応初期段階における Ub 化反応溶液中の His-E6AP^{HECT}~Ub 量を少なくした。Ub 化反応は、His-E6AP^{HECT}-PPPP の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 5, 10, 15, 30, 60 分)反応させた。SERVA Blue G 染色(上段)または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(下段)で検出した。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{HECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

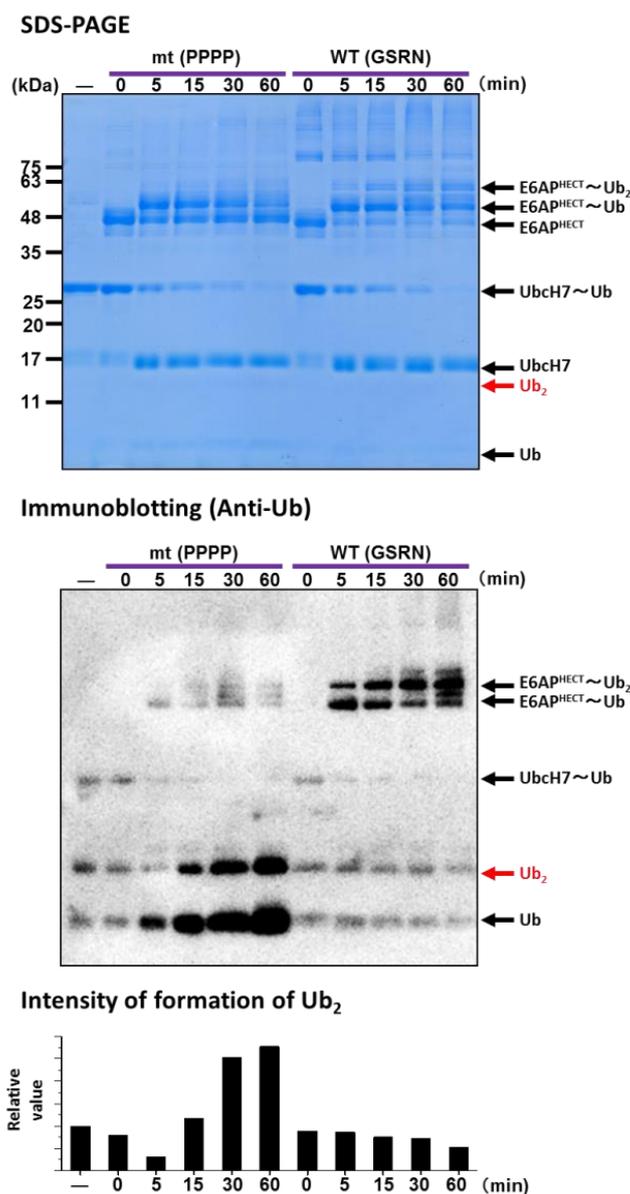


Fig.3-14 単離 E2~Ub を用いた Ub 化活性

ゲルろ過クロマトグラフィーによって単離した E2~Ub を用いて Ub 化反応を行った。His-E6AP^{PHECT} の添加を反応開始として、0~60 分間(0, 5, 15, 30, 60 分)反応させた。SERVA Blue G 染色(上段)または抗 Ub 抗体を用いた Western Blotting(中段)で検出し、Western Blotting のシグナル強度(下段)を Image J を用いて求めた。各レーン、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{PHECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

