

機関番号：12102
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2006～2010
 課題番号：18076006
 研究課題名（和文）ユビキチンシステムの個体生物学

研究課題名（英文） Biology of the Ubiquitin System

研究代表者

千葉 智樹 (CHIBA TOMOKI)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：00311423

研究成果の概要（和文）：

生体内のタンパク質は動的な状態にあり、常に「合成」および「分解」されている。タンパク質の分解はユビキチンシステムによって制御されており、選択的にユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームによって分解される。ユビキチンによる選択タンパク質分解は細胞の正常な増殖や分化に必要であり、その破綻は様々な疾患を引き起こす。本研究では、ユビキチンシステムの基質選択性、触媒反応を制御する新奇因子を探索し、その機能を解析した。またプロテアソームには多数の活性化因子が存在する。その機能を解明する目的で遺伝子欠損モデル動物を作成した。

研究成果の概要（英文）：

The proteins in the body are in a dynamic state and they are continually degraded as well as synthesized. Selective protein degradation is regulated by an elaborate system called Ubiquitin-system. Ubiquitin is a small molecule that marks the proteins for proteasomal degradation. This selective protein degradation is essential for many cellular events and its impairment cause various diseases such as cancer and neurodegenerative diseases. The summary of this study is twofold. We identified and characterized several enzymes involved in the ubiquitination reaction mediated by Cullin-based ubiquitin ligase complexes (ie; substrate recognition, regulation of conjugation and de-conjugation, etc). Secondly, we generated mutant mice for one of the proteasome regulatory subunit to clarify the function of proteasome regulatory particles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,600,000	0	12,600,000
2007年度	18,700,000	0	18,700,000
2008年度	26,700,000	0	26,700,000
2009年度	19,900,000	0	19,900,000
2010年度	14,300,000	0	14,300,000
総計	92,200,000	0	92,200,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ユビキチン、ユビキチン様タンパク質、プロテアソーム、タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンシステムは細胞内の選択的タンパク質分解を制御しており、その破綻は、がんや神経変性疾患などの難治性疾患の原因となる。ユビキチンシステムの中で基質選択を行うのは E3 ユビキチンリガーゼであり、その数は数千種類に及ぶ。ユビキチンリガーゼは多数報告されているものの、その特異的な基質、基質識別機構、ユビキチンリガーゼ活性の制御機構、ポリユビキチン鎖形成、プロテアソームへの輸送の全プロセスが明らかにされている例はまだない。複合体型の Cullin 型ユビキチンリガーゼファミリーは、ユビキチンリガーゼの約70%を占めており、その機能制御の全貌を解明することは重要である。Cullin 型複合体の基本構造は、足場となる Cullin、その C 末端側に相互作用するリングフィンガータンパク質 Roc1、その N 末端側に相互作用する基質識別サブユニットから構成される。この基質識別サブユニットは数千種類存在し、それぞれ固有の基質を C 末端側に存在する Roc1 へ配向させユビキチン化する。Cullin1 と相互作用する基質識別サブユニットは F-box タンパク質であり、ヒトで60数種類、植物では600種類以上存在する。Cullin2 は SOCS-box タンパク質、Cullin3 は BTB-POZ タンパク質というように、Cullin ファミリータンパク質はそれぞれ異なるファミリーの基質識別サブユニットと相互作用する。現在 Cullin ファミリータンパク質は 10 種類あり、それぞれ同様の構造を取ると考えられるが、その構成因子について全て明らかになっている訳ではない。

Cullin 型ユビキチンリガーゼの活性制御については、我々はこれまでにユビキチン様タンパク質 NEDD8 による Cullin サブユニットの翻訳後修飾が重要であることを明らかにしてきた。この NEDD8 修飾は、ユビキチン結合酵素(E2)との結合親和性を高め、Cullin 型ユビキチンリガーゼの活性を促進する。しかし、なぜ結合親和性が高まるのかについては明らかではなかった。

また Cullin 複合体は全てが活性のある複合体として存在する訳ではなく、一部は CAND1 と結合して基質識別サブユニットとの複合体形成が抑制されている。Cullin の NEDD8 修飾は CAND1 結合を阻害するが、CAND1 結合した Cullin は NEDD8 修飾されない。そのため現在

CAND1 を解離させる因子の探索が行われている。一方で CAND1 結合した Cullin を NEDD8 は修飾できるという報告もあり、現在 CAND1 の脱着機構は議論の対象となっている。

