

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006 ～ 2010

課題番号：18076004

研究課題名（和文） ユビキチン系による選択的基質識別メカニズム

研究課題名（英文） Mechanism underlying selective substrate recognition by the ubiquitin system

研究代表者

岩井 一宏 (Iwai Kazuhiro)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：60252459

研究成果の概要（和文）：ユビキチン修飾系は基質タンパク質を選択的に識別してユビキチンを付加することで、タンパク質の機能を制御する。本研究ではユビキチンリガーゼのユビキチン化した基質タンパク質の遊離メカニズム、新生不良タンパク質のプロテアソームへの運搬機構、新規ユビキチン鎖による細胞制御機構について研究を進め、ユビキチン修飾系によるタンパク質機能制御機構の解明を進めた。

研究成果の概要（英文）：The ubiquitin conjugation system regulates function of substrate proteins by conjugating ubiquitin in a selective manner. In this research projects, we have identified mechanisms underlying release of ubiquitinated substrate from ubiquitin ligases, which leads to degradation of the proteins and delivery of nascent abnormal proteins to the proteasome. We also identified regulation of cell functions by newly identified polyubiquitin chains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,100,000	0	12,100,000
2007年度	43,700,000	0	43,700,000
2008年度	43,700,000	0	43,700,000
2009年度	43,700,000	0	43,700,000
2010年度	43,700,000	0	43,700,000
総計	186,900,000	0	186,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：タンパク質、分解、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質分解系はタンパク質を積極的に分解することにより、細胞の機能を調節できる生体にとって必須な制御系であることが明らかとなってきた。中でもユビキチン依存性タンパク質分解系は特定のタンパク質を時空間的な特異性を持って認識して分解することが出来るので、細胞周期、シグナル伝達などの多様な生命現象の制御系として機能しているのみならず、その異常が神経変性疾患、ガンな

どの今後人類が克服すべき疾患の原因となっていることが示されている。ユビキチン修飾系はE1、E2、E3と呼ばれる3種の酵素系の作用によって、E3:ユビキチンリガーゼが選択的に識別するタンパク質に付加されるポリユビキチン鎖を、26Sプロテアソームが識別して基質タンパク質を分解に至らしめる。2004年のノーベル賞が発見者らに授与されたように、ユビキチン修飾系の重要性は広く認知されている。しかしながら、ユビキチン修飾系の機能の全

貌の解明にはほど遠いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、システムとしてのユビキチン修飾系の側面からユビキチン修飾系の重要性の理解を進めることを目的として、ユビキチン修飾系による選択的基質識別メカニズムについて解析を進めた。具体的には A. ユビキチンリガーゼが選択的に基質タンパク質を識別してポリユビキチン鎖を付加するメカニズム、B. ユビキチンリガーゼからポリユビキチン化された基質タンパク質が遊離して、C. プロテアソームに輸送されるメカニズムの3点から研究を進め、ユビキチン修飾系の機能の理解を深めることを目標とした。

3. 研究の方法

A. ユビキチンリガーゼが選択的に基質タンパク質を識別してポリユビキチン鎖を付加するメカニズム

直鎖状ポリユビキチン鎖を付加するユビキチンリガーゼ、LUBAC の機能解析および、直鎖状ポリユビキチン鎖生成メカニズムについて解析を行った。

B. ユビキチンリガーゼからポリユビキチン化された基質タンパク質が遊離メカニズム
低酸素応答性転写因子、HIF-2 α の酸素依存的ユビキチン化を担うユビキチンリガーゼである、VBC-Cul2 リガーゼをモデルに、主に試験管内反応を用いて、ユビキチン化されたタンパク質がユビキチンリガーゼから遊離するメカニズムについて検索を加えた。

C. ポリユビキチン化された基質タンパク質がプロテアソームに輸送されるメカニズム
新規ポリユビキチン鎖結合タンパク質 BAG-6 によるユビキチン化タンパク質のプロテアソームへの輸送機構について解析を行った。

4. 研究成果

A. ユビキチンリガーゼが選択的に基質タンパク質を識別してポリユビキチン鎖を付加するメカニズム

ポリユビキチン鎖はユビキチンのリジン残基を介して形成されると考えられてきたが、研究代表者らは、新規に同定したユビキチンリガーゼである LUBAC 複合体がリジン残基ではなく、ユビキチンの N 末端のメチオニンと別のユビキチンの C 末端のカルボキシル基間のペプチド結合した直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に生成することを明らかにした。さらに、選択的直鎖状ポリユビキチン鎖の生成機構の解析を進め、LUBAC が基質となるユビキチンの N 末端近傍を選択的に認識し、E2 にユビキチンの N 末端を選択的に提示することで直鎖状ポリユビキチン鎖を生成することを明らかにした(投稿準備中)。