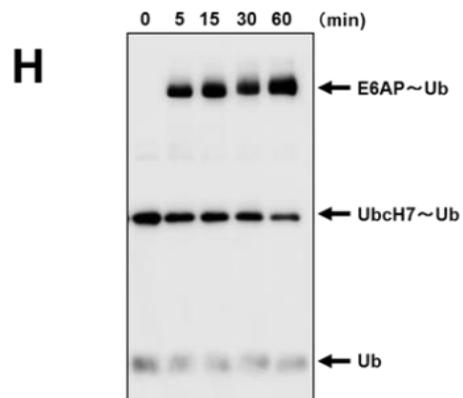
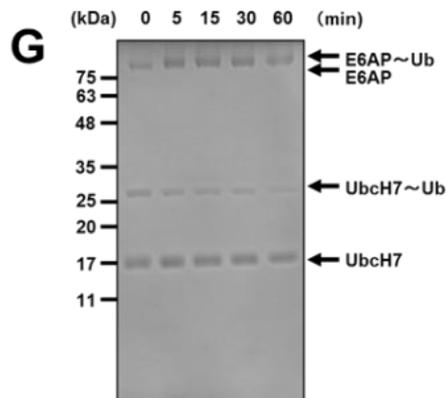
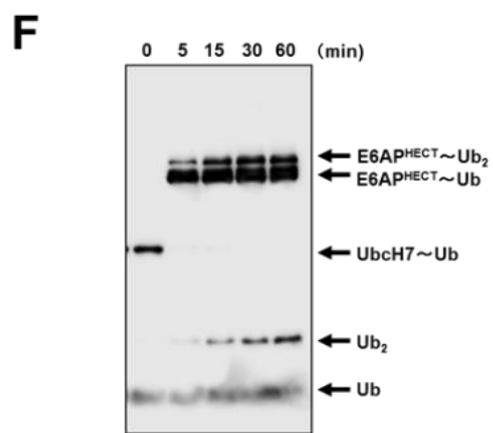
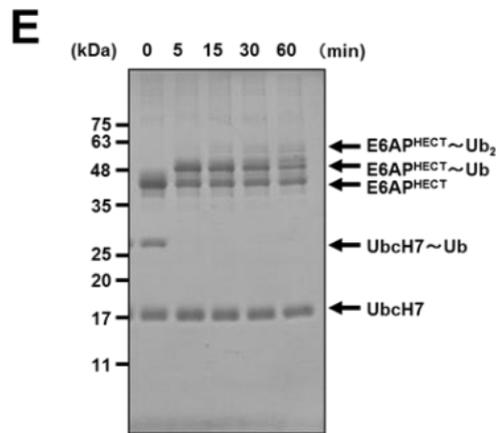
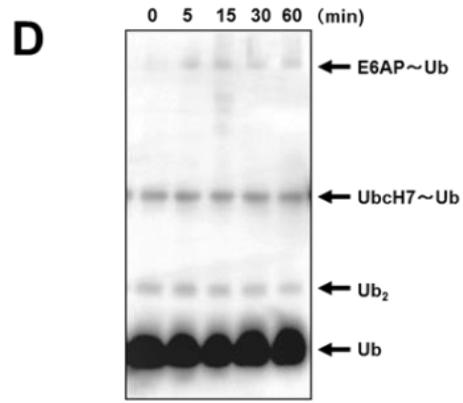
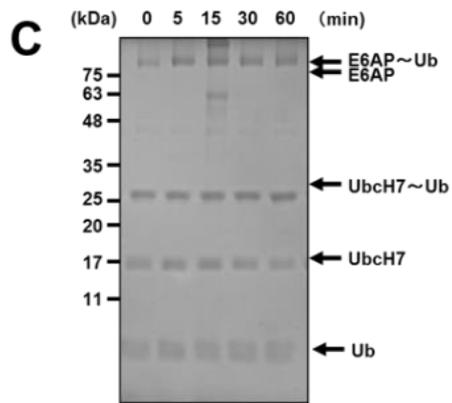
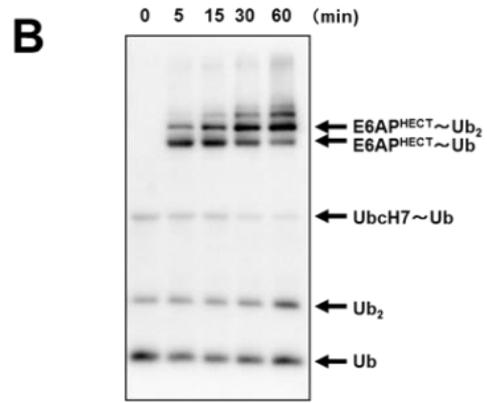
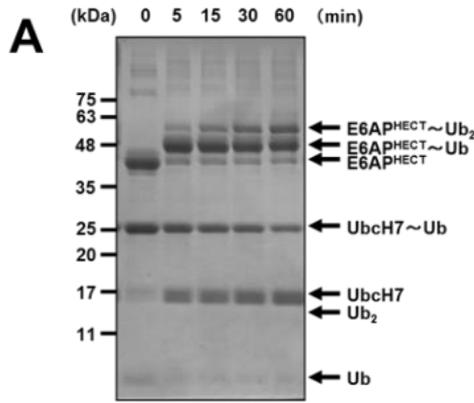