NEDD8 修飾は複合体形成の後に起こり、Cullin 複合体に E2 酵素を呼び寄せる。そのため基質結合した後に起こると考えられる。

ユビキチンと同様に NEDD8 も何らかの NEDD8 結合タンパク質を引き寄せると考えられるが、E2 酵素以外にはまだ不明である。

NEDD8 修飾は可逆的であり、COP9 シグナロソームによって Cullin から脱修飾される。COP9 シグナロソームは、Cullin 複合体が NEDD8 化され、基質がユビキチン化された後に Cullin と相互作用して機能すると考えられる。しかし、色素性乾皮症 XP-E 群の原因遺伝子産物 DDB2 と相互作用した Cullin4 の場合は、常時 COP9 シグナロソームと相互作用しており、紫外線照射などによって DDB2-Cullin4 複合体が損傷 DNA に結合すると、COP9 は解離し DDB2-Cullin4 は活性化される。このように一部の Cullin 複合体は COP9 が常時結合しており、その解離によって制御されるものもある。

さらに Cullin 複合体の構成因子には脱ユビキチン化酵素も存在することが最近明らかとなり、基質に対するユビキチン化・脱ユビキチン化制御のある可能性が推定されている。DNA 損傷修復に関わるユビキチン修飾反応において脱ユビキチン化反応は次のステップへと移行する信号として働くことがあり、Usp15 が DNA 損傷修復過程に関与する可能性が考えられる。

このように Cullin 型ユビキチンリガーゼ複合体の活性は、複合体形成、NEDD8 修飾と脱修飾、脱ユビキチン修飾の各段階で制御される。しかし、これらがどのような階層性を持って制御されているのかは不明である。

最後に Cullin 型ユビキチンリガーゼ複合体によってユビキチン化されるタンパク質は基本的にプロテアソーム分解される。しかし最近、ユビキチン化タンパク質はオートファジー経路でも分解されることが明らかとなっている。そのため Cullin によってユビキチン化されたタンパク質を特異的にプロテアソーム分解される機構の存在することが想定される。ユビキチン代謝研究に酵母の

ロテアソーム変異体は大きく貢献し、プロテアソーム変異体なしにはユビキチンリガーゼの制御機構を解析することは困難である。

プロテアソームは筒状のプロテアーゼ複合体であり、筒の入り口にはプロテアソーム活性化因子群が結合し、基質の出入りを制御する。プロテアソーム活性化因子には、PA700、PA28、PA200、Ecm29 など4種類の制御因子複合体が存在する。PA700 複合体はユビキチン化基質を識別してアンフォールディングし、そしてプロテアソーム内腔に基質を送り込む働きがある。PA28 複合体は免疫制御に関与し、プロテアソームの産生する抗原ペプチドの産生効率を促進する。PA200 はDNA 損傷試薬や放射線によって誘導され、Ecm29 は小胞体-ゴルジ小胞中間体区画に存在することから、それぞれ DNA 損傷修復や小胞体関連分解に機能する可能性が示唆されている。しかし、PA200、Ecm29 が実際に上記の生命現象に関与することは証明されておらず、その分子機序も不明である。

これらのノックアウトマウスを作成し、その解析基盤を整備することは、プロテアソーム機能の解明だけでなく、Cullin に留まらない様々なユビキチンリガーゼの機能解析に有用である。

2. 研究の目的

ユビキチンシステムによる選択的タンパク質分解はあらゆる生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。しかし、その反応がどのように制御されているかは殆ど明らかとなっていない。そこで本研究では、ユビキチンシステムの中で最も重要な Cullin 型ユビキチンリガーゼに着目し、その活性制御機構を包括的に明らかにすることを目的の一つにする。まず構成因子が同定されていないものについては、その構成因子の探索と機能解析を行う。そして Cullin 複合体の活性制御機構については NEDD8 修飾が重要であることから、新奇の NEDD8 結合タンパク質を探索し、複合体形成、NEDD8 修飾、脱修飾、ユビキチン化、脱ユビキチン化などの制御機構を解明することを目指す。

目的の二つ目として多数存在するプロテアソーム活性化因子群の役割を解析するため、それ

ぞれの遺伝子欠損マウスを作成する。その表現型解析を通じて、プロテアソーム活性化因子の機能を解明するとともに、様々なユビキチンリガーゼを解析する基盤とする。

3. 研究の方法

(1) Cullin 型ユビキチンリガーゼの構成因子の同定と機能解析

構成因子の不明な新奇 Cullin 型複合体について、酵母ツーハイブリッド法または質量分析法で新奇相互作用タンパク質を同定する。単離された分子がファミリー遺伝子を構成していれば、それらも合わせて検討する。また基質識別に関わることが想定されるタンパク質であった場合は、その基質を上記と同様の方法で探索し、実際にユビキチン化されるのかを解析する。さらに細胞内で機能抑制した場合の影響を、細胞増殖、シグナル伝達、ストレス応答などの観点から解析する。