また、直鎖状ポリユビキチン鎖は炎症、免疫応答、細胞の生存、がん化などに関わる

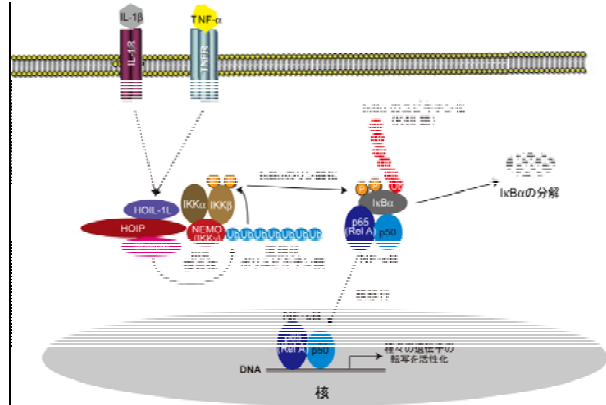


図1 LUBACによるNF- κ B活性化機構

NF- κ B の活性化に関与することを見出した。具体的には、細胞が TNF- α や IL-1 β で刺激されると、LUBAC は IKK 複合体の活性調節因子である NEMO に直鎖状ポリユビキチン鎖を付加することにより、NF- κ B の負に制御している I κ B α の分解を誘導することによって NF- κ B を活性化させることを見出した(図1)。

LUBAC は HOIL-1L、HOIP、SHARPIN の3種のタンパク質によって構成されるが、SHARPIN は慢性皮膚炎や種々の免疫異常を呈する自然変異マウスである cpdm マウスの責任遺伝子として同定されていた。しかし、cpdm マウスが上記症状を呈する理由は不明であった。そこで解析を進め、cpdm マウスでは SHARPIN が欠損することにより、LUBAC の他の2つのコンポーネントが不安定化することによって LUBAC リガーゼの量が減少するため、NF- κ B 活性化が減弱することで上記のような多彩な症状を呈することを明らかにした。すなわち、直鎖状ポリユビキチン化 HOIL-1L、HOIP、SHARPIN の3種のタンパク質から構成される LUBAC ユビキチンリガーゼは I κ B α を分解へ導く、NF- κ B 活性化の中核を担うタンパク質複合体であることを明瞭に示した。また、直鎖状ポリユビキチン鎖のウイルス感染における役割についても解析を進め、直鎖状ポリユビキチン鎖は Type I インターフェロン(インターフェロン- α 、 $-\beta$)の産生を抑制することも示した。

B. ユビキチンリガーゼからポリユビキチン化された基質タンパク質が遊離メカニズム
ガン抑制遺伝子産物 pVHL を含んだ VBC-Cul2 ユビキチンリガーゼは Cullin 型の多サブユニット RING-E3(CRL)である。CRL はユビキチン様翻訳後修飾因子である NEDD8 によって活性が増強されるので、HIF-2 α の *in vitro* ユビキチン化反応系でそのメカニズムを検索したところ、Cul2 の NEDD8 化は基質に結合するポリユビキチン鎖が伸長することが明らかとなった。さらに、COP9/シグナソーム(CSN)は脱 NEDD8 化活性を有する複合体であるが、CRL の活性を

増強させることが知られている。そこで、そのメカニズムを検索したところ、CSNはユビキチン化された基質のE3からの解離を促進することで、CRLを活性化させることを示した。具体的には、CSNが基質に結合したポリユビキチン鎖とNEDD8の両者を識別してCRLと結合したあと、ユビキチン化基質をVBCとともにCRLから解離させ、その後cullin-NEDD8結合を切断してCRLの活性増強から遊離すること、その結果としてユビキチン化されていない基質を結合しているVBCとCul2との結合を促進してCRLがユビキチン化する基質の分子数を増大させることでCRLを活性化させる可能性を示唆する所見を得た。

そこで、SiRNAでCSN2、CSN5の発現を抑制したHeLa細胞においては対照に比してVBC-Cul2に結合するユビキチン化HIF- α の量が増加したことから、CSNは細胞内においてもユビキチン化された基質とCRLの解離を促進していると考えられ、CSNがユビキチン化された基質タンパク質をCRLから解離させる作用を有することで、CRLを活性化させることが明らかとなった。

