

「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H0IL-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

昨年のノーベル化学賞がエネルギー依存的な細胞内たんぱく質分解系である、ユビキチン依存性たんぱく質分解系の発見の業績で、我々の共同研究者であるアロン・チカノバー教授を含めた3人に与えられた。ユビキチン修飾系は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、ATP依存的に標的たんぱく質にユビキチンを連続的に結合させてポリユビキチン鎖を形成し、そのポリユビキチン鎖がマークとなって標的たんぱく質がプロテアソームにより選択的に識別されて分解へと至るシステムである。現在ではユビキチン修飾系は細胞周期・シグナル伝達・DNA修復・転写調節・代謝制御など数多くの生命現象を制御する重要なたんぱく質翻訳後修飾系であることが報告されている。加えて、ユビキチン修飾系はたんぱく質分解以外の機能、脱ユビキチン化酵素も存在などから、リン酸化に比肩し得る可逆的なたんぱく質翻訳後修飾系であると認識されている。

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、生体内に数100種類存在すると考えられているE3:ユビキチンリガーゼが、時を得て選択的に標的たんぱく質を識別出来ることによる。E3による選択的識別には標的たんぱく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役割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。我々はユビキチン修飾系によって識別される標的たんぱく質の翻訳後修飾に焦点を絞って研究を進めてきた。

本研究では1. たんぱく質の酸化、2. N型糖鎖付加がトリガーとなるユビキチン修飾系の研究を進めている。

1. たんぱく質の酸化がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

我々は哺乳類における鉄代謝制御の研究に従事し、中核を担うたんぱく質であるIRP2(iron regulatory protein 2)が、鉄存在下にてユビキチン依存的に分解されることにより活性が制御されること、その鉄依存性分解にはIRP2に特異的な73アミノ酸からなるIDD(iron-dependent degradation)ドメインが必須であることを示してきた。さらに、IRP2たんぱく質の酸化修飾が鉄存在下における選択的なユビキチン識別のシグナルとして機能することを示すとともに、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明らかに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てきた。

a. IRP2のヘム依存性分解メカニズムの解析

本研究ではIRP2のヘム依存性分解機構の研究を進め、鉄依存性分解に必須であるIDDドメインがその結合部位であること、IDDドメイン内のCys201とHis204の両者をAlaに置換することによりIRP2を安定化することを昨年度までに明らかにしてきた。本年度は、まず、C201が Fe^{3+} -ヘムとH204は Fe^{2+} -ヘムとの結合に関与することを示した。IDDドメインのCys201、His204を含む領域はヘムによって制御を受けるたんぱく質のヘム結合部位であるHRM(heme regulatory motif)と相同性を有しているが、IRP2のHRMはHisの位置が他のHRMと異なっていることから、IRP2のHRMをHisが違う位置に存在するHRMと置換したところIRP2が安定化したこと、HOIL-1ユビキチンリガーゼとの結合が弱くなった。以上から、IRP2のHRMはヘム結合領域・ヘムによる酸化領域・HOIL-1ユビキチンリガーゼによる識別領域として機能することを明らかにした。(投稿中)。

b. HOIL-1ユビキチンリガーゼの機能解析

HOIL-1はたんぱく質酸化を識別するリガーゼとして初めて同定されたりガーゼであり、その機能検索を進めている。RING型リガーゼには単体で機能するものと複合体を形成して機能するものが存在する。HOIL-1はRING finger型ユビキチンリガーゼであり、一次構造からHOIL-1は単体で機能する可能性が示唆される。ゲル濾過や質量分析等によりHOIL-1は分子量600kD程度の分画に存在し、新規RINGフィンガーたんぱく質:HOIP(HOIL-1 interacting protein)と複合体を形成して機能することを明らかにした。HOIL-1、HOIPともにユビキチン結合モジュールであるNp14型のzincフィンガーを有したRING型リガーゼであり、HOIL-1/HOIP複合体がユビキチンを基質としてポリユビキチン鎖を形成し得ること、すなわち、ポリユビキチン鎖伸長活性(E4活性とも呼ばれる)を示した(投稿準備中)。