Fig.3-15 E6AP を用いた Ub 化活性

A,B : His-E6AP^{HECT} と Ub^{Wt} を用いた Ub 化反応結果。反応生成物を SDS-PAGE で分離し、SERVA 染色(A)、抗 Ub 化抗体の Western Blotting (B)で検出した。C,D : 全長 E6AP と Ub^{Wt} を用いた Ub 化反応結果。反応生成物を SDS-PAGE で分離し、SERVA 染色(C)、抗 Ub 化抗体の Western Blotting (D)で検出した。E,F : His-E6AP^{HECT} と Ub^{K48R} を用いた Ub 化反応結果。反応生成物を SDS-PAGE で分離し、SERVA 染色(E)、抗 Ub 化抗体の Western Blotting (F)で検出した。H,G : 全長 E6AP と Ub^{K48R} を用いた Ub 化反応結果。反応生成物を SDS-PAGE で分離し、SERVA 染色(H)、抗 Ub 化抗体の Western Blotting (G)で検出した。各レーンは、各反応時間に対応する Ub 化生成物を示す。E6AP^{HECT} 添加前のプレインキュベートした生成物も示している(-)。矢印は、それぞれの反応生成物の名称と移動位置を示す。

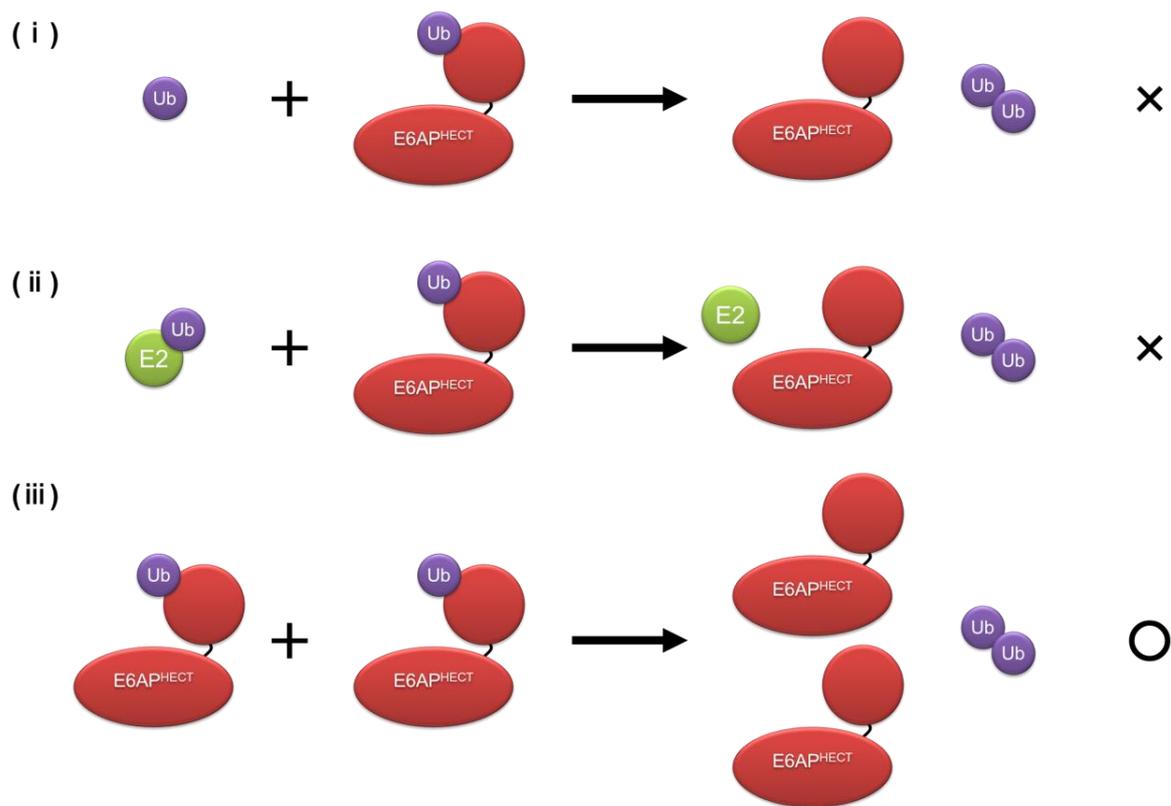


Fig.3-16 Ub₂の形成モデル

Ub₂の形成メカニズムとして、Wang らによって3つのメカニズムが提案された[22]。

- i) E3 モノマーモデル：非共有結合した Ub (アクセプターUb) の特異的 Lys は、HECT ドメインと結合した Ub (ドナーUb) のチオエステル結合と反応し、Ub₂を形成するモデル。
- ii) E3 ホモ二量体モデル：HECT ドメイン上の触媒 Cys にチオエステル結合した Ub の奥意的 Lys が、もう一方の HECT~Ub の Ub-G76 を攻撃し、Ub₂を形成するモデル。
