

「赤痢菌エフェクターによる NF- $\kappa$ B を介した  
炎症応答抑制機構の構造学的研究」

2016

西出 旭

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

# 目次

## 第1章 序論

1. 1. 細菌性赤痢	1
1. 2. 自然免疫系	4
1. 3. 急性炎症応答	6
1. 4. NF- $\kappa$ B 活性化経路	8
1. 5. ジアシルグリセロール (DAG) による NF- $\kappa$ B 活性化	9
1. 6. TRAF6 の活性化とユビキチン修飾経路	10
1. 7. エフェクタータンパク質とは	14
1. 8. OspI による脱アミド化反応	16

## 第2章 OspI 変異体結晶構造解析

2. 1. 目的	19
2. 2. 方法	
2. 2. 1. SDS-PAGE	20
2. 2. 2. OspI 精製	21
2. 2. 3. 結晶化、構造解析	23
2. 3. OspI Cys62Ser 変異体単独結晶構造解析	25
2. 4. OspI Cys62Ala 変異体単独結晶構造解析	31
2. 5. OspI Cys65Ser 変異体単独結晶構造解析	37
2. 6. 考察	43

第3章	OspI 変異体-Ubc13 複合体結晶構造解析	
3.1.	目的	50
3.2.	方法	
3.2.1.	Ubc13 精製	51
3.2.2.	OspI-Ubc13 複合体形成条件の検討および精製、結晶化	53
3.3.	OspI Cys62Ala-Ubc13 複合体結晶構造解析	55
3.4.	OspI Cys62Ser-Ubc13 複合体結晶構造解析	65
3.5.	考察	68
第4章	OspI-Ubc13 相互作用解析	
4.1.	目的	75
4.2.	方法	
4.2.1.	GST プルダウン実験	76
4.2.2.	脱アミド化活性測定実験	77
4.3.	結果	78
4.4.	考察	81
総括		87
参考文献		91
謝辞		99

# 第 1 章 序論

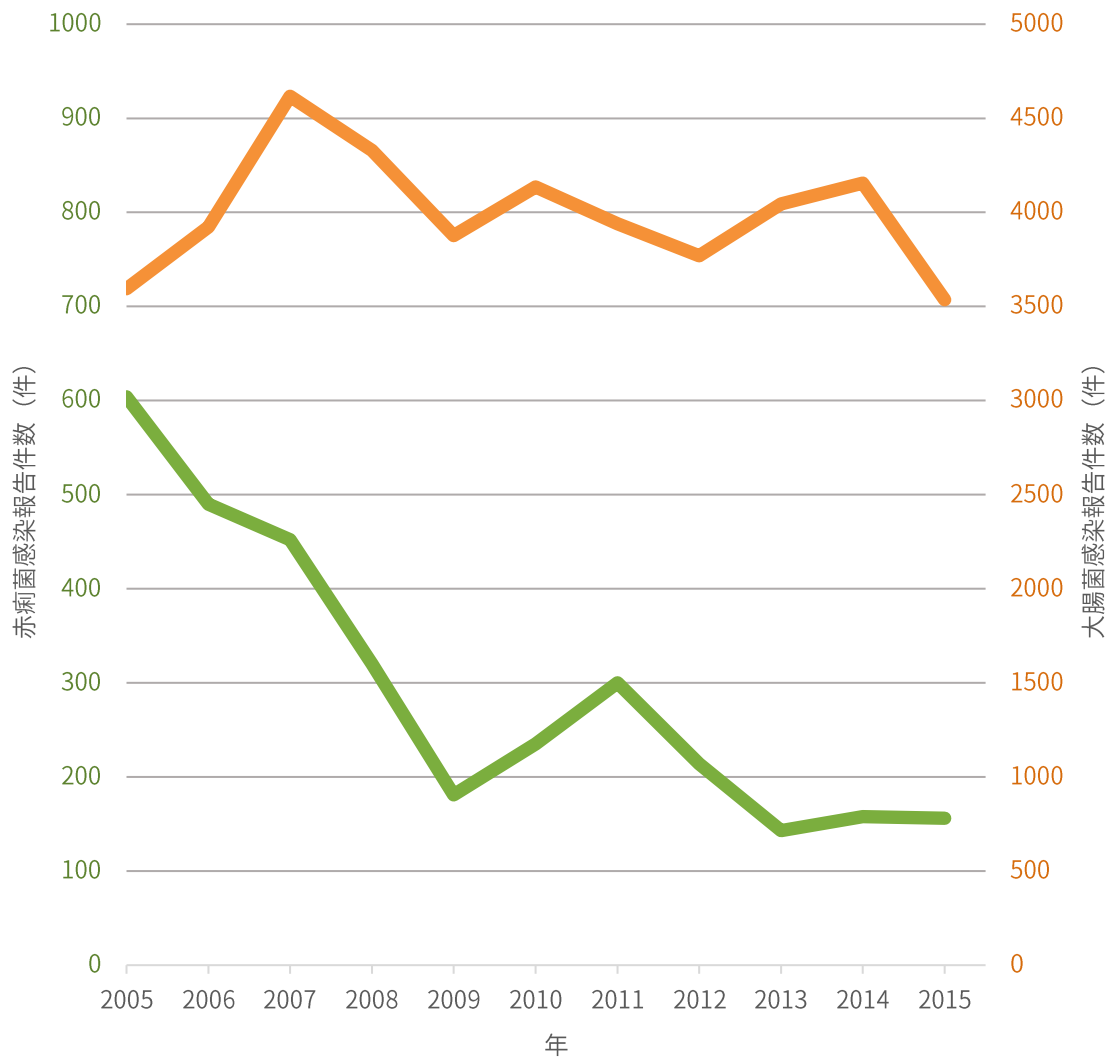
## 1. 1. 細菌性赤痢

赤痢菌 (*Shigella spp.*) は、細菌性赤痢の原因細菌として同定され、その発見から 100 年以上が経過した今日でも、年間およそ 1 億数千万人以上が細菌性赤痢に罹患し、数十万人が命を落としている [1] [2]。上下水道が整備されるなど、衛生環境の向上により日本国内での感染例は減少傾向であり年間数百例である (Figure 1)。しかし、海外旅行者などを介する輸入や、食中毒などによる大流行の危険性もあり、油断は許されない。

赤痢菌は 19 世紀末、日本人細菌学者である志賀潔により単離・同定された。このことから学名は『*Shigella*』とされ、独立した属として分類されているが、大腸菌 (*Escherichia coli*) との遺伝学的相同性は 80~90% 以上であり同族の生物種として扱っても問題ない数値である [3]。このため、外毒素であるペロ毒素 (志賀毒素) は赤痢菌・大腸菌間のプラスミド交換により伝播したとされている [4]。ペロ毒素は症状の重篤化を左右する要因の一つで、出血性大腸炎や溶血性尿毒症の直接的な原因である。

赤痢菌に対する有効なワクチンは未だに存在せず、細菌性赤痢の治療には対症療法と抗菌薬療法が用いられる。しかしながら、抗生物質に耐性を持つ多剤耐性赤痢菌の出現が近年報告され [5] [6]、更に抗生物質の開発、認可は鈍化しており、新たな薬剤の開発は急務である (Figure 2)。これらワクチンや新規の抗生物質の開発には、赤痢菌の宿主への感染機構の解明、理解といった基礎科学的研究は必要不可欠である。

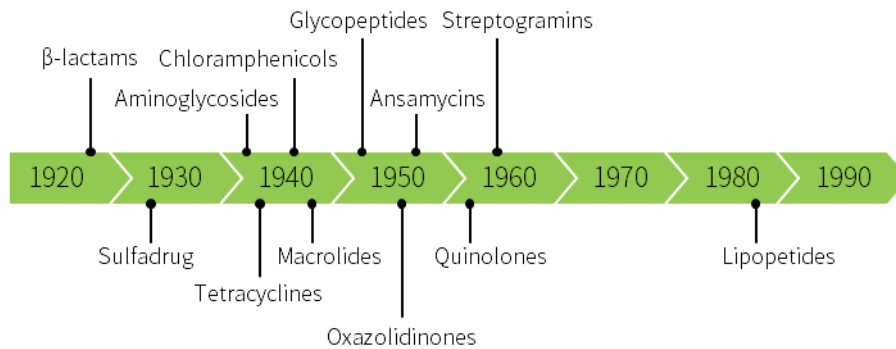




**Figure 1 国内の病原性大腸菌および赤痢菌感染報告件数の推移**

国立感染症研究所の感染症発生動向調査より、病原性大腸菌および赤痢菌の過去 10 年における年間感染者報告件数の推移を折れ線グラフにまとめた。なお、輸入感染例は含まず、感染地域国内のみの報告件数である。赤痢菌は年間数百件、大腸菌は 3000 件以上の感染報告例がある。赤痢菌感染者数は衛生環境の向上から、近年は減少傾向である。

A



B

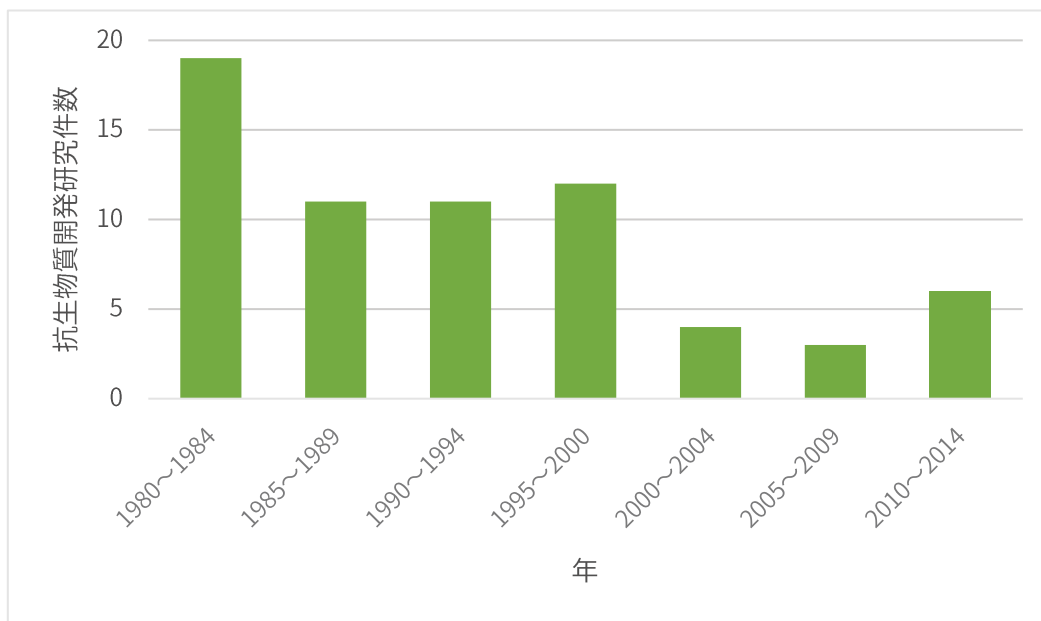


Figure 2 抗生物質発見の歴史と、新規抗生物質開発・研究件数の推移

A) 抗生物質開発の歴史。1928年  $\beta$ ラクタム系抗生物質ペニシリンの発見以降、次々と抗生物質が発見されてきた。しかし、1970年以降そのペースは減衰し、1980年リポペプチド系抗生物質の発見を最後に、新規阻害機構を持つ抗生物質は発見されていない [7]。

B) アメリカ合衆国における新規抗生物質開発・研究件数の推移 [8]。薬剤耐性細菌が増加する一方、新規抗生物質の開発研究事業は官民間問わず縮小している。

## 1. 2. 自然免疫系

私たちには、高度で複雑に発達した免疫系が備わっており、絶えず曝露する赤痢菌等の病原菌やウィルスの侵入から自己の恒常性を守っている (Figure 3)。免疫系は、物理障壁、自然免疫、獲得免疫の三つに大きく分けられる。異物に対する最初の防御機構である、物理的障壁には、皮膚や粘膜、繊毛などが挙げられ、その名の通り物理的に異物の侵入を防ぐ。次に機能するのが、自然免疫系である。自然免疫は、植物や無脊椎動物を含む多くの種に保存された原始的な免疫系で、細胞が異物の侵入を感知することで迅速に誘導される。一方、獲得免疫系は脊椎動物といった高等生物のみが持つ免疫系で、B細胞やT細胞による抗原、抗体反応を用いて異物排除を行い、抗体の産生には数週間を要することが知られている。これら免疫系は互いに独立して働くと考えられていた。しかし、近年の研究により自然免疫系は、病原体を認識することで、感染をいち早く感知し獲得免疫系を誘導する重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



Figure 3 感染と免疫

ヒトの免疫系は、物理的障壁、自然免疫（先天性免疫）、適応免疫（獲得免疫）の3重の防御機構から構成されている。身体を覆う皮膚や粘膜、涙や胃酸は物理障壁として外界との接触を遮断することで、異物の物理的接触、侵入を妨げる最初の防御機構である。また、異物の呼吸器への侵入により引き起こされる咳やくしゃみも、機械的に異物の侵入を妨げる物理障壁の一種である。次に、物理的障壁を突破した異物が侵入すると、これを感知し自然免疫応答が速やかに誘導される。自然免疫では、好中球やマクロファージなどの貪食細胞が食作用により異物を分解、排除する非特異的防御応答である。異物の侵入に対して最後に、マクロファージなどからT細胞が抗原提示を受けることで、獲得免疫が誘導される。獲得免疫系では、抗原提示を受けてB細胞により産生される抗体や、細胞傷害性T細胞により特異的に異物が排除される。赤痢菌を初めとする病原菌やウイルスは、これら防御機構を巧みに回避、利用することで感染を成功させる。

### 1. 3. 急性炎症応答

赤痢菌等の細菌やウィルスが感染すると、感部組織では発赤、発熱、腫脹、疼痛、機能障害といった症候に代表される急性炎症応答が引き起こされる。これらの症候は、細胞が感染を感知することで炎症性サイトカインを分泌し、血管の拡張、充血、透過性の向上を亢進し、マクロファージや好中球といった貪食細胞を感部へ誘導することに起因する。分泌された炎症性サイトカインは貪食細胞の活性化や感部の誘導だけではなく、獲得免疫系の活性化にも深く関与しており、速やかな急性炎症応答の誘導は、免疫系にとって非常に重要な役割を果たしている [9]。

細菌やウィルスの侵入は、免疫細胞が、病原因子に由来する分子群、病原菌関連分子パターン (PAMPS) を細胞膜または細胞質に存在するパターン認識受容体 (PRR) で認識することで検出される [10] [11]。代表的な PAMPS として、細菌に由来する鞭毛タンパク質フラジェリン、リポ多糖類 (LPS) や、ウィルスに由来する二本鎖 RNA などが知られている [12] [13] [14]。また、PRR も多種存在し、PRR は細胞膜局在の Toll-like receptor (TLR) および、細胞質局在の Nod-like receptor (NLR)、RIG1-like receptor の 3 種に大別される (Table 1)。中でも、TLR は最も古くより PRR の一つとして知られ、ヒトで 10 種類の受容体タンパク質が同定されている。TLR4 は PAMPS として赤痢菌等のグラム陰性細菌に由来する LPS と結合することにより、MyD88 や TRAF6 といったアダプタータンパク質を介して転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症性サイトカインの産生を促進する [13] [15]。その結果、病原菌が感染した組織で急性炎症応答が誘導される。この様に PRR は病原菌因子に由来する PAMPS と結合し、種々のシグナル伝達経路を介し急性炎症応答における起点として機能している。

近年、PRR が非病原体由来の内因性の分子群である、ダメージ関連分子パターン (DAMPS) を認識することが明らかになった [16]。DAMPS には IL-1 $\alpha$  や IL-6 といったサイトカインの他、Heat shock protein (HSP) や尿素、ATP といった細胞内に存在する分子が挙げ

られ、これら分子が細胞の壊死や損傷により細胞外へ放出される。PRR は細胞外へ流出したこれらの物質を DAMPS として認識し、急性炎症応答を誘導する。すなわち、PRR は PAMPS の認識と同様に、組織の壊死や細胞の損傷を DAMPS との結合により感知し、急性炎症応答を誘導する。

Table 1 パターン認識受容体一覧

Receptor	Structure	Cellular Localization	Ligand	Origin	Transcription Factor
TLR1	Trans-membrane	Cell membrane	Lipopeptides	Bacteria	NF- $\kappa$ B
TLR2	Trans-membrane	Cell membrane	Lipopeptides	Bacteria	NF- $\kappa$ B
TLR3	Trans-membrane	Endosomes Lysosomes	dsRNA	Viruses	IRF-3
TLR4	Trans-membrane	Cell membrane	LPS	Gram-negative Bacteria	NF- $\kappa$ B
TLR5	Trans-membrane	Cell membrane	Flagellin	Bacteria	NF- $\kappa$ B
TLR6	Trans-membrane	Cell membrane	Lipopeptides	Mycoplasma	NF- $\kappa$ B
TLR7	Trans-membrane	Endosomes Lysosomes	ssRNA	Viruses	NF- $\kappa$ B
TLR8	Trans-membrane	Endosomes Lysosomes	ssRNA	Viruses	NF- $\kappa$ B
TLR9	Trans-membrane	Endosomes Lysosomes	CpG DNA	Bacteris	NF- $\kappa$ B
TLR11	Trans-membrane	Cell membrane	???	Uropathogenic Bacteris	???
RIG-I	Soluble	Cytoplasm	ssRNA	Viruses	IRF-3
NOD1	Soluble	Cytoplasm	Peptidoglycans	Bacteria	NF- $\kappa$ B
NOD2	Soluble	Cytoplasm	Peptidoglycans	Bacteris	NF- $\kappa$ B

#### 1. 4. NF- $\kappa$ B 活性化経路

Nuclear factor - $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) は、炎症性サイトカインの発現、転写を制御する転写因子であり、炎症応答を初め免疫系の制御に深く関与している [17] [18]。未刺激状態の NF- $\kappa$ B は細胞質に局在しており阻害タンパク質 Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) と結合し核移行シグナルが被覆された不活性化状態である (Figure 4)。細胞が PAMPS や DAMPS による刺激を受けると、細胞内でリン酸化酵素複合体である、TAK1-TAB1-TAB2 複合体 (TAK1 複合体) や、NEMO-IKK $\alpha$ -IKK $\beta$  から構成される I $\kappa$ B kinase (IKK) 複合体が形成されることにより、リン酸化カスケードが活性化され、I $\kappa$ B に対するリン酸化修飾が起こる。リン酸化修飾を受けた I $\kappa$ B はユビキチンプロテアソームシステムにより分解され、その結果 NF- $\kappa$ B の核移行シグナルが表在化し NF- $\kappa$ B が核へ移行し転写の活性化が行われる [18] [19]。

## 1. 5. ジアシルグリセロール (DAG) による NF- $\kappa$ B の活性化

ジアシルグリセロール (DAG) は通常、真核生物の細胞膜内膜に局在する脂質である。細胞外から刺激を受けたホスホリパーゼ C (PLC) によるホスファチジルイノシトールの分解によって産生する DAG は、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することでシグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして機能する [20]。また、DAG は赤痢菌等のグラム陰性細菌が宿主へ侵入する時に細胞膜に形成する仮足状の葉状仮足 (Membrane ruffle) や、エンドソーム膜に局在することが報告されている [21]。

近年、DAG と類似の化学構造を持つ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用いた実験により、DAG が DAMPS として機能することが示唆された [22]。PMA は DAG と同様に PKC シグナル伝達経路を活性化し、アダプター分子 CARMA1-BCL10-MALT1 (CBM) 複合体の形成 [23]、TNF- $\alpha$  receptor associated factor 6 (TRAF6) の活性化を誘導する [24]。TRAF6 は下流のリン酸化カスケードを制御することで、NF- $\kappa$ B の活性化に参与していることが知られており、TRAF6 の活性化は NF- $\kappa$ B の活性化及び、急性炎症応答を誘導する。すなわち、細菌侵入時に局在する DAG は、宿主細胞に DAMPS として認識されることで、TRAF6 依存的な NF- $\kappa$ B 活性化を介して急性炎症応答を引き起こすと考えられる。



## 1. 6. TRAF6 の活性化とユビキチン修飾経路

タンパク質のプロテアソーム分解を誘導する翻訳後修飾として発見されたユビキチン修飾系は、細胞内の様々な生命現象に関与していることが知られている。ユビキチンは、76個のアミノ酸から構成される分子量約8500の球状タンパク質で、真正細菌を除く広汎な生物種に普遍的に保存されている。翻訳後修飾因子であるユビキチンは、標的タンパク質へ付加されることで『シグナル』として機能し、標的の機能や運命を制御する。

ユビキチン修飾反応は、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3種類の酵素群により触媒される。初めに、ユビキチン活性化酵素 (E1) がATPのエネルギーを利用し、ユビキチンC末端のグリシン残基のカルボニル基と自身の触媒システイン残基を介して、チオエステル結合を形成することで、ユビキチンを活性化する。次に、この結合が、E1~E3の橋渡しを行う、ユビキチン結合酵素 (E2) の触媒システイン残基へと転移され、E2酵素~ユビキチンチオエステル結合中間体が形成される。最後に、標的タンパク質を選択的に認識するユビキチンリガーゼ (E3) を介して標的タンパク質 (基質) のリシン残基へ、イソペプチド結合により転移されることでユビキチン修飾が行われる [25]。

ユビキチン修飾には、標的に対して1つのユビキチンのみが付加されるモノユビキチン化の他に、ユビキチンが数珠状に連結されたポリユビキチン鎖を修飾する、ポリユビキチン化がある。ポリユビキチン鎖は、修飾されたユビキチン分子内のリシン残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) または、N末端メチオニン残基 (M1) を介したイソペプチド結合により、連続してユビキチンが付加することで形成される。細胞内には、これら8種類のポリユビキチン鎖が存在していることが報告されており、それぞれ異なった『シグナル』として働くことで、細胞機能の制御に関与することが示されている [26]。例えば、K48ポリユビキチン鎖は、修飾された標的タンパク質をプロテアソームによる分解へと誘導する、分解シグナルであるが、K63ポリユビキチン鎖は、DNA修復応答や、

免疫系の制御シグナルとして機能する。ポリユビキチン鎖は連結様式によって異なった立体構造を持つことから、ポリユビキチン鎖の構造的多様性が、ユビキチン修飾系に数多くの生命現象の制御に関与することを可能にしていると考えられている。

アダプター分子 TRAF6 は、NF- $\kappa$ B 活性化経路においてユビキチンリガーゼとして働いている (Figure 4)。PAMPS、DAMPS 刺激を受けることにより活性化した TRAF6 は、E2 酵素である Ubiquitin conjugating enzyme 13 (Ubc13) -Ubiquitin conjugating enzyme variant 1a (Uev1a) 複合体と共調し、自己へ K63 ポリユビキチン鎖を修飾する。この K63 ポリユビキチン鎖は、NF- $\kappa$ B の活性化に必要なリン酸化カスケードで働く、TAK1 複合体や IKK 複合体の分子集合の足場として機能することが示唆されている [27] [28]。すなわち、上流からの刺激を受け、活性化した TRAF6 は自己へ K63 ポリユビキチン鎖を修飾し、これにより下流のリン酸化カスケードが活性化され、最終的に NF- $\kappa$ B の活性化が誘導される。

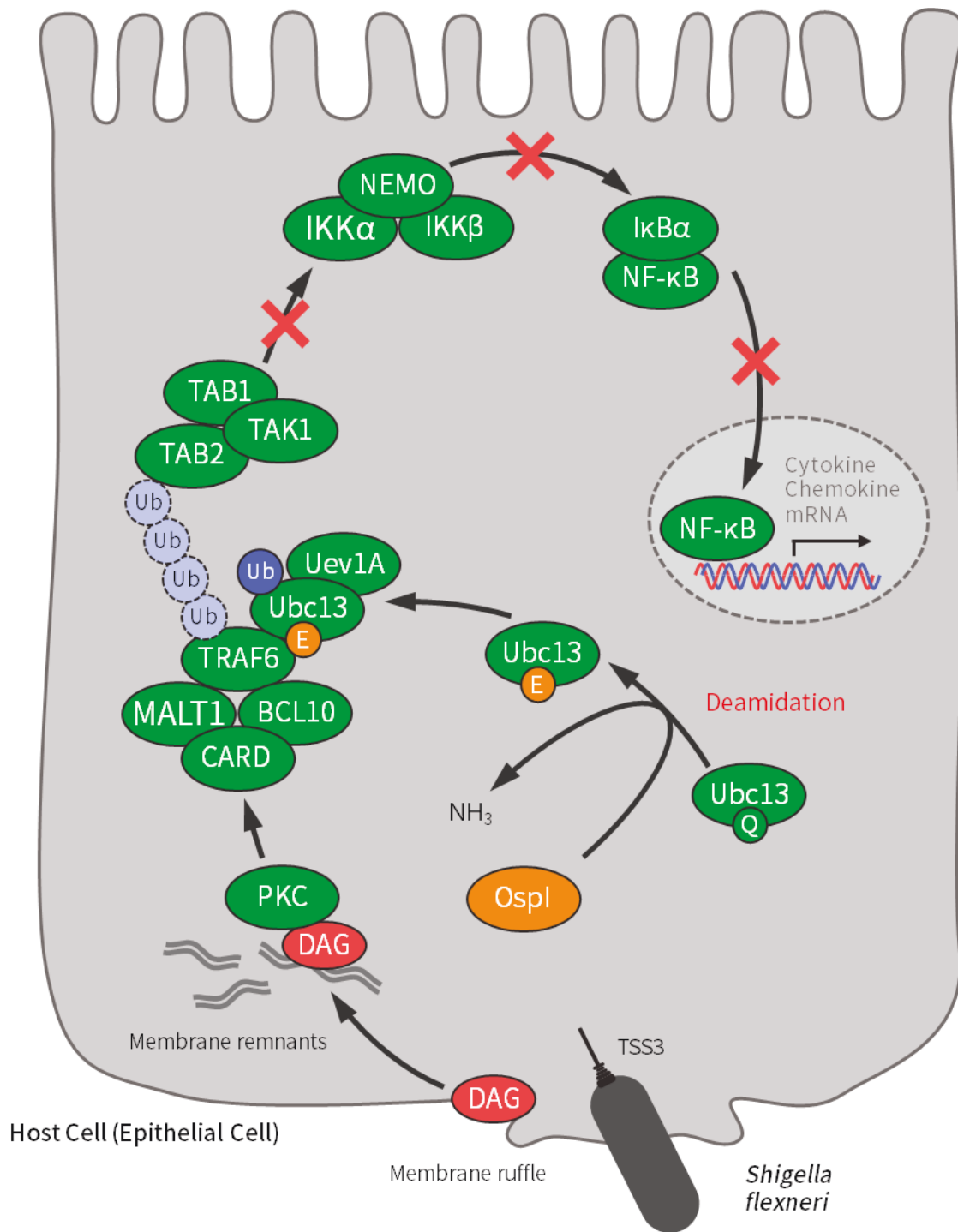


Figure 4 DAGによるNF- $\kappa$ Bの活性化と、OspIによるその抑制

Figure 4の説明は次項に示す。

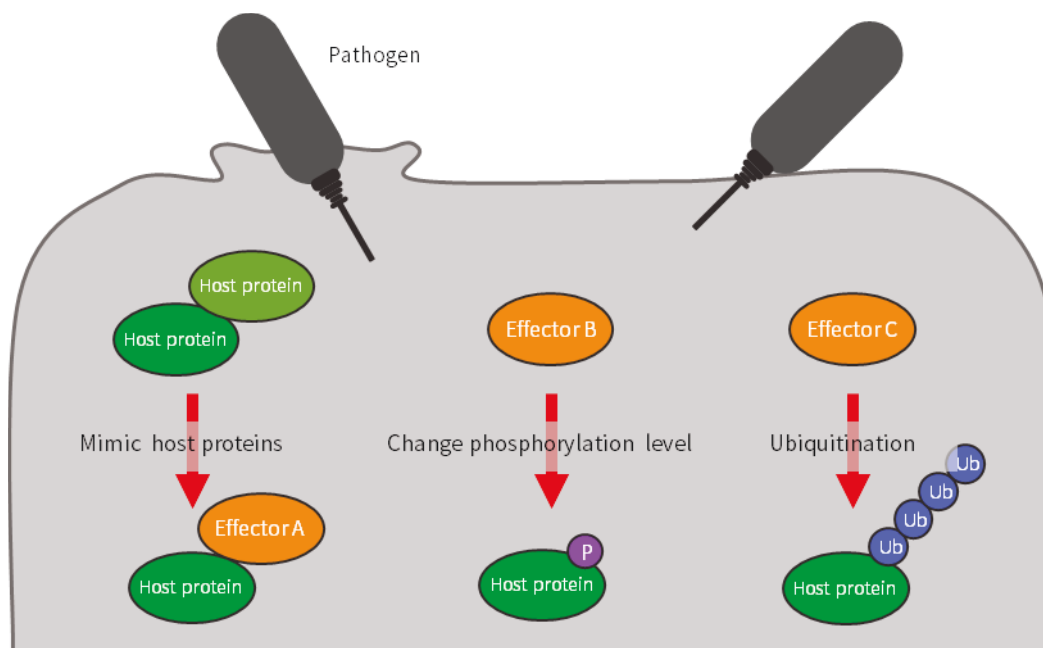
#### Figure 4 DAG による NF- $\kappa$ B の活性化と、OspI によるその抑制

グラム陰性細菌の感染時に形成される葉状仮足 (Membrane ruffle) に局在する DAG は PKC を活性化し、CARMA1-BCL10-MALT1 (CBM) 複合体が形成され、下流のユビキチンリガーゼ TRAF6 の活性化を引き起こす。TRAF6 は E2 酵素複合体 Ubc13-Uev1a 依存的に自己へ K63 ポリユビキチン鎖を修飾する。これを足場として TAK1 複合体、IKK 複合体が形成され、I $\kappa$ B をリン酸化することにより、NF- $\kappa$ B が活性化し、核内へ移行する。その結果、炎症性サイトカインの産生が促進される。赤痢菌エフェクターOspI は DAG-BCL10-TRAF6-NF- $\kappa$ B 経路を阻害することで急性炎症応答を抑制する。

