

「生体防御のメカニズム」
平成8年度採択研究代表者

田中 啓二

(財)東京都臨床医学総合研究所 部長)

「超分子システムによる免疫識別の分子機構解明」

1. 研究実施の概要

自己と非自己の免疫識別の分子的基礎は、主要組織適合性複合体(MHC)に結合するMHCリガンド(抗原ペプチド)の生成機構である。超分子蛋白質複合体であるプロテアソームは、内在性抗原のプロセシング酵素として機能する。本研究では、MHCクラスII結合ペプチド生成の分子機構についてプロテアソームの構造-機能変換の仕組みを研究することによって明らかにすると共に、併せてその制御機構の解明を目指してきた。本年度は、二種の活性化因子を併せもったハイブリッド型プロテアソームを発見し、本酵素が新しい内在性抗原のプロセシング酵素として作用する可能性を提唱した。現在、ハイブリッド型プロテアソームの遺伝学的な機能解析を進めている。

2. 研究実施内容

本研究班は、(1)プロテアソームの構造・機能解析グループ、(2)プロセシング機構解析グループ、(3)免疫識別評価グループ、から構成された実践的な組織によって組織されている。各プロジェクトの研究実施内容を以下に記す。

(1) プロテアソームの構造・機能解析グループの研究実施内容。

本年は、真核生物のATP依存性プロテアーゼであるプロテアソームが、標的蛋白質を識別する機構についての研究を進めた。プロテアソームは、触媒ユニット(CP: catalytic particle)と調節ユニット(RP: regulatory particle)から構成された分子量2.5 MDaの巨大な多成分複合体であり、主としてユビキチン化された蛋白質を選択的に分解する酵素である。今日、細胞内蛋白質の大部分がこのユビキチン/プロテアソーム系で処理されると考えられている。従って、プロテアソームによる蛋白質分解作用を理解するためには、「分解目印」として機能するポリユビキチン(pUb)鎖を識別する分子機構の解明が最も重要である。これまでに我々を含めた国内外の研究から、このpUb鎖の識別を司る分子として、約20種のサブユニット群から構成されるRPの中のRpn10(regulatory particle non-ATPase 10)がポリユビキチン鎖レセプター(pUb-R)として作用することが判明している。さらに我々は、昨年度から本年度に至る研究で、マウス及びヒトのpUb-Rにおいて5

種のアリソフォーム (pUb-R1 ~ pUb-R5) の存在を見出すと共に、これらが発生依存的なalternativeスプライシングによって、一つの遺伝子から派生してくることを明らかにした。興味深いことに、その中のpUb-R5を有するプロテアソームは、脳に特異的に発現しており、全ての組織細胞に発現しているpUb-R1をもった普遍型プロテアソームと機能的に異なっていることを見出した。そこで、pUb-Rの分子多様性の意義を解析する為、この遺伝子の欠損マウスを作製した結果、胚生致死になることが判明した。

ユビキチンの機能解析

平成11年度は、ユビキチン (Ub) リガーゼとユビキチン様蛋白質Ubl (Ub-like protein) についての研究が著しく進展した。ここ数年、ユビキチンシステムの研究領域では、標的蛋白質にユビキチンを連結させる酵素であるユビキチンリガーゼ (Ub活性化酵素E1及びUb結合酵素E2に引き継ぐ意味からE3とも呼ばれる) は、標的基質の運命を左右する最重要酵素として認識されてきたが、幾つかの先駆的例を除いて、E3の分子的实际体は不透明であった。そこで、E3の研究を精力的に進めた結果、平成11年度に2種の新しいE3を発見することに成功した。一つは、I Bのユビキチン化に働くりE3としてSCFFbw1複合体を同定したことである。I Bは、様々な機能を担う転写因子NF- Bの負の制御因子であり、そのシグナル依存的なリン酸化とこのリン酸化修飾に連携したユビキチン依存的な選択的分解が、NF- Bのシグナル伝達系において中枢的な役割を担っていることが判明していたが、多くのグループが激しく競合しながら探索していたI Bリガーゼの実際体は、長い間不明であった。本年度、我々を含めた国内外の複数の研究グループが、ほぼ同時期にSCFFbw1がI Bのユビキチンリガーゼであることを報告した。さらに我々はSCFFbw1と協同して働く300-kDaの新しい活性化因子を同定すると共に新規な翻訳後修飾による制御機構 (後述) も見出した。

