

「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る。本研究では、研究代表者らがこれまで明らかにしてきた酸化蛋白質を選択的に識別するユビキチン系、N 型糖鎖を選択的に識別するユビキチン修飾系の研究を進めている。酸化蛋白質を選択的に識別するユビキチン系に関してはユビキチン系によって識別される酸化修飾の生成機構の研究を進め、鉄代謝制御因子 IRP2 のユビキチン依存的分解のシグナルとなる酸化がヘムと IRP2 の分解に必須な IDD ドメイン内の Cys および His との相互作用により引き起こされることを明らかにした。ヘムはミトコンドリアで生成されることから、この結果は細胞の鉄感知メカニズムにおけるミトコンドリアの重要性を示唆したものである。また、酸化 IRP2 を選択的に識別する RING 型ユビキチンリガーゼ：HOIL-1 が RING 型リガーゼ HOIP と複合体を形成し、これまでに報告されていたリジン残基を介したポリユビキチン鎖ではなく N 末のメチオニンを介するポリユビキチン鎖を形成することが明らかとなった。また、N 型糖鎖を識別するユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs1,2} が、ER 関連分解に関与するリガーゼであることを示し、種々の翻訳後修飾を識別するユビキチンリガーゼが存在し、種々の細胞機能を制御していることを明らかにしてきた。

2. 研究実施内容

2004 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・チカノバ教授を含めた 3 人に与えられたことが示す如く、ユビキチン修飾系の重要性は広く認知されている。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結合させ、修飾したたんぱく質の機能を制御する。多くの場合は連続的にユビキチンが結合することにより生じる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。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 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、His の位置が他の HRM と異なっている。そこで、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。以上の結果から、IRP2 は鉄濃度の変化をヘム濃度の変化として感知すること、その感知に IRP2 の HRM が重要な機能を果たしていることが明らかとなった。ヘムはミトコンドリアで生成されることから、この結果は、細胞の鉄感知メカニズムにおけるミトコンドリアの重要性を示唆するもので

ある(Ishikawa et al. Molecular Cell, 19:171-181, 2005.)。

b. HOIL-1 ユビキチンリガーゼの機能解析

HOIL-1 は RING 型リガーゼであり、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。これまでに報告されていたリジン残基を介したポリユビキチン鎖ではなく N 末のメチオニンを介するポリユビキチン鎖を形成することが明らかとなった (投稿中)。

(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、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。

3. 研究実施体制

「岩井」グループ

①研究分担グループ長 : 岩井 一宏 (大阪市大、教授)

②研究項目 :

- ・ 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 : a. IRP2 へのヘムの結合様式および IRP2 により生じる酸化変化の同定および IRP2 の構造解析

b. HOIL-1 ユビキチンリガーゼの機能解析

ア) 分子レベルでの機能解析

イ) HOIL-1 リガーゼの構造解析

ウ) 細胞レベルでの機能解析

エ) HOIL-1 リガーゼのノックアウト解析

オ) 出芽酵母を用いた IRP2 のへム依存性分解における HOIL-1 リガーゼの役割の解析

- ・ N 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：Fbs ファミリーたんぱく質の個体レベルでの機能解析

「石森」グループ

①研究分担グループ長：石森 浩一郎（京都大学 助教授、北海道大学 教授）

②研究項目：

- ・ 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：IRP2 へのへムの結合様式および IRP2 により生じる酸化変化の同定および IRP2 の構造解析

「吉田」グループ

①研究分担グループ長：吉田 雪子（東京都臨床医学総合研究所、研究員）

②研究項目：

- ・ N 型糖鎖を選択的に識別するユビキチンリガーゼの機能解析

概要：Fbs1、2 以外の Fbs ファミリーの特に小胞体関連分解以外の機能の解明

「岩井裕子」グループ

①研究分担グループ長：岩井 裕子（京都大学、助教授）

②研究項目：

- ・ 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：HOIL-1 ユビキチンリガーゼの機能解析

- ・ 出芽酵母を用いた IRP2 のへム依存性分解における HOIL-1 リガーゼの役割の解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Megumi, Y., Miyauchi, Y., Sakurai, H., Nobeyama, H., Lorick, K., Nakamura, E., Chiba, T., Tanaka, K., Weissman, A M., Kirisako, T., Ogawa, O., and Iwai, K. Multiple roles of Rbx1 in the VBC-Cul2 ubiquitin ligase complex. **Genes to Cells** 10:679-691, 2005
- Ishikawa, H., Kato, M., Hori, H., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., and Iwai, K. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. **Molecular Cell** 19:171-181, 2005

- Suzuki,T., Ishihara, K., Migaki, H.,Ishihara, K., Yamaguchi-Iwai, Y., and Kambe, T. Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. **J. Biol. Chem.** 280:30956-30962, 2005
- Measday, V., Baetz, K., Guzzo, J., Yuen K., Kwok, T., Shekh, B., Ding, H., Ueta, R., Hoac, T., Cheng, B., Pot, I., Yamaguchi-Iwai, Y., Boone, C., Hieter, P., and Andrew, B. Systematic yeast synthetic lethal and synthetic dosage lethal screens identify genes required for chromosome segregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2005
- Shirakawa, K., Takaori-Kondo, A., Kobayashi, M., Tomonaga, M., Izumi, T., Fukunaga, K., Sasada, A., Abudu, A., Miyauchi, Y., Akari, H., Iwai, K., Uchiyama, T. Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. **Virology.** 344:263-266.,2006
- Wang, D., Masutani, H., Oka, S. I., Tanaka, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., and Yodoi, J. Control of mitochondrial outer membrane permeabilization and Bcl-xL levels by thioredoxin 2 in DT40 cells. **J. Biol. Chem.** .2006 in press.