

# 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/00051487">http://hdl.handle.net/2297/00051487</a>

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



# 学位論文概要

## Dissertation Summary

学位請求論文 (Dissertation)

題名 (Title) 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

専攻 (Division) : 自然システム学

学籍番号 (Student ID Number) : 1524062006

氏名 (Name) : 小林 史典

主任指導教員氏名 (Chief supervisor) : 紺野 宏記

### 学位論文概要 (Dissertation Summary)

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  $\epsilon$ -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<sup>HECT-Wt</sup>)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<sup>HECT-PPPP</sup>)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<sup>HECT-Wt</sup> 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<sup>HECT-PPPP</sup> の液中における立体構造状態も明らかにした。さらに、In vitro Ub 化分析から、E6AP<sup>HECT-Wt</sup> と E6AP<sup>HECT-PPPP</sup> の両方で Ub<sub>2</sub> が形成され、Ub<sub>2</sub> 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 Ub<sub>2</sub> 鎖型特異性の検証から、Ub<sub>2</sub> 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。