

活性化する USP7 の構造変化をクライオ EM で捉える ～不活性化の時は開き、活性化の時は“シュッ”と閉じる～

横浜市立大学大学院生命医科学研究科 構造生物科学研究室（エピジェネティクス構造生命科学）の中村菜緒さん（修士課程 2 年）、吉見早恵さん（2022 年度修士課程修了）、有田恭平教授、東京大学医科学研究所の西山敦哉准教授らを中心とした研究グループは、細胞運命を決定する DNA メチル化^{*1}の制御で働く、脱ユビキチン化酵素 USP7 の活性化に伴う構造変化を、クライオ電子顕微鏡単粒子法^{*2}で明らかにしました（図 1）。本研究成果は、がんや免疫関連疾患の原因タンパク質としても着目されている USP7 の阻害剤の開発に貢献する可能性があります。

本研究成果は、Cell Press 誌「Structure」に掲載されます（日本時間 2025 年 7 月 11 日 午前 0 時公開）。

研究成果のポイント

- DNMT1 の RFTS ドメイン単独は USP7 によるユビキチン化 H3 の脱ユビキチン化を阻害する。
- DNMT1 と結合した USP7 はヒストン H3 の脱ユビキチン化を効率的に行う。
- クライオ電顕で USP7 の活性型と不活性型の構造変化の可視化に成功。
- 活性化に伴う構造変化の解明は、USP7 の阻害剤の新たな作用点の探索につながると期待される。

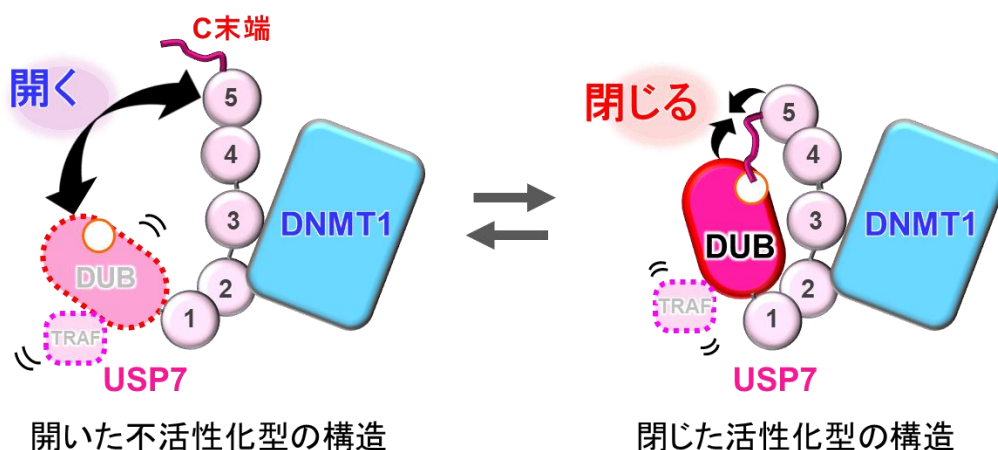


図 1 USP7 の活性化型と不活性化型構造の模式図

脱ユビキチン化酵素 USP7 が、UBL5 ドメインの C 末端と DUB ドメインが近接した閉じた活性化型の構造と（右）、開いた不活性化型の構造（左）を取ることをクライオ電子顕微鏡により可視化した。

右：活性化型 USP7 では、閉じた構造を取る。

研究背景

ヒトの体はおよそ 200 種類以上の細胞から成りますが、すべての細胞は同じ設計図 (DNA) を持ちます。それにもかかわらず、細胞がそれぞれ特有の働きや形を取るのには、設計図に書かれた情報 (遺伝子) のうち、各細胞で使われる遺伝子が異なるためです。ヒトのゲノムに起こる DNA メチル化は、各細胞での遺伝子の使い方を決める重要な生命現象です。細胞が一旦獲得した DNA メチル化はヒトの生涯にわたって正確に受け継がれます。これにより、細胞は正常な機能を保ったまま増殖できます。この「DNA 維持メチル化」とよばれるプロセスが正常でないと、細胞のがん化や神経変性疾患など様々な病気を引き起こすため、DNA メチル化パターンが厳密に制御される仕組みを理解することはとても重要です。