C. ポリユビキチン化された基質タンパク質がプロテアソームに輸送されるメカニズム
ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに輸送して分解に導く、ユビキチン受容体の存在が知られている。研究分担者らはユビキチン様ドメインを有するBAG6タンパク質が新たに合成されたが、フォールディングできなかった新生不良タンパク質を選択的にプロテアソームへ輸送して、分解へ導くユビキチン受容体であることを見出した。新生不良タンパク質由来のペプチドはDRiPsと呼ばれ、ウイルス抗原の提示に関与すると言われているので、DRiPs生成にBAG6が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計16件)

1. Ikeda, F., Deribe, Y. L., Skånland, S. S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S. J. L., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J. P., Rittinger, K., Schaefer, L., Macek, B., and Dikic, I. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. **Nature** 471:637-641, 2011.
2. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S.-I., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K. SHARPIN is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin chain assembly complex. **Nature** 471:633-636, 2011.
3. Inn, K.-S., Gack, M. U. Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.-Y., Iwai, K., (corresponding author) and Jung, J. U. Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type-I interferon induction. **Molecular Cell** 41:354-365, 2011.
4. Kagawa, H., Shino, Y., Kobayashi, D., Demizu, S., Shimada, M., Ariga, H. and Kawahara, H. A novel signaling pathway mediated by the nuclear targeting of C-terminal fragments of mammalian Patched 1. **PLoS ONE** 6: e18638. doi:10.1371/journal.pone.0018638, 2011.
5. Minami, R., Hayakawa, A., Kagawa, H., Yanagi, Y., Yokosawa, H. and Kawahara, H. BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. **J. Cell Biol.** 190: 637-650. 2010.
6. Ojima, K., Y Kawabata, Y., Nakao, H., Nakao, K., Doi, N., Kitamura, F., Ono, Y., Hata, S., Suzuki, H., Kawahara, H., Labeit, S., Toyama-Sorimachi, N., Suzuki, K., Maeda, T., Abe, K., Aiba, A. and Sorimachi, H. Role of dynamic distribution of muscle-specific calpain in physical-stress adaptation and muscular dystrophy in mice. **J. Clin. Invest.** 120: 2672-2683, 2010.
7. Tokunaga, F., Sakata, S.-I., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K. and Iwai, K. Involvement of linear polyubiquitination of NEMO in NF- κ B activation. **Nature Cell Biology** 11:123-132, 2009.
8. Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S. Structural basis for specific cleavage of Lys63-linked polyubiquitin chains. **Nature** 455:358-362, 2008.
9. Miyauchi, Y., Kato, M., Tokunaga, F., and Iwai, K. The COP9/signalosome increases the efficiency of pVHL ubiquitin ligase-mediated hypoxia inducible factor- α ubiquitination. **J. Biol. Chem.** 283:16622-16631, 2008.
10. Morito, D., Hirao, K., Oda, Y., Hosokawa, N., Tokunaga, F., Cyr, D.M., Tanaka, K., Iwai, K., and Nagata K. Gp78 Cooperates with RMA1 in ER-associated Degradation of CFTR Δ F508. **Mol. Biol. Cell.** 19:1328-1336, 2008.
11. Zhou, G., Dada, L.A., Chandel, N.S., Iwai, K., Lécuna, E., Ciechanover, A., and Sznajder, J.I. Hypoxia-mediated Na-K-ATPase degradation requires von Hippel Lindau protein. **FASEB J.**

- 22:1335-1342, 2008.
12. Minami, R., Shimada, M., Yokosawa, H. and Kawahara, H. Scythe regulates apoptosis through modulating ubiquitin-mediated proteolysis of XEF1AO. **Biochem. J. (London)** 405: 495-501, 2007.
 13. Shabek, N., Iwai, K., and Ciechanover, A. Ubiquitin is degraded by the ubiquitin system as a monomer and as part of its conjugated target. **Biochem Biophys Res Commun.** 363: 425-431, 2007.
 14. Sakata, E., Yamaguchi, Y., Miyauchi, Y., Iwai, K., Chiba, T., Saeki, Y., Matsuda, N., Tanaka, K. and Kato, K. Direct interactions between Nedd8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes contribute to up-regulation of cullin-based E3 ligase activity. **Nature Struct. Mol. Biol.** 14:167-168, 2007.
 15. Shimada, M., Kanematsu, K., Tanaka, K., Yokosawa, H. and Kawahara, H. Proteasomal ubiquitin receptor RPN-10 controls sex determination in *Caenorhabditis elegans*. **Mol. Biol. Cell** 17: 5356-5371, 2006.
 16. Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, K., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K. and Iwai, K. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. **EMBO J.** 25: 4877-4887. 2006.

