

氏 名 Simin Rahighi

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大 1281 号

学位授与の日付 平成 21 年 9 月 30 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 and biochemical studies on ubiquitin
signaling in the NF- κ B pathway

論文審査委員 主 査 准教授 加藤 龍一
准教授 小林 克己
准教授 足立 伸一
准教授 五十嵐 教之
教授 加藤 晃一
教授 若槻 壮市

論文内容の要旨

The transcription factor NF- κ B plays vital roles in many physiological and pathological processes, primarily by controlling the transcription of cytokines, antimicrobial effectors, and genes that regulate cell differentiation, survival and proliferation. In the resting cells NF- κ B is kept inactive in the cytoplasm by binding to inhibitory molecules (I κ Bs). Activation is tightly regulated by a signaling network that integrates stimuli from various sources. The endpoint of all signaling pathways is phosphorylation of the I κ Bs by IKK (I κ B kinase) complex. Subsequently, I κ B is ubiquitylated and undergoes proteasomal degradation. IKK comprises two catalytic subunits, IKK α and IKK β , and a regulatory subunit, NEMO (NF- κ B essential modulator). Although possessing no enzymatic activity, NEMO is required for IKK and thus NF- κ B activation in most circumstances. Activation of IKK is mediated by binding of NEMO to ubiquitylated substrates via its UBAN (ubiquitin binding in ABIN and NEMO proteins) motif.

UBAN motif is also conserved in ABIN and Optineurin proteins. ABIN-1 (A20 binding and inhibitor of NF- κ B) is known as an inhibitor of the NF- κ B pathway. ABIN-1 is an ubiquitin sensor and its binding to ubiquitin chains via UBAN motif is required for its inhibitory activity.

In order to shed light on the regulatory role of ubiquitin signaling in the NF- κ B pathway, recognition of ubiquitin chains by UBAN motifs of NEMO and ABIN-1 was investigated in this study.

The data provided in this study indicates that UBAN motifs of NEMO and ABIN-1 have significantly higher affinity for binding to linear over other types (Lys63- or Lys48-linked) of ubiquitin chains. Also, crystal structure of the NEMO UBAN motif in the free form was determined which reveals a parallel, coiled-coil, homo-dimer with side chains of the conserved residues in the UBAN motif being symmetrically located on either side of the coiled-coil structure. Solving the crystal structures of NEMO and ABIN-1 UBAN motifs in complex with linear diubiquitins provided evidence for selective binding of UBAN to linear ubiquitin chains. In the complex structures, two diubiquitins symmetrically interact with the UBAN motifs of NEMO and ABIN-1. Integrity of simultaneous binding of two diubiquitins and novel mode of binding of proximal ubiquitins to UBAN counts for the specificity for linear ubiquitin chain recognition. Moreover, further structure-based functional investigations showed that residues from UBAN motif of NEMO which are involved in binding to diubiquitins are required for NF- κ B activation by TNF- α and other agonists. These findings lead to the understanding of detrimental effect of NEMO mutations in patients suffering from X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency.

博士論文の審査結果の要旨

NF- κ B pathway は、細胞の免疫応答などに関わる重要な細胞内シグナル伝達過程の1つである。この過程で働く NEMO タンパク質は、ユビキチンタンパク質が結合することによって、NF- κ B pathway を活性化させることが知られている。また、同様にユビキチンタンパク質を結合する ABIN-1 タンパク質は、この経路を抑制することが知られている。

本論文では、NF- κ B pathway の分子機構を明らかにするため、その制御因子である NEMO および ABIN-1 タンパク質について、ユビキチンとの相互作用を詳細に明らかにした。結晶化が困難であった NEMO タンパク質の結晶化をしやすいするために、エントロピー低減効果を予測して変異を導入する事によって、結晶を得ることに成功した。単体および直鎖状ユビキチン2量体との複合体のX線結晶構造解析を行い、NEMO 単体では2分子が直鎖状コイルを形成していることを、複合体ではそれに2分子の直鎖状ユビキチンが結合していることを明らかにした。また、ABIN-1 タンパク質についても直鎖状ユビキチン2量体との複合体の立体構造を決定した。この結果、今まで知られていなかった、ユビキチンの全く新しい結合様式を明らかにすることができた。これまで NEMO タンパク質は、直鎖状ユビキチン2量体とは結合しないとされていたが、共同研究者の知見により結合することが示されており、その結果をよく説明するものである。また、得られた構造に基づいて作成した変異体の結合能の消失からも、構造の確からしさが確認された。

立体構造の決定だけでなく、溶液中でのユビキチンとの相互作用を等温適定型熱量計を用いて測定し、その化学量論および結合の強さの解析を行った。その結果、2分子対2分子、2分子対1分子の異なる結合力を持つ結合様式がある事を示し、結晶構造はその前者に該当する可能性を示した。これらから、NEMO タンパク質がユビキチンと結合することにより NF- κ B pathway を活性化する分子機構の一端を明らかにした。さらに、NEMO および ABIN-1 タンパク質とユビキチンの複合体の立体構造の比較から、その認識の差を利用した医薬品開発の可能性も示した。

本論文では、上に述べた科学的意義、実験方法、実験結果、それに基づく議論と考察が要領よくまとめられている。本論文の結果は、世界で超一流の専門雑誌である Cell 誌に、Rahighi 氏を筆頭著者とする論文として掲載された。以上のことから判断して、本論文の結果は科学的に重要であり、学位論文としてふさわしいものとして審査委員会全員一致で合格と判定した。