(b) Cullin 型ユビキチンリガーゼの新たな活性制御因子の探索とその機能解析。NEDD8 を中心として、新奇の相互作用タンパク質を探索し、Cullin の複合体形成、NEDD8 修飾・脱修飾、ユビキチン化、脱ユビキチン化のどのステップで機能するのかを検討する。これらのステップが生理的な条件化でどのように制御されるのかを解析するには、刺激依存性に誘導される選択的タンパク質分解を解析するのが有効である。例として、TNF α 刺激依存性の I- κ B 分解、先行研究によって明らかにした TGF β シグナル依存性のサイクリン依存性キナーゼ抑制因子 p57 分解、紫外線照射による DDB2-Cullin4 複合体の活性化などが挙げられる。

(c) Cullin 型複合体と相互作用する脱ユビキチン化酵素の機能解析。脱ユビキチン化酵素 Usp15 が Cullin 複合体と相互作用するため、まずはどのサブユニットと相互作用するのか解析する。次いで Usp15 ノックアウトマウスの表現型解析を通して、Cullin 複合体機能に対する役割を解析する。

(2) プロテアソーム活性化因子の遺伝子欠損マウス作成と表現型解析。

プロテアソーム活性化因子の一つである Ecm29 の遺伝子欠損マウスを常法にしたがって作成する。ノックアウトマウスの組織解剖

学的表現型解析のほか、プロテアソーム活性、分子構成、分子集合などを解析する。またプロテアソームはMHCクラスIに提示される抗原の切り出しに必須であるため、Ecm29 ノックアウトマウスの抗原提示能や免疫機能を解析する。

4. 研究成果

Cullin 型ユビキチンリガーゼ複合体に関する研究成果として、新奇構成因子として常染色体優性網膜色素変性症の原因遺伝子産物を同定した。その変異体は Cullin 複合体と相互作用できず、ユビキチンリガーゼ活性を持たないことが判明し、優性変異となる原因が説明された。また骨芽細胞において TGF β 刺激依存性にサイクリン依存性キナーゼ抑制因子 p57 を分解する新奇ユビキチンリガーゼ Fb112 を同定した。Fb112 は、Cullin-1 と相互作用し、TGF β 刺激によってリン酸化された p57 を特異的にユビキチン化した。TGF β 刺激は骨芽細胞の分化を抑制するが、Fb112 を機能抑制すると本来抑制されるはずの骨芽細胞分化が促進されたため、p57 分解は骨芽細胞分化を抑制する機構であることが判明した。さらに、Fb1-12 は細胞分化のみならず細胞増殖にも重要であることが判明したので、新たな基質の同定を進めた。その結果、プロテアソーム活性化因子との特異的な相互作用も見いだした。プロテアソーム活性化因子はユビキチン化の標的基質ではない結果が得られつつあり、その生理的意義の解析を進めている。

Cullin 型ユビキチンリガーゼファミリーはユビキチン様タンパク質 NEDD8 によって翻訳後修飾される。NEDD8 修飾は Cullin 複合体の活性化に必須であり、それは Ubc4 を Cullin 複合体に引き寄せるためである。その分子機序は明らかではなかったが、Ubc4 と NEDD8 の直接的な相互作用部位を構造生物学的に明らかにし、その部位が NEDD8 によるユビキチンリガーゼの活性化に重要であることを明らかにした。また NEDD8 は Ubc4 以外のタンパク質を Cullin 複合体に動員する可能性があるため、NEDD8 結合タンパク質を探索した。その結果、新奇 NEDD8 結合タンパク質 2 種を同定した。そのひとつは Cullin、NEDD8 修飾

タンパク質とも相互作用したため、NEDD8 修飾経路に関わる可能性が考えられた。もう一方は Cullin と COP9 シグナロソームと相互作用したので、脱 NEDD8 修飾を制御する可能性が考えられた。この他、骨髄種で高発現する機能未知因子も Cullin および COP9 シグナロソームと相互作用することを見い出し、NEDD8 および Cullin の機能に関わることが判明した。いずれの因子も CAND1 とは相互作用せず、複合体形成以降に機能すると考えられた。なお CAND1 については、そのファミリーである CAND2 が筋芽細胞分化を促進すること、それは筋芽細胞分化に重要な転写因子である Myogenin を選択的に識別する Cullin 型ユビキチンリガーゼを抑制するためであることが明らかとなった。

Cullin と相互作用する Usp15 は、基質識別サブユニットと Cullin 非依存性に相互作用することが明らかとなり、複合体形成以前に機能するか、あるいは複合体形成後に解離するステップの存在する可能性が示唆された。また DDB2 と相互作用した Usp15 は、紫外線照射によって損傷 DNA には結合せず、DNA 損傷修復との関連を示す結果は得られなかった。その他、Usp15 には今回同定した新奇因子 2 種が相互作用したので、今後その関連を解析する必要がある。Usp15 欠損マウスは、正常に成長し、繁殖可能であった。このことから Usp15 欠損を補償するファミリー遺伝子のノックアウトマウス作成が重要であろう。しかしながら、C57/BL6 マウスと戻し交雑する過程で表現型のあるマウスが生まれつつあり、現在解析を進めている。

