

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成13年度採択研究代表者

岩井 一宏

(大阪市立大学 大学院医学研究科)

## 「ユビキチン修飾による蛋白質機能変換機構の解析」

### 1. 研究実施の概要

ユビキチンは基質タンパク質に結合してその機能を変換させる翻訳後修飾分子であり、分解のみならず多様なタンパク質機能を制御しています。本研究では、これまで明らかにしてきた酸化修飾を認識するユビキチン修飾系、中でも代表者らが明らかにした酸化蛋白質を選択的に識別するHOIL-1ユビキチンリガーゼを中心に、広くユビキチン修飾系によるタンパク質機能変換機構の解析を進め、今後大幅な増加が予想されるユビキチン関連疾患の解明と治療法開発を目指します。

### 2. 研究実施内容

研究目的：ユビキチン系はE1(活性化酵素)/E2(結合酵素)/E3(ユビキチンリガーゼ)の3種の酵素群の働きにより標的蛋白質にユビキチンを結合させ、その機能を制御する。ユビキチン系が生体制御において重要な役割を担うのは、適切な時期に状況に応じて選択的に基質を認識してユビキチン化できること、すなわち、E3の選択的な基質識別能に依存する。E3の選択的な基質識別には基質の翻訳後修飾が重要な役割を果たしていることが知られている。近年、E3研究はRING fingerを持つ蛋白質などいくつかのユビキチンリガーゼのファミリーが同定されるなど、大きな進展を見せつつあるが、ユビキチン化のシグナルとなる修飾の同定は未だ少ないのが現状である。それゆえ、ユビキチン修飾系の蛋白質機能制御系としての重要性の理解を進めるために、研究代表者らはユビキチン修飾系の始動シグナルとなる蛋白質修飾およびその選択的識別を担うユビキチンリガーゼの同定を進めるとともに、その生理学役割および疾患への関与の研究を進めている。

#### 1-a. 鉄代謝制御蛋白質:IRP2を酸化依存的に識別するユビキチンリガーゼHOIL-1の同定

鉄イオンはヒトの全ての細胞、ほとんどの生命体に必須な微量元素である。その一方で、鉄は反応性に富んでおり、酸素と反応しフリーラジカルの主たる産生源となるため、その代謝は厳密に制御されている。哺乳類細胞における鉄代謝制御系は鉄代謝に関与する蛋白質であるフェリチンや、トランスフェリン受容体のmRNAの非翻訳領域に存在するIRE (iron responsive element)と、細胞質に存在するIRP (iron regulatory protein)と呼ばれるRNA結合蛋白との特異的な結合による。IRPは細胞内鉄イオン濃度が低い場合にのみ

IREと結合し、細胞内遊離鉄イオン濃度を高める様に作用する。一部例外を除き、全ての細胞にIRP1、IRP2の2種の高い相同性を有したIRPが存在する。IRP1は鉄イオンの存在に係わらず安定で、鉄依存性の鉄-硫黄錯体形成により制御されるが、IRP2は鉄イオンの存在下でユビキチン依存的に分解されることにより制御される。研究代表者らはその分解にはIRP2に特異的な73アミノ酸からなるIDD (iron dependent degradation) ドメインの存在と、IRP2蛋白質の酸化が必須であることを明らかにし、蛋白質の酸化修飾が選択的なユビキチン修飾のシグナルとして機能することを示してきた。

IDDドメインがIRP2の鉄依存性の分解に必須であることから、IDDドメインが鉄による酸化修飾・ユビキチンリガーゼの識別部位になると考えられる。そこで、IDDドメインをbaitとした酵母2ハイブリッド法を用いて酸化IRP2を選択的に識別するユビキチンリガーゼの同定を試みた。IDDドメインは酸化状態においてのみE3に識別されると考えられるので、酵母内でIDDドメインの酸化・非酸化状態の制御できれば機能的な2-hybridスクリーニング法を樹立できると考えた。その結果、468アミノ酸からなるRING finger蛋白質を同定し、HOIL-1(Heme-Oxidized IRP2 Ubiquitin-Ligase-1)と名付けた。HOIL-1はN末にユビキチン様ドメイン、C末側にRING Fingerドメインを有しており、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の1つとして同定されたParkinユビキチンリガーゼと似た構造を有している。HOIL-1がIRP2ユビキチンリガーゼであるか否かの検索を進めたところ、1) 細胞内でHOIL-1はIRP2と鉄依存性に結合し、その結合にはユビキチン様ドメインが必須であること、2) RING fingerドメインに変異を持つHOIL-1の導入により、IRP2の鉄依存性分解が阻害されたことから、HOIL-1がIRP2を鉄依存性にユビキチン化するユビキチンリガーゼ活性である可能性が強く示唆された。

