

氏 名 阿久津 誠人

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1038 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 **Structural studies of ubiquitin-dependent protein-protein interactions in vesicle transport and NF-kappaB signaling pathway**

論文審査委員	主 査	助教授	加藤 龍一
		教授	松下 正
		助教授	小林 克己
		助教授	足立 伸一
		教授	若槻 壮市
		教授	中山 和久（京都大学）

NF- κ B シグナル伝達機構に関わるユビキチン結合タンパク質の構造生物学的研究

タンパク質の X 線結晶構造解析法を主な研究手法として、免疫・炎症反応の調節に重要な NF- κ B のシグナル伝達機構に関わるユビキチン結合タンパク質 Tollip(Toll interacting protein)、Tom1(Target of Myb 1)、及び NEMO(NF- κ B essential modulator)の構造機能解析を行った。

細菌やウイルスなどの病原微生物の侵入に対する生体防御機構は、自然免疫と呼ばれるものと獲得免疫と呼ばれるものに分けられる。獲得免疫は、B 細胞や T 細胞といったリンパ球によって行われていて、多彩な抗原受容体を形成することにより、特異的に抗原を認識する。獲得免疫の成立には通常、感染してから数日かかるが、自然免疫は感染初期段階に迅速に機能する免疫応答機構である。自然免疫系の生体防御機構では、細胞表面上に存在するさまざまな受容体が、ウイルスや細菌などの病原体の構成成分を特異的に認識し、炎症反応などの細胞応答を導き、個体レベルでの、細菌あるいはウイルスに対する抵抗性の獲得に重要な役割を果たしている。また、自然免疫は異物を排除するだけでなく、その後の獲得免疫の成立にも重要な役割を果たしている。本研究では、自然免疫系の細胞応答の中でも、とくに重要な役割を果たしている、NF- κ B シグナル伝達機構に注目をした。

NF- κ B は、転写因子の1つで、免疫・炎症反応などに関わる様々な遺伝子の転写活性を調節している。通常 NF- κ B は、I- κ B と結合して不活性型として細胞質に留まっているが、ウイルス感染など、細胞外からの刺激を受けると、I- κ B はリン酸化、ユビキチン化といった修飾を受け、プロテアソームに運ばれて分解される。I- κ B が分解されると、NF- κ B は活性化されて核内に移動し、標的遺伝子の転写を開始する。ユビキチンによるタンパク質の修飾が、受容体からのシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしていることから、NF- κ B のシグナル伝達機構において、ユビキチンと相互作用する三種のタンパク質 Tollip, Tom1, NEMO の結晶構造解析を行った。

Tollip C2ドメインの構造解析: Tollip には、N 末端に Tom1 結合領域、そしてリン脂質と結合する C2ドメイン、C 末端にはユビキチンと結合する CUEドメインが存在する。Tollip は、IL-1 受容体や Toll 様受容体の下流でシグナル伝達を負に制御するタンパク質である。一方で Tollip は、エンドソームに局在し、Tom1 とユビキチン化されたタンパク質を引き寄せる可能性が報告されている。Tollip に存在する C2ドメインが、膜に存在するリン脂質との相互作用を介して膜への局在に重要な役割を果たしていることが考えられることから、Tollip C2ドメイン、特にリン脂質との相互作用に注目した。Tollip C2ドメインの構造解析を行った結果、8本の β 鎖からなり、4本の β 鎖のサンドイッチ構造であることが分かった。結晶構造中において、Tollip の C2ドメインは硫酸イオンと結合していた。この硫酸イオン結合部位が、リン脂質との結合に重要な役割を果たすことが予想された。変異体 C2ドメインを用いて、C2ドメインとリン脂質との結合について検討を行ったところ、やはり結晶構造中で確認された硫酸イオン結合サイトが、リン脂質への結合に関わっていることが確認された。

Tom1 GAT ドメイン/ユビキチン複合体の構造解析: Tom1 は、N 末端に VHS(Vps27p/Hrs/Stam)ドメイン、続いて GAT(GGA and Tom1)ドメインを有する。さらに、