- iii) E2/E3 ヘテロ二量体モデル：HECT ドメイン上の触媒 Cys にチオエステル結合した Ub の特異的 Lys が、HECT ドメインの E2 結合部位に結合した E2~Ub の Ub-G76 と反応して、Ub₂が形成されるモデル。

第4章 総括・考察

本研究では、これまでに結晶構造解析から予測されている HECT ドメインの N-lobe の周りの C-lobe の動態をリアルタイムで初めて直接実証した[21-23]。HECT ドメインの C-lobe の動態の可視化は、以前の構造生物学解析との比較を可能にする。

まず、E2 または Ub の非存在下での E6AP HECT ドメインの構造が、E2 から Ub をすばやく受け取ることができる触媒立体配座状態をとる可能性があることを明らかにした。これは、HS-AFM によって観察された E6AP^{HECT}-PPPP の構造が、触媒立体配座状態に類似していることと、Ub を触媒性 Cys 残基に保持する能力を有するという結果から導かれる。さらに、E6AP^{HECT}-Wt の HS-AFM 観察は、C-lobe が 4nm 以上移動する能力を持つとともに、C-lobe が動いている HECT ドメインの構造状態が主に L 字型および逆 T 字型をとることも明らかにした。SMURF2 結晶構造の立体配座状態において、E2 と C ロープとの間の触媒性 Cys 残基の距離は、依然として Ub を転移させるには遠すぎる[39]。HECT ドメインは HECT 型 E3 で高く保存されているため、E6AP の C-lobe の動きを他の HECT 型 E3 の HECT ドメインの動きに対応させることができる。今回、観察された E6AP の C-lobe の移動の最大距離はほぼ 6nm だった。よって、SMURF2 上の C-lobe はこの大きな距離を移動できると予測される。