## 1.7. エフェクタータンパク質とは

一部のグラム陰性細菌は、われわれが発達させてきた免疫系に対して、エフェクタータンパク質（エフェクター）と呼ばれる毒性タンパク質群を進化させてきた。エフェクターは、細菌の感染時に注射針状の分泌装置を介して、宿主細胞の細胞質へと直接分泌される。分泌されたエフェクターは宿主タンパク質との結合、リン酸化、ユビキチン化といった種々の宿主高次機能を乗っ取り利用することで、病原菌の感染を亢進する働きを持つ（Figure 5）。

Outer surface protein I (OspI) は、III 型分泌装置を介して分泌される、赤痢菌の新規のエフェクタータンパク質として同定された [29]。OspI は DAG により誘導される TRAF6~NF- $\kappa$ B 依存的な急性炎症応答を抑制する機能を持つ（Figure4）。OspI は脱アミド化酵素であり、E2 酵素 Ubc13 の 100 番グルタミン側鎖アミド結合を加水分解することでグルタミン酸へと修飾する。Ubc13 は TRAF6 の自己ユビキチン化に必要な因子であり、OspI による脱アミド化修飾をうけた Ubc13 は TRAF6 と共調することができず、結果 TRAF6 による自身への K63 ポリユビキチン化修飾が阻害され、NF- $\kappa$ B の活性化が抑えられる。DAG は、赤痢菌感染時に宿主細胞膜に形成される葉状仮足に局在することが知られており、OspI はこの DAG を介した TRAF6~NF- $\kappa$ B 依存的な急性炎症応答を抑制していると考えられる。



**Figure 5 エフェクタータンパク質とは**

感染時に、注射針状の分泌装置を介して宿主へと分泌されるエフェクタータンパク質は、宿主タンパク質との、結合やリン酸化、ユビキチン化修飾などを介して、細胞高次機能を乗っ取り、巧みに免疫系を制御、抑制することにより感染を進める。

## 1. 8. OspI による脱アミド化反応

変異赤痢菌を用いた感染実験と、変異体 OspI を用いた in vitro 脱アミド化実験により、OspI の活性残基として Cys62、His145、Asp160 の 3 残基が活性に必須であることが報告されていた [29]。また、野生型 OspI の X 線結晶構造解析により、OspI は *Pseudomonas syringae* のエフェクタータンパク質である AvrPph と類似の構造をとっていることが示された (Figure 6、7) [29]。AvrPph は OspI と同様の活性部位を保持するシステインプロテアーゼファミリーであることから、OspI はシステインプロテアーゼ様の活性部位を形成し、プロテアーゼによるペプチド結合の加水分解と同様の反応機構により脱アミド化反応を行うと予想された。しかしながら、報告された OspI の結晶構造中では活性残基である Cys62 と近傍の Cys65 がジスルフィド結合しており、システインプロテアーゼ様の活性部位を形成していなかった (Figure 7)。

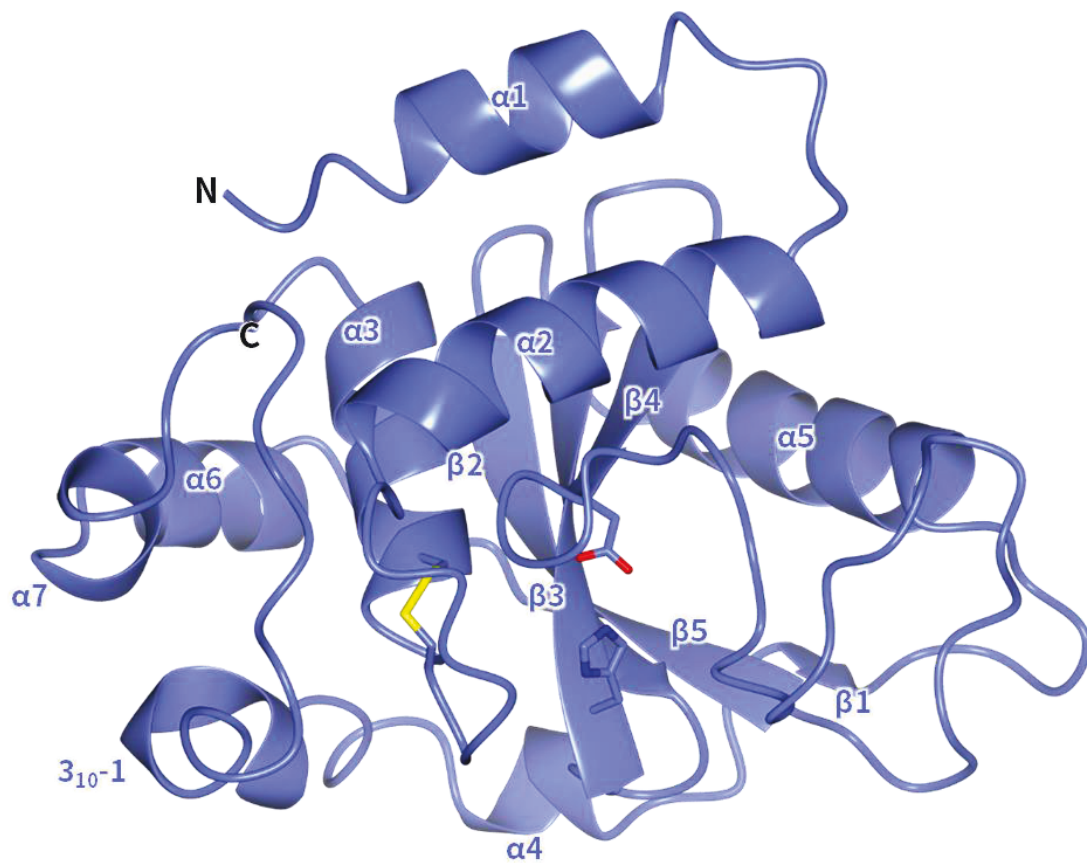


Figure 6 野生型 OspI 全体構造

*Shigella flexneri* OspI (PDB ID : 3B21) の全体構造をリボン図で表した。野生型 OspI 結晶構造は C2221 晶系、分解能 1.8Å で得られた。



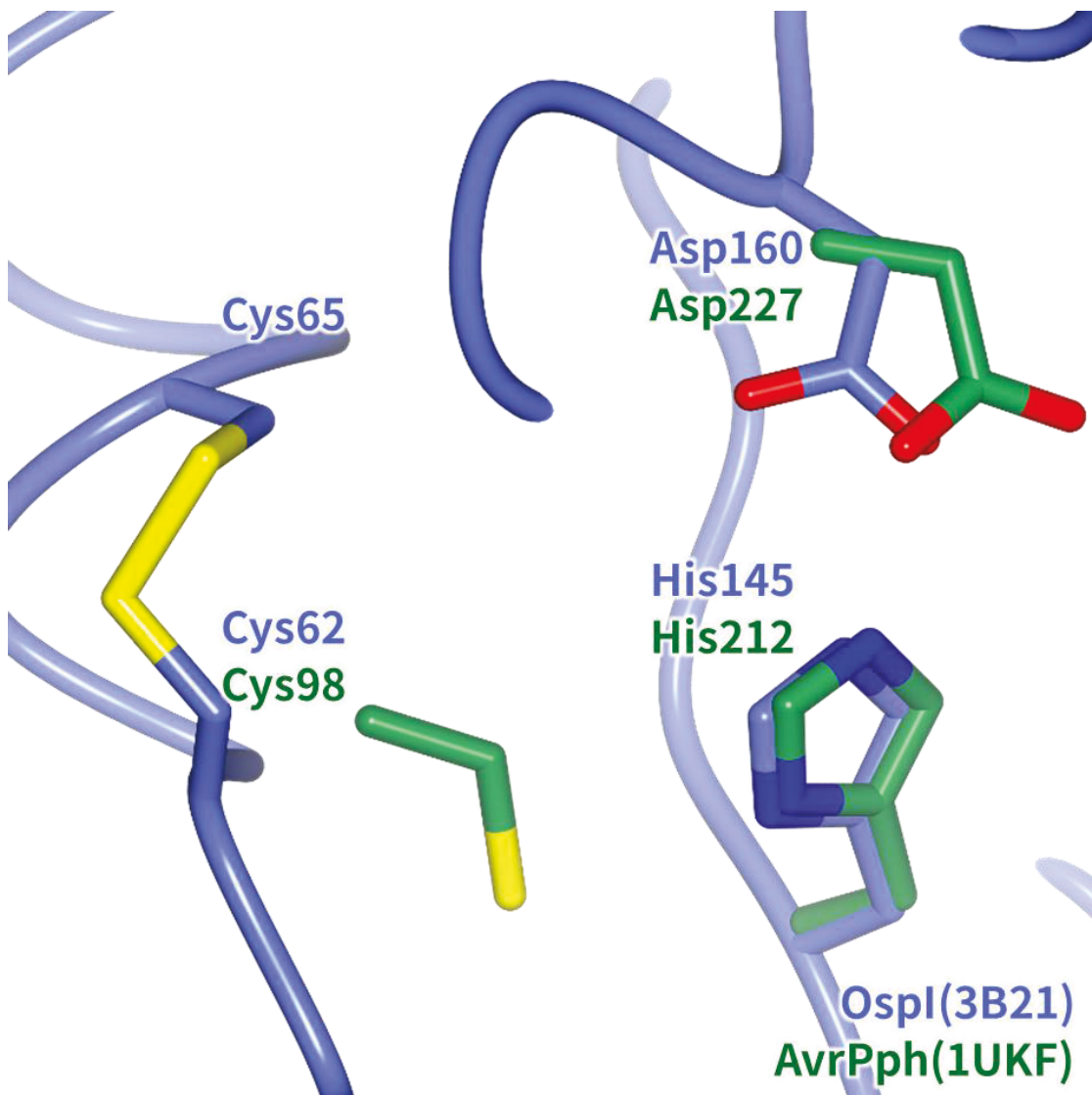


Figure 7 野生型 OspI 活性部位構造

*Shigella flexneri* OspI (青) と *Pseudomonas syringae* AvrPph (緑) (PDB ID : 1UKF) の活性部位構造を表した。活性残基側鎖構造をスティック図で、その他は主鎖構造のみライン図で表示した。*Pseudomonas syringae* のエフェクタータンパク質である AvrPph はシステインプロテアーゼでありペプチド加水分解活性を持つ。その活性部位は Cys98、His212、Asp227 の触媒三残基から構成される。OspI は加水分解反応において中心的役割を果たす Cys62 が Cys65 とジスルフィド結合を形成しており、AvrPph にみられる様なシステインプロテアーゼ様活性部位を形成していなかった。

## 第 2 章 OspI 変異体結晶構造解析

### 2. 1. 目的

OspI は活性残基 (Cys62、His145、Asp160) の構成と、類似の立体構造を持つ AvrPph がシステインプロテアーゼであることから、システインプロテアーゼ様の活性部位を形成し、同様の加水分解機構を介して脱アミド化反応を行っていると考えられた。しかし、野生型 OspI は単独状態の結晶構造中で、活性 Cys62 が近傍の Cys65 とジスルフィド結合を形成しており、システインプロテアーゼ様の活性部位を形成していなかった。そこで、本研究では、OspI の活性残基である Cys62 または Cys65 の変異体を作製し、これらの結晶構造を決定することで、活性型構造の解明とそれに伴う構造変化を明らかにする。

## 2. 2. 方法

### 2. 2. 1. SDS-PAGE

SDS-PAGE は以下に示す方法で行った。評価試料に対して体積比 1/4 の Sample Denature Buffer(10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、10mM 2-Mercapt ethanol (2-ME)、20% Glycerol、0.2M Tris/HCl pH 6.8、0.05% Bromophenol blue)と混合し、95°Cで 5 分ボイルしたものを SDS-PAGE 用試料とした。SDS-PAGE に用いるゲルは Running Gel : 12% acrylamide、0.3M Tris/HCl pH 8.8、0.1% SDS、0.05% ammonium per sulfate (APS)、0.01% tetramethylethylenediamine (TEMED)、Stacking Gel : 4% acrylamide、125mM Tris/HCl pH 6.8、0.1% SDS、0.05% APS、0.01% TEMED の組成で作製し、SDS-PAGE 電気泳動 Buffer (25mM Tris、50mM Glycine、0.12% SDS) を用いて定電流設定でゲル 1 枚あたり 20mA の条件で電気泳動を行った。タンパク質の分子量の目安として、タンパク質分子量マーカーLMW Marker Kit (GE Healthcare) を使用した。LMW Marker Kit は、rabbit muscle 由来 Phosphorylase B (97000Da)、bovine serum 由来 Albumin (66000Da)、chicken egg white 由来 Ovalbumin (45000Da)、bovine erythrocyte 由来 Carbonic anhydrase (30000Da)、soybean 由来 Trypsin inhibitor (20100Da)、bovine milk 由来  $\alpha$ -Lactalbumin (14400Da) から構成され、それぞれの SDS-PAGE 結果に分子量を示した。タンパク質の検出は、全て Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を用いた。電気泳動後のゲルをイオン交換水中で洗浄し、固定染色液 (0.25% CBB、5% エタノール、7.5% 酢酸) で 15 分振盪し染色、脱色液 (5% エタノール、7% 酢酸) で一晩脱色した。

## 2. 2. 2. OspI 精製

OspI (C62S、C62A、C65S) は pGEX-6P ベクターを用いて、Glutathione S Transferase (GST) タグ融合タンパク質として大腸菌 (DE3 BL21) 発現系により発現した。培養には LB 培地 (10g/ℓ ポリペプトン、5g/ℓ 乾燥酵母エキス、5g/ℓ NaCl) へ終濃度 100mg/ℓ になるようにアンピシリンを加えた培地を使用した。本培養の 1/100 量培地で前培養を一晩行い、本培養に移した。本培養開始後、濁度 ( $OD_{600}$ ) を測定し  $OD_{600} : 0.5$  で終濃度 0.1mM になるように Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、20°C 20 時間培養を行った。その後、6000×g 30 分遠心分離により集菌し、沈殿画分 (菌体) を Lysis Buffer (150mM NaCl、25mM Tris/HCl pH 7.5) で懸濁し、再度 6000×g 30 分遠心分離、上清を捨て菌体は-80°Cで凍結保存した。

精製では、菌体 6g 分に対して 60mℓ の Lysis Buffer で凍結菌体を懸濁したのちに、超音波破碎機を用いて破碎した。大腸菌破碎液は 30000×g 30 分で遠心分離し、上清を可溶画分とした。次に、可溶画分は GST タグを用いて Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) によるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。オープンカラムを用いて、3ℓ 分の可溶化画分に対して、5mℓ のビーズを使用して、吸着操作を 5 回繰り返し行った。100mℓ の Lysis Buffer で洗浄後、Elution Buffer (20mM Glutathione、30mM Tris/NaOH pH 7.5) を 5mℓ ずつ 4 回加え融合タンパク質を溶出した。SDS-PAGE により融合タンパク質が検出された画分に Precision Protease を加え 4°C 20 時間静置することで GST タグを切断した。タグを切断したタンパク質溶液は 1ℓ 脱塩バッファー (25mM Tris/HCl pH 7.5、10mM 2-ME) を用いて 2 時間×2 回 透析を行った。次に AKTA (GE Healthcare) 高速液体クロマトグラフィーシステムを利用してイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。切断した GST タグとの分離を目的とし、HiTrap QFF 5mℓ (GE Healthcare) による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムからの溶出は、NaCl を利用し、A Buffer (0mM NaCl、25mM

Tris/HCl pH 7.5, 10mM 2-ME) に対して B Buffer (2M NaCl, 25mM Tris/HCl pH 7.5, 10mM 2-ME) を NaCl が直線的な濃度勾配を形成するように混合した。溶出画分は SDS-PAGE により評価し、OspI を含む画分を次の精製試料とした。イオン交換クロマトグラフィーのみでは、完全な GST タグの排除は難しい。さらに、OspI を含む画分には OspI よりやや低分子の不純物が混在し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより純度の向上を図った。ゲルろ過クロマトグラフィーは、HiLoad Superdex75 26/600 (GE Healthcare) カラムを使用し、Buffer は 150mM NaCl、25mM Tris/HCl pH 7.5、10mM 2-ME の組成で行った。溶出画分は SDS-PAGE で純度を評価し、不純物の少ないピーク前半を結晶化試料として、結晶化 Buffer (25mM Tris/HCl pH 7.5、1mM DTT) で透析した。結晶化 Buffer へ透析した試料は、Amicon Ultra 10k (Millipore) を用いた限外濾過濃縮法で、20mg/ml を目安とし濃縮した。

### 2.2.3. 結晶化、構造解析

精製サンプルを用い、結晶化条件スクリーニングにより結晶化条件の探索を行った。スクリーニングには、シッティングドロップ蒸気拡散法を用い、タンパク質試料  $1\mu\ell$  にたいして結晶化溶液  $1\mu\ell$  を加え結晶化を行った。このスクリーニングには、HAMPTON Crystal Screen I, II を用いた。OspI は多くの条件で結晶を生じるが、全て回折実験に不向きな針状多結晶であるため、さらなる条件検討を行った。条件検討はハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて、スクリーニング同様、タンパク質試料  $1\mu\ell$  に対して結晶化溶液  $1\mu\ell$  を加えて結晶化を行った。結晶化条件は、スクリーニングで得られた条件を元に検討した。条件検討では更に、多結晶の改善に有効とされている、マイクロシーディングを行った。マイクロシーディングでは得られた結晶を細かく砕き、それを種結晶として結晶の質の向上を図った。種結晶は、結晶析出条件の溶液中で破碎し 6 時間インキュベートした。ニードルを種結晶溶液につけた後、そのニードルで結晶化溶液とタンパク質試料 混合直後のドロップに触れることで、種結晶の播種を行った。回折実験は SPring-8 BL-44XU で行った。得られたデータはプログラム HKL2000 [30]を用いて指数付け、積分を行い、位相決定は、既に決定されていた野生型 OspI 単独構造 (PDB ID : 3B21) をモデルに、CCP4 [31]に統合される Molrep [32]を用いた分子置換法により行い、CCP4 refmac5 [33]、Coot [34]によりモデルの修正、精密化を行った。

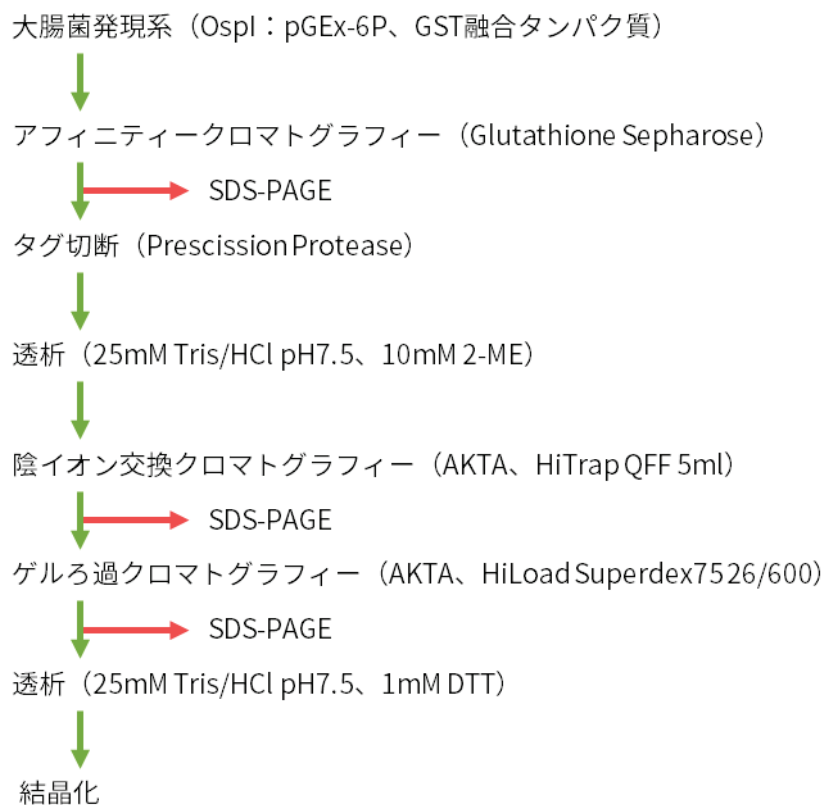


Figure 8 OspI 精製フローチャート

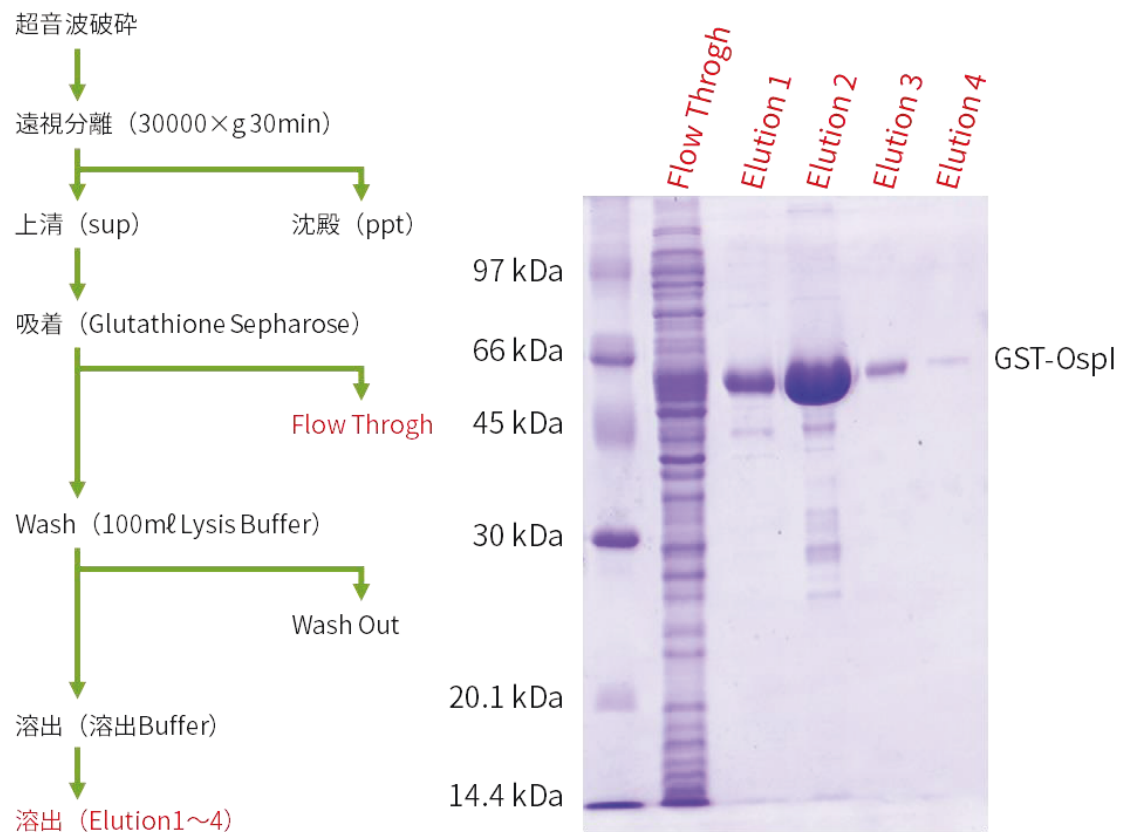
結晶化に用いた、OspI の発現および精製の流れをフローチャート図に表した。

### 2.3. OspI Cys62Ser 変異体単独結晶構造解析

実験方法で述べた通り、OspI C62S は GST 融合タンパク質として大腸菌発現系を用いて発現し、GST タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った (Figure9)。溶出画分を SDS-PAGE で確認し、OspI C62S が含まれる、Elution1~3 をタグ切断後、次の精製に用いた。次に、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った (Figure10)。陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、2つの波長 280nm 吸光度を示した。一次配列から ProtParam Server [35]を用いて算出した、それぞれの理論等電点は GST : 5.4、OspI : 4.95 であることから、Buffer pH (7.5) により近い GST の方が低塩濃度で溶出されると考えられる。更に、1つ目の溶出ピークのタンパク質は、2つ目の溶出ピークを構成するタンパク質と比較して僅かに小さい分子量を示した。GST (約 23kDa) は OspI (約 25kDa) より分子量が僅かに小さいことから、SDS-PAGE の結果からも 1つ目の溶出ピークが GST であり、2つ目の溶出ピークが OspI であることが強く示唆された。これらのことから、2つ目の溶出ピークの画分 25~27 をゲルろ過クロマトグラフィーに用いた。ゲルろ過クロマトグラフィー溶出画分から不純物の混入の少ない、画分 6~9 を結晶化試料とした。得られた試料は 21.9mg/ml まで濃縮し結晶化を行った (Figure11)。結晶化はファーストスクリーニング HAMPTON Crystal Screen I No.18、0.2M Magnesium acetate、0.1M Sodium cacodylate pH 6.5、20%PEG8000 で得られた結晶を回折実験に用いた。回折実験の結果を Table2 に示す。

構造解析の結果、OspI C62S 単独構造は分解能 2.2 Å で決定した (Figure12)。OspI C62S の二次構造は単独結晶構造中で、7本の  $\alpha$  ヘリックスと、1本の  $3_{10}$  ヘリックス、5本の  $\beta$  ストランドから形成されていた。野生型 OspI では2つに分かれていた  $3_{10}$  ヘリックスが1本になっていることを除き、二次構造に大きな相違はみられなかった。





**Figure 9** OspI C62S 変異体 アフィニティークロマトグラフィー

OspI C62S 変異体のアフィニティークロマトグラフィーの工程フローチャート図（左）とその SDS-PAGE 結果（右）。OspI は大腸菌発現系を用いて、GST タグ融合タンパク質として発現し、GST タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、非吸着 Through 画分（Flow Through）と溶出画分（Elution1~4）を SDS-PAGE し、CBB 染色により検出した。分子量マーカーを参考に、45~65 kDa にあるバンドが GST-OspI C62A（約 49kDa）であると判断した。

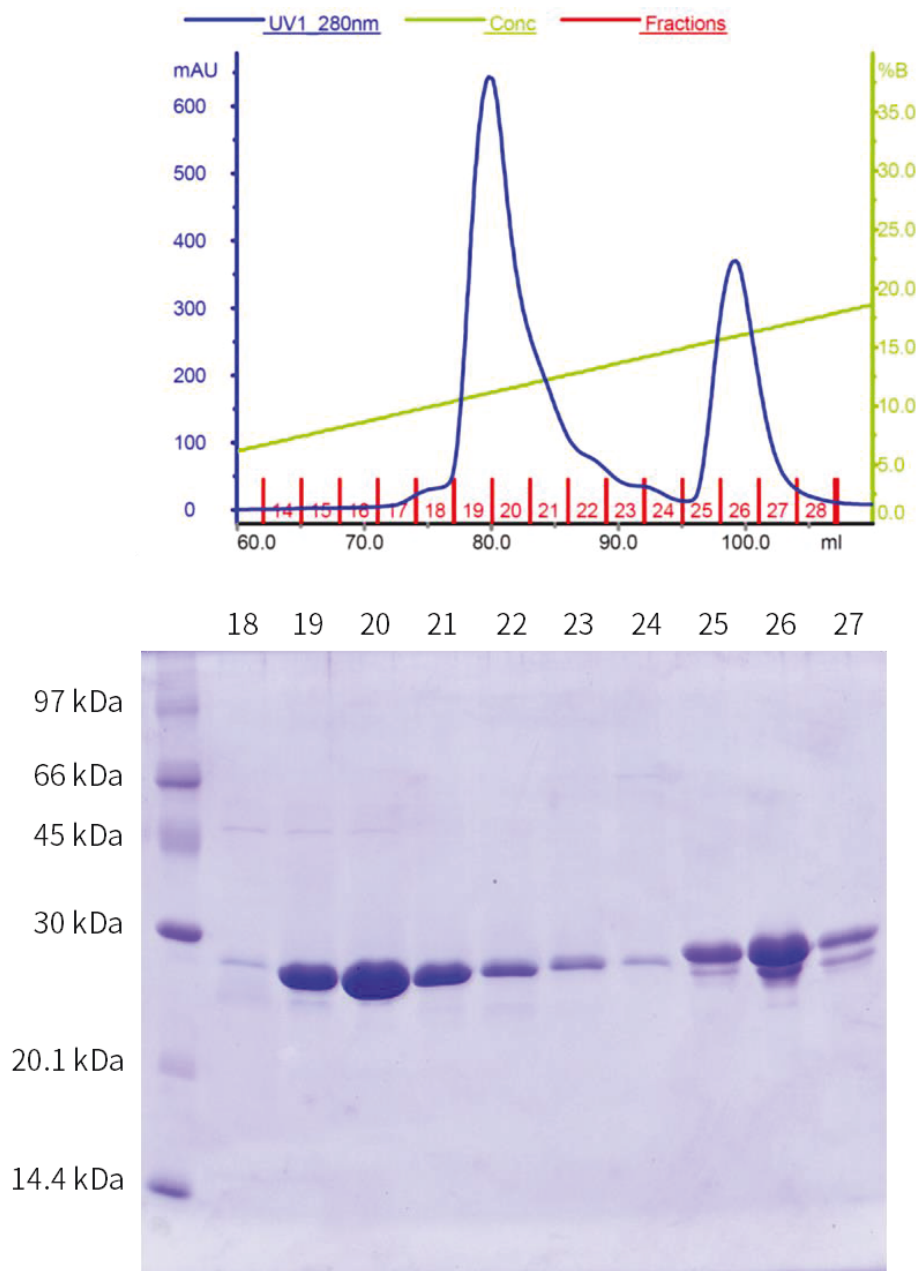


Figure 10 OspI C62S 変異体 陰イオン交換クロマトグラフィー

AKTA システムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap QFF 5ml) の結果  
 クロマトグラム (上) と、溶出画分 (18~27) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラ  
 ムは横軸に溶出体積 (ml)、縦軸に波長 280 nm 吸光度 (青) と、溶出 Buffer の塩濃度  
 (黄緑) を表した。吸光度は相対値 (AU) を、塩濃度勾配は A Buffer (0M NaCl TBS)  
 と B Buffer (2M NaCl TBS) の混合比率 (%) を表示している。