この DNA 維持メチル化では DNA メチル化酵素 DNMT1 とそれを DNA メチル化部位に呼び込むタンパク質 UHRF1 が必須です。UHRF1 は継承されるメチル化部位の近傍にあるヒストン H3 タンパク質をユビキチン化^{*3}します。このユビキチン化された H3 が DNMT1 をメチル化部位に呼び込み、DNA メチル化の正確な継承が行われます。この過程には、ユビキチンをヒストン H3 から外す脱ユビキチン化酵素 USP7 も重要な働きをします。USP7 がユビキチンをヒストン H3 から外せないで、DNA メチル化の継承がおかしくなり、細胞に悪影響をもたらします。今回研究グループは、USP7 がどのようにユビキチンをヒストン H3 から取り除くのかを、クライオ電子顕微鏡を用いてその働きを可視化することで明らかにしました。

研究内容

本研究では、試験管内で USP7 によるユビキチン化 H3 の脱ユビキチン化を再現するための実験系を構築しました。生化学的な方法で 2 カ所のリジン残基がモノユビキチン化されたヒストン H3 (H3ub2) を作り、そこに USP7 タンパク質を混ぜることで、ユビキチンがヒストン H3 から外れる実験系 (脱ユビキチン化実験) を構築しました。次に、ユビキチン化 H3 に結合する DNMT1 の一部である RFTS ドメインを加えて脱ユビキチン化実験を行いました。すると、USP7 はユビキチンをヒストン H3 から外すことができないことがわかりました。これは RFTS ドメインが非常に強く H3ub2 に結合しているため、USP7 の働きを物理的に阻害するからだと考えられます (図 2)。

生化学実験

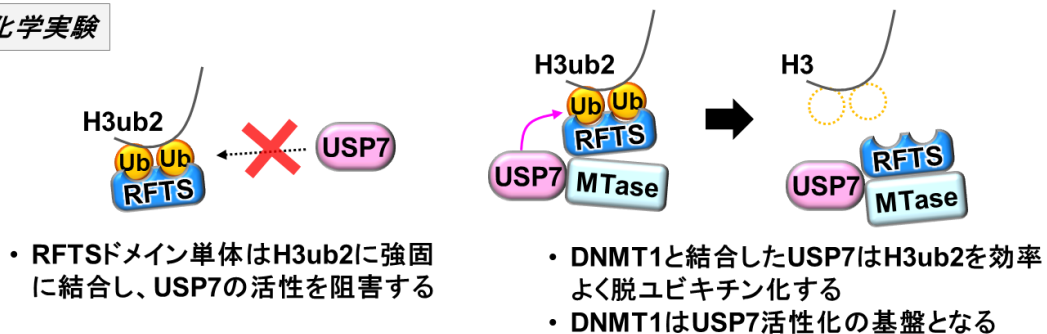


図 2 USP7 は DNMT1 を足場にした状態で、ユビキチン化 H3 を脱ユビキチン化する

報道解禁：日本時間 2025 年 7 月 11 日午前 0 時・11 日朝刊

これまでに、USP7 は DNMT1 と相互作用して複合体を作ることがわかっていたため、DNMT1 のすべての機能ドメインを含むタンパク質を調製して、脱ユビキチン化実験を行いました。すると USP7 は DNMT1 と複合体を作った時のみ、ユビキチンをヒストン H3 から取り除くことができました。つまり、USP7 と DNMT1 の複合体の形成はヒストン H3 の脱ユビキチン化に必須であり、DNMT1 は USP7 が活性化状態になるための足場として機能していることがわかりました（図 2）。

さらに、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法により USP7 が DNMT1 と結合した際の構造状態を調べたところ、USP7 の構造状態には 2 種類あることが明らかになりました（図 3）。