現在、Ub₂ の生理学的機能として、直鎖状ポリ Ub 鎖を形成する LUBAC の中心的な触媒因子である HOIP の活性に影響を与えることが報告されているが[44]、Ub₂ の生理学的機能の多くは未だ明らかになっていない。したがって、E2 から E3 への Ub 転移機構の包括的な理解を得るために、Ub₂ 鎖の形成機構を調べることは有用である。ヒンジループ柔軟性阻害変異体の HECT ドメイン(E6AP^{HECT}-PPPP)の Ub₂ 合成活性は、野生型 HECT ドメイン(E6AP^{HECT}-Wt)のものよりもはるかに高かった。HS-AFM 観察と Ub 化反応の結果から、Ub および E2 の非存在下で HECT ドメインは触媒立体構造をとっている可能性が高い。そのため、E6AP^{HECT}-PPPP および E6AP^{HECT}-Wt の双方において、E2 から転移してきた Ub と

HECT ドメイン間のチオエステル結合形成の効率に有意差がないことが予測される。しかし、E6AP^{HECT_PPPP}の方がE6AP^{HECT_Wt}よりも形成効率が高かった。Ub₂はHECT ドメイン間で形成されている。よって、ヒンジループの柔軟性の制限がC-lobeの動きを低下させるとともに、HECT ドメイン間の相互作用に影響を与えているかもしれない。HECT 型 E3 の1つである KIAA 10 の Ub₂ およびより長いポリ Ub 鎖の形成効率は、E6AP HECT ドメインの形成効率よりもはるかに高いことが知られている[17]。KIAA 10 の C-lobe のダイナミクスを直接視覚化することにより、遊離ポリ Ub 鎖とヒンジループの形成の関係をより詳細に理解できることが期待される。したがって、HECT ドメインのヒンジループの柔軟性と Ub₂ 鎖形成効率との関連は、今後のさらに研究する必要がある。

HECT 型 E3 が、基質タンパク質上に特異的な Ub 鎖を形成するとともに [36,37]、基質タンパク質の非存在下で鎖型特異性を有する遊離 Ub 鎖 (主に Ub₂)を形成することが知られている[37]。Ub 鎖型特異性の決定には、HECT ドメインの C 末端領域が大きく関与していることが示されているが、本研究の全長 E6AP と HECT ドメインの Ub₂ 形成と鎖型特異性の検証から、E6AP^{HECT} ドメインの上流の N 末端領域も鎖型特異性の決定に関与していることが新たに示された。

まとめると、本研究では HECT ドメイン上のヒンジループの柔軟性が、Ub 転移反応における C-lobe の移動を可能にしているとともに、Ub₂ 鎖の形成にも大きな影響を及ぼすことを示した。また、全長 E6AP の HECT ドメイン上流の N 末端領域も Ub の鎖型特異性に関与することを示した。しかし、Ub 化における Ub 化酵素の動態の詳細の多くは明らかになっていない。今後、HECT 型 E3 の HS-AFM 観察を更に行って、動的な Ub 化機構の詳細を明らかにすることを期待する。

参考文献

1. G. Goldstein, M. Scheid, U. Hammerling, D.H. Schlesinger, H.D. Niall, E.A. Boyse, Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72 (1975) 11-15.
2. Z.M. Eletr, D.T. Huang, D.M. Duda, B.A. Schulman, B. Kuhlman, E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer, *Nat Struct Mol Biol*, 12 (2005) 933-934.
3. I. Lee, H. Schindelin, Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes, *Cell*, 134 (2008) 268-278.
4. S.K. Olsen, C.D. Lima, Structure of a ubiquitin E1-E2 complex: insights to E1-E2 thioester transfer, *Mol Cell*, 49 (2013) 884-896.
5. S. Lorenz, A.J. Cantor, M. Rape, J. Kuriyan, Macromolecular juggling by ubiquitylation enzymes, *BMC Biol*, 11 (2013) 65.
6. Suryadinata R., Roesley S.N.A., Yang G., Sarčević B, Mechanisms of Generating Polyubiquitin Chains of Different Topology, *Cells.*, 3 (2014) 674–689.
7. K. Iwai, H. Fujita, Y. Sasaki, Linear ubiquitin chains: NF-kappaB signalling, cell death and beyond, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15 (2014) 503-508.
8. H. Fujita, S. Rahighi, M. Akita, R. Kato, Y. Sasaki, S. Wakatsuki, K. Iwai, Mechanism underlying I kappa B kinase activation mediated by the linear ubiquitin chain assembly complex, *Mol Cell Biol*, 34 (2014) 1322-1335.
9. K. Rittinger, F. Ikeda, Linear ubiquitin chains: enzymes, mechanisms and biology, *Open Biol*, 7 (2017).
10. J. Liu, Y. Wang, Y. Gong, T. Fu, S. Hu, Z. Zhou, L. Pan, Structural Insights into