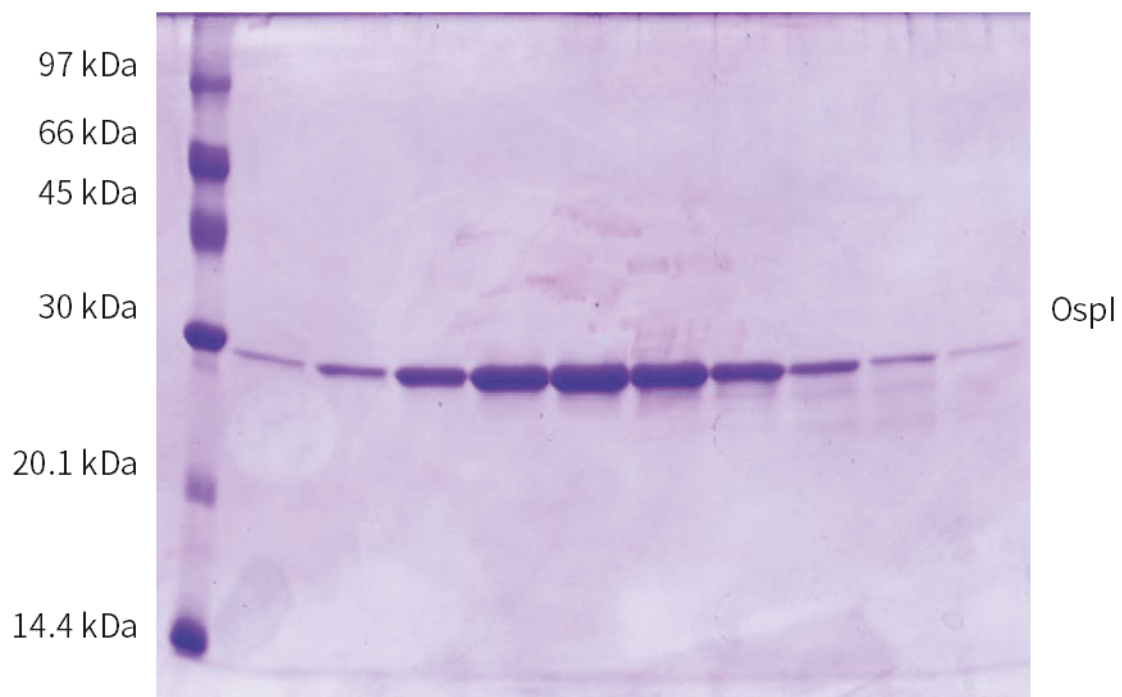
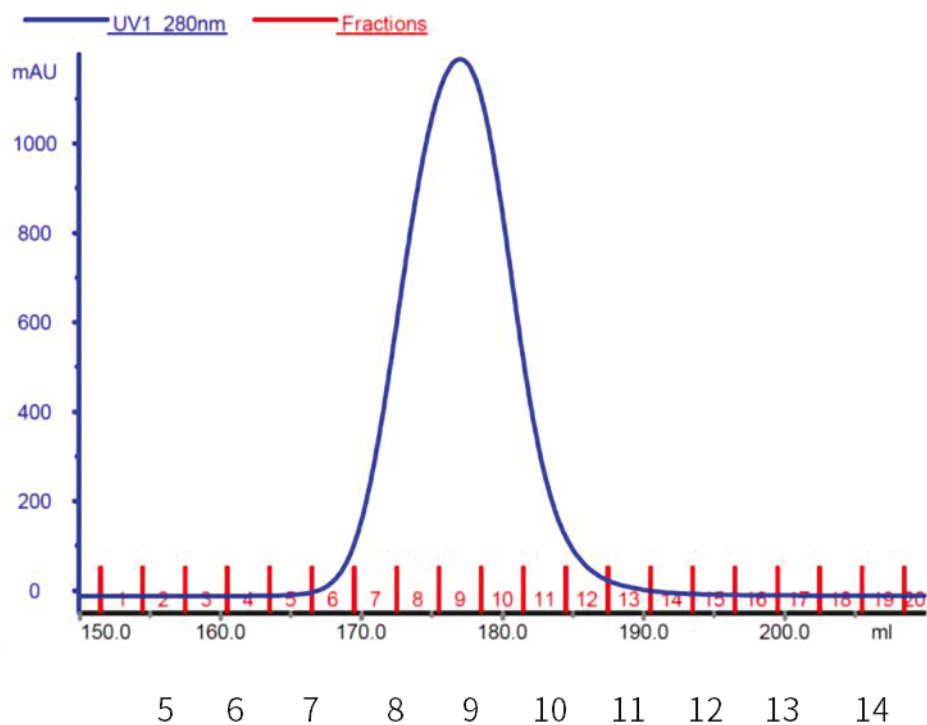


Figure 11 OspI C62S 変異体 ゲルろ過クロマトグラフィー

AKTA システムを用いたゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad Superdex75 26/600) 結果 (上) と、溶出画分 (5~14) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラムは横軸に溶出体積 (ml)、縦軸に波長 280nm 吸光度 (青) で表した。

Table 2 OspI 変異体 単独結晶構造解析に関する回折実験及び精密化統計値

	OspI C62S	OspI C65S	OspI C62A
<b>Data Collection</b>			
Space Group	$C222_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit-Cell(a,b,c Å)	68.4,92.0,68.1	68.1,67.3,85.0	67.5,67.9,85.0
Wave Length(Å)	0.9	0.9	0.9
Resolution(Å)	38.1-2.2(2.24-2.20)	50.0-2.8(2.85-2.80)	50.0-3.0(3.05-3.00)
Total Reflection	80257	103650	49143
Unique Reflection	11184	9945	8194
Completeness	99.9(100.0)	99.5(97.3)	99.9(100.0)
$R_{\text{merge}}$ (%)	9(24.5)	16.0(35.5)	16.0(29.4)
$I / \sigma$	14.3	7.1	12.5
Redundancy	7.2(7.4)	10.4(10.6)	6.0(5.7)
<b>Refinement Data</b>			
Resolution(Å)	38.1-2.2	84.9-2.8	53.0-3.0
Reflection	10572	9829	7750
Reflection of $R_{\text{free}}$	738	515	375
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	18.1/24.8	29.6/36.5	24.8/26.9
R.m.s.d. bond length(Å)	0.010	0.009	0.003
R.m.s.d. bond angle(°)	2.261	1.232	0.404
Residue(atom)	1492	2983	2983
Water molecules	111	—	—

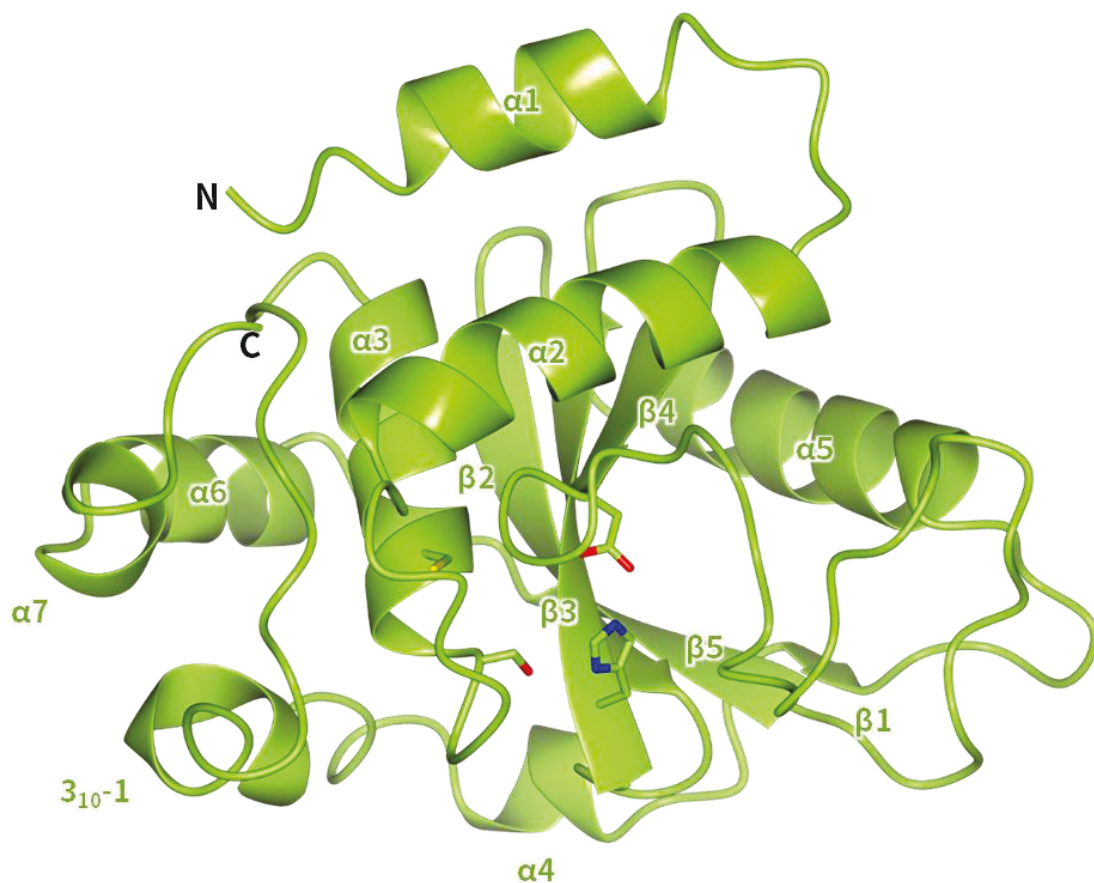


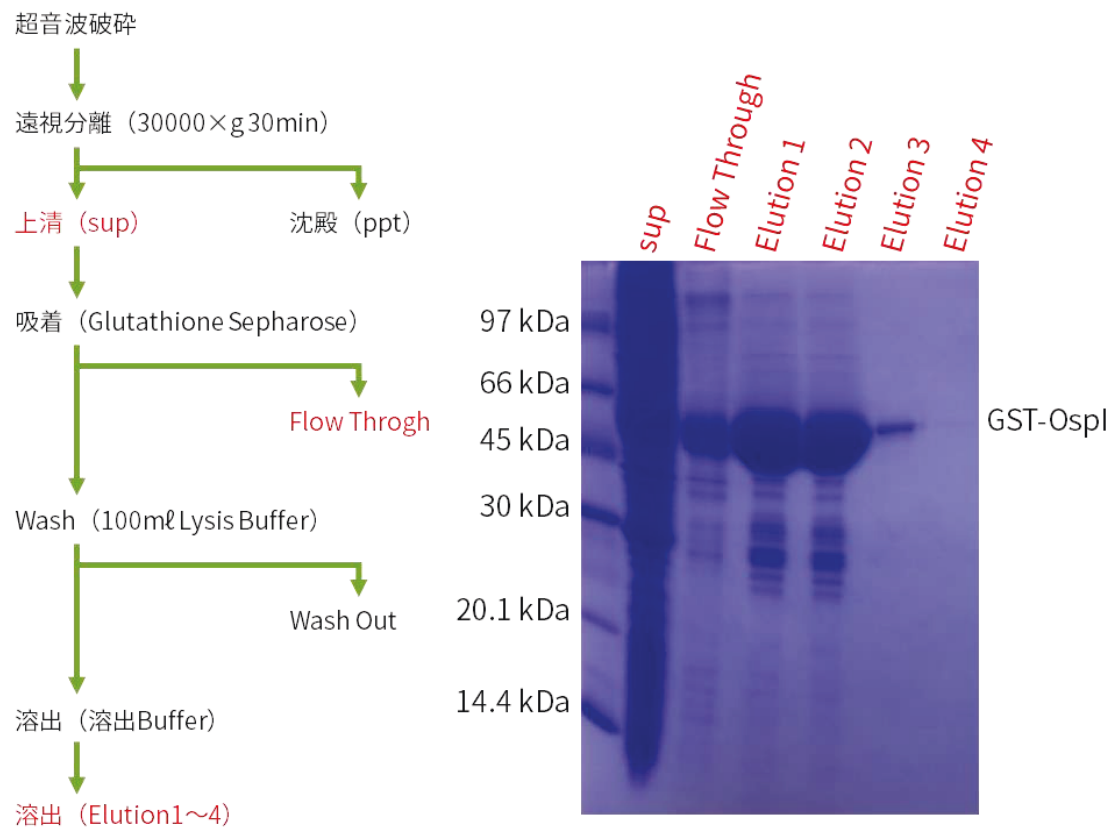
Figure 12 OspI C62S 変異体 全体構造

*Shigella flexneri* OspI C62S 変異体の全体構造をリボン図で表示した。結晶構造中の N 末端に “N”、C 末端に “C” と表示し、二次構造に関しては  $\alpha$  ヘリックスを “ $\alpha$ ”、 $\beta$  ストランドを “ $\beta$ ”、 $3_{10}$  ヘリックスを “ $3_{10}$ ” としてラベルした。二次構造のアサインは DSSP サーバーを利用した。

## 2. 4. OspI Cys62Ala 変異体単独結晶構造解析

OspI C62A 変異体も、OspI C62S 変異体同様に発現、精製した。GST タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーの結果、Elution 1~3 を次段精製試料とし、アフィニティータグを切断、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った (Figure 14)。ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出画分から、不純物の混入のすくない画分 7~11 を結晶化試料として、40.3mg/ml まで濃縮し、結晶化を行った (Figure 15)。結晶化条件は OspI C62S を参考に行い、0.2M Magnesium Acetate、0.1M Tris/HCl pH 6.5、25% (w/v) PEG8000 の条件で針状結晶が得られた (Figure 16)。針状多結晶は回折実験に不向きであることから、シーディングにより結晶の質の向上を図り、板状結晶を得たが、分解能は向上しなかった。

回折実験の結果、統計値を Table 2 に示す。OspI C62A の単独結晶構造を分解能 2.8 Å で決定した (Figure 17)。OspI C62A は野生型 OspI や C62S 変異体とは異なった晶系で得られた。C62A 変異体の 7 本の  $\alpha$  ヘリックスと 5 本の  $\beta$  ストランドで構成され、野生型 OspI とは異なり  $3_{10}$  ヘリックスが崩壊し、 $\alpha 4$  の伸長が観察された。



**Figure 13** OspI C62A 変異体 アフィニティークロマトグラフィー

OspI C62A 変異体のアフィニティークロマトグラフィーの工程フローチャート図 (左) とその SDS-PAGE 結果 (右)。OspI は大腸菌発現系を用いて、GST タグ融合タンパク質として発現し、GST タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、超音波破碎後の可溶化画分 (sup) と非吸着 Through 画分 (Flow Through)、溶出画分 (Elution1~4) を SDS-PAGE し、CBB 染色により検出した。

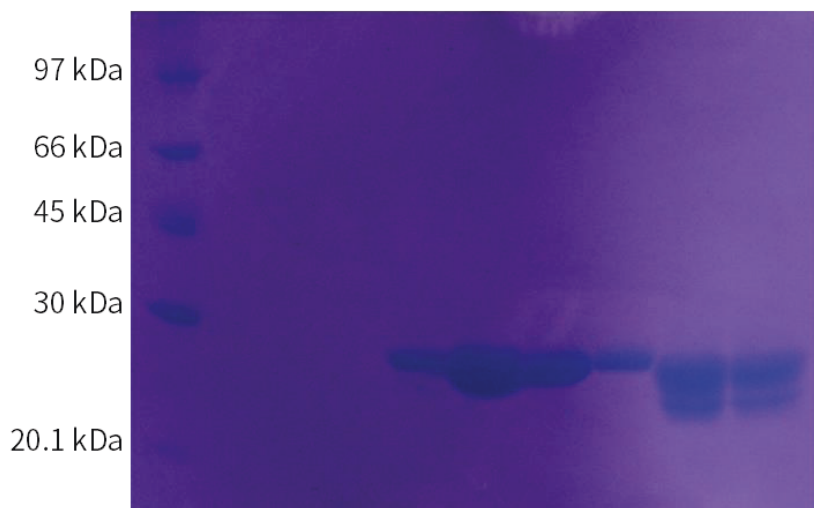
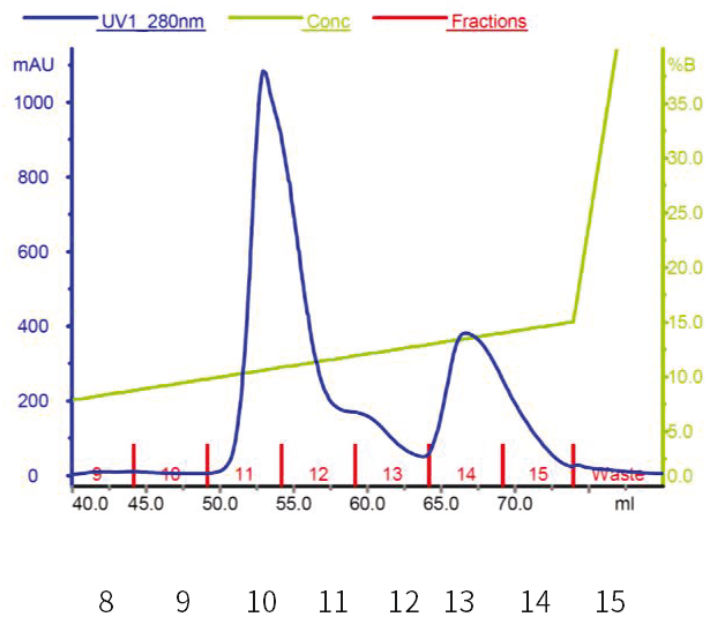


Figure 14 OspI C62A 変異体 陰イオン交換クロマトグラフィー

AKTA システムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap QFF 5mℓ) の結果  
 クロマトグラム (上) と、溶出画分 (8~15) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラム  
 は横軸に溶出体積 (mℓ)、縦軸に波長 280 nm 吸光度 (青) と、溶出 Buffer の塩濃度  
 (黄緑) を表した。吸光度は相対値 (AU) を、塩濃度勾配は A Buffer (0M NaCl TBS)  
 と B Buffer (2M NaCl TBS) の混合比率 (%) を表示している。



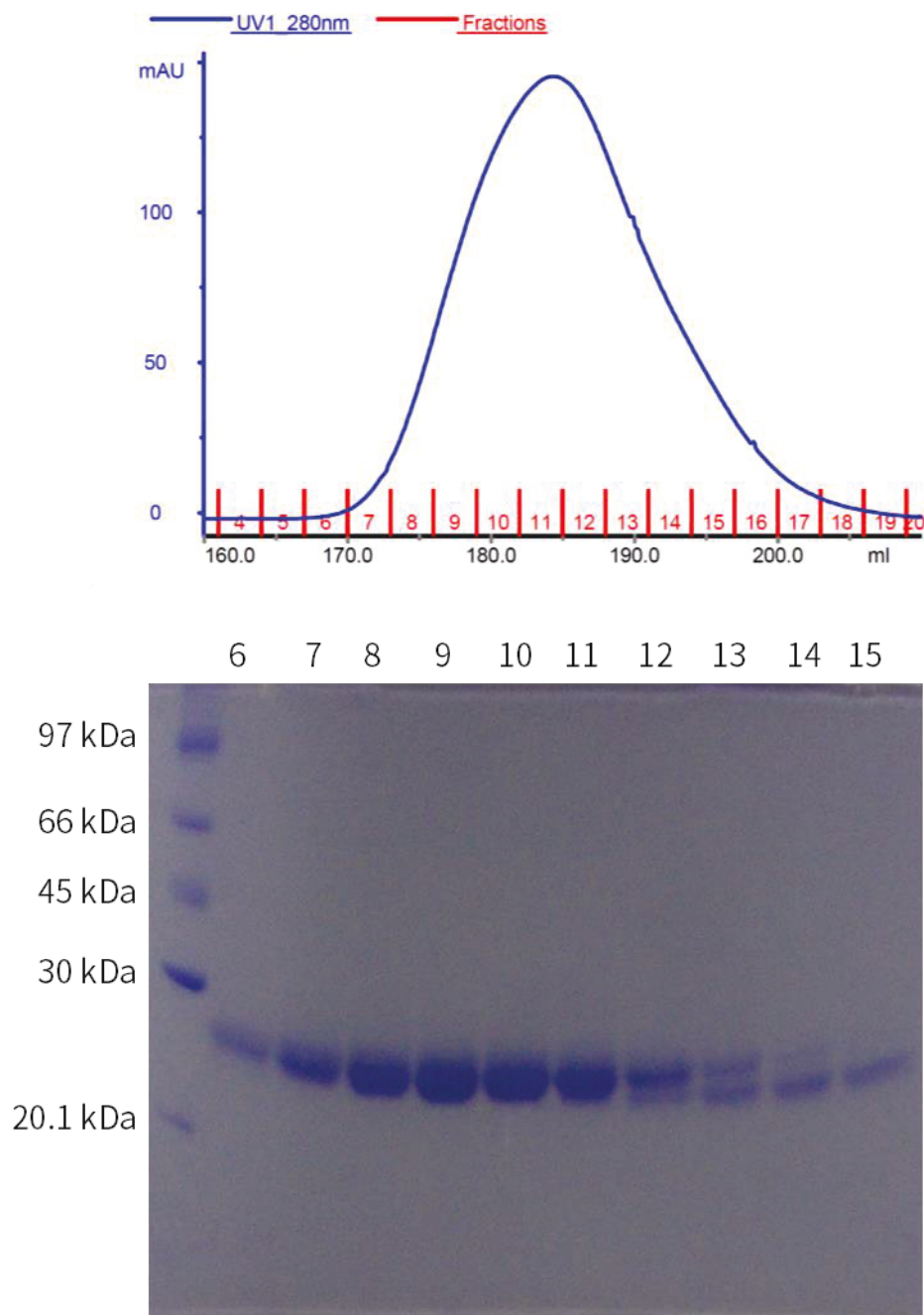


Figure 15 OspI C62A 変異体 ゲルろ過クロマトグラフィー

AKTA システムを用いたゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad Superdex75 26/600) 結果 (上) と、溶出画分 (6~15) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラムは横軸に溶出体積 (ml)、縦軸に波長 280nm 吸光度 (青) で表した。

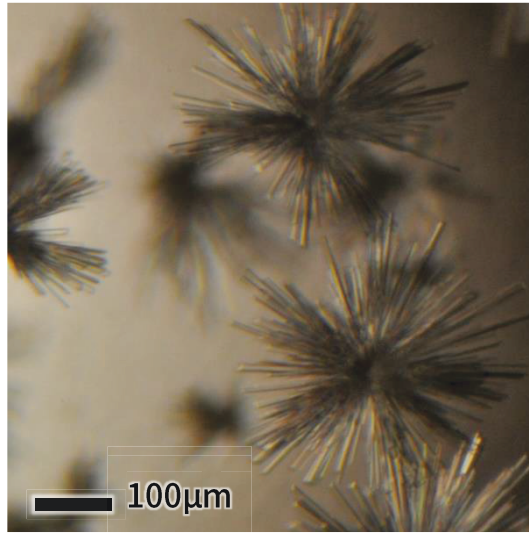


Figure 16 OspI C62A 変異体の結晶写真

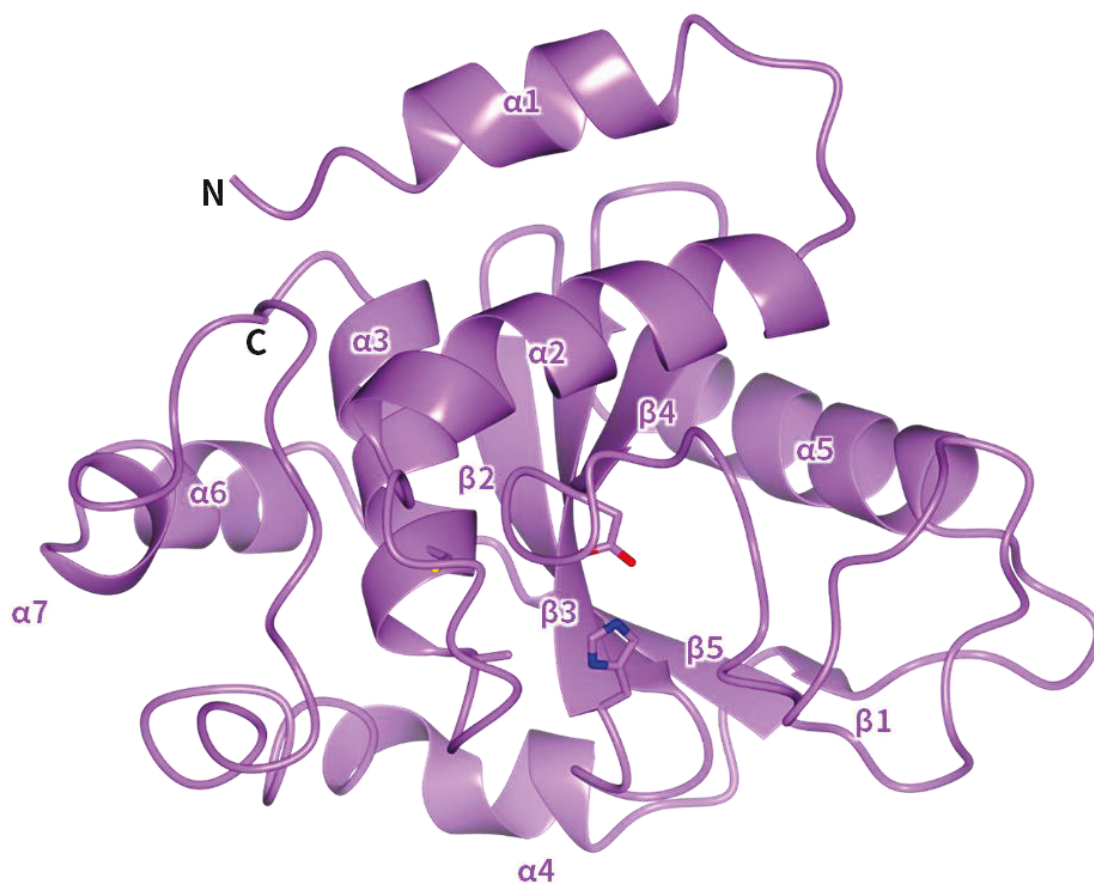


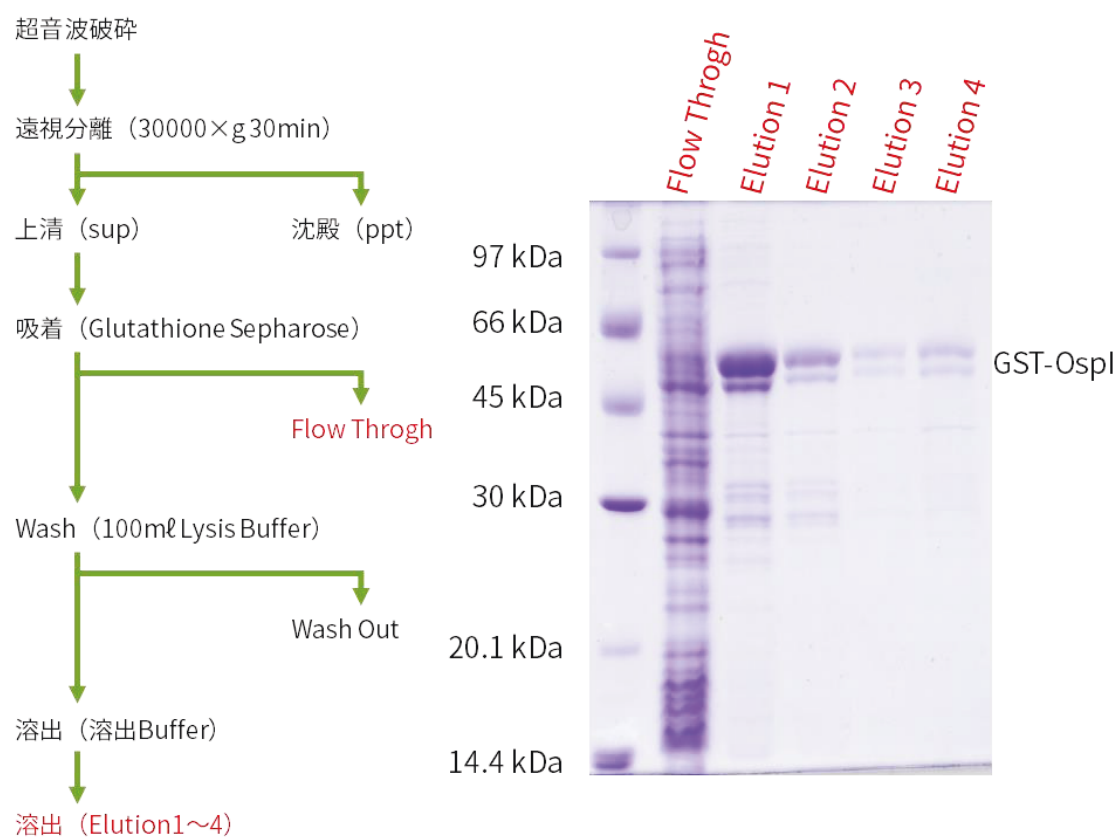
Figure 17 OspI C62A 変異体 全体構造

*Shigella flexneri* OspI C62A 変異体の全体構造をリボン図で表示した。結晶構造中の N 末端に “N”、C 末端に “C” と表示し、二次構造に関しては  $\alpha$  ヘリックスを “ $\alpha$ ”、 $\beta$  ストランドを “ $\beta$ ” としてラベルした。二次構造のアサインは DSSP サーバーを利用した。