2. N型糖鎖がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

ユビキチン修飾系はたんぱく質翻訳後修飾系であることから、たんぱく質自身を識別してユビキチンを付加するシステムであると考えられていた。しかしながら、我々はN型糖

鎖結合たんぱく質としてF-Boxたんぱく質：Fbs1/Fbx2/NFB42を同定した。Fbs1はFbs1-5の5種類からなるファミリー蛋白質であり、Fbs1のみならずユビキタスに発現するFbs2がユビキチンリガーゼであるSCF複合体すなわちSCF^{Fbs1}、SCF^{Fbs2}を形成し、たんぱく質自身ではなく付加しているN型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼとして機能することを明らかにした。

本研究ではN型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼの生理的機能を中心に研究を進めている。N型糖鎖は小胞体、ゴルジ体で膜・分泌たんぱく質に付加されるのに対し、ユビキチン修飾系は細胞質・核に存在するので、N型糖鎖付加たんぱく質とユビキチン修飾系は細胞内の異なるコンパートメントに存在する。しかしながら、膜・分泌たんぱく質には小胞体関連分解(ERAD)と呼ばれる品質管理メカニズムが存在し、正常にフォールディングしないたんぱく質は小胞体から逆行輸送され、細胞質でユビキチン依存性に分解される。我々はFbs1、Fbs2はERADに関与するユビキチンリガーゼの基質識別サブユニットとして機能することを示した。また、Fbs1の構造解析の結果、Fbs1は全てのN型糖鎖に共通したたんぱく質結合にあずかる糖鎖の基部を選択的に識別することを明らかにした。本年度はFbs1、Fbs2は変性糖たんぱく質により強い結合能を有することも明らかにし、Fbs1、Fbs2は小胞体から逆行輸送された、変性した糖たんぱく質を選択的に識別するのに適した識別様式を有していることを示した (EMBO rep. 2005)。

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. たんぱく質の酸化がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析
2. N型糖鎖がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

概要：

1. たんぱく質の酸化がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析
 - a. IRP2のヘム依存性分解メカニズムの解析
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
 - b. HOIL-1ユビキチンリガーゼの機能解析
HOIL-1リガーゼのタンパクレベルでの機能解析
HOIL-1のノックアウト・ノックダウン解析
2. N型糖鎖がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析
 - 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. たんぱく質の酸化がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

概要：

1. たんぱく質の酸化がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

a. IRP2のヘム依存性分解メカニズムの解析

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：

2. N型糖鎖がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

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

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Mizushima T, Hirao T, Yoshida Y, Lee SJ, Chiba T, Iwai K, Yamaguchi Y, Kato K, Tsukihara T, Tanaka K. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. **Nat Struct Mol Biol.** 11:365-370, 2004.
- Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. **IUBMB Life.** 56 : 193-201, 2004
- Tenno T, Fujikawa K, Tochio H, Iwai K, Morita EH, Hayashi H, Murata S, Hiroaki H, Sato M, Tanaka K and Shirakawa M. Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. **Genes Cells.** 9: 865-875, 2004.
- Inuzuka T, Yun BG, Ishikawa H, Takahashi S, Hori H, Matts 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.** 279:6778-6782, 2004.
- Yoshida Y, Adachi E, Fukiya K, Iwai K, Tanaka K. Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. **EMBO Rep.** 3:239-244, 2005
- Yang J, Ishimori K, O'Brian MR. Two heme binding sites are involved in the regulated degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. **J Biol Chem.** 280:7671-7676, 2005.
- Kobayashi M, Takaori-Kondo A, Miyauchi Y, Iwai K, Uchiyama T. Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-cullin5-elonginB-elonginC

complex is essential for Vif function. **J. Biol. Chem.** 2005 in press.