さて、我々が見出したもう一つのユビキチンリガーゼは"Parkin"である。1998年、常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の原因遺伝子産物Parkinが、順天堂大・慶応大のグループによって発見された。ParkinはN末端領域にUbl (Ubiquitin-like) ドメインをもちC末端領域にRING-Fingerモチーフをもつ分子として記載されたが、その機能は全く不明であった。我々は、上記のグループと提携しながら、ParkinがRING-Fingerモチーフで特異的なE2 (UbcH7) をリクルートし、Ublドメインで標的分子を識別する新規なユビキチンリガーゼとして作用することを発見した。これまでに調べた患者の遺伝子変異では、全てこの機能が喪失していることから、今回得られた結果は、AR-JPの発症原因の本態を突き止めた事を意味している。即ち、ユビキチン/プロテアソーム系の破綻

が黒質神経細胞死を誘発してパーキンソン病様症状を引き起こすことを示唆している。本研究は、神経変性疾患が蛋白質の品質管理機構の異常によって発生することをはじめて解明したことになり、今後、ユビキチン化蛋白質の異常蓄積が恒常的に観察されるアルツハイマー病やハンチントン舞踏病など他の神経変性疾患の研究にも多大な影響を与えると予想される。

他方、我々は、代表的なUblモディファイアー分子の一つである Rub-1 (modifier related to ubiquitin-1)の新しいライゲーション機構を構成する活性化酵素E1と結合酵素E2を世界に先駆けて発見すると共にそのターゲット分子がユビキチンリガーゼ SCF複合体のサブユニットcullinであることを見出した。そしてcullin-1のRub-1修飾が、前述のE1リガーゼSCFFbw1の活性を顕著に増強することをインビトロの再構成実験により証明した。さらに、Rub-1修飾が分裂酵母のSCFPOP1の機能に必須であることを遺伝学的手法により明らかにすると共に、ごく最近Rub-1化を触媒するE1の遺伝子欠損マウスが早期に胎生致死になることも解明して、この修飾システムの生物学的重要性をインビボで確認した。本研究は、Rub-1が新規な蛋白質の機能変換システムとして作動していることを示しており、今後のユビキチン研究に計り知れない影響を与えると推察される。

(2) プロセッシング機構解析グループの研究実施内容

本年度の研究は、プロテアソームが内在性抗原のプロセッシング酵素として免疫制御に関与することの機構と意義を解明するプロジェクトとして立案した。当該研究グループでは、これまで研究代表者のグループと提携して、ガンマ型インターフェロン (IFN- γ) に応答して「免疫プロテアソーム」が造成され、内在性抗原の迅速な処理に適応することを明らかにしてきた。さらに本年、IFN- γ がもう一つの免疫型酵素である「ハイブリッドプロテアソーム」を造成することを見出した。これまでに、プロテアソームの調節ユニット(RP)としてPA700とPA28の二種の存在が知られており、これらは独立に触媒ユニット(CP)に会合して2種類の活性型プロテアソーム複合体を形成すると考えられていた。ところが、ごく最近、我々は細胞内に二つの調節因子「PA700」と「PA28」を共有したプロテアソームが存在することを突き止め、この新型酵素を「ハイブリッドプロテアソーム」と命名した。興味深いことに、このハイブリッドプロテアソームはIFN- γ 処理によって強く誘導されることが判明した。併せて我々は、ハイブリッド型プロテアソームが26Sプロテアソーム (homo-PA700 complex) と同様にATP依存性プロテアーゼとして作用することを証明すると共に、本酵素が本質的に重要な内在性抗原のプロセッシング酵素である可能性を示唆した。

(3) 免疫識別評価グループの研究実施内容

本プロジェクトは抗原提示担当遺伝子群の分子進化研究から、免疫システムが構築されてきた原理を解明し、将来における免疫識別評価に備えることを最大の目標にしている。平成10～11年度にかけては、PA28の分子進化研究を進め、 β 型サブユニットが祖先遺伝子であり、 α 型インターフェロンに応答するとサブユニットの遺伝子が、TAP遺伝子・MHC遺伝子・免疫プロテアソーム遺伝子らとほぼ同時期に太古の染色体重複によって造成されたことを明らかにした。

また、MHC領域に存在するIFN- γ 誘導性のdi-ubiquitinについてもその機能解析を試み、予備的であるが、細胞内蛋白質を標的とした新しいモディファイアー分子として作用する知見を得つつある。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Furukawa, H., Murata, S., Yabe, T., Shimbara, N., Keicho, N., Kashiwase, K., Watanabe, K., Ishikawa, Y., Akaza, T., Tadokoro, K., Tohma, S., Inoue, T., Tokunaga, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., and Juji, T. (1999) Splice acceptor site mutation of the TAP1 gene in HLA class I deficiency. *J. Clin. Inv.* 103, 755-758.