## 2.5. OspI Cys65Ser 変異体単独結晶構造解析

実験方法に示した通りに発現、精製、結晶化を行った。OspI C65S 変異体は大腸菌発現系を用いて GST 融合タンパク質として発現、アフィニティークロマトグラフィーを行った (Figure 18)。OspI C65S 変異体は他の変異体と比較して収量が少なかった。溶出画分のうち GST-OspI C65S を含む、Elution 1、2 を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った (Figure 19)。これまでの他の変異体の精製と同様に、後半のピークに OspI が含まれると判断し、画分 11、12 をゲルろ過クロマトグラフィーに用いた。また、他の変異体と比べ、OspI C65S 変異体は、不純物を多く混入しているため、画分 6、7 のみを結晶化に用いた (Figure 20)。結晶化条件は OspI C62A 変異体と同様に OspI C62S 変異体の結晶化条件を参考に条件検討を行った。OspI C65S 変異体も他の変異体と同様に針状多結晶を生じ、マイクロシーディングを行ったが、結晶の形状や質に変化は見られなかった。最終的に、0.18M Magnesium Acetate、0.1M Tris/HCl pH 6.5、25% (w/v) PEG8000 で得られた結晶を回折実験に用いた (Figure 21)。

回折実験の統計値は Table 2 に示した。OspI C65S 変異体は OspI C62A 変異体と同系の  $P2_12_12_1$  晶系で得られ、分離能  $2.8\text{\AA}$  で結晶構造を決定した (Figure 22)。OspI C65S 変異体の結晶構造は、7本の  $\alpha$  ヘリックスと、6本の  $\beta$  ストランドから構成されていた。また、同系の結晶であった、OspI C62A 変異体と同様に、 $3_{10}$  ヘリックスは崩壊していたが、 $\alpha 4$  の伸長は見られなかった。更に、 $\beta 4$ -5 間に  $\beta$  ストランド ( $\beta 4.5$ ) が挿入されていた。



**Figure 18** OspI C65S 変異体 アフィニティークロマトグラフィー

OspI C65S 変異体のアフィニティークロマトグラフィーの工程フローチャート図 (左) とその SDS-PAGE 結果 (右)。OspI は大腸菌発現系を用いて、GST タグ融合タンパク質として発現し、GST タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、非吸着 Through 画分 (Flow Through) と溶出画分 (Elution1~4) を SDS-PAGE し、CBB 染色により検出した。分子量マーカーを参考に、GST-OspI C65S (約 49kDa) のアサインを行った。

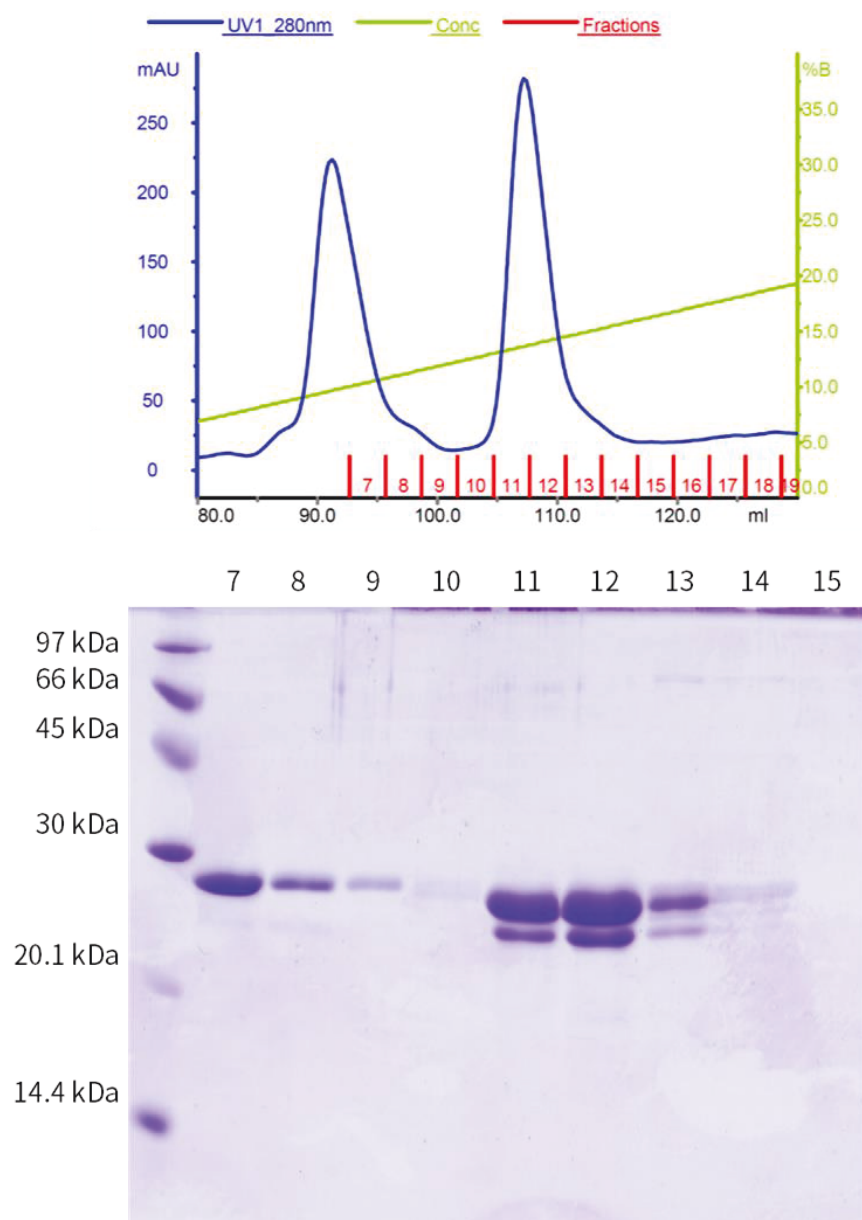


Figure 19 OspI C65S 変異体 陰イオン交換クロマトグラフィー

AKTA システムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap QFF 5mℓ) の結果  
 クロマトグラム (上) と、溶出画分 (8~15) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラム  
 は横軸に溶出体積 (mℓ)、縦軸に波長 280 nm 吸光度 (青) と、溶出 Buffer の塩濃度  
 (黄緑) を表した。吸光度は相対値 (AU) を、塩濃度勾配は A Buffer (0M NaCl TBS)  
 と B Buffer (2M NaCl TBS) の混合比率 (%) を表示している。

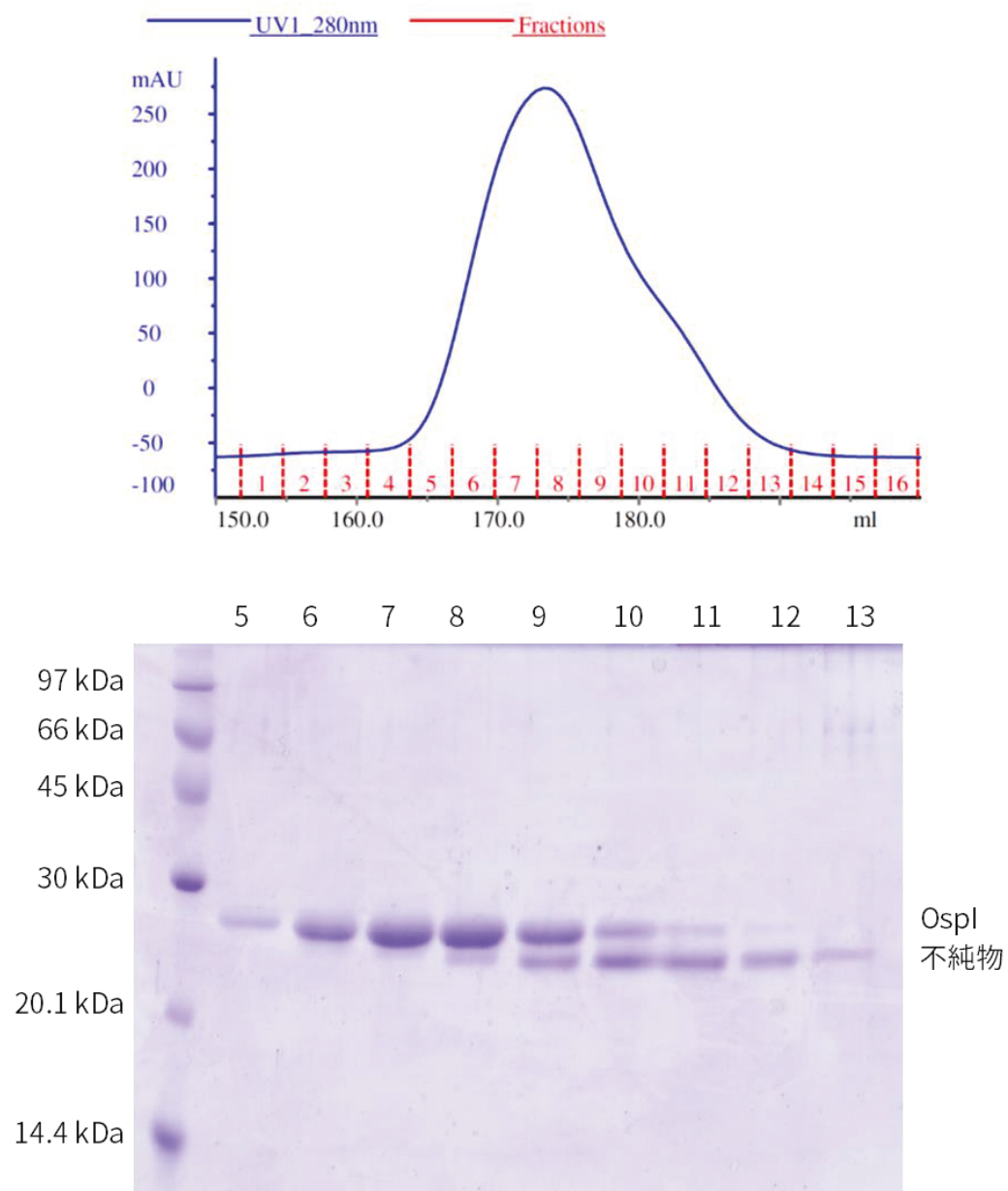


Figure 20 OspI C65S 変異体 ゲルろ過クロマトグラフィー

AKTA システムを用いたゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad Superdex75 26/600) 結果 (上) と、溶出画分 (5~13) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラムは横軸に溶出体積 (ml)、縦軸に波長 280nm 吸光度 (青) で表した。

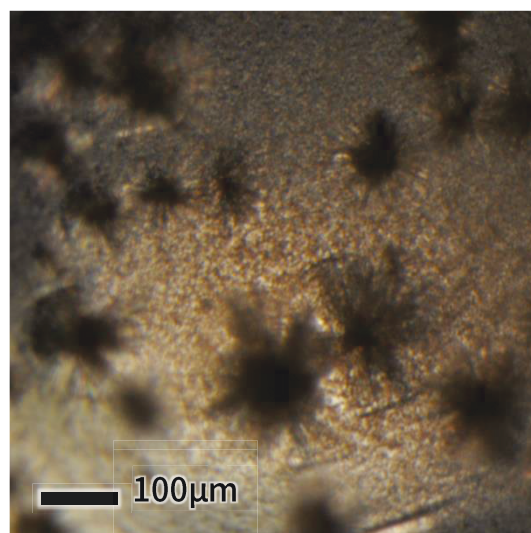


Figure 21 OspI C65S 変異体の結晶写真



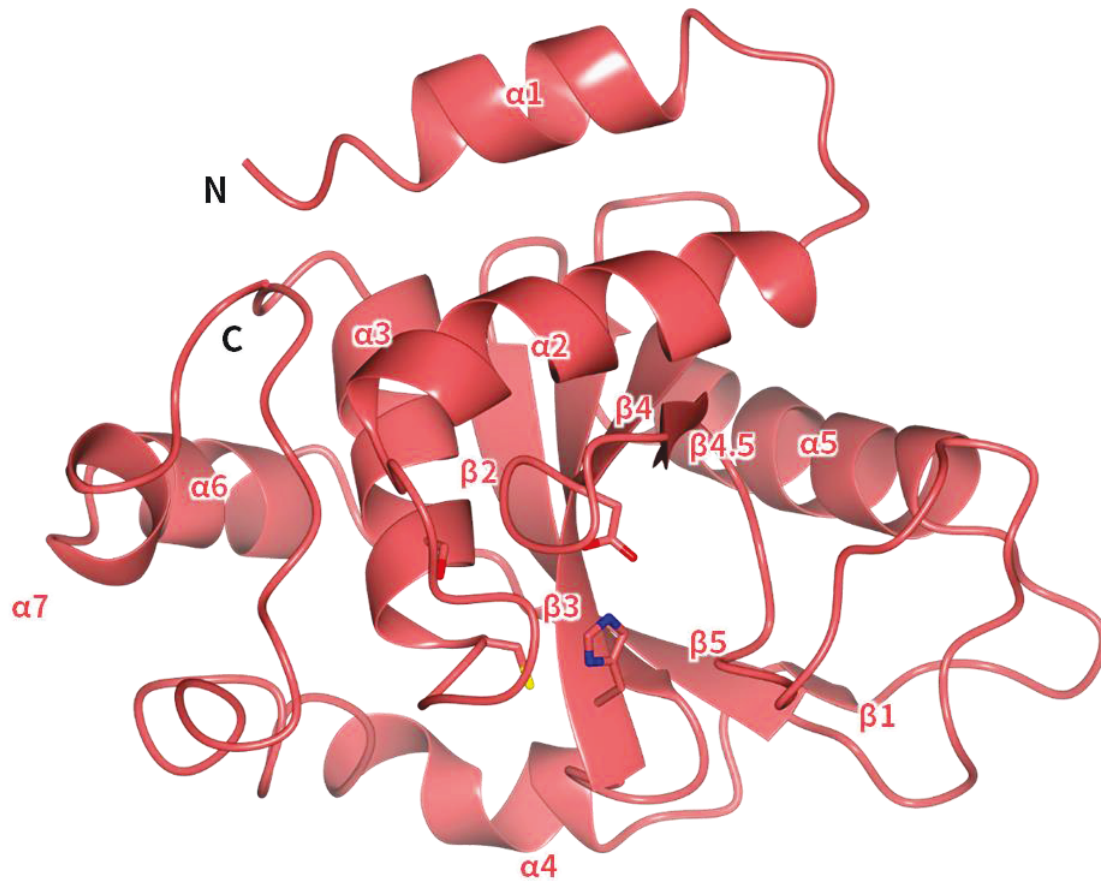


Figure 22 OspI C65S 変異体 全体構造

*Shigella flexneri* OspI C62A 変異体の全体構造をリボン図で表示した。結晶構造中の N 末端に“N”、C 末端に“C”と表示し、二次構造に関しては $\alpha$ ヘリックスを“ $\alpha$ ”、 $\beta$ ストランドを“ $\beta$ ”としてラベルした。二次構造のアサインは DSSP サーバーを利用した。

## 2.6. 考察

OspI 変異体と野生型の全体構造を比較したところ、WT との C $\alpha$  RMSD は (C62S : 0.30 Å、C62A : 0.36 Å、C65S : 0.49 Å) であり主鎖構造に大きな違いは見られなかった (Figure 23)。しかし、活性システインの位置する  $\alpha$ 3 直前のループ構造には違いが見られた。これは、変異による環境の変化であること、ループ周辺の温度因子が高いことからループ自身が非常に柔軟な構造であるためだと考えられる (Figure 24)。次に、OspI WT、C62S、C62A、C65S とシステインプロテアーゼ *Pseudomonas syringae* AvrPph の活性部位を比較した。その結果、全ての OspI 変異体で 62 番目のアミノ酸残基側鎖は Cys65 (Ser65) ではなく、His145 の方へ向いて、野生型とは異なった構造をとっていた (Figure 25)。この構造は、システインプロテアーゼである AvrPph の活性部位と類似の構造であることから、OspI がシステインプロテアーゼ様の活性部位を形成していると言える。つまり、OspI の Cys62 が、システインプロテアーゼのペプチド加水分解反応において、求核攻撃を行う触媒システイン残基の役割を果たしていることが示唆された。

システインプロテアーゼは、活性部位近傍にオキシアニオンホールと呼ばれる正電荷に帯びたポケットを形成することが知られている。オキシアニオンホールは、加水分解反応時に基質カルボニル酸素と水素結合を形成することで、四面体中間体を安定化し、システインプロテアーゼの高い活性を維持するために必須である。AvrPph では Asn96 主鎖アミド基と、Asn93 側鎖  $\delta$  位アミド基から構成されるオキシアニオンホールが存在する [36]。そこで、OspI と AvrPph の活性部位構造を比較したところ、AvrPph の Asn96、Asn93 それぞれに対して OspI では Gly60、Asn162 が存在し、これらのアミノ酸残基によりオキシアニオンホールを形成していることが示唆された (Figure 26)。さらに、OspI Q162A 変異体を作製し、脱アミド化活性測定実験を行うことにより、Asn162 がオキシアニオンホールとして機能しているかを検証した (※脱アミド化実験の手法に関しては 3 章で記述する)。その結果、Q162A 変異体は、野生型と比較して低い活性を示した。この

ことから、OspI では Gln162 がオキシアニオンホールを形成し、システインプロテアーゼ様の反応機構により加水分解活性を示していると考えられる。つまり、OspI の脱アミド化反応では、OspI が Ubc13 を認識した酵素基質中間体を形成し、OspI Cys62  $\gamma$  位硫黄による Ubc13 Gln100  $\delta$  位炭素への攻撃により OspI と Ubc13 がチオエステル結合した四面中間体となる、その後、アミノ基がアンモニウムイオンとして脱離したアミノアシル中間体が形成される。最終的に、遊離水分子がアミノアシル中間体中のチオエステル結合へと求核攻撃することにより、Ubc13 Glu100 が OspI Cys62 から脱離することで脱アミド化反応は完了する。

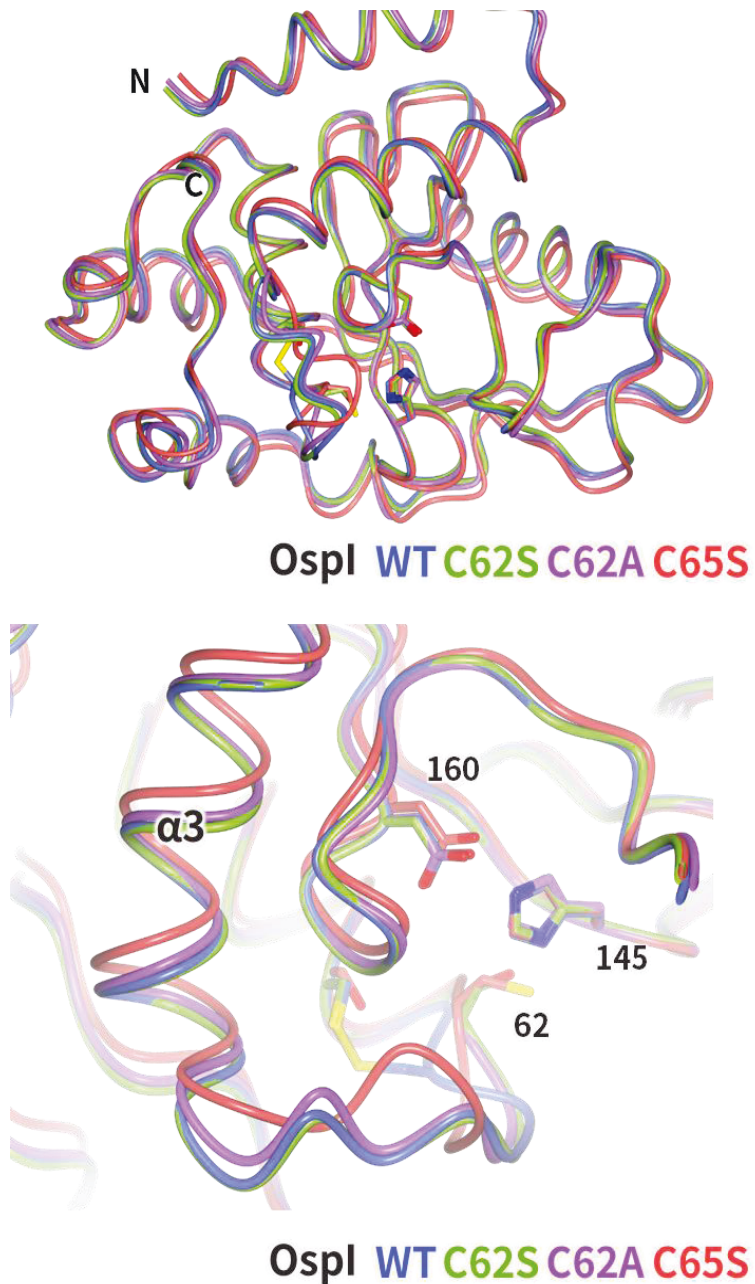


Figure 23 OspI 主鎖構造の比較

主鎖構造比較結果、全体の主鎖構造比較（上）、活性部位周辺の主鎖構造の比較（下）。主鎖をライン、活性残基側鎖をスティックで表した。下図では活性残基番号と $\alpha 3$ をアサインした。OspI WT に対するそれぞれの C $\alpha$ 間の R.M.S.D.は C62S : 0.30 Å、C65S : 0.49 Å、C62A : 0.36 Å。

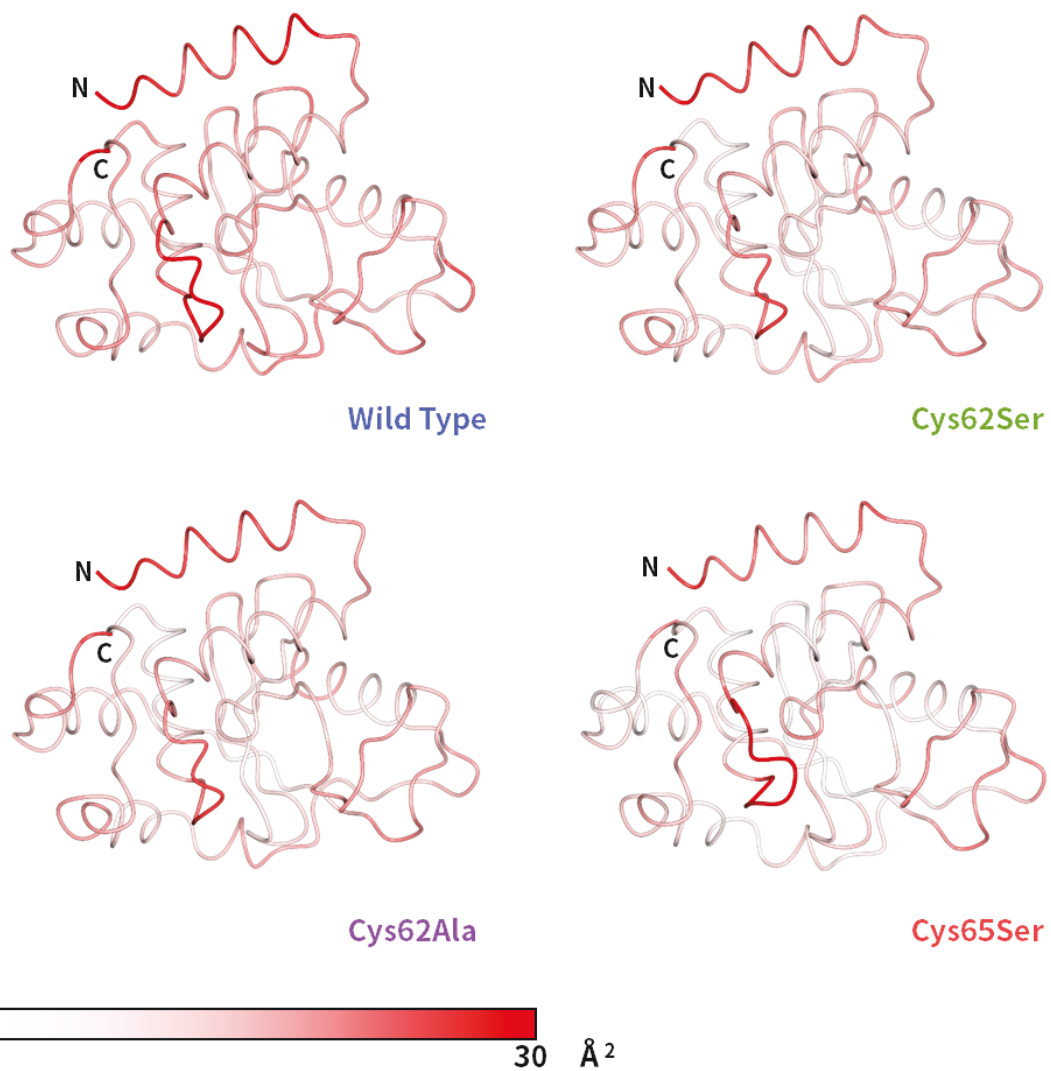


Figure 24 OspI の温度因子の比較

OspI WT、C62S、C62A、C65S の主鎖をライン図で表し、温度因子の高い部分を赤色で示した。N 末端  $\alpha 1$  と、活性部位直前の  $\alpha 3-4$  ループの温度因子が高い。

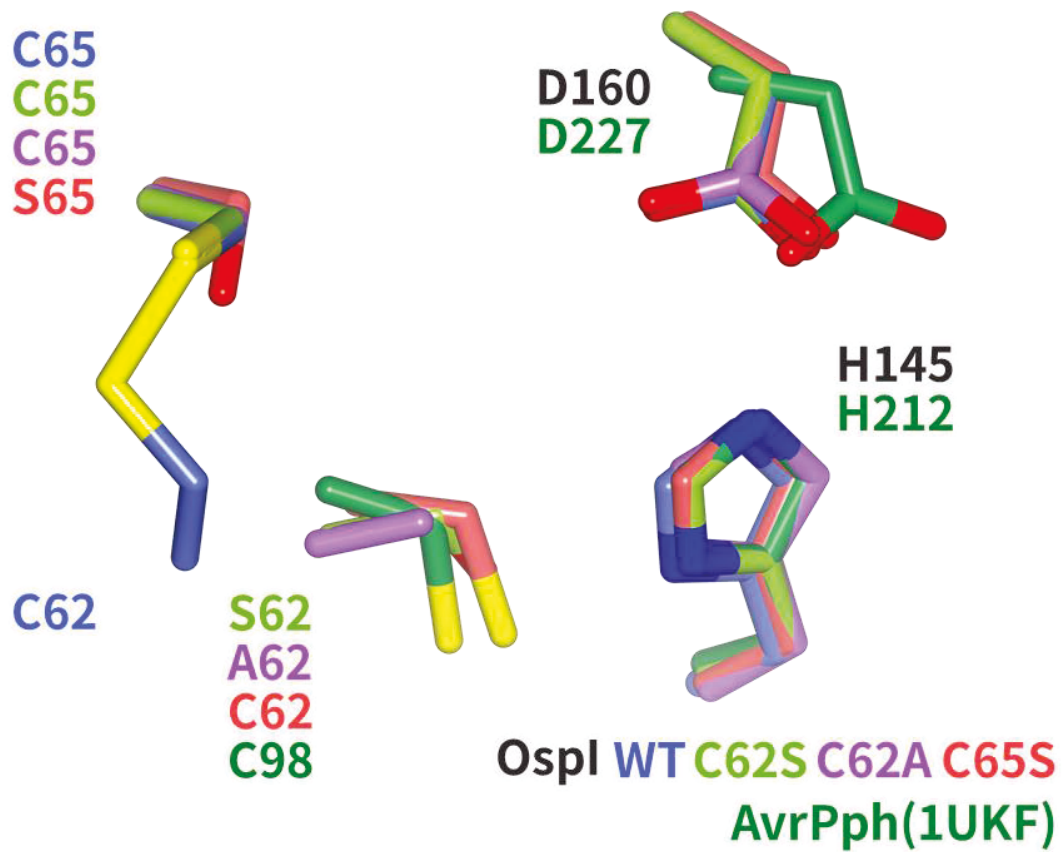
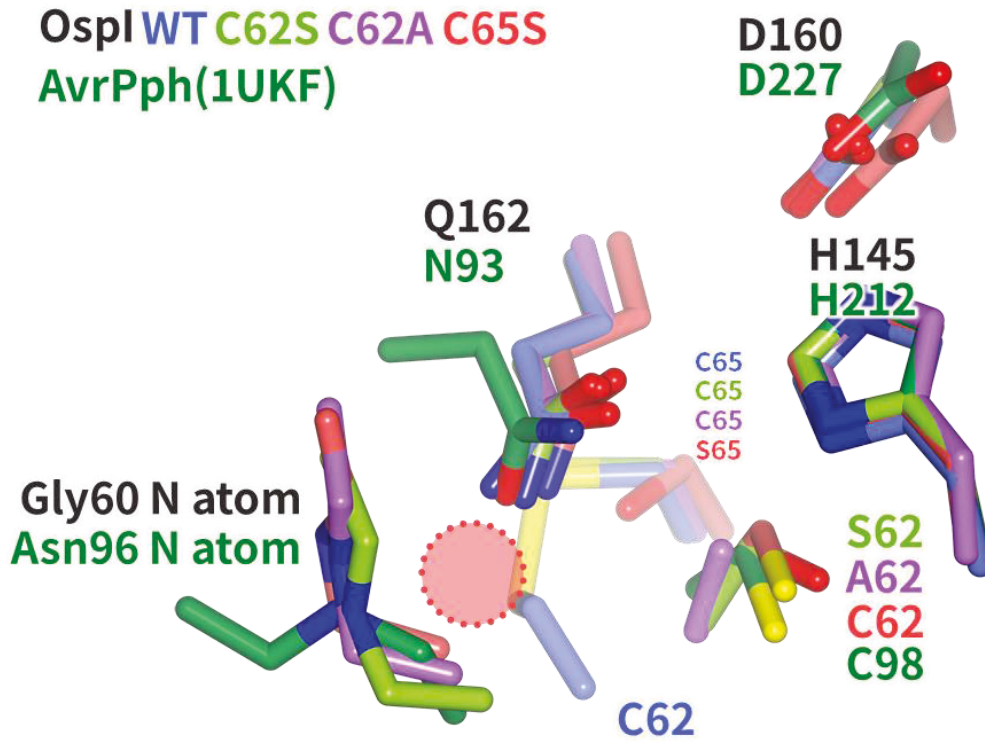