SHARPIN-Mediated Activation of HOIP for the Linear Ubiquitin Chain Assembly, *Cell Rep*, 21 (2017) 27-36.

11. B. Stieglitz, A.C. Morris-Davies, M.G. Koliopoulos, E. Christodoulou, K. Rittinger, LUBAC synthesizes linear ubiquitin chains via a thioester intermediate, *EMBO Rep*, 13 (2012) 840-846.
12. S. Camus, S. Menendez, C.F. Cheok, L.F. Stevenson, S. Lain, D.P. Lane, Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6, *Oncogene*, 26 (2007) 4059-4070.
13. A.P. VanDemark, R.M. Hofmann, C. Tsui, C.M. Pickart, C. Wolberger, Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer, *Cell*, 105 (2001) 711-720.
14. M. Scheffner, U. Nuber, J.M. Huibregtse, Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade, *Nature*, 373 (1995) 81-83.
15. A. Hershko, A. Ciechanover, The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem*, 67 (1998) 425-479.
16. N. Zheng, P. Wang, P.D. Jeffrey, N.P. Pavletich, Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases, *Cell*, 102 (2000) 533-539.
17. M. Wang, C.M. Pickart, Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis, *EMBO J*, 24 (2005) 4324-4333.
18. D. Rotin, S. Kumar, Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (2009) 398-409.
19. M. Scheffner, S. Kumar, Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1843(2014) 61-74.
20. T. Kishino, M. Lalande, J. Wagstaff, UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman

- syndrome, *Nat. Genet.* 15 (1997) 70-73.
21. L. Huang, E. Kinnucan, G. Wang, S. Beaudenon, P.M. Howley, J.M. Huibregtse, N.P. Pavletich. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*, 286(1999)1321-1326.
 22. M.A. Verdecia, C.A. Joazeiro, N.J. Wells, J.L. Ferrer, M.E. Bowman, T. Hunter, J.P. Noel. Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell*, 11(2003)249-59.
 23. H.B. Kamadurai, J. Souphron, D.C. Scott, D.M. Duda, D.J. Miller, D. Stringer, R.C. Piper, B.A. Schulman. Insights into ubiquitin transfer cascades from a structure of a UbcH5B approximately ubiquitin-HECT(NEDD4L) complex. *Mol Cell*. 36 (2009) 1095-1102.
 24. N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, T. Ando, Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy, *Nature*, 468 (2010)72-76.
 25. T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando, H. Noji, High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase, *Science*, 333 (2011)755-758.
 26. T. Uchihashi, N. Kodera, T. Ando, Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy, *Nat Protoc*, 7 (2012)1193-1206.
 27. T. Ando, T. Uchihashi, S. Scheuring, Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy, *Chem Rev*, 114(2014)3120-3188.
 28. S. Vijay-Kumar, C.E. Bugg, W.J. Cook, Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution, *J Mol Biol*, 194(1987)531-44.
 29. K.L. Lorick, J.P. Jensen, S. Fang, A.M. Ong, S. Hatakeyama, A.M. Weissman, RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination, *Proc Natl Acad Sci*, 96(1999)11364-11369.