Tom1 の GAT ドメインは、ユビキチンと結合することが明らかになり、ユビキチンを介したタンパク質の輸送に関わる可能性が考えられている。Tom1 の GAT ドメインとユビキチンの複合体の結晶構造解析を行ない、その相互作用の様式を調べた。GAT ドメインは 3 本の α -ヘリックスから構成されており、ユビキチンと結合するサイトは 2ヶ所存在していた。ユビキチンとの結合様式は、これまで報告されている他のユビキチン結合ドメインと同様に、ユビキチンの Ile44 を含む疎水性面を介した疎水性相互作用によるものであった。

NEMO の結晶化: I κ -B をリン酸化する I κ -B キナーゼ (IKK) 複合体は、リン酸化酵素である 2 つの触媒サブユニット IKK α と IKK β 、ならびに制御サブユニットである IKK γ (別名 NEMO) の 3 つのサブユニットで構成されている。NEMO というタンパク質自身には、リン酸化酵素としての働きはないが、IKK 複合体の活性化には、なくてはならない重要なタンパク質として、注目されている。NEMO とユビキチンとの相互作用の分子機構を解明するために、NEMO の結晶構造解析を試みたところ、NEMO のユビキチン結合領域の結晶を作成することに成功した。

NF- κ B は、転写因子の1つで、免疫・炎症反応などに関わる様々な遺伝子の転写活性を調節している。通常NF- κ Bは、I- κ Bと結合して不活性型として細胞質に留まっているが、ウイルス感染など、細胞外からの刺激を受けると、I- κ Bはリン酸化、ユビキチン化といった修飾を受け、プロテアソームに運ばれて分解される。I- κ Bが分解されると、NF- κ Bは活性化されて核内に移動し、標的遺伝子の転写を開始する。ユビキチンによるタンパク質の修飾が、受容体からのシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしていることから、NF- κ Bのシグナル伝達機構において、ユビキチンと相互作用する三種のタンパク質Tollip, Tom1, NEMOの結晶構造解析を行った。

Tollip C2ドメインの構造解析: Tollipには、N末端にTom1結合領域、そしてリン脂質と結合するC2ドメイン、C末端にはユビキチンと結合するCUEドメインが存在する。Tollipは、IL-1受容体やToll様受容体の下流でシグナル伝達を負に制御するタンパク質である。一方でTollipは、エンドソームに局在し、Tom1とユビキチン化されたタンパク質を引き寄せる可能性が報告されている。Tollip C2ドメインの構造解析を行った結果、8本の β 鎖からなり、4本の β 鎖のサンドイッチ構造であることが分かった。結晶構造中において、TollipのC2ドメインは硫酸イオンと結合していた。この硫酸イオン結合部位が、リン脂質との結合に重要な役割を果たすことが予想された。変異体C2ドメインを用いて、C2ドメインとリン脂質との結合について検討を行ったところ、やはり結晶構造中で確認された硫酸イオン結合サイトが、リン脂質への結合に関わっていることが確認された。

Tom1 GATドメイン/ユビキチン複合体の構造解析: Tom1は、N末端にVHS(Vps27p/Hrs/Stam)ドメイン、続いてGAT(GGA and Tom1)ドメインを有する。さらに、Tom1のGATドメインは、ユビキチンと結合することが明らかになり、ユビキチンを介したタンパク質の輸送に関わる可能性が考えられている。Tom1のGATドメインとユビキチンの複合体の結晶構造解析を行ない、その相互作用の様式を調べた。GATドメインは3本の α -ヘリックスから構成されており、ユビキチンと結合するサイトは2ヶ所存在していた。ユビキチンとの結合様式は、これまで報告されている他のユビキチン結合ドメインと同様に、ユビキチンのIle44を含む疎水性面を介した疎水性相互作用によるものであった。

NEMOの結晶化: I- κ Bをリン酸化するI- κ Bキナーゼ (IKK) 複合体は、リン酸化酵素である2つの触媒サブユニットIKK α とIKK β 、ならびに制御サブユニットであるIKK γ (別名NEMO) の3つのサブユニットで構成されている。NEMOとユビキチンとの相互作用の分子機構を解明するために、NEMOの結晶構造解析を試みたところ、NEMOのユビキチン結合領域の結晶を作成することに成功した。

以上、学位論文に記述された、研究成果は質的にも量的にも十分博士の学位のレベルに達していると審査員全員一致で判断した。