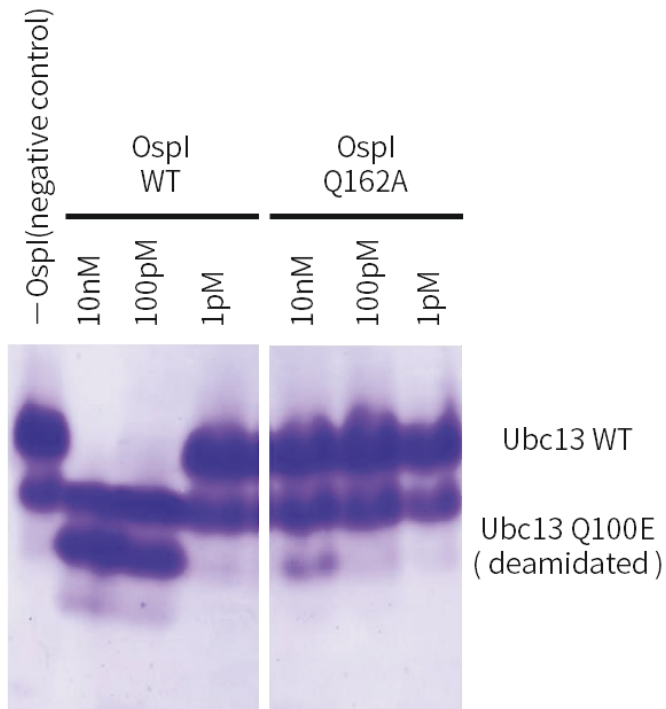
Figure 25 OspI 活性部位の比較

OspI WT、C62S、C62A、C65S と AvrPph の活性部位構造を比較した。OspI の活性残基（62、145、160）とジスルフィド結合を形成する 65 番、AvrPph の触媒三残基（98、212、217）を示した。

A



B



## Figure 26 OspI のオキシアニオンホール

A) OspI WT、C62S、C62A、C65S と AvrPph のオキシアニオンホールを形成するアミノ酸残基と活性残基をスティック図で表した。OspI は Gly60 主鎖アミド基、Gln162 側鎖  $\epsilon$  位のアミド基により、AvrPph は Asn96 主鎖アミド基、Asn93 側鎖  $\delta$  位のアミド基によりオキシアニオンホールを形成していることが示唆された。AvrPph Asn93 側鎖  $\delta$  位アミド基は、OspI Gln162 側鎖  $\epsilon$  位のアミド基と比較して、オキシアニオンホールに対して反対の構造で決定されているが、反応時は同様に側鎖アミド基がオキシアニオンホールの形成に寄与すると考えられる。

B) OspI Q162A 変異体の Native-PAGE 法を用いた OspI Q162A 変異体活性測定。OspI による基質 Ubc13 の脱アミド化修飾は Native-PAGE での電気泳動度の差異で検出可能である。10 $\mu$ g の Ubc13 に対して、図中に示した終濃度で OspI を加え、30 度 10 分間反応させた後 Native-PAGE を行った。OspI Q162A 変異体では negative control に対して電気泳動度の差はない。つまり、脱アミド化反応は進んでおらず活性が低下したことが示された。



## 第3章 OspI 変異体-Ubc13 複合体結晶構造解析

### 3.1. 目的

OspI の基質として E2 酵素 Ubc13 が既に同定されているが、その認識機構は明らかではない。そこで、OspI と Ubc13 の複合体結晶構造解析を行い、OspI の基質認識機構およびその阻害機構の解明を目的とする。

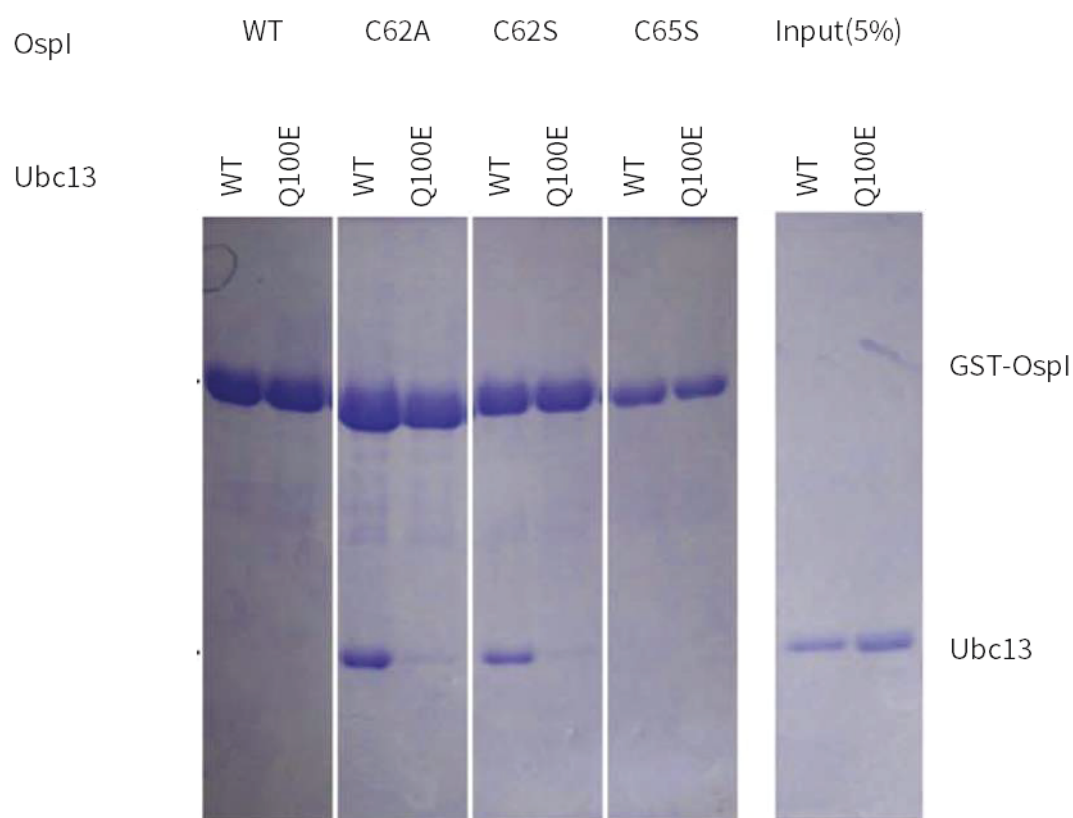


Figure 27 GST-OspI プルダウン実験

GST-OspI を用いたプルダウン実験結果。基質である Ubc13 の野生型 (WT) と、脱アミド化修飾を受けた Ubc13 と同等の Ubc13 Q100E 変異体の、GST-OspI (WT、C62A、C62S、C65S) に対する結合親和性をプルダウン実験により評価した。

## 3. 2. 方法

### 3. 2. 1. Ubc13 精製

野生型および変異体 *Homo sapiens* Ubc13 は pET-28b ベクターを用いた His×6 タグ融合タンパク質として大腸菌 (DE3 BL21) を用いて発現した。培養には LB 培地に終濃度 20mg/ℓ になるようにカナマイシンを加え、OspI と同様に前培養、本培養、誘導、集菌を行った。

1 回の精製に菌体 6g 分を用いた。菌体 6g 分に対して 60mℓ の Lysis Buffer を加え凍結菌体を懸濁したのちに、超音波破碎機を用いて破碎した。大腸菌破碎液を 30000×g 30 分で遠心分離を行い、上清を可溶化画分として精製した。可溶画分は次に His×6 タグを用いて Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) によるアフィニティークロマトグラフィーを行った。オープンカラムを用いて、3ℓ 分の可溶化画分に対して、5mℓ のビーズを用いて、5 回繰り返し流すことにより吸着操作を行った。100mℓ の Lysis Buffer で洗浄後、Elution Buffer (300mM imidazole、200mM NaCl、20mM Tris/HCl pH 7.5) を 5mℓ ずつ加え融合タンパク質を溶出した。SDS-PAGE により、融合タンパク質を含む画分へ Thrombin protease を加え 20℃ 20 時間処理することで、アフィニータグを切断し、脱塩 Buffer へ透析した。Ubc13 はアフィニータグの切断および、脱塩によって白色沈殿を多く生じるため、透析後の試料は 30000×g 30 分で遠心分離を行い、上清画分を次の精製に使用した。次に AKTA 高速液体クロマトグラフィーシステムを利用して、OspI 同様に HiTrap QFF 5mℓ カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、HiLoad Superdex75 26/600 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行い、精製純度の向上を図った。ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出画分を SDS-PAGE により評価し、Ubc13 を含む画分を最終標品とした。



Figure 28 OspI 精製フローチャート

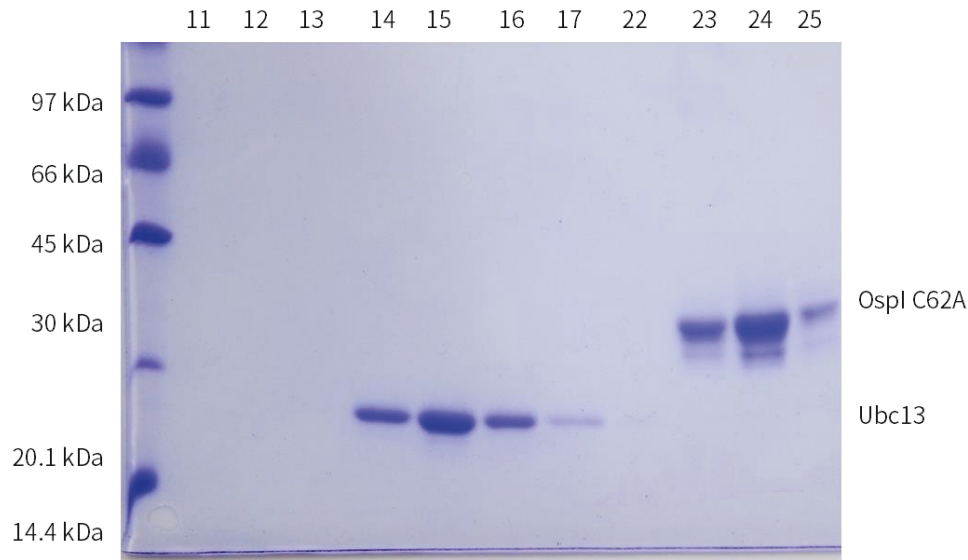
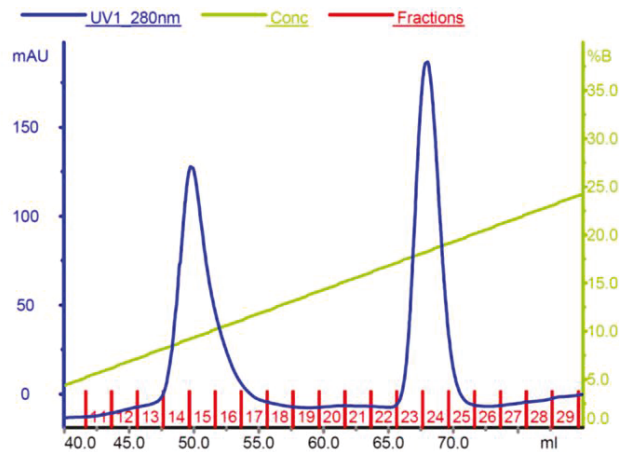
OspI-Ubc13 複合体の精製法をフローチャート図に表した。

### 3. 2. 2. OspI-Ubc13 複合体形成条件の検討および精製、結晶化

GST-OspI を用いた GST プルダウン実験により、Ubc13 と結合し、安定な複合体を形成する条件の検討を行った (Figure 27)。野生型 OspI および C65S 変異体では、Ubc13 との結合がみられず、活性残基変異体である C62A、C62S 変異体でのみ結合が確認された。また、全ての OspI で、脱アミド化生成物と同等の Ubc13 Q100E 変異体の結合は見られなかった。このことから、複合体の調製には OspI C62A、C62S を使用した。

OspI 変異体および Ubc13 はゲルろ過クロマトグラフィー後の試料を複合体の調製に用いた。OspI に対してモル比で 1 : 1 以上になるように Ubc13 を加え、複合体を調製した。OspI-Ubc13 複合体は、陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことで、複合体が解離し、それぞれ別々に溶出されたため、陰イオン交換カラムを用いた精製はできない

(Figure 28)。よって、複合体の精製には HiLoad Superdex75 26/600 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行い、SDS-PAGE で複合体が形成されている画分を、結晶化 Buffer へ透析した。透析後の試料を、Amicon Ultra 30k (Millipore) を用いて濃縮し、OspI 同様にシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化条件のスクリーニングを行い、ハンギングドロップ蒸気拡散法で条件検討を行った。



**Figure 29** OspI C62A-Ubc13 陰イオン交換クロマトグラフィー

AKTA システムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap QFF 5m $\ell$ ) の結果  
 クロマトグラム (上) と、溶出画分 (11~17、22~25) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロ  
 マトグラムは横軸に溶出体積 (m $\ell$ )、縦軸に波長 280 nm 吸光度 (青) と、溶出 Buffer  
 の塩濃度 (黄緑) を表した。吸光度は相対値 (AU) を、塩濃度勾配は A Buffer (0M  
 NaCl TBS) と B Buffer (2M NaCl TBS) の混合比率 (%) を表示している。

### 3. 3. OspI Cys62Ala-Ubc13 複合体結晶構造解析

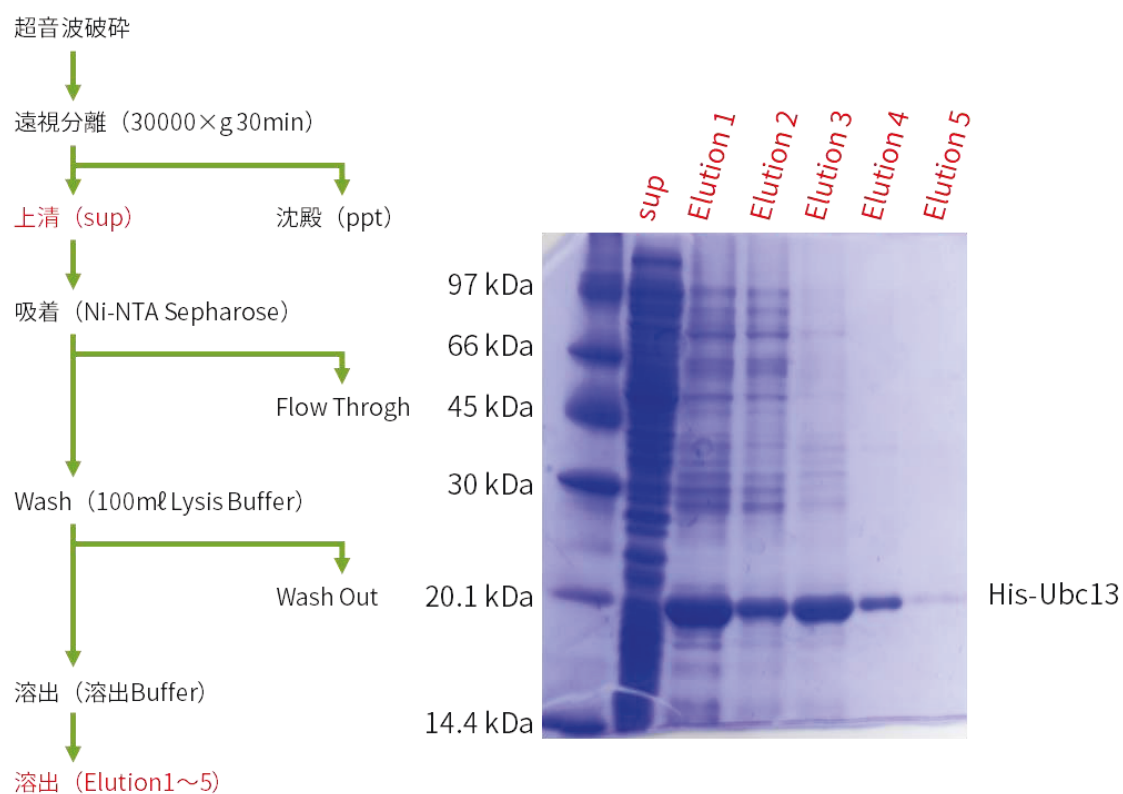
Ubc13は大腸菌発現系を用いて、His×6 タグ融合タンパク質として発現し、Ni-NTA Sepharose を利用してアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った (Figure 30)。溶出画分の SDS-PAGE の結果、Elution 1~4 へ Thrombin protease を加え His×6 タグを切断した。実験方法に示した通り、His×6 タグの切断および脱塩透析により白濁沈殿を生じるため、遠心分離を行ったのち、この上清画分を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った (Figure 31)。SDS-PAGE の結果、低い塩濃度で溶出された画分が Ubc13 であることが示され、画分 12~15 を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、Ubc13 はシングルピークを示し、SDS-PAGE の結果をもとに画分 4~6 を複合体の調製に用いた (Figure 32)。

OspI C62A に対してモル比で 1 : 1 以上になるように Ubc13 を加えたものを試料として、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った (Figure 33)。溶出画分の SDS-PAGE の結果から、複合体を形成している画分 14~18 を結晶化試料として、透析、濃縮した。結晶化条件スクリーニングは 33mg/ml まで濃縮した試料で HAMPTON Protein Complex Suite を用いてスクリーニングを行った。その結果 0.2M Potassium Iodate、0.1M M-4-morpholinoethanesulfonic (MES) pH 6.5、25% PEG4000 の条件と 0.1M Tris pH 8、1.2M Sodium/Potassium tartrate の条件で結晶が得られた (Figure 34)。次に結晶の質の改善を目指してハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて、塩、緩衝液、沈殿剤濃度の条件検討を行った。しかし、同一試料、同一の結晶化溶液で結晶化を行った場合でも、結晶を生じず球状の非晶質を生じる場合が見られた (Figure 34)。この現象は、精製後時間の経過した試料に顕著であったことから、試料中の還元剤が結晶化に影響していると考えられた。そこで、結晶化溶液中に DTT を添加し、結晶化を行った。その結果、0.4M Potassium Iodate、0.1M MES pH 6.5、15% PEG8000、4mM DTT の条件で結晶が得

られた (Figure 34)。この結晶を用いて、SPring-8 BL44-XU にて X 線回折実験を行った (Table 3)。

OspI C62A-Ubc13 複合体結晶は、OspI C62A 変異体単独構造と、既に報告されていた単独状態の Ubc13 (PDB ID : 1JBB) の構造を用いて、Phenix Phaser [37] [38]を用いた分子置換法により位相決定を行い、Crystal NMR System Refine、Composite omit map [39] [40]を用いて精密化、電子密度図作製を行い、CCP4 Refmac を用いて結晶構造中に存在するヨウ素分子の精密化を行った。

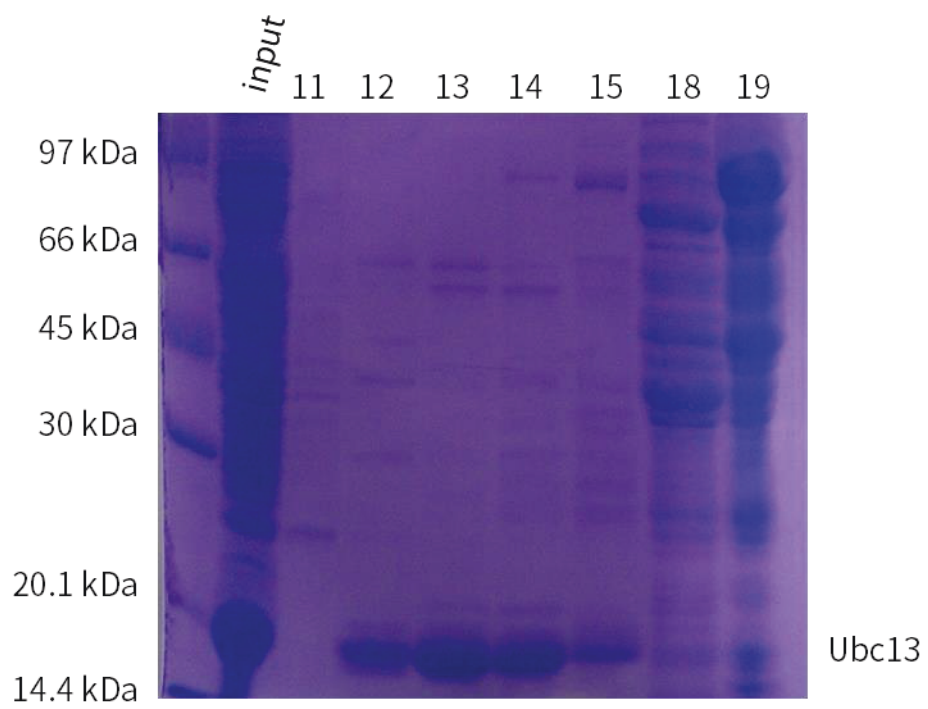
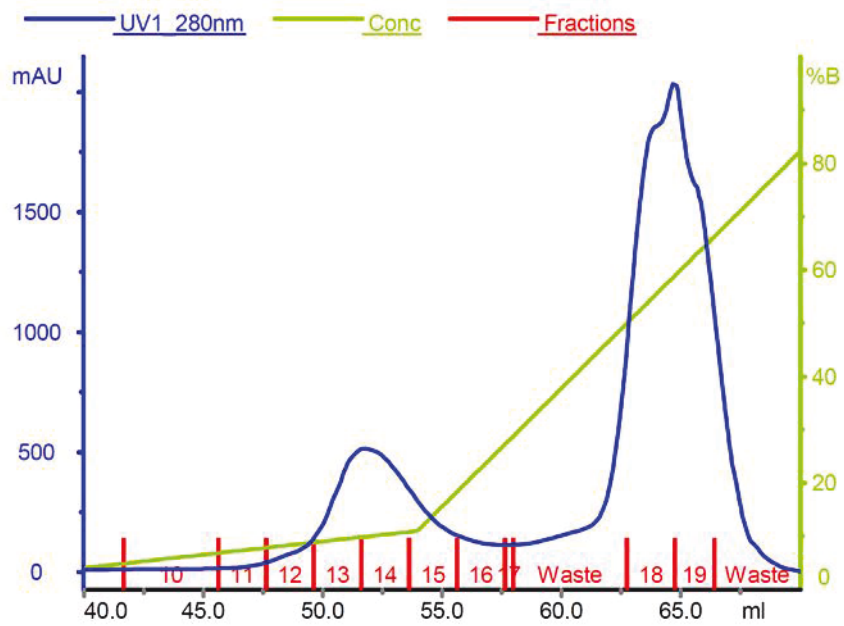
構造解析の結果 OspI C62A-Ubc13 複合体結晶構造を、分解能 3.0 Å で決定した (Figure 35)。複合体中の OspI C62A 変異体は  $\alpha$  1~7 の 7 本の  $\alpha$  ヘリックスと、 $\beta$  1~5 の 5 本の  $\beta$  ストランドから構成され、 $3_{10}$  ヘリックスは含まれなかった。Ubc13 は  $\alpha$  1~4 の 4 本の  $\alpha$  ヘリックスと、 $\beta$  1~6 の 6 本の  $\beta$  ストランドから構成されていた。結晶構造中で OspI は基質残基である Gln100 を含む表面と結合しており、Ubc13 の活性残基である Cys87 の位置する分子表面との間に相互作用は見られなかった。



**Figure 30 Ubc13 アフィニティークロマトグラフィー**

Ubc13のアフィニティークロマトグラフィーの工程フローチャート図（左）とその SDS-PAGE 結果（右）。Ubc13 は、大腸菌発現系を用いて、His×6 タグ融合タンパク質として発現し、His×6 タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、超音波破碎後の可溶化画分（sup）と、溶出画分（Elution1～5）を SDS-PAGE し、CBB 染色により検出した。分子量マーカーを参考に、20.1 kDa のバンドが His×6-Ubc13（約 2kDa+約 17kDa）であると判断した。





### Figure 31 Ubc13 陰イオン交換クロマトグラフィー

AKTA システムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap QFF 5mℓ) の結果  
クロマトグラム (上) と、溶出画分 (11~15、18、19) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロ  
マトグラムは横軸に溶出体積 (mℓ)、縦軸に波長 280 nm 吸光度 (青) と、溶出 Buffer  
の塩濃度 (黄緑) を表した。吸光度は相対値 (AU) を、塩濃度勾配は A Buffer (0M  
NaCl TBS) と B Buffer (2M NaCl TBS) の混合比率 (%) を表示している。分子量マー  
カーを参考に、14~20.1kDa にあるバンドが Ubc13 (約 17 kDa) であると判断した。

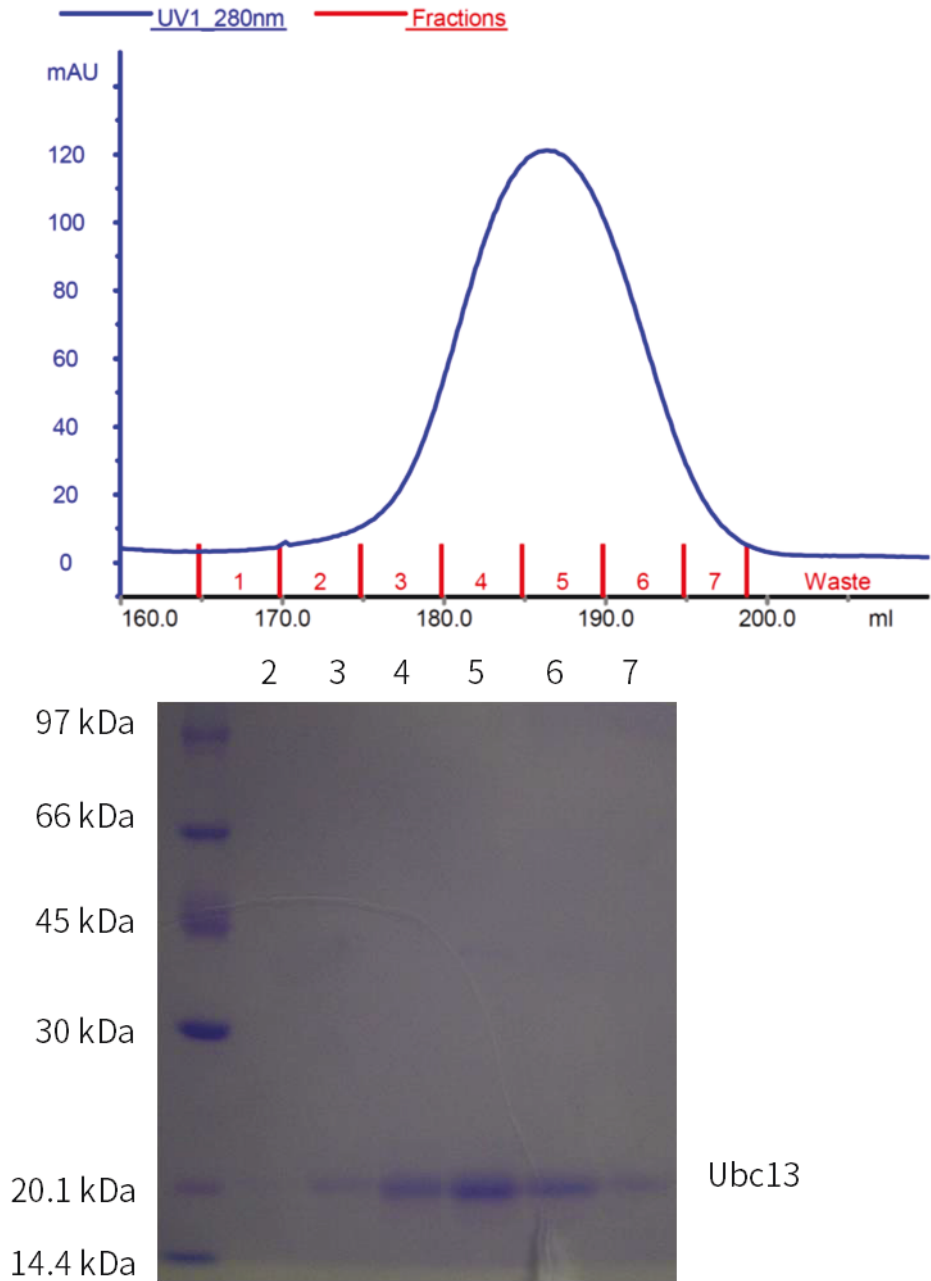


Figure 32 Ubc13 ゲルろ過クロマトグラフィー

AKTA システムを用いたゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad Superdex75 26/600) 結果 (上) と、溶出画分 (2~7) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラムは横軸に溶出体積 (ml)、縦軸に波長 280nm 吸光度 (青) で表した。分子量マーカーを参考に、14~20.1kDa にあるバンドが Ubc13 (約 17 kDa) であると判断した。