30. B. Mohapatra, G. Ahmad, S. Nadeau, N. Zutshi, W. An, S. Scheffe, L. Dong, D. Feng, B. Goetz, P. Arya, TA. Bailey, N. Palermo, GE. Borgstahl, A. Natarajan, SM. Raja, M. Naramura, V. Band, H. Band, Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases, *Biochim Biophys Acta*. 1833(2013)122-139.
31. T. Cardozo, M. Pagano, The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2004)739-751.
32. M.C. Rodrigo-Brenni, D.O. Morgan, Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets, *Cell*, 130 (2007) 127-139.
33. Y. Sheng, J.H. Hong, R. Doherty, T. Srikumar, J. Shloush, G.V. Avvakumov, J.R. Walker, S. Xue, D. Neculai, J.W. Wan, S.K. Kim, C.H. Arrowsmith, B. Raught, S. Dhe-Paganon, A human ubiquitin conjugating enzyme (E2)-HECT E3 ligase structure-function screen, *Mol Cell Proteomics*, 11 (2012) 329-341.
34. ZM. Eletr, B. Kuhlman, Sequence determinants of E2-E6AP binding affinity and specificity. *J Mol Biol*, 369(2007)419-428.
35. C. Purbeck, Z.M. Eletr, B. Kuhlman, Kinetics of the transfer of ubiquitin from UbcH7 to E6AP, *Biochemistry*, 49 (2010) 1361-1363.
36. H.C. Kim, J.M. Huibregtse, Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity, *Mol Cell Biol*, 29 (2009) 3307-3318.
37. M.E. French, J.L. Klosowiak, A. Aslanian, S.I. Reed, J.R. Yates, 3rd, T. Hunter, Mechanism of ubiquitin chain synthesis employed by a HECT domain ubiquitin ligase, *J Biol Chem*, 292 (2017) 10398-10413.
38. E. Maspero, E. Valentini, S. Mari, V. Cecatiello, P. Soffientini, S. Pasqualato, S. Polo, Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming, *Nat Struct Mol Biol*, 20 (2013) 696-701.

39. AA. Ogunjimi, DJ. Briant, N. Pece-Barbara, C. Le Roy, GM. Di Guglielmo, P. Kavsak, RK. Rasmussen, BT. Seet, F. Sicheri, JL. Wrana, Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain, *Mol Cell*. 19(2005)297-308.
40. M. Scheffner, JM. Huibregtse, RD. Vierstra, PM. Howley, The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, *Cell*, 75(1993)495-505.
41. D. Martinez-Zapien, FX. Ruiz, J. Poirson, A. Mitschler, J. Ramirez, A. Forster, A. Cousido-Siah, M. Masson, S. Vande Pol, A. Podjarny, G. Travé, K. Zanier, Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53, *Nature*, 529(2016)541-545.
42. AL. Talis, JM. Huibregtse, PM. Howley, The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells, *J Biol Chem*, 273(1998)6439-6445.
43. D.E. Christensen, P.S. Brzovic, R.E. Klevit, E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages, *Nat Struct Mol Biol*, 14 (2007) 941-948.
44. BC Lechtenberg, A Rajput, R Sanishvili, MK Dobaczewska, CF Ware, PD Mace, SJ Riedl, Structure of a HOIP/E2~ubiquitin complex reveals RBR E3 ligase mechanism and regulation, *Nature*, 529(2016) 546-550.

謝辞

本研究を行うにあたり、6年間研究の場を与えてくださり、また指導教官として多くの指導をいただきました紺野宏記准教授には心より感謝申し上げます。そして、高速 AFM の操作方法、観察したデータに関して、さまざまなアドバイスを下さいました安藤敏夫教授、内橋貴之教授、古寺哲幸准教授に深く感謝いたします。さらに、試料の調製における生化学・分子生物学・質量分析による解析等の実験において、適切な方針・助言をしていただきました中山隆宏准教授、西内巧准教授には深く感謝いたします。

また、タンパク質精製に関する操作方法や知識を多く教えていただきました春山隆充博士研究員に心から感謝します。最後に、大学院修了まで心身ともに支え続けてくれた両親に深く感謝します。