Suzuki, H., Chiba, T., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Furuichi, K., and Tanaka, K. (1999) In vivo and in vitro recruitment of an I β -ubiquitin ligase to I β phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 121-126.

Suzuki, H., Chiba, T., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Suzuki, T., Ichiyama, A., Ikenoue, T., Omata, M., Furuichi, K., and Tanaka, K. (1999) I β ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins TrCP1 and TrCP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 127-132.

Mugita, N., Honda, Y., Nakamura, H., Fujiwara, T., Tanaka, K., Omura, S., Shimbara, N., Ogawa, M., Saya, H., and Nako, M. (1999) The involvement of proteasome in myogenic differentiation of murine myocytes and human rhabdomyosarcoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 3, 127-137.

Urano, T., Yashiroda, H., Muraoka, M., Tanaka, K., Hosoi, T., Inoue, S., Ouchi, Y., Tanaka, K., and Toyoshima, T. (1999) p57Kip2 is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor β 1. *J. Biol. Chem.* 274, 12197-12200.

Fujiwara, T., Suzuki, M., Tanigami, A., Ikenoue, T., Omata, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (1999) The TCP1 gene encoding a human F-box/WD40 repeat protein map to chromosome 10q24-q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 58, 104-105.

Combaret, L., Rallie, C., Taillandier, D., Tanaka, K., and Attaix, D. (1999) Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing

rats. *Mol. Biol. Rep.* 26, 95-101.

Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Osawa, T., Toyokuni, S., Tanaka, K., and Uchida, K. (1999) 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress in vivo. Identification of the proteasome as a target molecule. *J. Biol. Chem.* 274, 23787-23793.

Kawakami, T., Suzuki, T., Baek, S. H., Chung, C. H., Ichiyama, A., Hirano, H., Omata, M., Tanaka, K. (1999) Isolation and characterization of cytosolic and membrane-bound deubiquitinating enzymes from bovine brain. *J. Biochem.* 126, 612-623.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (1999) ATP-dependent sequestration of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome, a process coupled to unfolding, is a prerequisite for the degradation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7216-7227.

Hiyama, H., Yokoi, M., Masutani, C., Sugasawa, K., Maekawa, T., Tanaka, K., Hoeijmakers, J.H.J., and Hanaoka, F. (1999) Interaction of hHR23 with S5a: The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* 274, 28019-28025.

Suzuki, T., Ichiyama, A., Saitoh, H., Kawakami, T., Omata, M., Chung, C. H., Kimura, M., Shimbara, N., and Tanaka, K. (1999) A new 30 kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 274, 31131-31134.

Makino, Y., Yoshida, T., Yogosawa, S., Tanaka, K., Muramatsu, M., and Tamura, T. (1999) Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes to Cells* 4, 529-539.

Suzuki, H., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Furuichi, K., Chiba, T., and Tanaka, T. (1999) Identification of a novel 300-kDa factor termed I B E3-F1 that is required for ubiquitylation of I B . *FEBS Lett.* 458, 3430348.

Takeuchi, J., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Tanaka, K., and Toh-e, A. (1999) Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6575-6584.

Baek, S. H., Yoo, Y. J., Tanaka, K., and Chung, C. H. (1999) Molecular cloning of chick UCH-6 which shares high similarity with human UCH-L3: Its unusual substrate specificity and tissue distribution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 235-240.

Hori, T., Osaka, F., Chiba, T., Miyamoto, C., Okabayashi, K., Shimbara, N., Kato, S., and Tanaka, K. (1999) Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* 18, 6829-6834.

Murata, S., Kawahara, K., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K., and Chiba, T. (1999) Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28. *J. Biol. Chem.* 274, 38211-38215.

Mitsui, K., Nakanishi, M., Ohtsuka, S., Norwood, T. H., Okabayashi, K., Miyamoto, C., Tanaka, K., Yoshimura, A., and Ohtsubo, M. (1999) A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 115-122.

Yanagawa, Y., Ohhashi, A., Murakami, Y., Tanaka, K., Hashimoto, J., Sato, T., and Nakagawa, H. (1999) Purification and characterization of the 26S proteasome from cultured rice (*Oryza sativa*) cells. *Plant Science* 149, 33-41.