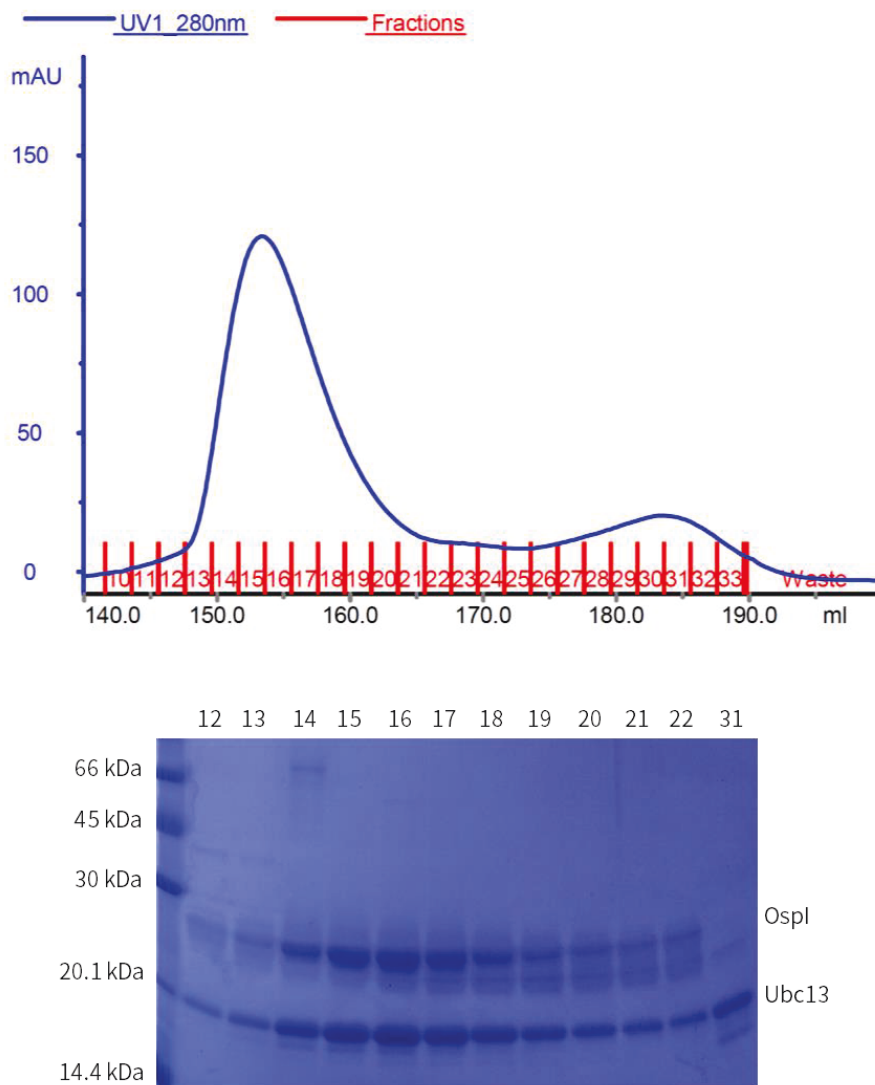
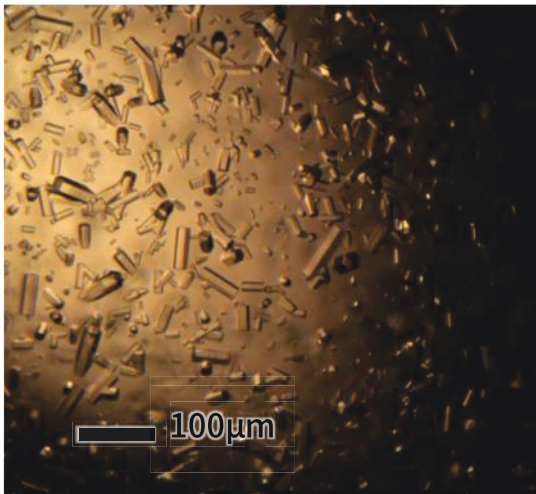
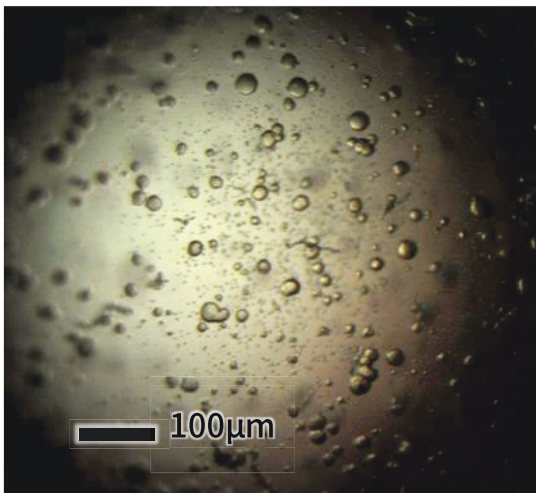


Figure 33 OspI C62A-Ubc13 複合体ゲルろ過クロマトグラフィー

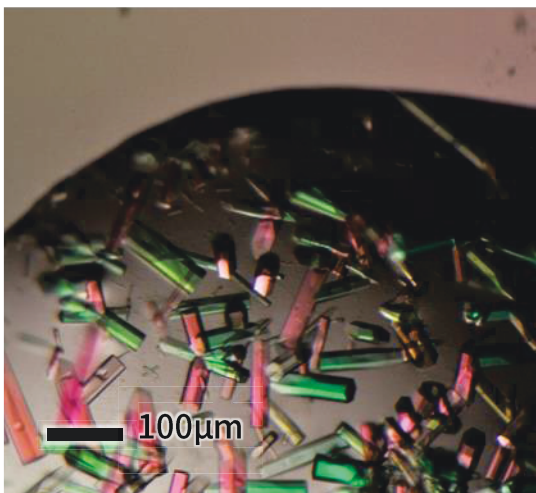
AKTA システムを用いたゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad Superdex75 26/600) 結果 (上) と、溶出画分 (12~22、31) の SDS-PAGE 結果 (下)。クロマトグラムは横軸に溶出体積 (ml)、縦軸に波長 280nm 吸光度 (青) で表した。分子量マーカーを参考に、14~20.1kDa にあるバンドが Ubc13 (約 17 kDa)、20.1~30 kD にあるバンドが OspI (約 23kDa) であると判断した。



33mg/ml  
0.2M Potassium iodate  
0.1M MES pH6.5  
25%(w/v) PEG4000



40mg/ml  
0.4M Potassium iodate  
0.1M MES pH6.5  
14%(w/v) PEG8000



40mg/ml  
0.4M Potassium iodate  
0.1M MES pH6.5  
14%(w/v) PEG8000  
4mM DTT

Figure 34 OspI C62A-Ubc13 複合体結晶写真

ファーストスクリーニング時（上）、条件検討時（中）、DTT 添加時（下）。全て、偏光板を使用して撮影を行った。

Table 3 OspI-Ubc13 複合体 結晶構造解析に関する回折実験及び

精密化統計値		
	OspI C62A-Ubc13	OspI C62S-Ubc13
<i>Data Collection</i>		
Space Groupe	$P32_1$	$P4_32_1$
Unit-Cell(a,b,c Å)	119.2,119.2,70.0	109.8,109.8,264.6
Wave Length	0.9	0.9
Resolution(Å)	50.0-3.0(3.00-2.96)	50.0-3.0(3.05-2.997)
Total Reflection	56970	59760
Unique Reflection	12193	21544
Completeness	99.8(100.0)	99.5(100.0)
$R_{\text{merge}}$	9.4(30.0)	7.7(43.0)
$I/\sigma$	13.3	23.76
Redundancy	3.4(3.5)	2.8(2.9)
<i>Refinement Data</i>		
Resolution(Å)	33.14-2.96	46.62-3.00
Reflection	12150	31539
Reflection of $R_{\text{free}}$	1251	1679
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	24.5/28.6	21.4/28.1
R.m.s.d. bond length	0.009	0.011
R.m.s.d. bond angle	1.381	1.267
Residue(atom)	2699	10796
Water molecules	0	0
Others(Iodine)	4	

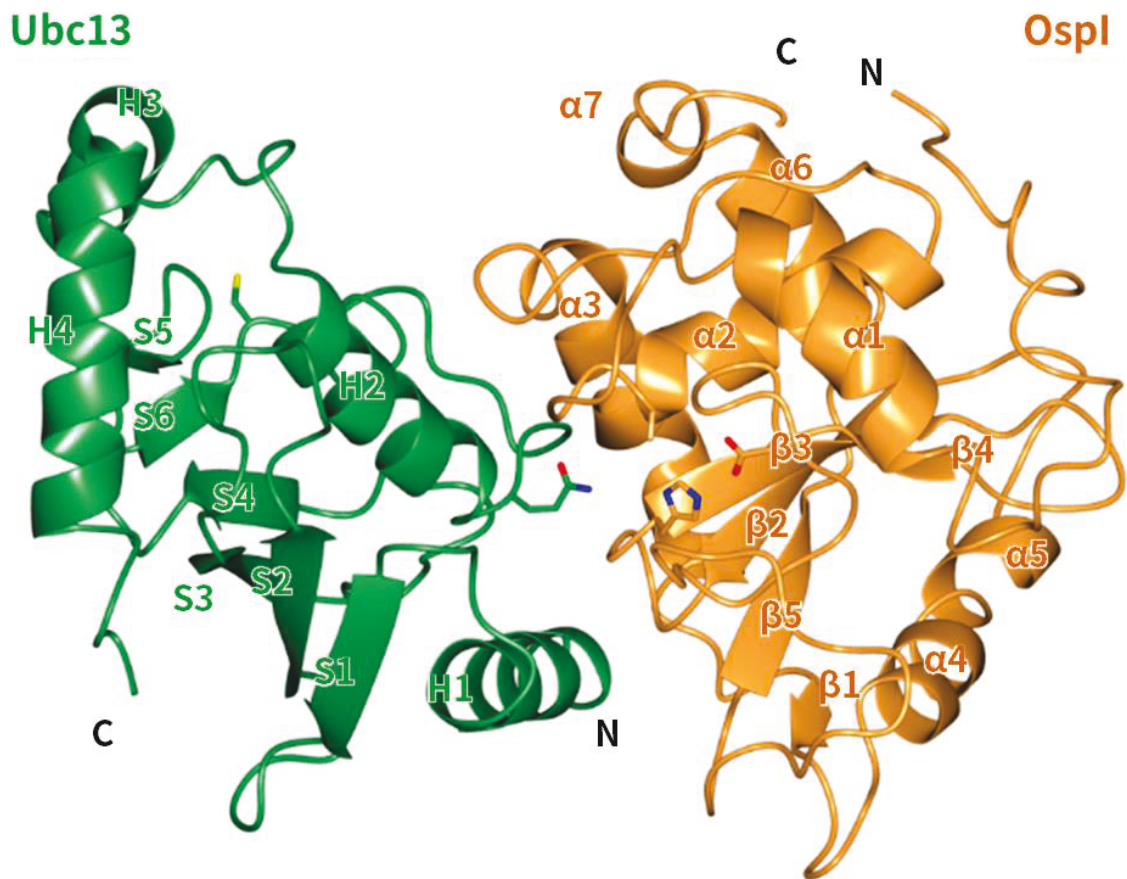


Figure 35 OspI C62A-Ubc13 複合体全体構造

OspI C62A-Ubc13 複合体全体構造。OspI C62A（オレンジ）、Ubc13（緑）で、リボン図で示した。活性残基である OspI A62、H145、D160 と基質部位である Ubc13 Q100 の側鎖はスティックで表した。OspI の二次構造は  $\alpha$  ヘリックスを “ $\alpha 1 \sim 7$ ”、 $\beta$  ストランドを “ $\beta 1 \sim 5$ ” で、Ubc13 は  $\alpha$  ヘリックスを “H1~4” で、 $\beta$  ストランドを “S1~6” で示した。

### 3. 4. OspI Cys62Ser-Ubc13 複合体結晶構造解析

OspI C62A-Ubc13 複合体と同様にして調製し、HiLoad Superdex75 26/600 ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、複合体を含む画分を結晶化試料として結晶化に用いた。OspI C62A-Ubc13 複合体の結晶化条件をもとに、ハンギングドロップ蒸気拡散法で、塩に Potassium Iodate、緩衝剤に MES pH 6.5、沈殿剤に PEG8000 を用い条件検討を行ったが、分解能の高い回折像を得ることはできなかった。また、シッティングドロップ蒸気拡散法を用い、HAMPTON PEG/ION Screen I、II、QIAGEN JCSG Core Suite III による結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、PEG/ION Screen I の 0.2M Potassium Nitrate、20% PEG3350 の条件で結晶が得られ、それを用いて構造解析を行った。

OspI C62S-Ubc13 複合体結晶は、OspI C62A-Ubc13 をモデルとして用いた分子置換法では有意な解が得られなかったため、個別に OspI C62S 変異体と Ubc13 (PDB ID : 1JBB) をモデルとして用いて、分子置換法による解析を行った。CCP4 refmac5 を用いて先に OspI C62S のみの条件で解を導出した。しかしながら、 $R/R_{free}$  より得られた結果は有意なものでなかったことから、決定された 2~5 分子の OspI の解析結果を用いて CCP4 refmac5 で実際に電子密度を作製し、モデルと電子密度の一致を確認した。その結果、OspI 3 分子までは電子密度に沿ったモデルが存在したため、これを Input fix model として固定し、Ubc13 (PDBID : 1JBB) をサーチモデルとして Phenix Phaser を用いて分子置換法を行い。精密化は PHENIX refine [41]を用いて行った。

構造解析の結果、OspI C62S-Ubc13 複合体結晶構造を分解能 3.0Å で決定した (Figure 36)。OspI C62S-Ubc13 は非対称単位中に 4 分子の OspI と、4 分子の Ubc13 を含んでいた。OspI には 1 分子の OspI と 2 分子の Ubc13 が接触しており、2 分子のうち一方が、OspI C62A-Ubc13 複合体と同様の様式で複合体を形成していた (Figure 37)。



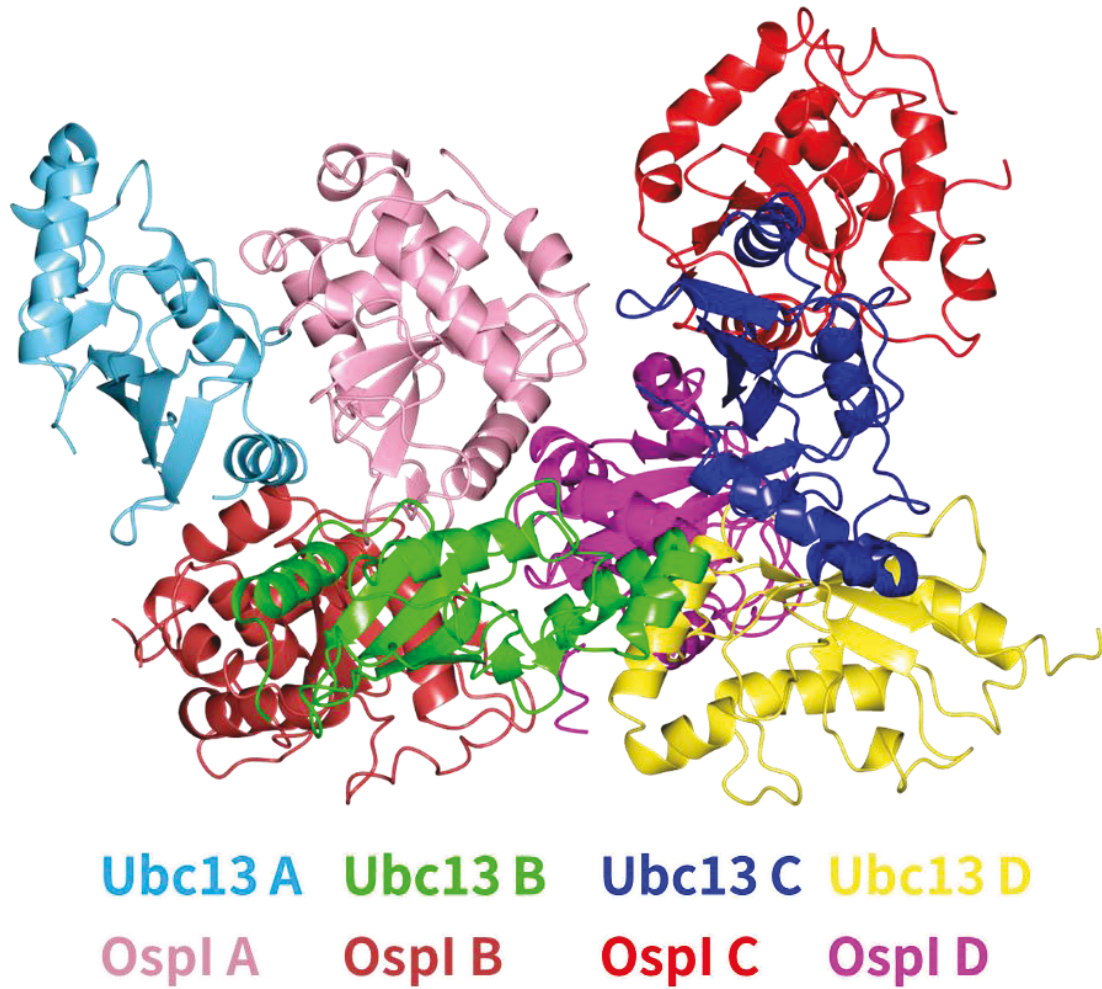


Figure 36 OspI C62S-Ubc13 複合体の非対称単位中の全分子

OspI C62S-Ubc13 複合体の非対称分子を示した。それぞれ、タンパク質名の後ろのアルファベットごとに、非対称分子内または対象分子間で OspI C62A-Ubc13 で見られた様式で複合体を形成していた。

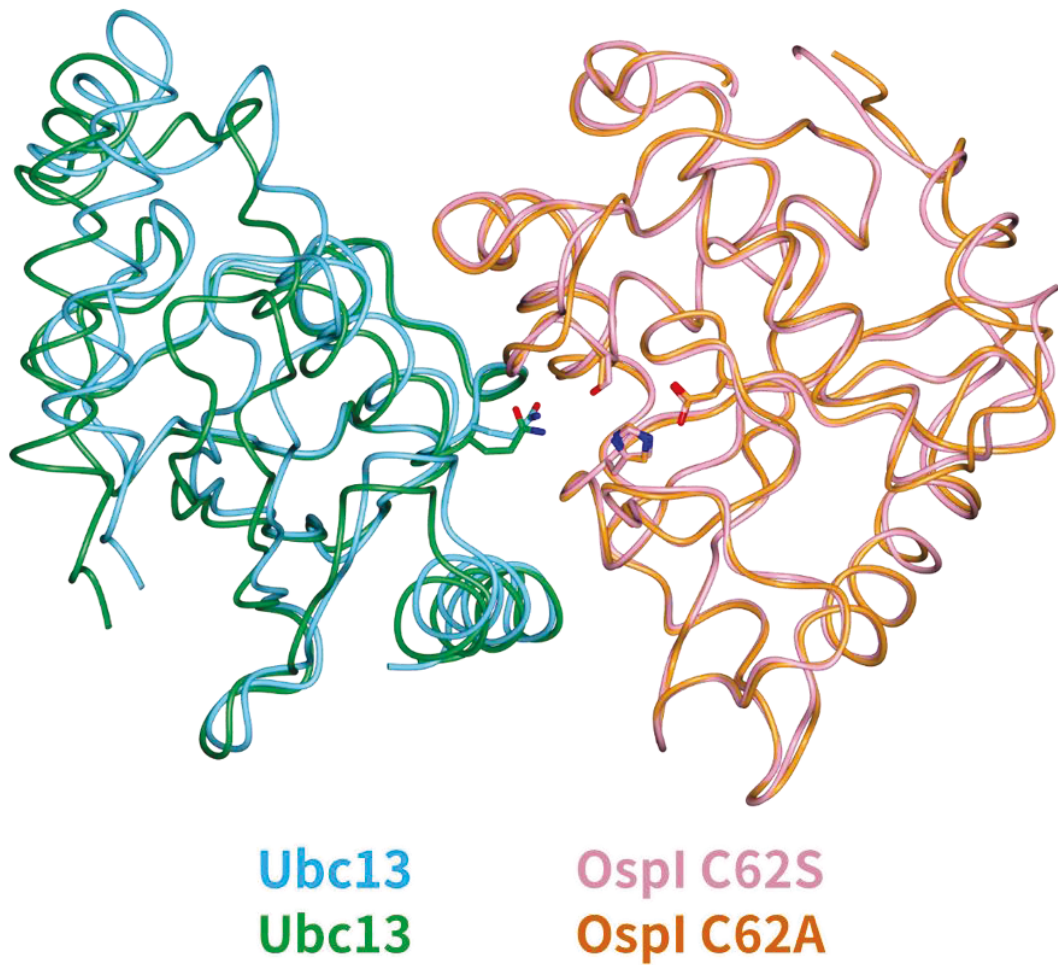


Figure 37 複合体全体構造の比較

OspI C62A-Ubc13 複合体と OspI C62S-Ubc13 複合体との構造比較。全体をライン図で表示し、活性残基（S62/A62、H145、D160）と基質部位 Ubc13（Q100）の側鎖構造をスティック図で表した。

### 3.5. 考察

複合体結晶構造解析の結果、OspI C62A-Ubc13 複合体構造中では1種類、OspI C62S-Ubc13 複合体ではOspI C62A-Ubc13 複合体で確認された相互作用様式の他に、もう一種の相互作用様式が見られた (Figure 38)。新たに確認された相互作用では、OspI はUbc13 のS1、S2-3 ループから構成される表面を認識しており、Ubc13 の触媒 Cys87、脱アミド化修飾をうける Gln100 のどちらもこの相互作用表面には含まれない。また、相互作用面積に関しても、Gln100 を含む表面による相互作用 ( $1024\text{\AA}^2$ ) と比較して、 $408\text{\AA}^2$  と小さかった [42]。このことから、OspI C62S-Ubc13 複合体中で新たに確認された相互作用様式は脱アミド化反応には関与しないと考えられるため、以降は、OspI C62A-Ubc13、OspI C62S-Ubc13 複合体の両者で見られた複合体構造を脱アミド化反応における中間体複合体として扱う。

2章で述べたようにOspIによるUbc13の脱アミド化反応中には複数の中間体が存在すると考えられる。中間体複合体結晶構造中のUbc13 Gln100は、OspIの活性部位の近傍に位置していたが、Ala62またはSer62とは4~6 Å離れており、OspI-Ubc13間に共有結合性の結合は観察されなかった。(Figure 39)。したがって、決定した複合体構造は、脱アミド化反応において加水分解反応が開始する直前の酵素基質中間体と等価であると考えられる。

OspI-Ubc13 中間体複合体において、OspIはUbc13のN末端H1、S3-4ループ、S6-H2ループから構成される表面を認識しており、脱アミド化修飾を受けるUbc13 Gln100はS6-H2ループに存在する (Figure 35)。この表面はUbc13がユビキチンとチオエステル結合中間体の形成に用いる触媒Cys87と独立した領域である。このことは、OspIによるUbc13のGln100への脱アミド化修飾はUbc13自身のチオエステル転移反応には影響しないという報告を裏付けている。

次に、OspI と Ubc13 の相互作用表面を検証したところ、結晶構造中で OspI は Ubc13 を相補的な電荷による相互作用と、疎水性相互作用 2 種類の相互作用により認識していることが明らかになった (Figure 40)。この相互作用表面は、OspI の Asp59、Gly60、Ser63、Ile87、Thr92、Phe95、Asp103、Glu141、Gln142、Ala143、Thr144、Tyr170、Asn184 とそれに対応する。Ubc13 の Gly3、Leu4、Arg6、Arg7、Arg14、Met64、Ser96、Pro97、Ala98、Leu99、Gln100、Thr103、Leu106 のアミノ酸残基から構成されていた (Figure 41)。OspI が認識する、Ubc13 正電荷表面は主に N 末端 H1 の Arg6、Arg7、Arg14 といった正電荷アミノ酸により構成され、疎水性表面は S3-4 ループの Met64、S6-H2 ループの Pro96、Leu99 を中心に構成されていた。

次に、既に立体構造が報告されている TRAF6-Ubc13 複合体結晶構造との比較を行い、阻害機構を考察した (Figure 42)。TRAF6 は OspI と同様の表面を介して相互作用しており、S3-4 ループ、S6-H2 ループから形成される疎水性表面が E3 ユビキチンリガーゼとの相互作用に重要であることが示唆されていた [43]。そのため、OspI により Ubc13 の Gln100 がグルタミン酸へと修飾されることで、Ubc13 と TRAF6 の相互作用に影響し、その結果 TRAF6 の自己ユビキチン化が阻害されていると考えられる。

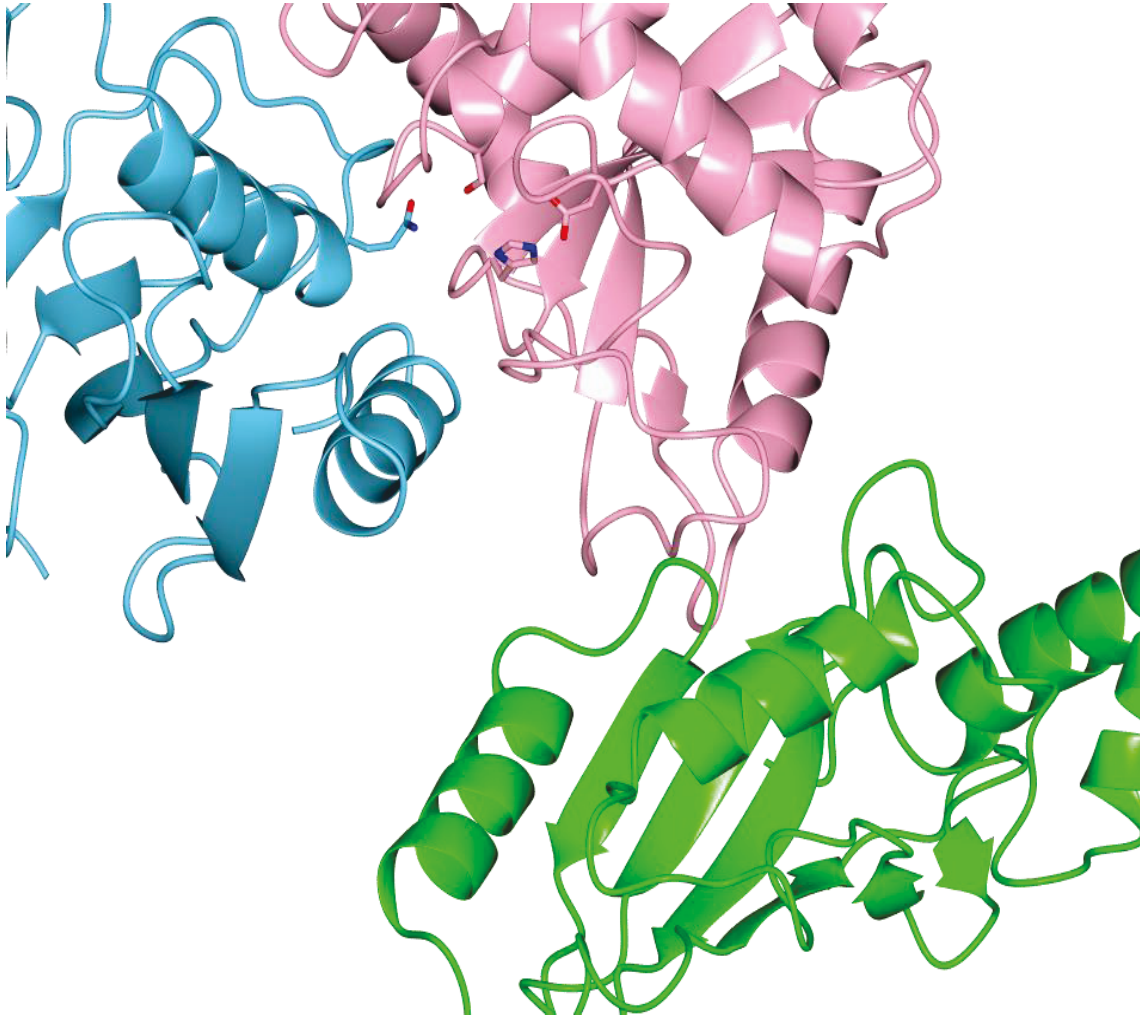


Figure 38 OspI と相互作用する 2 分子の Ubc13

OspI C62S-Ubc13 複合体構造中に見られた、2 種類の OspI と Ubc13 間相互作用様式。

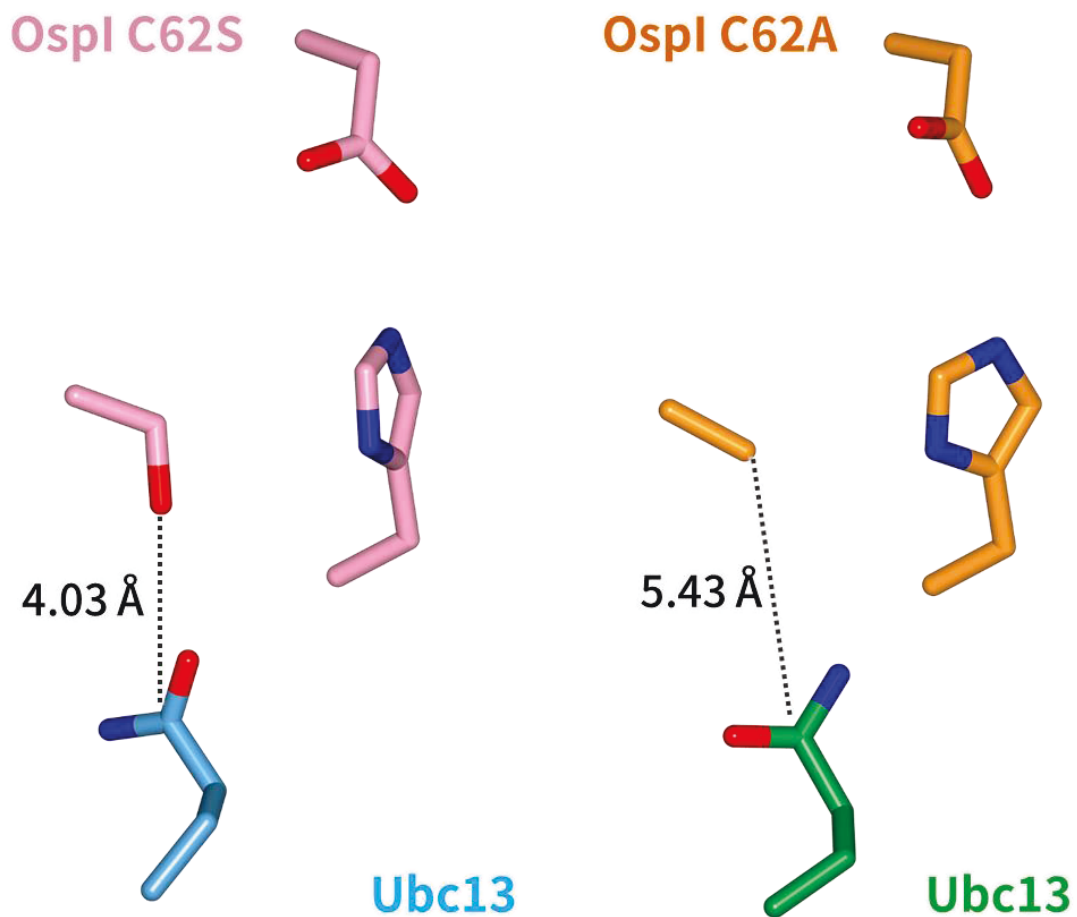
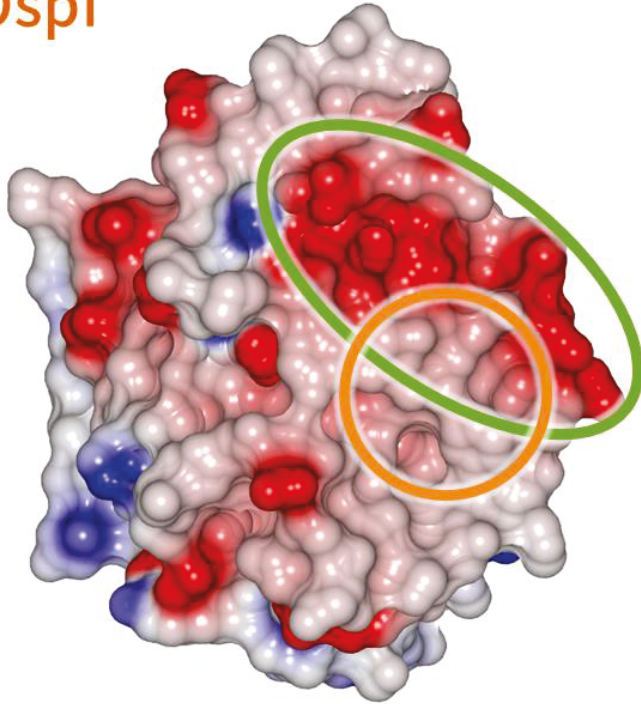