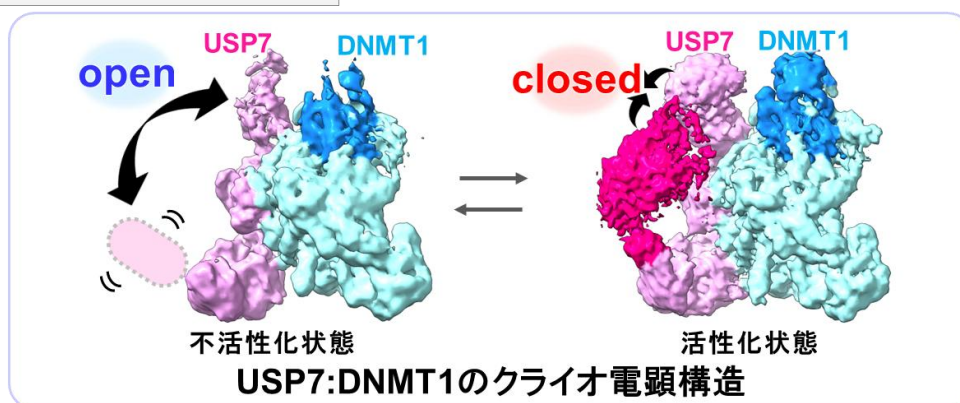
クライオ電子顕微鏡単粒子解析

図 3 クライオ電子顕微鏡を用いて、USP7 の活性化と不活性化の構造状態を決定

USP7 はアミノ末端から TRAF, DUB, UBL1-5 ドメインから成ります。1 つ目の構造状態は、TRAF と DUB ドメインは一定の構造状態を取らず、DUB ドメインの構造が見えない“開いた構造”でした。一方、2 つ目の構造状態は、DUB ドメインの構造が可視化でき、DUB ドメインは UBL1-5 のカルボキシル末端に近接した“閉じた構造”でした。これまでの研究から USP7 の活性化には、UBL1-5 のカルボキシル末端が DUB ドメインと相互作用することが必須であることが報告されていました。したがって、1 つ目の開いた構造は USP7 の不活性化状態、2 つ目の閉じた構造は活性化状態であると考えられます（図 1）。本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いることで、USP7 の活性化に伴う構造変化の可視化に初めて成功しました。

今後の展開

これまでに、USP7 の構造生物学研究は研究技術の制限により機能ドメイン単位で行われてきたので、活性化のメカニズムに関しては限定的な情報しか得られていませんでした。本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いることで全長 USP7 が DNMT1 と結合した状態で、活性化と不活性化の構造状態を取ることを可視化することに成功しました。USP7 はがんや免疫関連疾患を含む多くの病気に関与する酵素であり、その立体構造情報に基づいた阻害剤の開発が注目されています。今回の研究成果に基づいて、さらなる高分解能で USP7 の活性化に伴う構造変化の解明は、阻害剤の新たな作用点の探索につながると期待されます。

報道解禁：日本時間 2025 年 7 月 11 日午前 0 時・11 日朝刊

研究費

本研究は、JSPS 科研費(JP18H02392, JP19H05294, JP19H05741, 24K01967, 25H01301)をはじめ、横浜市立大学学長裁量事業 戦略的研究推進事業 (SK201904) などの助成を受けて行われました。

論文情報

タイトル：Structures of USP7 in active and inactive states bound to DNMT1 revealed by cryo-EM

著者：Nao Nakamura†, Sae Yoshimi†, Amika Kikuchi, Hiroki Onoda, Satomi Kori, Makoto Nakanishi, Atsuya Nishiyama, Kyohei Arita

† Equal contribution

掲載雑誌：Structure

DOI： <https://doi.org/10.1016/j.str.2025.06.005>



横浜市立大学は、様々な取り組みを通じてSDGsの達成を目指します。



用語説明

- *1 DNA メチル化：DNA 中のシトシン塩基の 5 位の炭素にメチル基 (CH₃-) が付加される反応。ヒトでは主に CG 配列中のシトシン塩基がメチル化される。DNA メチル化により、細胞の遺伝子発現が抑制される。生物の体（多細胞の形質）を形成するために必須であり、DNA メチル化異常はがん化の原因の一つである。
- *2 クライオ電子顕微鏡単粒子解析：タンパク質の立体構造を明らかにする手法の一つ。生体分子をマイナス 180 °C 近い極低温状態の氷の中に包埋し、その状態で電子顕微鏡により観測する。観測した生体分子の粒子像を大量に撮影し、得られた数十万の粒子像から 3 次元に再構成することで立体構造を明らかにする手法のこと。2017 年にノーベル化学賞を受賞した研究技術。
- *3 ユビキチン（化）：76 個のアミノ酸からなる球状タンパク質で、基質となるタンパク質のリジン残基に共有結合を介して付加される翻訳後修飾因子。基質に付加されたユビキチンのリジン残基には、さらにユビキチンが数珠状に付加されることがあり、タンパク質分解やシグナル伝達、DNA 損傷修復などの様々な生命現象を制御する。ユビキチンは脱ユビキチン化酵素によって外される。