[学会発表] (計11件)

1. Iwai, K. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B signaling. Banbury Center meetings, "SIGNALING THROUGH UBIQUITIN" November 14-17, 2010, The Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. (Invited)
2. Iwai, K. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B signaling. 2010 FASEB Summer Research Conferences "Ubiquitin and Cellular Regulation" June 13-18, 2010, Saxtons River, Vermont, USA. (Invited)
3. Iwai, K. Linear Polyubiquitination: A Newly Identified Regulator of NF- κ B Signaling. "BIOLOGY OF THE UBIQUITIN AND THE UBIQUITIN-LIKE SYSTEMS" Research Conference of the Institute for Advanced Studies, the Israel Science Foundation. March 14-19, 2010, Jerusalem, Israel. (Invited)
4. Iwai, K., Sakata, S.-I., Nakagawa, T., and Tokunaga, F. Linear polyubiquitination : A newly identified regulator of NF- κ B signaling. Keystone Symposium "NF- κ B in Inflammation and Disease" January 5-10, 2010, Santa Fe, New Mexico, USA.
5. Iwai, K., and Tokunaga, F. Linear

- polyubiquitination : A newly identified regulator of NF- κ B signaling. The EMBO Conference "Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation" September 22-26, Riva Del Garda, 2009 Italy.
6. Tokunaga, F., Sakata, S.-I., Nakagawa, T., and Iwai, K. Involvement of linear polyubiquitination of NEMO in NF- κ B activation April 21-25, 2009, Cold Spring Harbor Laboratory meeting "The Ubiquitin Family", Cold Spring Harbor, NY, USA.
 7. Iwai, K., Physiological Function of Linear Polyubiquitin Chain. Keystone Symposium "The Many Faces of Ubiquitin" Jan 11-16, 2009 Copper Mountain Resort, CO, USA (Invited)
 8. Miyauchi, Y., Kato, M., Tokunaga, F., Iwai, K. The COP9/Signalosome increases the efficiency of pVHL-containing ubiquitin ligase-mediated HIF- α ubiquitination. ZOMESV: The Fifth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome and eIF3: At the interface between signaling and proteolysis November 11-14, 2008 Yokohama, Japan. (Invited)
 9. Tokunaga, F., Sakata, S.-I., Kirisako, T., Nakagawa, T., Murata, S., Tanaka, K. and Iwai, K. Linear ubiquitination of NEMO triggers NF- κ B activation. The EMBO Conference "Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation" September 22-26, 2007, Riva Del Garda, Italy.
 10. Kawahara, H., Shimada, M., and Yokosawa, H. Proteasomal ubiquitin receptor RPN-10 controls TRA-2-mediated sex determination in *Caenorhabditis elegans*. 4th NIBB-EMBL Symposium, Okazaki, Japan, December 2-4, 2006. (Invited)
 11. Kirisako, T., Tokunaga, F., Nakamura, M., and Iwai, K. Identification of a ligase complex polymerizing linear polyubiquitin chains and its physiological role. The Fourth NIBB-EMBL Symposium, December 2-4, 2006 Okazaki, Japan. (Invited)

[図書] (計 2 件)

1. Iwai, K. FUNCTIONS OF LINEAR UBIQUITIN CHAINS IN THE NF- κ B PATHWAY Linear Polyubiquitin in NF- κ B Signaling. **Conjugation and Deconjugation of Ubiquitin Family Modifiers** Groettrup, M. eds Landes Biosciences; 2010.
2. Lorick, K., Yang, Y., Jensen, J., Iwai, K. and Weissman, A.M. Studies of the ubiquitin proteasome system. Units 15.9 Sections 1-12. **Current Protocols in Cell Biology** Bonifacino J, Dasso M, Lippincott-Schwartz J, Harford J, Yamada K, Bonifacino J, eds. John Wiley and Sons; 2006.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

1. 名称：新規なユビキチンリガーゼ及びその利用

発明者：岩井 一宏

権利者：大阪大学

種類：PCT

番号：Jp2010/063345

出願年月日：平成22年8月6日

国内外の別：国外

2. 名称：新規なユビキチンリガーゼ及びその利用

発明者：岩井 一宏

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2009-184878

出願年月日：平成21年8月7日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cellbio.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 一宏 (IWAI KAZUHIRO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：60252459

(2) 研究分担者

川原 裕之 (KAWAHARA HIROYUKI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：70291151

徳永 文稔 (TOKUNAGA FUMINORI)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00212069