

「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 教授)

「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

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たんぱく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。それゆえ、ユビキチン修飾系のたんぱく質機能制御系としての重要性の理解にはユビキチン修飾の始動シグナルとして働く標的たんぱく質の翻訳後修飾の同定と、その翻訳後修飾を選択的に識別するユビキチンリガーゼの機能の解析が重要となる。

研究代表者らは鉄代謝の制御たんぱく質・IRP2(iron regulatory protein 2)の鉄依存性分解の研究の従事してきた。IRP2は細胞質に存在するたんぱく質であり、細胞内鉄イオン濃度が低いときにのみトランスフェリン受容体やフェリチンなどの鉄代謝にかかわる分子をコードするmRNA上に存在するIRE (iron responsive element)と選択的に結合し、細胞の鉄代謝を制御する。ヒトには2つのIRP1, IRP2の高い相同性を有したIRPが存在しており、いずれのIRPも鉄により直接その活性が制御されている。IRP1は安定なたんぱく質であり、鉄硫黄錯体の着脱により制御されているのに対し、IRP2はその特異的なIDDドメイン (iron dependent degradation domain) の鉄による酸化修飾が、選択的なユビキチン修飾のシグナルとなること、相同領域にIDDドメインを有したIRP1変異体(IRP1+73)も鉄依存

性に分解することを示してきた。また、CREST研究開始と前後してIRP2にヘムが結合すること、酸化IRP2を選択的に識別するユビキチンリガーゼ：HOIL-1を同定した。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。

また、研究代表者らは昨年度よりチームに参加した東京都臨床医学総合研究所・吉田雪子博士と共同でN型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼSCF^{Fbs1}を同定した。

上記を踏まえ、本CREST研究では、識別シグナルを形成するたんぱく質の酸化修飾の同定、HOIL-1リガーゼによる酸化たんぱく質識別メカニズム、酸化修飾・糖鎖付加の新規たんぱく質識別様式を持つユビキチンリガーゼの生理的意義の検索を中心に研究を進めている。

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の同定

IRP2は鉄存在下で結合するヘムと酸素によりIRP2に生じる酸化変化が引き金となってHOIL-1ユビキチンリガーゼを選択的に識別されることにより、ユビキチン依存的に分解される。それゆえ、IDDドメインへのヘムの結合様式、IRP2の分解に必須なIDDドメイン内のアミノ酸の同定が必須である。本年度はIDDドメインへのferricヘムの結合に必須なアミノ酸残基が、IRP2のCysteine 201であることを同定した。しかしながら、Cys201をAlaに変異しただけではIRP1+73は安定化せず、C201Aに加えHis204のAlaへの置換があって初めて安定化することが明らかとなった。現在、His204と酸化修飾とに関連について検索を進めている。

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のノックアウト解析

細胞レベルおよび個体レベルにおけるHOIL-1の機能解析を進めており、細胞レベルでは、高頻度に相同組換えを生じることが知られているトリDT40細胞を用いて、HOIL-1ノックアウト細胞の作成を進め、HOIL-1ノックアウト細胞を樹立した。現在、HOIL-1ノックアウトDT40細胞を用いて、過酸化水素、アミノ酸アナログなどで処理してその耐性を解析することにより、HOIL-1リガーゼの酸化ストレス、異常たんぱく質分解における役割を検索を進めている。予備的な結果ではあるが、驚いたことにHOIL-1欠損細胞は過酸化水素にやや耐性となることから、確認とその分子メカニズムの検索を進めている。

b. HOIL-1のB型肝炎ウイルス発癌への関与の解析

HBxはB型肝炎ウイルス発癌に必須な因子である。HBxは種々の遺伝子の転写亢進を生じることが示されているが、HBx自身はDNA結合活性を示さないなど、その機能発現メカ

ニズムは不明である。HOIL-1はHBx結合蛋白質としても報告されている。そこでHOIL-1の共発現によりHBxの転写能への影響を検索したところ、HOIL-1はHBxの転写活性を亢進させることが明らかとなった。

②N型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼの機能解析

研究代表者、分担者らはSCF^{Fbs1}ユビキチンリガーゼがN型糖鎖を選択的に識別することを示してきたが、脳特異的に発現するFbs1と高い相同性を有し、全ての臓器に普遍的に発現しているFbs2もN型糖鎖を識別することを明らかにした。さらに、Fbs1の構造解析を行い、糖鎖結合様式を明らかにした。

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
②N型糖鎖を選択的に識別する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

②N型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼの機能解析

b. Fbs1、Fbs2ノックアウトマウスの作成

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

吉田グループ (吉田雪子)

東京都臨床医学総合研究所

腫瘍免疫

研究実施項目：N型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼの構造および機能解析

概要：

②N型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼの機能解析

1. a. Fbs2, Fbs3の糖鎖結合の可能性、基質の検索

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., Rouault, T.A., Morishima, I., Minato, N., Ishimori, K., and Iwai, K. Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. **Nature Cell Biol.** 5:336-340, 2003.
- Ishida, D., Kometani, K., Yang, H., Kakugawa, K., Masuda, K., Iwai, K., Suzuki, M., Itohara, S., Nakahata, T., Hiai, H., Kawamoto, H., Hattori, M. and Minato, N. Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in SPA-1-deficient mice. **Cancer Cell.** 4:55-65, 2003.
- Tosha T, Yoshioka S, Takahashi S, Ishimori K, Shimada H, Morishima I. NMR study on the structural changes of cytochrome P450cam upon the complex formation with putidaredoxin. Functional significance of the putidaredoxin-induced structural changes. **J Biol Chem.** 278:39809-39821, 2003.
- Iwai K. An ubiquitin ligase recognizing a protein oxidized by iron: implications for the turnover of oxidatively damaged proteins. **J. Biochem. (Tokyo).** 134:175-82, 2003.
- Egawa T, Yoshioka S, Takahashi S, Hori H, Nagano S, Shimada H, Ishimori K, Morishima I, Suematsu M, Ishimura Y. Kinetic and spectroscopic characterization of a hydroperoxy compound in the reaction of native myoglobin with hydrogen peroxide. **J Biol Chem.** 278:41597-41606, 2003.
- Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K. and Tai, T. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. **J Biol Chem.** 278:43877-43884, 2003.
- Meyron-Holtz, E.,G., Ghosh, M.,C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U.,V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P. and Rouault, T.,A. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. **EMBO J.** 23:386-

395, 2004.

- Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S.J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T. and Tanaka, K. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 11: 365-70, 2004.
- Inuzuka T, Yun BG, Ishikawa H, Takahashi S, Hori H, Mats RL, Ishimori K, Morishima I. Identification of crucial histidines for heme binding in the N-terminal domain of the heme-regulated eIF2alpha kinase. **J Biol Chem.** 20:279:6778-6782, 2004.
- Uzawa T, Akiyama S, Kimura T, Takahashi S, Ishimori K, Morishima I, Fujisawa T. Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of alpha-helical content and compactness. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 101:1171-1176, 2004.
- Matsuura K, Yoshioka S, Takahashi S, Ishimori K, Mogi T, Hori H, Morishima I. Dioxygen reduction by bo-type quinol oxidase from Escherichia coli studied by submillisecond-resolved freeze-quench EPR spectroscopy. **Biochemistry.** 43:2288-2296, 2004.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：0件）