NEDD8 はユビキチンと同様に保存されたリジン残基が分子表面に存在し、これらのリジン残基を介してポリ鎖を形成することが示唆されていた。しかし生体内には複数のユビキチン様タンパク質が存在するため、質量分析によって NEDD8 が修飾されることは明らかとなっても、それがポリ NEDD8 鎖である証明は困難であった。そこで組換えタンパク質を用いた試験管内反応系を再構築し、実際にポリ NEDD8 鎖が形成されうることを確認した。また、その形成機構のモデルを提唱した。

その他、パーキンソン病原遺伝子 Parkin について遺伝子欠損マウスの病態を解析し、

精巢が早期に萎縮することを見いだした。精巢萎縮は精原幹細胞の脱落によるもので、Parkin は幹細胞の品質管理に重要であることが判明した。

プロテアソーム活性化因子 Ecm29 のノックアウトマウスは稔性で成長にも異常が認められなかった。また各臓器におけるプロテアソームのペプチダーゼ活性、構成因子、分子集合に大きな異常は認められなかった。現在免疫機能を解析する目的で、C57/BL6 マウスとの戻し交雑を進めている。その他、他のプロテアソーム活性化因子ノックアウトマウスと交配し、多重ノックアウトマウスを作成している。

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 2 2 件)

1. Ooki Y, Konishi N, Funatsu N, Chiba T. The mechanism of poly-NEDD8 chain formation *in vitro*. 査読有 **B.B.R.C.** 381, 443-447 (2009)
2. Shima Y, Shima T, Chiba T, Irimura T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML activates transcription by protecting HIPK2 and p300 from SCFFbx3-mediated degradation. 査読有 **Mol Cell Biol.** 28, 7126-7138 (2008)
3. Kim M, Nakamoto K, Nishimori S, Tanaka K, Chiba T. A novel ubiquitin ligase involved in p57^{Kip2} proteolysis regulates osteoblast cell differentiation. 査読有 **EMBO rep.** 9, 878-884 (2008)
4. Yamano T, Sugahara H, Mizukami S, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Uono H. Allele-selective effect of PA28 in MHC class I antigen processing. 査読有 **J. Immunol.** 181, 1655-1664 (2008).
5. Koyama S, Hata S, Witt CC, Ono Y, Lerche S, Ojima K, Chiba T, Doi N, Kitamura F, Tanaka K, Abe K, Witt SH, Rybin V, Gasch A, Franz T, Labeit S, Sorimachi H. Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. 査読有 **J Mol Biol.** 376, 1224-1236 (2008).
6. Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, Hatanaka K, Fukuda Y, Chiba T, Morone N, Yuasa S, Inokuchi K, Ohtsuka T, MacGregor GR, Tanaka K, Setou M. SCRAPER- Dependent Ubiquitination of Active Zone Protein RIM1 Regulates Synaptic Vesicle Release. 査読有 **Cell** 130,

943-957 (2007).

7. Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-kuriyama Y, Kato S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. 査読有 **Nature** 446, 562-6 (2007).
8. Shiraishi S, Zhou C, Aoki T, Sato N, Chiba T, Tanaka K, Yoshida S, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Tamura TA. TBP-interacting protein 120b(TIP120B)/cullin-associated and neddylation-dissociated 2 (CAND2) inhibits SCF-dependent ubiquitination of myogenin and accelerates myogenic differentiation. 査読有 **J Biol Chem.** 282, 9017-9028 (2007).
9. Sakata E, Yamaguchi Y, Miyauchi Y, Iwai K, Chiba T, Saeki Y, Matsuda N, Tanaka K, Kato K. Direct interactions between NEDD8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes upregulate cullin-based E3 ligase activity. 査読有 **Nat. Struct. Mol. Biol.** 14, 167-168 (2007).

[学会発表] (計 3 2 件)

1. Kigoshi Y, Tsuruta F, Chiba T. A mutation in an AdRP causative gene affects its Cullin complex formation. American Society of Cell Biology Meeting. 2010年12月11-15日, Philadelphia, U.S.A
2. Komatsu T, Satake T, Sato A, Tsuruta F, Chiba T. Loss of Parkin leads to selective degeneration of spermatogonia in mice. 日本分子生物学会、日本生化学会合同年会, 2010年12月7-10日, 神戸市、神戸ポートアイランド
3. Takashima O, Tsuruta F, Funatsu N, Konishi N, Chiba T. The analyses of the poly-NEDD8 chain. The 6th International Conferences on COP9 Signalosome, Proteasome and eIF3. ZOMES VI. 2010年10月1-10日, Safed, Israel.

[その他]

ホームページ等

<http://tchibalab.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉智樹 (CHIBA TOMOKI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00311423