Suzuki, H., Chiba, T., Suzuki, T., Fujita, T., Ikenoue, T., Omata, M., Furuichi, K., Shikama, H., and Tanaka, K. (2000) Homodimer of two F-box proteins TrCP1 or TrCP2 binds to I κ B α for signal-dependent ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 275, 2877-2884.

Tone Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Fujimuro, M., Yokosawa, H., and Toh-e, A. (2000) Nob1, a new essential gene, associates with the 26S proteasome of growing *Schaccaromyces cerevisiae* cells. *Gene* 243, 37-45.

Minami, Y., Kawasaki, H., Minami, M., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Yahara, I. (2000) A critical role of the proteasome activator PA28 in the Hsp-90-dependent protein folding. *J. Biol. Chem.* 275, 9055-9061.

Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., Sassa, H., Tanaka, K., Sherman, F., and Hirano, H. (2000) Na-Acetylation and proteolytic activity of the yeast 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 4635-4639.

Kim, K. I., Baek, S. H., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, S., Saitoh, H., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2000) A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J. Biol. Chem.* 275, 14102-14106.

Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K. B., and Tanaka, K. (2000) Hybrid proteasomes: Induction by interferon- γ and contribution to the ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 275, 14336-14345.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (2000) Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 1-6.

Tanaka, K., and Kawahara, H. (2000) Proteasome and apoptosis. in "Proteases as Targets for Therapy" *Handbook of Experimental Pharmacology.* (eds. K. von der Helm and B. Korant) 341-358. Springer-Verlag, New York.

- Tanaka, K., Tanahashi, N., and Shimbara, N. (2000) Proteasomes and MHC class I-peptide generation. in "Major Histocompatibility Complex: Evolution, Structure, and Function" (ed. by M. Kasahara) 203-212. Springer-Verlag Tokyo, Inc. Tokyo.
- 笠原正典, 村田茂穂, 田中啓二 : 抗原プロセッシングと遺伝子. "遺伝子医学" 3, 136-143 (1999)
- 田中啓二 : 生命を解く鍵 - ユビキチンとプロテアソーム. 細胞工学・特集号"ユビキチンは細胞周期を制御する : タンパク質分解から見た細胞周期制御" 18, 610-621 (1999)
- 田中啓二 : ユビキチンライゲーションシステム - 発見から現在までの軌跡 - . "蛋白質核酸酵素" 44, 737-743 (1999)
- 新原直樹, 田中啓二 : 内在性抗原提示と免疫識別の分子機構 . "臨床免疫" 331-342 (1999)
- 田中啓二 : 免疫プロテアソームとハイブリッド型プロテアソーム - 内在性抗原のプロセッシング酵素. "最新医学" 210-217 (1999)
- 田中啓二, 棚橋伸行, 村田茂穂 : プロテアソームによる抗原プロセッシング機構 . 実験医学, 17, 1523-1528 (1999)
- 田中啓二 : PEST配列「BioScience用語ライブラリー - 細胞内シグナル伝達」第2版 pp90-91, 羊土社 (1999)
- 川原裕之, 田中啓二 : ユビキチンとプロテアソーム「医学のための基礎分子細胞生物学」第2版 28-29, 南山堂 (1999)
- Kasahara, M. The chromosomal duplication model of the major histocompatibility complex. Immunol. Rev. 167: 17-32, 1999.
- Kirchhoff, C., Osterhoff, C., Kasahara, M. and Ivell, R. Molecular biology of sperm maturation - New strategies for male contraception? In: M. Rajalakshmi and P. D. Griffin (eds.): Male Contraception: Present and Future, pp. 103-123, World Health Organization, Geneva, 1999.
- Nishi, S., Hoshi, N., Kasahara, M., Ishibashi, T. and Fujimoto, S. Existence of human DAZLA protein in the cytoplasm of human oocytes. Mol. Hum. Reprod. 5: 495-497, 1999.
- Kasahara, M. Genome dynamics of the major histocompatibility complex. Immunogenetics 50 (special anniversary issue): 134-145, 1999.
- Flajnik, M. F., Ohta, Y., Greenberg, A. S., Salter-Cid, L., Carrizosa, A., Du Pasquier, L. and Kasahara, M. Two ancient allelic lineages at the single classical class I locus in the Xenopus MHC. J. Immunol. 163: 3826-3833, 1999.
- Kasahara, M. Genome paralogy: A new perspective on the organization and origin of

the major histocompatibility complex. In: L. Du Pasquier and G. W. Litman (eds.): Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System, Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 248, pp. 53-66, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 2000.