Figure 39 複合体結晶構造中の OspI 活性部位の構造

OspI C62S-Ubc13、OspI C62A-Ubc13 複合体結晶構造中の OspI 活性部位の比較。  
 野生型 OspI では、脱アミド化反応の初段で求核攻撃する、62 番目のアミノ酸側鎖と、その求核攻撃を受ける、Ubc13 Gln100  $\delta$  位炭素の距離を示した。OspI C62S-Ubc13 複合体構造中では OspI Ser62 O $\gamma$ -Ubc13 Gln100 C $\delta$  : 4.04 Å、OspI Ser62 C $\beta$ -Ubc13 Gln100 : 5.38 Åであった。一方、OspI C62A では  $\gamma$  位に原子が存在せず、OspI C $\beta$ -Ubc13 Gln100 C $\delta$  が 5.43 Å だった。



OspI



Ubc13

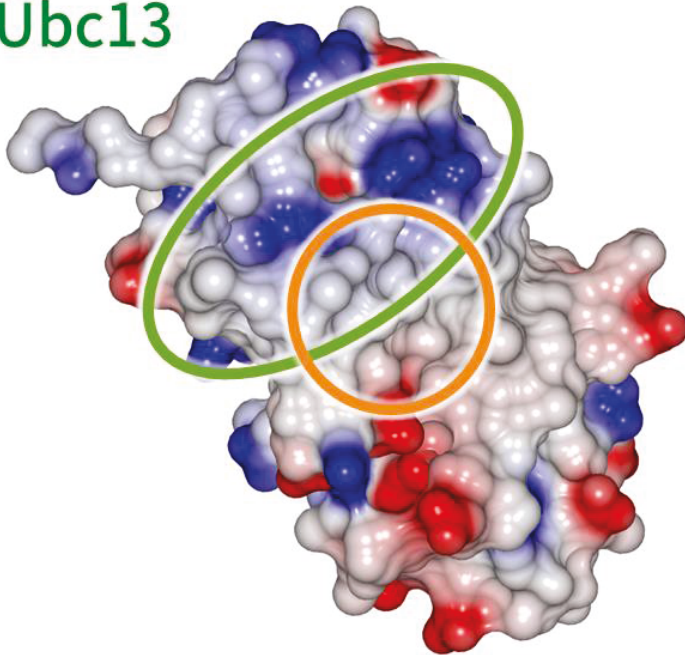


Figure 40 OspI-Ubc13 相互作用表面の電荷

OspI-Ubc13 の相互作用表面電荷を表した。赤色は負電荷、青色は正電荷表面の形成を示し、白色は無極性のアミノ酸により構成される疎水性表面を示す。

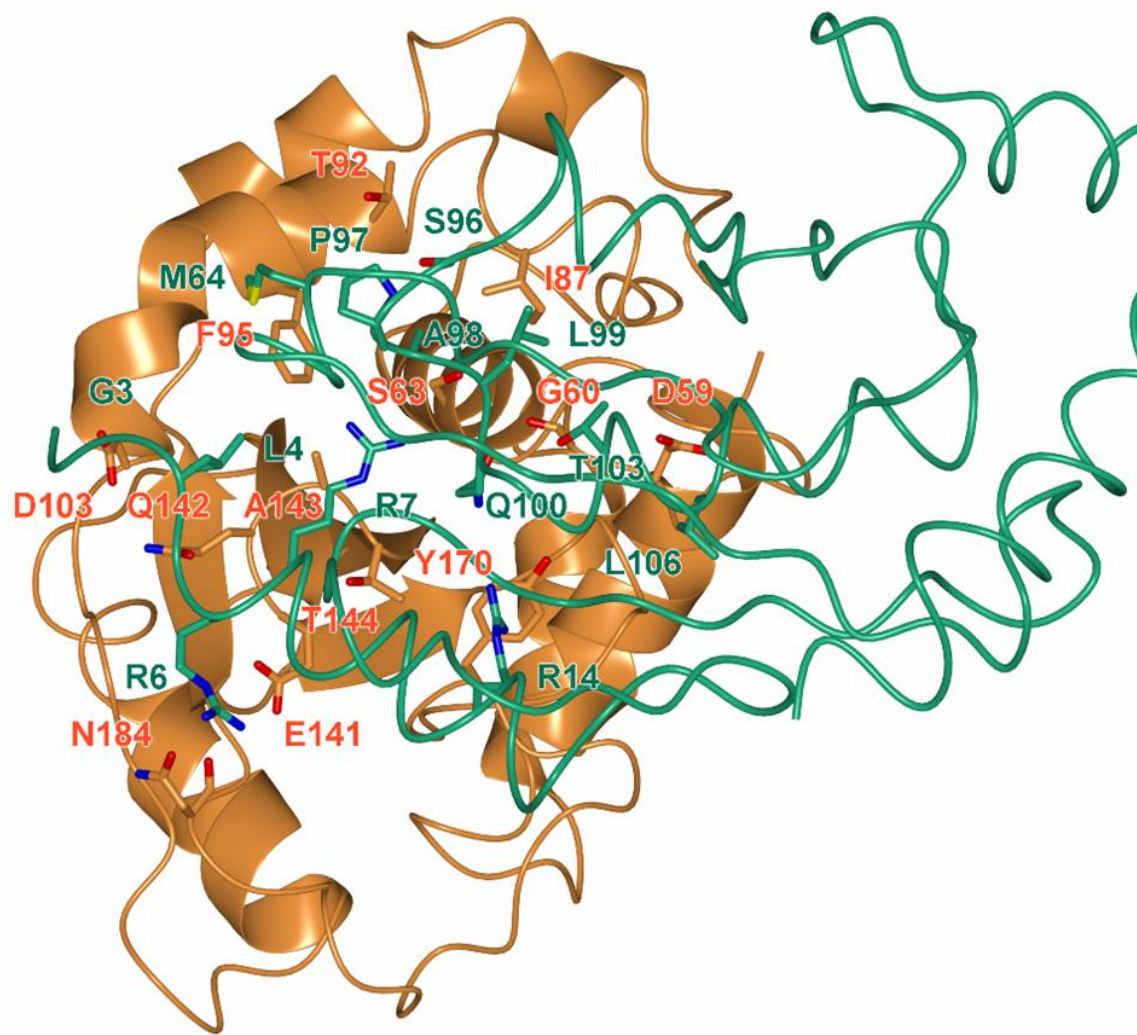


Figure41 OspI-Ubc13 間の相互作用残基

OspI (オレンジ) をリボン図、Ubc13 (緑) をライン図、それぞれの相互作用に関与するアミノ酸側鎖をスティックで表した。



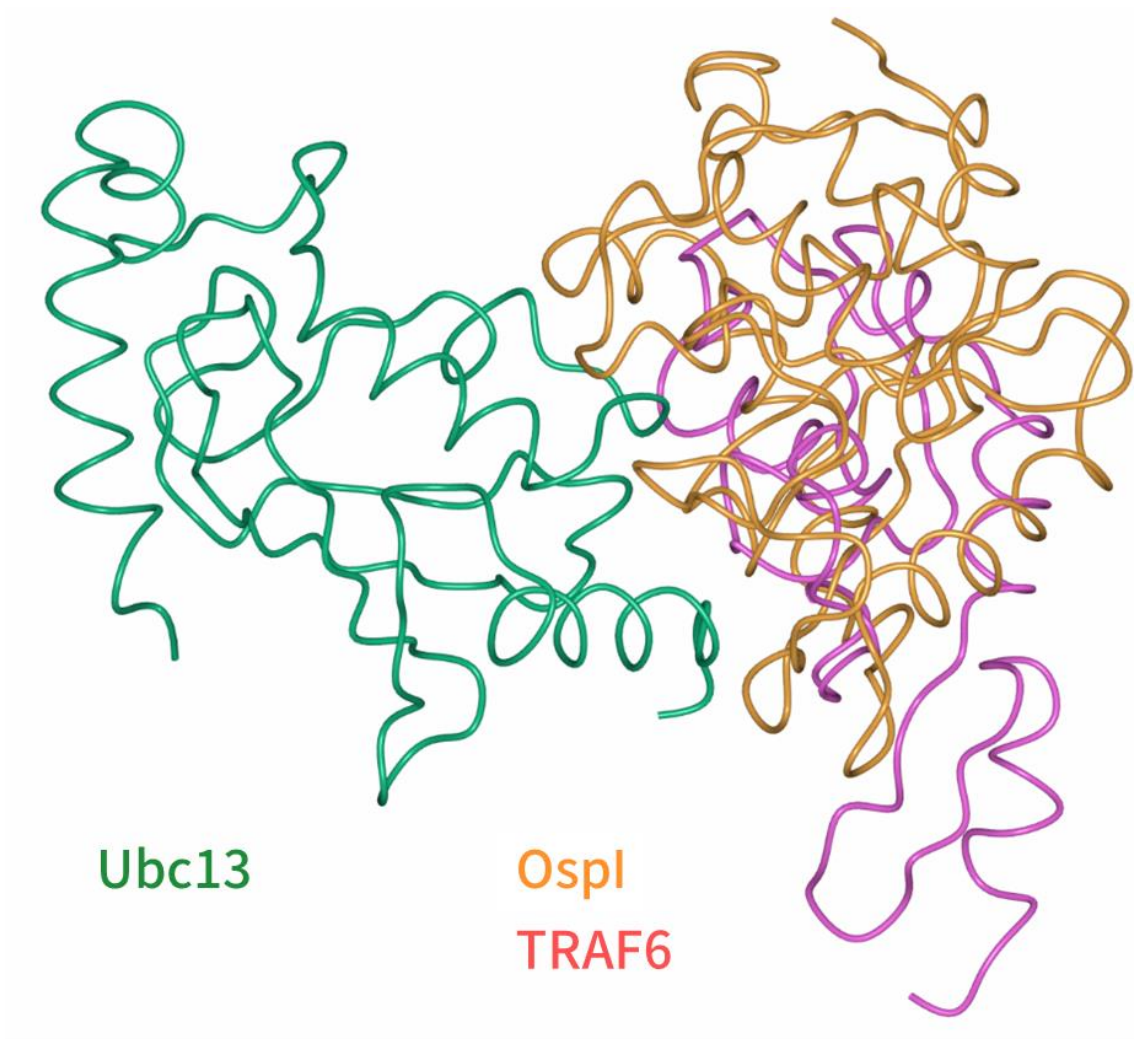


Figure 42 Ubc13-TRAF6 との構造比較

OspI C62A-Ubc13 複合体構造と、既に決定されていたユビキチンリガーゼ TRAF6-Ubc13 複合体構造 (PDB ID : 3HCT) を、Ubc13 を基準に重ね合わせライン図で表した。

## 第 4 章 OspI-Ubc13 相互作用解析

### 4. 1. 目的

複合体結晶構造解析により、OspI-Ubc13 間の相互作用様式に関して原子レベルの構造情報が得られ、相互作用に関与するアミノ酸残基が示唆された。これらアミノ酸残基の Ala 変異体を作製し、プルダウン実験および脱アミド化活性測定を行うことにより、OspI による Ubc13 の認識における重要性を生化学的に評価する。

## 4. 2. 方法

### 4. 2. 1. GST プルダウン実験

3. 2. 2. で述べたように野生型 OspI は Ubc13 と安定な複合体を形成しないため、ベイトタンパク質として不適切である。そのため、GST-OspI C62A 変異体をプルダウン実験に用いた。GST-OspI C62A は 2. 1. 同様にアフィニティークロマトグラフィーを行い、タグ切断を行わず陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより精製した。プルダウン解析に用いた Ubc13 は、3. 2. 1. 同様にアフィニティークロマトグラフィー、His×6 タグ切断、陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより精製し、プルダウン実験に用いた。

初めに 25  $\mu$  M GST-OspI C62A 100  $\mu$   $\ell$  を 10  $\mu$   $\ell$  の Glutathione Sepharose へ加え、Wash Buffer (150mM NaCl, Tris/HCl pH 7.5, 10mM 2-ME) を 1m  $\ell$  加え、30 分間ローテーターを用いて 4°C のチャンバー内で攪拌、インキュベーションを行い、GST-OspI をベイトタンパク質として Glutathione Sepharose へと吸着した。吸着後、20000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上清を捨て、1m  $\ell$  Wash Buffer を加え懸濁し、再度 20000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し上清を取り除く洗浄操作を 3 回繰り返した。次にアナライトタンパク質である 40 $\mu$ M Ubc13 を 200  $\mu$   $\ell$  加え、GST-OspI と同様に吸着操作、洗浄操作を行った。洗浄後の試料にサンプルバッファーを加え、SDS-PAGE を行い CBB 染色によりアナライトの吸着を検出した。

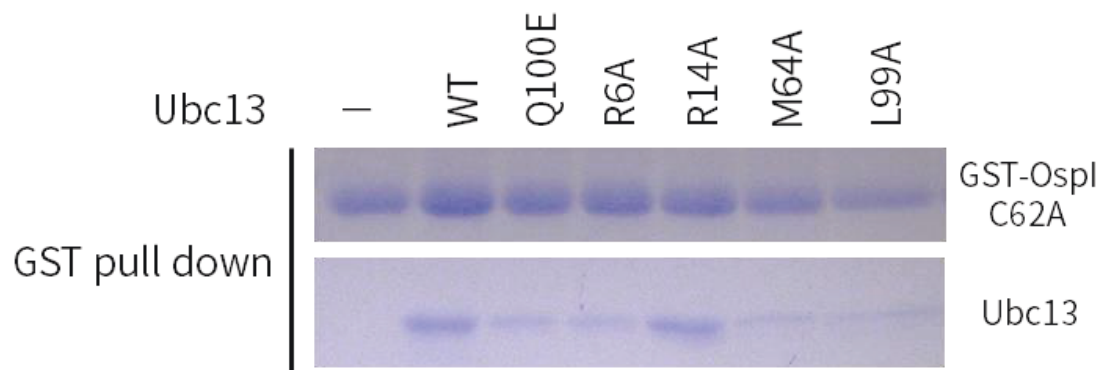
#### 4. 2. 2. 脱アミド化活性測定実験

脱アミド化活性測定で使用した、OspI および、Ubc13 は 2. 2. 1. および 3. 2. 1. と同様の手順で精製を行った。OspI による Ubc13 の脱アミド化反応の検出は、Native-PAGE を利用した。非変性条件での電気泳動である Native-PAGE では、OspI による脱アミド化修飾を受けた Ubc13 は野生型と比較してアノード側へ高い泳動度を示すため、泳動度の差異として脱アミド化反応を検出することが可能である。Native-PAGE は Running Gel : 12% acrylamide、0.3M Tris/HCl pH 8.8、 0.05% APS、0.01% TEMED、Stacking Gel : 4% acrylamide、125mM Tris/HCl pH 6.8、0.05%APS、0.01% TEMED、の組成でゲルを作製し、Running Buffer (25mM Tris/HCl pH 8.3、0.2M Glycine) を使用して電気泳動を行った。10  $\mu$ g の Ubc13 に対して、図中に記載した終濃度で OspI を加え、ゲルろ過 Buffer を用いて全量 12  $\mu$ l として 30°C 10 分静置した。反応後の試料を、4  $\mu$ l の Native-PAGE 4X Sample Buffer (invitrogen) と混合した後、定電圧 170V 120 分電気泳動を行った。電気泳動は電気抵抗の上昇に伴うサンプルの変性を避けるため、4°C のチャンバー内で行った。電気泳動後のゲルからのタンパク質の検出には CBB 染色を用いて、SDS-PAGE と同様の工程で染色及び脱色を行った。

### 4. 3. 結果

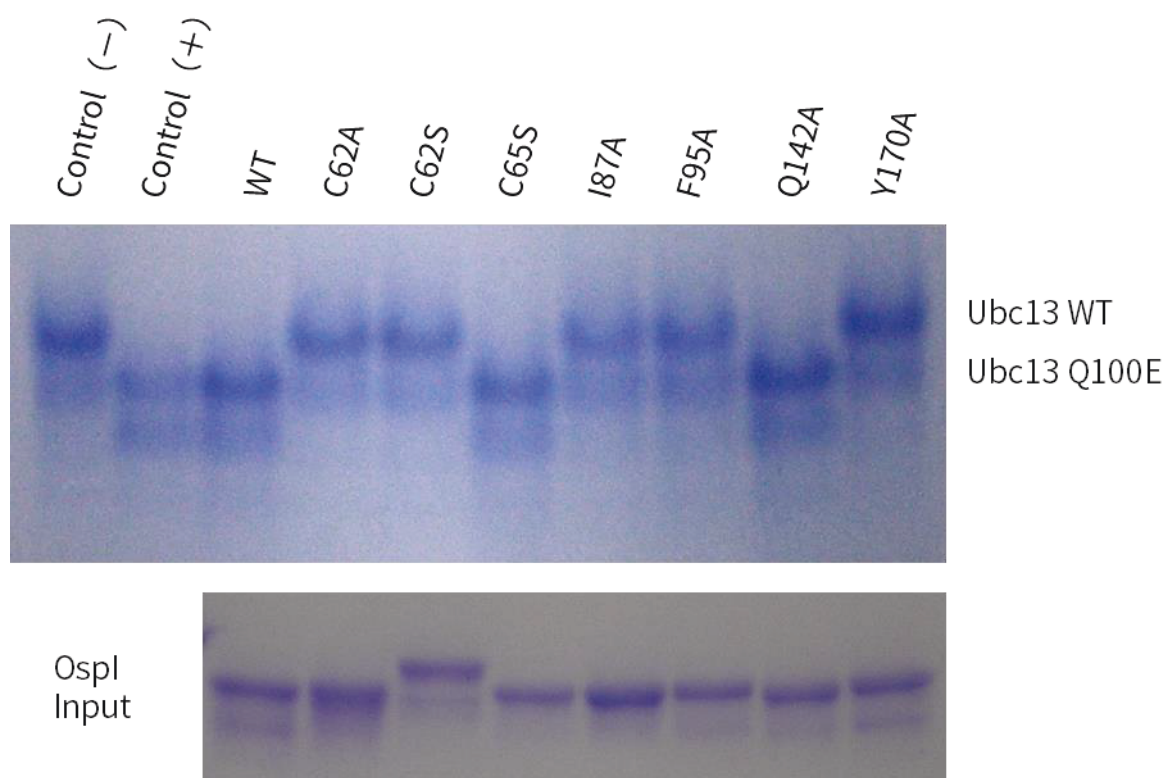
OspI C62A-Ubc13 複合体結晶構造解析から OspI-Ubc13 間の相互作用に関与するアミノ酸残基として、Ubc13 Arg6、Arg14、Met64、Leu99 に着目しこれらの Ala 変異体をアナライトとして 4. 2. 1. に示した手順で GST-OspI C62A によるプルダウン実験を行った (Figure 43)。プルダウン実験ではこれら Ubc13 変異体 (lane 4~7) の他に、ベイトタンパク質 Control としてアナライト無し (lane 1)、Positive Control として野生型 Ubc13 を (lane 2)、Negative Control として脱アミド化と同様のアミノ酸変異を加えた Ubc13 Q100E 変異体を (lane 3)、アナライトとして吸着させた実験結果も示した。プルダウン実験の結果、Ubc13 R6A、M64A、L99A 変異体では野生型 Ubc13 と比較して結合は弱く、Negative control である Ubc13 Q100E 変異体と同程度であり、結合親和性が低下していた。一方、Ubc13 R14A 変異体は野生型 Ubc13 と比較しても結合量に大きな差はなかった。

プルダウン実験での Ubc13 と同様に、OspI C62A-Ubc13 複合体結晶構造解析により明らかになった、OspI 中で相互作用に関与する Ile87、Phe95、Gln142、Tyr170 の Ala 変異体を作製し、これらの脱アミド化活性を測定した (Figure 44)。Control については、Negative Control として OspI 未処理の野生型 Ubc13 (lane 1)、OspI 活性残基変異体 (lane 4、5) を、Positive Control として、OspI 未処理の Ubc13Q100E 変異体 (lane 2)、野生型 OspI (lane 3) の、脱アミド化反応結果を示した。脱アミド化活性測定の結果、OspI C62A、C62S、I87A、F95A、Y170A 変異体は、Negative Control と泳動度に差はなく脱アミド化活性の低下がみられた。しかし、OspI WT、C65S、Q142A 変異体では、Ubc13 の電気泳動度の変化が見られ、活性を保持していることが示された。



**Figure 43 GST-OspI C62A 変異体を用いた Ubc13 変異体のプルダウン実験**

GST-OspI C62A 変異体をベイトタンパク質、Ubc13 変異体をアナライトとして、相互作用への影響を検証した。lane 1 Control はアナライトを加えず固定した GST-OspI C62A、lane 2 は野生型 Ubc13 をアナライトとして用いた Positive Control、lane 3 は脱アミド化修飾をうけた Ubc13 と同等の Ubc13 Q100E 変異体を用いた Negative Control である。



**Figure 44** OspI 変異体脱アミド化活性測定

OspI 変異体を用いた脱アミド化活性測定の Native-PAGE 結果（上）、OspI Loading Control（下）。10 $\mu$ g の Ubc13 に対して終濃度 10nM で OspI を加えて全量 12 $\mu$ l とし、脱アミド化反応を行い、Native-PAGE、CBB 染色により検出した。Input は脱アミド化反応に用いた OspI の 16 倍量を Control として、SDS-PAGE を行った。

#### 4. 4. 考察

OspI-Ubc13 間の疎水性相互作用表面を形成する、OspI Ile87、Phe95、Ubc13 Met64、Leu99 の変異体相互作用解析では、結合親和性の低下または活性の低下が確認され、一貫性のある結果が得られた。一方、電荷的相互作用表面では Ubc13 Arg6 の変異体で結合親和性の低下が見られたものの、OspI Gln142、Ubc13 Arg14 の単独の変異では結合親和性や活性の低下は確認できなかった。OspI Gln142 は複合体結晶構造中で、Arg6 の主鎖アミド基と水素結合を形成していたにもかかわらず活性の低下が見られなかった。これは、Gln142 は相互作用表面の外縁にあり脱アミド化反応が起きる Gln100 から離れた位置にあるため、変異による相互作用への影響を脱アミド化活性により検出することができなかったのではないかと考えられる。次に Ubc13 Arg6 は、Ubc13 の形成する正電荷表面と疎水性表面の境界に位置し、正電荷表面の形成に寄与するが、OspI C62S-Ubc13 複合体結晶構造中では Arg16 のアルキル基は近傍に位置する Tyr170 と疎水性の相互作用を形成していた。しかし、OspI C62A-Ubc13 複合体構造中では Tyr170 は Arg16 の  $\beta$  位炭素に対して 180 度反対にフェニル基を向け大きく Arg16 から離れた構造をとっており、Ubc13 Arg16 の認識が相互作用に決定的でないため、それぞれの複合体構造に差異が生じたと考えられる。プルダウン実験および脱アミド化活性測定実験による相互作用解析の結果、OspI-Ubc13 間の疎水性相互作用の重要性は明らかになったが、電荷表面による相互作用の重要性を明らかにすることができなかった。

Ubc13 と結合する分子として、TRAF6 の他にユビキチンリガーゼである Carboxy terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) や脱ユビキチン化酵素 OTU domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) の立体構造が Ubc13 との複合体として報告されている [43] [44] [45] [46]。そこで、OspI の基質認識機構の解明を目指し、これら複合体構造と、相互作用表面を比較した (Figure 45)。その結果、TRAF6 だけではなく CHIP や OTUB1 も OspI と同様の表面を介して、Ubc13 と相互作



用していることが示された (Figure 45)。しかし、相互作用表面の電荷分布は OspI と異なり、OspI が疎水性表面と負電荷表面の 2 種類の分子表面を介して Ubc13 と相互作用しているのに対して、TRAF6 や CHIP、OTUB1 では負電荷表面は見られず、疎水性表面のみを介して Ubc13 と相互作用していた (Figure 46)。

TRAF6、CHIP、OTUB1 は Ubc13 以外に、Ubc13 と同じファミリータンパク質である UbcH5 と相互作用することが報告されている [47] [48] (Figure 47 A)。そこで、OspI も他のタンパク質と同様に UbcH5 と結合するのかを、GST-OspI を用いたプルダウンアッセイにより検証した。しかし、OspI では UbcH5 との結合は確認されなかった (Figure 47 B)。Ubc13 と UbcH5 の相互作用表面を比較したところ、Ubc13 で確認された正電荷表面が UbcH5 には存在しないことが明らかとなった (Figure 47 C)。

以上の結果をまとめると、OspI は疎水性表面と負電荷表面の 2 種類の表面それぞれを介して Ubc13 の疎水性表面、正電荷表面と相互作用しており、正電荷表面を持たない UbcH5 とは結合しない。一方、TRAF6 や CHIP、OTUB1 は、疎水性表面のみを介して Ubc13 を認識するため、正電荷表面の有無に関わらず UbcH5 と結合することが可能である。つまり、OspI は負電荷表面を持つことで Ubc13 への基質特異性を獲得していることを示唆している。

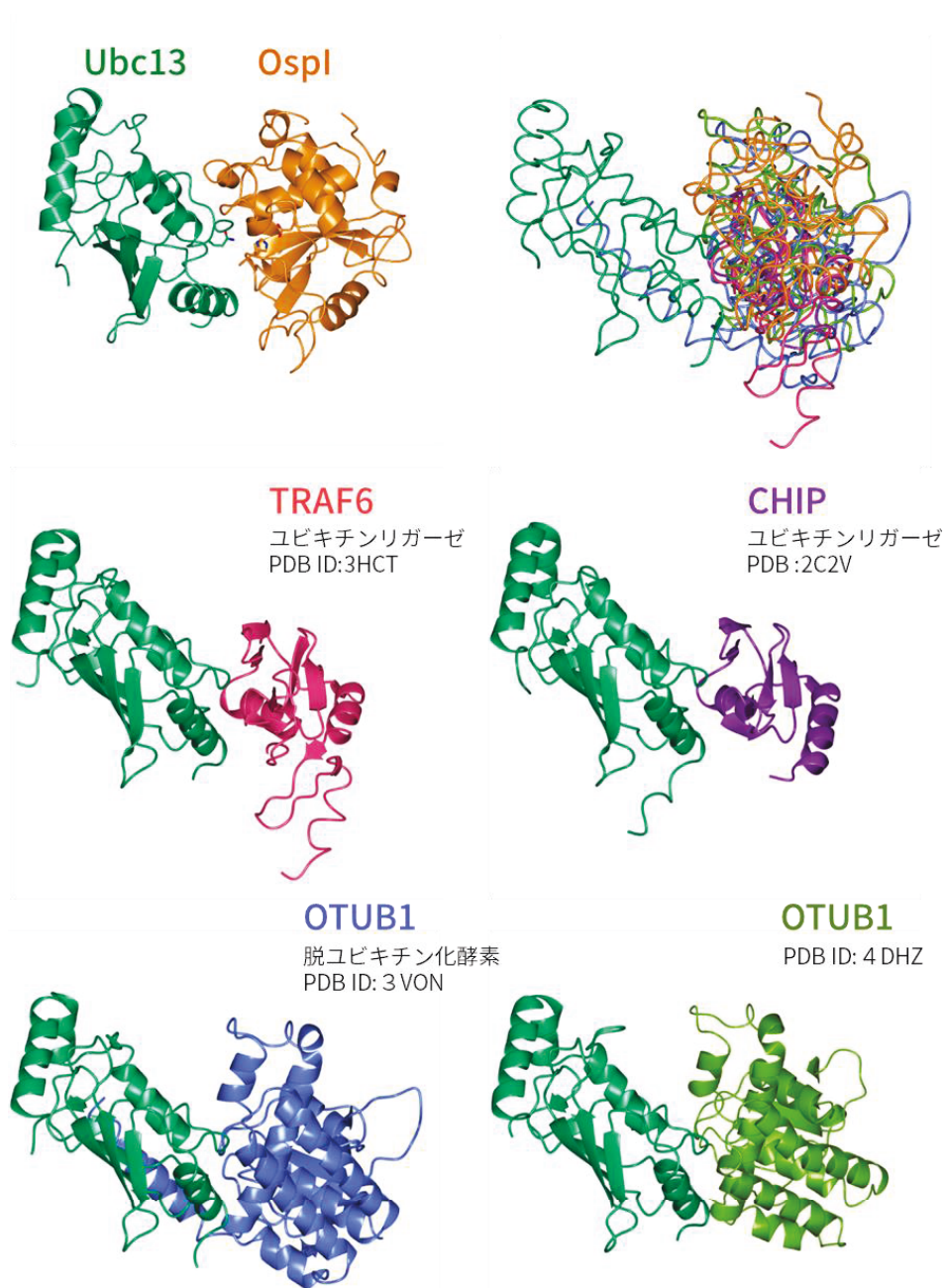


Figure 45 Ubc13 複合体の相互作用様式の比較

Ubc13 と複合体を形成することが報告されている、ユビキチンリガーゼ TRAF6 (PDB ID : 3HCT)、CHIP (PDB ID : 2C2V)、脱ユビキチン化酵素 OTUB1 (PDB ID : 3VON、4DHZ) との複合体結晶構造をリボン図で表示した。