試薬・材料リスト

- Acrylamide Solutin [30(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution(29:1)] (Nacalai Tesque)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ammonium Sulfate) (Nacalai Tesque)
- Agar (Nacalai Tesque)
- Agarose (電気泳動用 : Agarose STANDARD 01) (Salana)
- Ampicillin Sodium (Amp) (Wako)
- APS (Ammonium Peroxodisulfate) (Wako)
- ATP (Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Salt n-Hydrate) (Wako)
- Bromophenol Blue (Wako)
- Boric Acid (Wako)
- CH_3COOH (acetic acid) (Nacalai Tesque)
- Chloramphenicol (Cam) (Nacalai Tesque)
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Wako)
- DTT (dithiothreitol) (Nacalai Tesque)
- EDTA \cdot 2Na (Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid,disodium salt,dehydrate)
(Wako)
- EtOH [Ethanol(99.5)] (Wako)
- Glycerol (Nacalai Tesque)
- Glycine (Aminoacetic Acid) (Wako)
- HCl (Hydrochloric Acid) (Wako)
- HEPES {2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic Acid} (Nacalai Tesque)
- IPTG (Isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) (Wako)
- KCl (Potassium Chloride) (Nacalai Tesque)
- KOH (Potassium Hydroxide) (Nacalai Tesque)

- 2-Mercaptoethanol (2-ME) (Nacalai Tesque)
- MeOH (Methanol) (Wako)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Magnesium Chloride Hexahydrate) (Nacalai Tesque)
- MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid] (SIGMA)
- Na_2HPO_4 (Disodium Hydrogenphosphate) (Wako)
- NaCl (Sodium Chloride) (Nacalai Tesque)
- NaN_3 (Sodium Azide)
- NaOH(Sodium Hydroxide) (Nacalai Tesque)
- PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) (Nacalai Tesque)
- SDS (Sodium Lauryl Sulfate) (Nacalai Tesque)
- SERVA Blue G (CoomassieTM Brilliant Blue G) (SERVA Electrophoresis)
- TEMED (N , N , N ' , N ' -Tetramethylethylenediamine) (Nacalai Tesque)
- Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] (Nacalai Tesque)
- Tryptone (Nacalai Tesque)
- Tween20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) (東京仁成工業株式会社)
- Yeast Extract (Nacalai Tesque)
- WIDE RANGE Gel Preparation Buffer (4X) for PAGE (Nacalai Tesque)
- スキムミルク

酵素類・タンパク質

- NdeI (NEB)
- HindIII—HF (NEB)
- NcoI (TOYOBO)
- T4 DNA ligase (Invitrogen)
- PrimeSTAR Max DNA polymerase (TAKARA)

Ub (Enzo Life Science)

Ub 変異体((K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K63R : LifeSensors)

タンパク質定量

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)

キット類

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)

In-fusion HD clonig Kit (Clonthech)

EmeraldAmp® PCR Master Mix (TAKARA)

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (SIGMA)

PrimeScript® High Fidelity RT-PCR Kit (TAKARA)

KOD - Plus – Mutagenesis Kit (TOYOBO)

大腸菌宿主

DH5α

BL21(DE3) (NEB)

BL21 codon Plus (DE3) RIPL (Agilent Technologies)

限外濾過

Amicon® Ultra 10000 MWCO (Millipore)

Amicon® Ultra 30000 MWCO (Millipore)

Amicon® Ultra 100000 MWCO (Millipore)

担体(タンパク質精製用)

Toyopearl® DEAE-650M (TOSOH)

Toyopearl® CM-650M (TOSOH)

Superdex 75 10/300 GL (GE HealthCare)

Ni-NTA superflow (QIAGEN)

□ Profinity eXact™ purification resin (Bio-rad)

分子マーカー

□ Gene Ladder Fast 2 (ニッポン・ジーン) ※遺伝子用

□ BlueStar PLUS Prestained Protein Marker (NIPPON GENETICS) ※タンパク質用