#### 1-b. IRP2への鉄結合様式の同定

IRP2はユビキチン化に先立ち、鉄による酸化を受ける。すなわちIRP2は鉄濃度依存的に鉄と結合し、遺伝子発現を制御する鉄センサーとして機能する。鉄の蛋白質への結合にはヘム・鉄-硫黄錯体などが知られているが、IRP2では鉄結合様式は明らかではなかった。IDDドメインにはヘム結合に関与すると考えられるモチーフであるCPモチーフ様の配列が存在する。1) 試験管内で精製IRP2にヘムがIRP2に結合すること、2) 培養液にヘムを添加して培養したIRP2発現バキュロウイルス感染昆虫細胞から回収したIRP2に特異的なヘム結合が認められたことから、IRP2にヘムが結合すると考えられた。

#### 1-c. HOIL-1リガーゼはhemeにより酸化されたIRP2を識別する。

ヘム結合IRP2はHOIL-1によって試験管内でユビキチン化され、その反応は酸素非存在下では有意に減弱された。以上の事実から、IRP2はヘムを介して鉄を感知し、今回同定したIRP2の酸化依存的ユビキチン修飾を担うHOIL-1リガーゼはヘムと酸素の反応により酸化修飾を受けたIRP2を選択的に識別しユビキチン化すると考えられた。以上踏まえ、ヘムのIDDドメインへの結合が、IRP2の選択的なユビキチン修飾の第1ステップとなり、IDDドメインに結合したヘムと、分子状酸素との反応によって生じる活性酸素種により酸化修飾を受けたIDDドメインが、HOIL-1リガーゼに認識されることにより、IRP2がユビキチン化さ

れることを発表し、酸化修飾を識別するユビキチン修飾系の実体の一部を明らかにした (Nature Cell Biology 2003年4月号掲載予定)。

#### 1-d. IRP2における鉄結合部位の立体構造解析

研究代表者らによる従来の研究より、IRP2の鉄依存性分解はIRP2上の特定のアミノ酸配列 (Iron-dependent Degradation Domain; IDDドメイン) の削除により大きく阻害されることが示され、この部位にヘムが結合すると推測できた。このIDDドメインはアミノ酸73残基からなるドメインで、IRP2から切り出しても安定に存在でき、その分子量からもNMR法による立体構造解析が可能であると考えられたことから、クライオプローブを装着した600MHzNMRを用いて立体構造解析を試みた。通常分子生物学的、生化学的解析に比べ、NMR法のような分光学的解析は大量の蛋白質試料を必要とするが、単離されたIDDドメインは大腸菌を用いた発現系で発現、精製が可能であり、測定に十分耐えうる量の蛋白質量は確保できた。また、NMR法による立体構造決定に必須なN-15、C-13などの安定同位体をラベルしたIDDドメインを得るために、この大腸菌による発現系を最小培地に対して培養したところ、通常の培地を用いる場合に比べ収量は少ないものの、培養規模を大きくすることで多次元NMR測定のための蛋白質量は十分確保できる見通しが得られた。

多次元NMR測定のパラメータ等を検討するために、IDDドメインの1次元NMRを測定したところ、そのNMRシグナルがあまり分離していないスペクトルが得られた。このようなシグナルの分離していないNMRスペクトルは、変性蛋白質によく見られるスペクトルで、IDDドメインはその立体構造が解けた状態であると推測できた。しかし、IDDドメインの精製過程において、精製したIDDドメインの一部はシグナルがよく分離したNMRスペクトルを与える成分として単離できた。つまり、IDDドメインは精製条件によって、安定な立体構造を示す可能性も示されたことから、IDDドメインの構造解析については、その精製条件、測定条件等をさらに検討する必要があると考えられた。