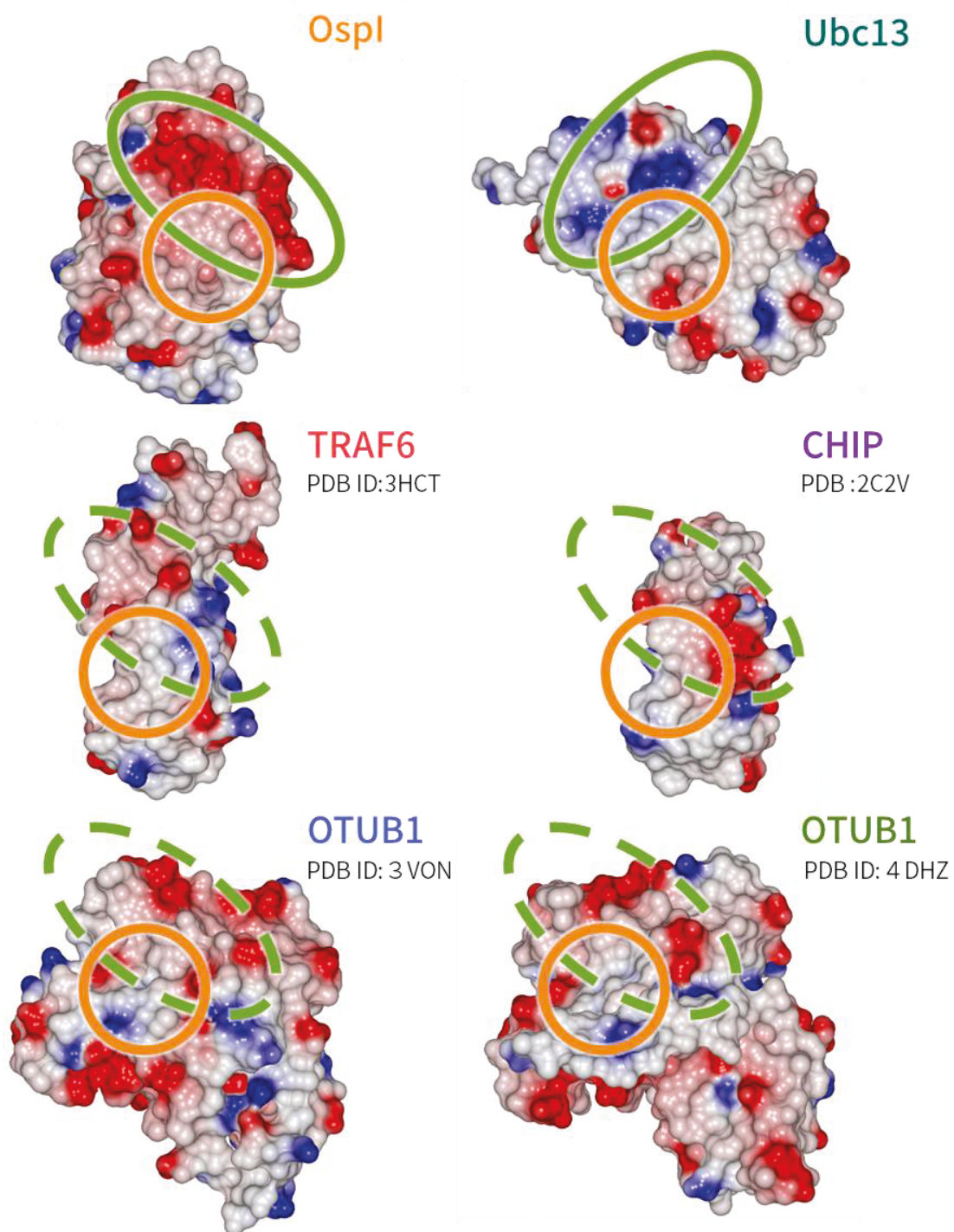


Figure 46 Ubc13 複合体相互作用表面電荷の比較

Ubc13 と複合体を形成することが報告されている、ユビキチンリガーゼ TRAF6、CHIP、脱ユビキチン化酵素 OTUB1 の Ubc13 認識表面の表面電荷を表した。赤色が負電荷を、青色が正電荷を示し、白色は無極性、つまり疎水性表面を示す。

A

```

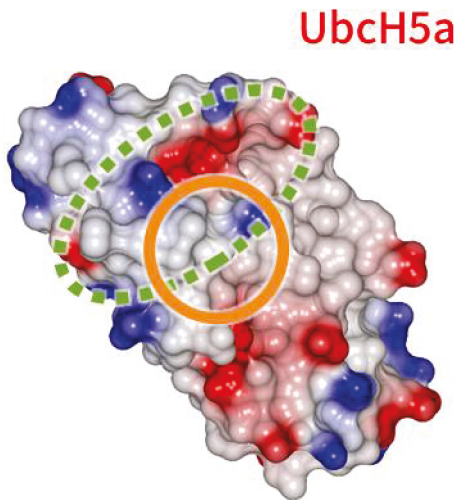
sp|P61088|UBE2N_HUMAN/1-152  1  M A G L P R R I I K E T Q R L L A E P V P G I K A E P D E S N A R Y F H V V 38
sp|P51668|UB2D1_HUMAN/1-147  1  M A - - L K R I Q K E L S D L Q R D P P A H C S A G P V G D D L F H W Q A T 36

sp|P61088|UBE2N_HUMAN/1-152  39  I A G P Q D S P F E G G T F K L E L F L P E E Y P M A A P K V R F M T K I Y 76
sp|P51668|UB2D1_HUMAN/1-147  37  I M G P P D S A Y Q G G V F L T V H F P T D Y P F K P P K I A F T T K I Y 74

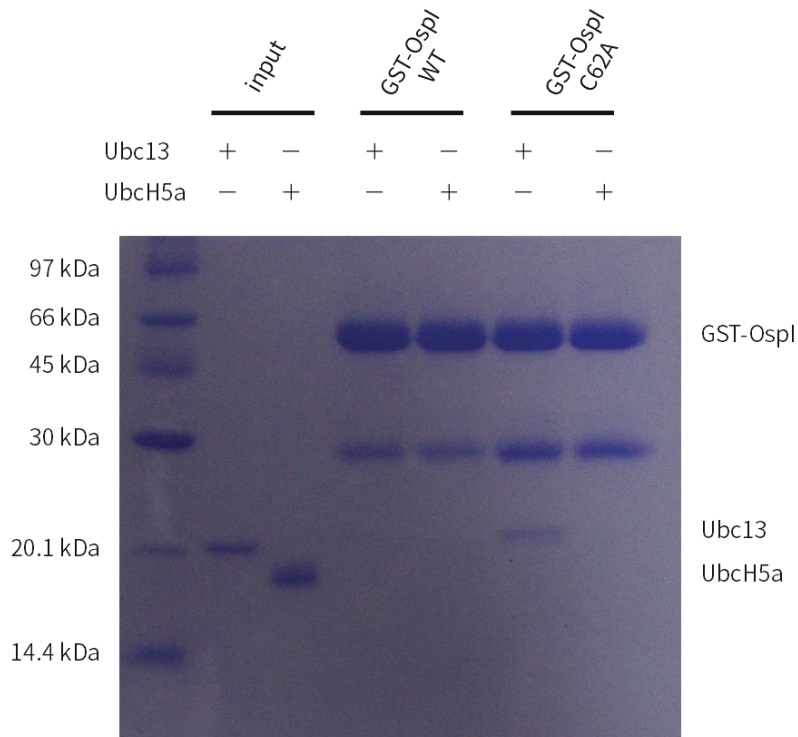
sp|P61088|UBE2N_HUMAN/1-152  77  H P N V D K L G R I C L D I L K D K W S P A L Q I R T V L L S I Q A L L S A 114
sp|P51668|UB2D1_HUMAN/1-147  75  H P N I N S N G S I C L D I L R S Q W S P A L T V S K V L L S I C S L L C D 112

sp|P61088|UBE2N_HUMAN/1-152  115 P N P D D P L A N D V A E Q W K T N E A Q A I E T A R A W T R L Y A M N N I 152
sp|P51668|UB2D1_HUMAN/1-147  113 P N P D D P L V P D I A Q I Y K S D K E K Y N R H A R E W T Q K Y A M - - 147
  
```

B



C



## Figure 47 Ubc13 とホモログ UbcH5 の相互作用解析

- A) Ubc13 (UBE2N) と UbcH5 (UB2D1) の一次配列の比較、半数以上のアミノ酸残基が保存されており、類似性は非常に高い。
- B) UbcH5a の表面電荷。UbcH5 の TRAF6、CHIP、OTUB1 との相互作用表面の表面電荷を表示した。Figure 46 と同様に赤色が負電荷を、青色が正電荷を示し、白色は無極性、つまり疎水性表面を示す。
- C) GST-OspI による UbcH5a プルダウン実験の SDS-PAGE 結果。lane1、2 はアナライトとして加えた Ubc13 または UbcH5 の 5%volume の input。lane3、4 は GST-OspI WT を、lane5、6 は GST-OspIC62A 変異体をベイトタンパク質として使用したプルダウン実験結果。

## 総括

OspI C62A、C62S、C65S 変異体単独結晶構造解析により OspI の活性部位および反応機構を明らかにすることができた。OspI 変異体は結晶構造中で、野生型とは異なった活性型のシステインプロテアーゼ様活性部位を形成していた。つまり、OspI はシステインプロテアーゼによるペプチド加水分解反応と同様の機構を介して、Ubc13 Gln100 側鎖を脱アミド化することが示唆された。エフェクタータンパク質は分泌装置を介して直接に宿主細胞質へ分泌され、宿主細胞質でフォールディング、成熟すると考えられている。このことから、野生型 OspI において観察された Cys62-Cys65 間のジスルフィド結合は、結晶化溶液による影響を受けたものだと考えられる。

OspI-Ubc13 複合体解析を行った結果、OspI の Ubc13 認識機構に関して多くの知見が得られた。OspI は負電荷表面と疎水性表面、2 種類の相互作用表面を介して、Ubc13 の H1 を中心に形成される正電荷表面、S3-4 ループおよび S6-H2 ループにより構成される疎水性表面を認識していることが明らかになった。また、TRAF6 や CHIP、OTUB1 と Ubc13 複合体との構造比較により、OspI と Ubc13 の相互作用面に存在する電荷的相互作用は独自のものであり、これにより Ubc13 と類似した UbcH5 とは相互作用せず、Ubc13 を特異的に認識することが明らかになった。

赤痢菌が持つエフェクター IpaH は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持ち、E2 酵素として UbcH5 を利用することで、宿主タンパク質へユビキチン鎖を付加し、プロテアソームによる分解へと誘導する。IpaH9.8 は、NF- $\kappa$ B の活性化に必須な NEMO へユビキチン化修飾を行い、プロテアソーム分解へと導くことで、急性炎症応答を抑制することが報告されている (Figure 48) [49]。OspI の基質特異性は同じエフェクタータンパク質である IpaH ファミリーと共調して機能するにあたって重要であり、OspI は Ubc13 への特異性を獲得することで、UbcH5 と不要に相互作用せず E2 酵素の競合、IpaH ファミリーの活性の低下を回避していると考えられる。



相互作用解析では、実際に相互作用に寄与するアミノ酸残基の重要性を評価することができた。疎水性相互作用表面を形成する OspI Ile87 や Phe95、Ubc13 の Met64 や Phe95 の変異では結合親和性の低下、脱アミド化活性の低下が確認され、整合性のとれた知見が得ることができた。一方で、電荷表面を形成する一部のアミノ酸残基の変異体では結合親和性や脱アミド化活性への影響は見られなかった。

OspI-Ubc13 複合体、TRAF6-Ubc13 複合体を構造比較した結果、OspI と TRAF6 はともに Ubc13 の Gln100 の位置する類似の表面を認識していることが明らかになった。ユビキチンリガーゼは、E2 酵素ユビキチン複合体との結合、基質へのユビキチンの修飾、E2 酵素の解離、を繰り返すことで基質へユビキチン鎖を修飾する。そのため、ユビキチンリガーゼと E2 酵素間の結合は強固なものではなく、付かず離れずの制限された相互作用であり、この相互作用の強さがユビキチンリガーゼの活性に深く関与していると考えられる。Ubc13 Gln100 は TRAF6 のどのアミノ酸残基とも直接に相互作用していないが、TRAF6 が認識する表面の端に位置し、TRAF6 と Ubc13 の相互作用になんらかの影響を及ぼすと考えられる。つまり、OspI による Ubc13 Gln100 の脱アミド化修飾は、TRAF6-Ubc13 間の適切な相互作用に影響を与え、その結果、TRAF6 の自己ユビキチン化活性の低下を引き起こしていることが示唆された。

触媒残基変異体である OspI C62A、C62S 変異体は野生型 Ubc13 とは結合したが、脱アミド化反応生成物と同等の Ubc13 Q100E とは結合せず、低い結合親和性を示した (Figure 27)。これは、脱アミド化修飾を受けた Ubc13 Glu100 の負電荷が、近傍に存在する Ubc13 H1 から構成される正電荷表面に影響を及ぼし、その結果、OspI との相互作用が妨げられたと考えられる。代謝回転効率の観点から、酵素は次の反応サイクルに向けて、反応後に生成物を速やかに解離することが必要であり、OspI が Ubc13 Q100E 変異体に低い親和性を示すことは合理的である。また、野生型 OspI および C65S 変異体は、野生型 Ubc13 と結合しなかった。これは、野生型 OspI および C65S 変異体は触媒

活性を保持しているため、プルダウン実験のために加えた野生型 Ubc13 に対して脱アミド化反応を引き起こしたためだと考えられる。

本研究により、OspI 変異体単独構造、OspI と基質 Ubc13 との複合体構造の決定に成功した。これにより、OspI の活性部位構造、反応機構、基質認識機構に関する多くの知見を得たことで、赤痢菌感染機構の一端を明らかにすることができた。赤痢菌が、エフェクタータンパク質 OspI の持つ脱アミド化という非常に簡素な反応を用いて、細菌に存在しないユビキチン修飾系を制御するという希有な感染機構は、進化学、分子生物学からも非常に興味深い。OspI 同様に宿主高次機能を利用し感染を促進するエフェクタータンパク質は、赤痢菌に限らず多く報告されている。しかし、未だにその活性や基質といった詳細が不明なエフェクタータンパク質も多く、細菌の持つ巧みな感染戦略の解明のために更なる研究が期待される。



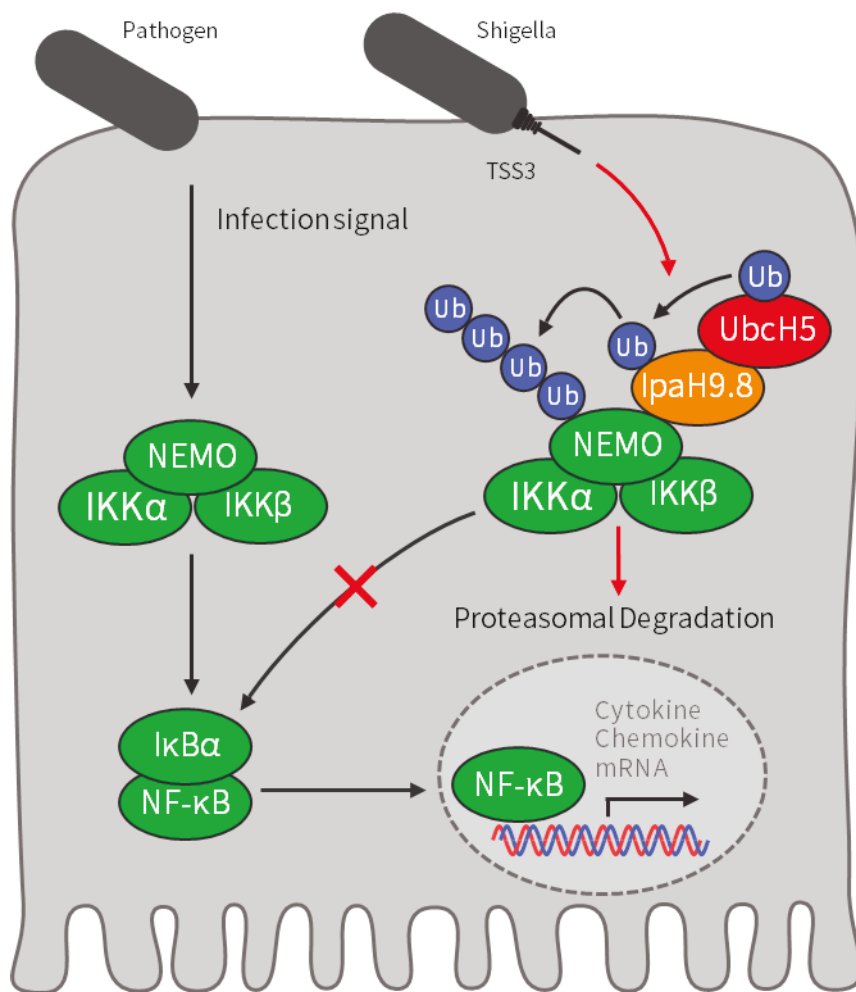


Figure 48 赤痢菌エフェクターIpaH9.8とは

赤痢菌エフェクターIpaH9.8はユビキチンリガーゼ活性を持ち、NF-κBの活性化に必要なNEMOへユビキチン鎖を修飾することでプロテアソーム分解を誘導する。

## 参考文献一覽

1. Center for Disease Control and Prevention. “CDC Health Information for International Travel 2016.” *Oxford University Press*, 2016, **Chapter 3 (81)**.
2. Kotloff K. L., Winickoff J. P., Ivanoff B., Clemens J. D., Swerdlow D. J., Sansonetti P. J., Adak G. K., Levine M. M. “Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies.” *Bull. World Health Organ.* 1999, **77**, 651-66.
3. Brenner D. J., Steigerwalt A. G., Wathen H. G., Gross R. J., Rowe B. “Confirmation of aerogenic strains of Shigella boydii 13 and further study of Shigella serotypes by DNA relatedness.” *J. Clin. Microbiol.* 1982, **16**, 432-6.
4. Lüscher D., Altwegg M. “Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries.” *Mol. Cell. Probes.* 1994, **8**, 285-90.
5. Hirose K., Terajima J., Izumiya H., Tamura K., Arakawa E., Takai N., Watanabe H. “Antimicrobial susceptibility of Shigella sonnei isolates in Japan and molecular analysis of S. sonnei isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones.” *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, **49**, 1203-5.

6. Nagano Y., Nagano N., Wachino J., Ishikawa K., Arakawa Y. “Novel chimeric beta-lactamase CTX-M-64, a hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14 beta-lactamases, found in a *Shigella sonnei* strain resistant to various oxyimino-cephalosporins, including ceftazidime.” *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, **53**, 69-74.
7. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T. “Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy.” *Nat. Chem. Biol.* 2007, **3**, 541-8.
8. Infectious Diseases Society of America (IDSA), Spellberg B., Blaser M., Guidos R. J., Boucher H. W., Bradley J. S., Eisenstein B. I., Gerding D., Lynfield R., Reller L. B., Rex J., Schwartz D., Septimus E., Tenover F. C., Gilbert D. N. “Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives.” *Clin. Infect. Dis.* 2011, **52**, 397-428.
9. Khokha R., Murthy A., Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013, **13**, 649-65.
10. Mills K. H. “TLR-dependent T cell activation in autoimmunity.” *Nat. Rev. Immunol.* 2011, **11**, 807-22.
11. Schon H. T., Weiskirchen R. “Immunomodulatory effects of transforming growth factor- $\beta$  in the liver.” *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014, **3**, 386-406.
12. Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. *Nature*, 2001, **410**, 1099-103.

13. Poltorak A., Ricciardi-Castagnoli P., Citterio S., Beutler B. “Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, **97**, 2163-7.
14. Liu L., Botos I., Wang Y., Leonard J. N., Shiloach J., Segal D. M., Davies D. R. “Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA.” *Science*. 2008, **320**, 379-81.
15. Miller S. I., Ernst R. K., Bader M. W. “LPS, TLR4 and infectious disease diversity.” *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, **3**, 36-46.
16. Krysko D. V., Garg A. D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P. “Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy.” *Nat. Rev. Cancer*, 2012, **12**, 860-75.
17. Bonizzi G., Karin M. “The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.” *Trends Immunol.* 2004, **25**, 280-8.
18. Hayden M. S., Ghosh S. “Shared principles in NF-kappaB signaling.” *Cell*, 2008, **132**, 344-62.
19. Iwai K. “Diverse ubiquitin signaling in NF- $\kappa$ B activation.” *Trends Cell Biol.* 2012, **22**, 355-64.
20. Griner E. M., Kazanietz M. G. “Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer.” *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 281-94.

21. Shahnazari S., Yen W. L., Birmingham C. L., Shiu J., Namolovan A., Zheng Y. T., Nakayama K., Klionsky D. J., Brumell J. H. “A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy” *Cell Host Microbe*, 2010, **8**, 137-46.
22. Holden N. S., Squires P. E., Kaur M., Bland R., Jones C. E., Newton R. “Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C.” *Cell Signal*. 2008, **20**, 1338-48.
23. Palkowitsch L., Marienfeld U., Brunner C., Eitelhuber A., Krappmann D., Marienfeld R. B. “The Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF-kappaB activation.” *J. Biol. Chem.* 2011, **286**, 7522-34.
24. Sun L., Deng L., Ea C. K., Xia Z. P., Chen Z. J. “The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes” *Mol. Cell*, 2004, **14**, 289-301.
25. Hershko A., Ciechanover A. “The ubiquitin system.” *Annu. Rev. Biochem.* 1998, **67**, 425-79.
26. Iwai K., Fujita H., Sasaki Y. “Linear ubiquitin chains: NF- $\kappa$ B signalling, cell death and beyond.” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 503-8, 2014.
27. Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G. R., Inoue J., Chen Z. J. “TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK” *Nature*, 2001, **412**, 346-51.

28. Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C., Chen Z. J. “Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.” *Cell*, 2000, **103**, 351-61.
29. Sanada T., Kim M., Mimuro H., Suzuki M., Ogawa M., Oyama A., Ashida H., Kobayashi T., Koyama T., Nagai S., Shibata Y., Gohda J., Inoue J., Mizushima T., Sasakawa C. “Shigella flexneri effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response.” *Nature*, 2012, **483**, 623-6.
30. Otwinowski Z., Minor W. “Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode.” *Meth. Enzymol.* 1997, **276**, 307-26.
31. Winn M. D., Ballard C. C., Cowtan K. D., Dodson E. J., Emsley P., Evans P. R., Keegan R. M., Krissinel E. B., Leslie A. G., McCoy A., McNicholas S. J., Murshudov G. N., Pannu N. S., Potterton E. A., Powell H. R., Read R. J., Vagin A., Wilson K. S. “Overview of the CCP4 suite and current developments.” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2011, **67**, 235-42.
32. Vagin A., Teplyakov A. “Molecular replacement with MOLREP.” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010, **66**, 22-5.
33. Vagin A. A., Steiner R. A., Lebedev A. A., Potterton L., McNicholas S., Long F., Murshudov G. N. “REFMAC5 dictionary: organisation of prior chemical knowledge

and guidelines for its use.” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004, **60**, 2184-9.

34. Emsley P., Cowtan K. “Coot: model-building tools for molecular graphics” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004, **60**, 2126-32.

35. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. “Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (ed) Walker M. John.” *The Proteomics Protocols Handbook. Human Press*, 2005, 571-607.

36. Zhu M., Shao F., Innes R. W., Dixon J. E., Xu Z. “The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB: a papain-like fold with a distinct substrate-binding site.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, **101**, 302-7.

37. Adams P. D., Afonine P. V., Bunkóczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L. W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W., McCoy A. J., Moriarty N. W., Oeffner R., Read R. J., Richardson D. C., Richardson J. S., Terwilliger T. C., Zwart P. H. “PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010, **66**, 213-21.

38. McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., Winn M. D., Storoni L. C., Read R. J. “Phaser crystallographic software.” *J Appl Crystallogr.* 2007, **40**, 658-674.

39. Brünger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson

T., Warren G. L. “Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination.” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1998, **54**, 905-21.

40. Brünger A. T. “Version 1.2 of the Crystallography and NMR system.” *Nat Protoc*, 2007, **2**, 2728-33.

41. Headd J. J., Echols N., Afonine P. V., Grosse-Kunstleve R. W., Chen V. B., Moriarty N. W., Richardson D. C., Richardson J. S., Adams P. D. “Use of knowledge-based restraints in phenix.refine to improve macromolecular refinement at low resolution.” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2012, **68**, 381-90.

42. Krissinel E., Henrick K. “Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.” *J. Mol. Biol.* 2007, **372**, 774-97.

43. Yin Q., Lin S. C., Lamothe B., Lu M., Lo Y. C., Hura G., Zheng L., Rich R. L., Campos A. D., Myszka D. G., Lenardo M. J., Darnay B. G., Wu H. “E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6.” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009, **16**, 658-66.

44. Zhang M., Windheim M., Roe S. M., Peggie M., Cohen P., Prodromou C., Pearl L. H. “Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex.” *Mol. Cell*, 2005, **20**, 525-38.



45. Sato Y., Yamagata A., Goto-Ito S., Kubota K., Miyamoto R., Nakada S., Fukai S. “Molecular basis of Lys-63-linked polyubiquitination inhibition by the interaction between human deubiquitinating enzyme OTUB1 and ubiquitin-conjugating enzyme UBC13.” *J. Biol. Chem.* 2012, **287**, 25860-8.
46. Wiener R., Zhang X., Wang T., Wolberger C. “The mechanism of OTUB1-mediated inhibition of ubiquitination.” *Nature*, 2012, **483**, 618-22.
47. Windheim M., Lang C., Peggie M., Plater L. A., Cohen P. “Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide.” *Biochem. J.* 2007, **404**, 179-90.
48. Nakada S., Tai I., Panier S., Al-Hakim A., Iemura S., Juang Y. C., O'Donnell L., Kumakubo A., Munro M., Sicheri F., Gingras A. C., Natsume T., Suda T., Durocher D. “Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1.” *Nature*, 2010, **466**, 941-6.
49. Ashida H., Kim M., Schmidt-Supprian M., Ma A., Ogawa M., Sasakawa C. “A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response.” *Nat. Cell Biol.* 2009, **12**, 22-73.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究テーマの決定から、終始してご指導いただきました、兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー研究所 構造細胞生理部門 水島恒裕教授に深甚な感謝の意を表します。水島博士には、実験全般のご指導はもちろんのこと、博士課程の進学にわたるまで、公私問わず多大なるご支援、ご鞭撻を賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。

査読していただきました、兵庫県立大学 大学院生命理学研究科生体物質化学 I 講座 阪口雅郎教授、同学 生体物質構造学 I 講座 樋口芳樹教授、静岡県立大学大学院 薬学研究院 生命物理化学教室 橋本博教授には、本論文を取りまとめるにあたり多くのご助言をいただきました、心より感謝申し上げます。

コンストラクトのご提供いただきました、千葉大学 真菌医学研究センター 笹川千尋教授、京都大学 白眉センター 金玖秀 特任准教授に、深く感謝申し上げます。金博士には、コンストラクトの提供の他、生化学的な実験手法や結果について、ご教示、ご助言いただきましたことを重ねて感謝いたします。また、結晶回折実験で SPring-8 BL44-XU を利用するにあたり、丁寧にご指導していただきました大阪大学 蛋白質研究所 山下栄樹助教、東浦彰史 助教に感謝申し上げます。

半年という短い期間でしたが、研究を通じての議論にお付き合いいただきました、兵庫県立大学 生命理学研究科 生体情報学 II 講座 西谷秀男 教授、塩見泰史 准教授、林晃世助教および生体情報学 II 講座に所属の皆さまには、貴重なご助言をいただきました、心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、構造細胞生理部門 西尾和也 特任講師、高木賢治 客員教員および構造細胞生理部門の皆さまには、様々な場面でご支援、ご協力をいただき、充実した研究生を送ることができました、深く感謝申し上げます。本当に、ありがとうございました。