Kasahara, M., Yawata, M. and Suzuki, T. The MHC paralogous group: Listing of members and a brief overview. In: M. Kasahara (ed.): Major Histocompatibility Complex: Evolution, Structure, and Function, pp. 27-44, Springer-Verlag, Tokyo-Berlin-Heidelberg-New York, 2000.

笠原正典：顎と免疫系．文部省特定領域研究「免疫病の分子機構とその修復」ニユース・レター 6: 10-11, 1999.

笠原正典：自己と非自己の識別．アエラムック「生物学がわかる」, 朝日新聞社, 東京, pp. 30-33, 1999.

Kasahara, M. (ed.) Major Histocompatibility Complex: Evolution, Structure, and Function. Springer-Verlag, Tokyo-Berlin-Heidelberg-New York, pp. 1-561, 2000.

Sasaki, T., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. (2000) Extragenic suppressors that rescue defectis in the heat stress responses of the budding yeast mutant tom1. Mol. Gen. Genet. 262, 940-948.

Toh-e, A., and Oguchi, T. (2000) An improved integration replacement/disruption method for mutagenesis of yeast essential genes. Gene. Genet. Sys., 75, 33-39.

Toh-e, T., and Oguchi, T. (1999) Las21 participates in extracellular phenomena in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. Genet. Sys., 74, 241-256.

Nozaki, T., Toh-e, A., Fujii, M., Yagisawa, H., Nakagawa, M., and Takeuchi, T. (1999) Cloning and characterization of a gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Paracytol. , 102, 283-295.

Tsukamoto, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., and Toh-e, A. (1999) Theopederins F-J: Five new antifungal and cytotoxic metabolites from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. Tetrahedron, 55, 13697-13702.

Nishizawa, M., Suzuki, K., Fujino, M., Oguchi, T., and Toh-e, A. (1999) The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (Cdk) family, has a regulation mechanism different from Cdks functioning throughout the cell cycle. Genes Cells, 4, 627-642.

Nishizawa, M., Kanaya, Y., and Toh-e, A. (1999) Mouse cyclin-dependent kinase (Cdk) 5 is a functional homologue of a yeast Cdk, Pho85 kinase. J. Biol. Chem., 274, 33859-33862.

Takeuchi, J., and Toh-e, A. (1999) Genetic interaction between components of the yeast 26S proteasome: Synthetic lethality between a mutation in RPN12 (a lid component

gene) and those in RPT1 (an ATPase gene). *Mol. Gen. Genet.*, 262, 145-153.

浅川和秀、吉田知史、東江昭夫 (2000) M期終了機構はどこまでわかった、細胞工学、19、556 - 563 .

武内純子、東江昭夫 (1999) 酵母の細胞周期における26Sプロテアソームの役割、細胞工学、18、672 - 678 .

東江昭夫 (1999) 酵母26Sプロテアソームの構造と機能、生化学、71、173 - 181 .

Brooks, P., Fuentes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C. Hendil, K. B., Tanaka, K. Dyson, J. and Rivett, A. J. (2000) Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J.* 346,155-161.

Tomisugi, Y., Unno, M., Morimoto, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Tsukihara, T., and Yasuoka, N. (2000) New crystal forms and low resolution structure analysis of 20S proteasomes from bovine liver. *J. Biochem.* 127,941-943.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, T., Suzuki, S. (2000) Familial Parkinsons disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics* 25,302-305.

Park, K. C., Choi, E. J., Min, S. W., Chung, S. S., Kim,H., Suzuki, T., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2000) Tissue specificity, functional characterization, and subcellular localization of rat ubiquitin-specific protease, UBP109, whose mRNA expression is developmentally regulated. *Biochem. J.* 349,443-453.

Osaka, F., Saeki, M., Aida, N., Toh-e, A., Katayama, S., Kominami, K., Toda, T., Suzuk, T., Chiba, T., Tanaka, K., Kato, S. (2000) Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J.* 19,3475-3484.

Kawahara, H., Goto, T., Nishiyama, A., Ohsumi, K., Saeki, Y., Kasahara, M., Shimbara, N., Yokosawa, H., Kishimoto, T., Suzuki, K., and Tanaka, K. (2000) Embryo-specific 26S proteasomes with a functionally distinct polyubiquitin receptor. *EMBO J.* 19,4144-4153.

McCutchen-Maloney, S.L., Matsuda, K., Shimbara, N., Tanaka, K., Slaughter, C.A., and DeMartino, G.N.(2000) cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 18557-18565.