#### 2. N型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼSCF<sup>Fbx2</sup>の同定

ユビキチン系はリン酸化・プロリンヒドロキシル化など蛋白質にアミノ酸残基の修飾を識別することは明らかにされていた。研究代表者らは東京都臨床医学総合研究所の吉田雪子博士と共同実験を行い、F-box蛋白質Fbx2がN型糖鎖を特異的に識別すること、Fbx2はSkp1、Cul1、Rbx1と複合体を形成し、ユビキチンリガーゼとして機能すること、Skp1との結合の右派持たないがN型糖鎖と結合できる $\Delta$ F-Fbx2の導入によりER関連分解を阻害できることを示し、N型糖鎖が選択的な識別シグナルとして機能することを示した。また小胞体関連分解は、小胞体内で成熟できない蛋白質の分解系であり、小胞体ストレス応答の一端をなす。成熟できない蛋白質はトランスロコンを介して小胞体から細胞質に逆行輸送されユビキチン-プロテアソーム系で分解される。N型糖鎖の付加は幕コンパートメントにおいてのみ生じることから、N型糖鎖を識別するユビキチンリガーゼがERから逆行された蛋白質を選択的に識別することによりER関連分解のユビキチンリガーゼとして機能していると考えられた。

### 3. 研究実施体制

#### 岩井グループ (岩井 一宏)

大阪市立大学 大学院医学研究科

研究実施項目：①たんぱく質の機能変換系としての酸化修飾系の役割の解析及び酸化修飾を識別するHOIL-1ユビキチンリガーゼの機能解析

概要：

##### ①-a たんぱく質の機能変換系としての酸化修飾系の役割の解析

- a. IDDドメインへのヘム結合様式
- b. ユビキチン修飾系の識別シグナルとして機能する酸化修飾の同定

##### ①-b 酸化修飾を識別するHOIL-1ユビキチンリガーゼの機能解析

- a. HOIL-1のノックアウト・ノックダウン解析
- b. HOIL-1のB型肝炎ウイルス発癌への関与の解析

#### 石森グループ (石森浩一郎)

京都大学 大学院工学研究科

分子設計学研究室

研究実施項目：①たんぱく質の機能変換系としての酸化修飾系の役割の解析

概要：

##### ①-a たんぱく質の機能変換系としての酸化修飾系の役割の解析

- a. IDDドメインへのヘム結合様式
- b. IRP2蛋白質の構造解析

### 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

#### (1) 論文 (原著論文) 発表

- Sasaki, A., Masuda, Y., Iwai, K., Ikeda, K. and Watanabe, K.  
A RING finger protein Praja1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1.  
**J. Biol. Chem.** 277: 22541-22546, 2002.
- Amir, R. E., Iwai, K. and Ciechanover, A.  
The NEDD8 pathway is essential for SCF-beta-TrCP - mediated ubiquitination and processing of the NF-kB precursor p105  
**J. Biol. Chem.** 277: 23253-23259, 2002.
- Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Minoru Yoshida, M., Tanaka, K. and Tai, T.  
E3 ubiquitin-ligase that recognises sugar chains  
**Nature** 418: 438-442, 2002.
- Ashizuka, M., Fukuda, T., Nakamura, T., Shirasuna, K., Iwai, K., Izumi, H.,

Kohno, K., Kuwano M. and Uchiumi, T.

A novel translational control through Iron-Responsive Element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2

**Mol. Cell. Biol.** 22:6375-6383, 2002.

- Ishikawa, H., Yun, B. G., Takahashi, S., Hori, H., Matts, R. L., Ishimori, K., Morishima, I. NO-induced Activation Mechanism of the Heme-regulated eIF2a Kinase

**Journal of American Chemical Society** 124: 13696-13697, 2002

(2) 特許出願

なし