

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570178
 研究課題名（和文） Itm2ファミリー膜タンパク質のエンドソームにおける機能と痴呆症への関与
 研究課題名（英文） Function of the Itm2 family of membrane proteins on endosomes

研究代表者
 駒田 雅之（KOMADA MASAYUKI）
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授
 研究者番号：10225568

研究成果の概要：

遺伝性痴呆症の原因遺伝子産物である Itm2 タンパク質が細胞内小器官であるエンドソームに局在するタンパク質複合体 Hrs-STAM と結合することから、エンドソーム機能の痴呆症発症への関与が示唆されている。本研究では、エンドソームで Hrs-STAM 複合体と結合する Itm2 タンパク質および脱ユビキチン化酵素 UBPY と AMSH の解析を行い、1) Itm2 タンパク質がエンドソームで働くこと、2) UBPY と AMSH が細胞質分裂においても重要な役割を果たすこと、そして 3) AMSH の酵素活性の基質特異性の構造的基盤、を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：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：細胞、タンパク質、ユビキチン、脱ユビキチン化酵素、メンブレントラフィック、選別輸送、エンドソーム

1. 研究開始当初の背景

増殖因子が結合して活性化された細胞膜上の増殖因子受容体は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソームを経由してリソソームに運ばれて分解される（受容体ダウンレギュレーション）。増殖因子受容体は活性化に伴いユビキチン化され、これがリソソームに輸送されるための選別

輸送シグナルとして機能している。研究代表者らは、これまでユビキチン化された増殖因子受容体のエンドソームにおける選別輸送機構の解析を行ってきた。

研究代表者らは、ユビキチン化された増殖因子受容体をエンドソーム膜上で認識して選別するユビキチン結合タンパク質複合体 Hrs-STAM に結合するタンパク質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングし、

Itm2A (integral membrane protein 2A) をその候補として同定した (未発表)。Itm2A は Itm2 ファミリー (Itm2 A~C) に属する膜貫通タンパク質であるが、Itm2 ファミリーの分子機能はこれまで不明であった。しかし、*Itm2B* 遺伝子の変異が遺伝性痴呆症を引き起こすことが報告されている (*Nature* 399: 776-781, 1999; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4920-4925, 2000)。

また、Itm2A が結合する Hrs-STAM 複合体には、2種類の脱ユビキチン化酵素 UBPY と AMSH が結合する。研究代表者らは、UBPY が脱ユビキチン化する基質タンパク質の網羅的なプロテオーム解析を行い、Itm2A を UBPY の基質の1つとして同定している (未発表)。すなわち Itm2A がユビキチン化と脱ユビキチン化による活性制御をうけていることが示唆されている。

以上の結果から、エンドソームにおけるユビキチン化タンパク質の選別輸送機構が痴呆症の発症と関連することが示唆されるようになった。

2. 研究の目的

本研究は、Itm2 ファミリーと相互作用するユビキチン化タンパク質選別輸送マシナリーの分子機構を解明することにより、新たな痴呆症の発症機序を解明することを目的とした。

(1) Itm2 ファミリー膜タンパク質のエンドソームにおける機能

Itm2 ファミリー膜タンパク質に関する論文はこれまでほとんど発表されておらず、その細胞機能は不明である。しかし、Itm2A がエンドソーム上のタンパク質複合体 Hrs-STAM と結合すること (研究代表者ら、未発表) は、Itm2 ファミリーがエンドソームで機能していることを示唆している。そこで、Itm2 ファミリーのエンドソームにおける機能の解明を目的とし、解析を行った。

(2) ユビキチン化と脱ユビキチン化による細胞質分裂の制御

研究代表者らは、細胞分裂期に脱リン酸化と 14-3-3 タンパク質の解離により脱ユビキチン化酵素 UBPY の酵素活性が上昇することを見出していた (Mizuno et al. 2007. *Exp. Cell Res.* 313: 3624-3634)。このことは、UBPY が何らかの細胞分裂期特異的な機能を有することを示唆していた。そこで、UBPY (および AMSH) の細胞分裂期特異的機能の解明を目的とし、解析を行った。

(3) 脱ユビキチン化酵素 AMSH の基質特異性の構造的基盤

脱ユビキチン化酵素 AMSH は Lys48 結合型のポリユビキチン鎖を切断せず、Lys63 結合型ポリユビキチン鎖を特異的に切断することが報告されていた (*J. Cell Biol.* 166: 487-492, 2004)。そこでこの基質特異性の構造的基盤の解明を目的とし、AMSH のパラログである AMSH-like protein と Lys63 結合型ポリユビキチン鎖の X 線結晶構造解析を行った。

3. 研究の方法

(1) Itm2 ファミリー膜タンパク質のエンドソームにおける機能

Itm2A, B, C それぞれにエピトープ・タグをつけた発現ベクターを作製し、ヒト培養細胞に発現させて細胞内局在を解析した。またそれらを細胞のライセートから免疫沈降し、ユビキチン化されているか、また UBPY, AMSH によって脱ユビキチン化されるかを解析した。

(2) ユビキチン化と脱ユビキチン化による細胞質分裂の制御

ユビキチン、UBPY、そして AMSH に対する抗体で細胞質分裂期のヒト培養細胞の免疫蛍光染色を行い、これらタンパク質の細胞質分裂期における細胞内局在の時間的、空間的な変化を解析した。また UBPY あるいは AMSH の発現をノックダウンした細胞の細胞質分裂を観察し、これら脱ユビキチン化酵素が細胞質分裂に必要であるかどうか解析した。さらに、細胞質分裂に必須のタンパク質 VAMP8 のユビキチン化と脱ユビキチン化による機能調節について解析を行った。

(3) 脱ユビキチン化酵素 AMSH の基質特異性の構造的基盤

AMSH およびそのパラログである AMSH-like protein の酵素活性欠失変異体を大腸菌に発現させ、大量精製した。またユビキチンを大腸菌に発現させ、Lys63 結合型ユビキチン 2 量体を大量に調製した。これらを合わせてその複合体の結晶を作製し、X 線構造解析によりその構造を解明した。その構造に基づき、Lys63 結合型ユビキチン鎖に対する AMSH の基質特異性発現のメカニズムを解明した。

4. 研究成果

(1) Itm2 ファミリー膜タンパク質のエンドソームにおける機能 (未発表)

Itm2A, B, C の細胞内局在は後期エンドソームのマーカーである LAMP2 タンパク質と高い共局在を示し、Itm2 ファミリーが主に後期エンドソームにおいて機能していることが示唆された。この結果は、Itm2 ファミリーとエンドソームとの関連を強く示唆するものであり、現在その機能についてさらに解析を進めている。

(2) ユビキチン化と脱ユビキチン化による細胞質分裂の制御 (Mukai et al. 2008. J. Cell Sci. 121: 1325-1333)

UBPY と AMSH が細胞質分裂期に中央部紡錘体に時間的、空間的に異なるパターンで局在すること、さらに UBPY の局在化に先立って、中央部紡錘体で一過的に強いタンパク質のユビキチン化がおきることを見出した。また、UBPY と AMSH は効率よい細胞質分裂に不可欠な役割を果たすことを見出した。さらに、エンドソームの膜融合に必須の役割を果たすタンパク質 VAMP8 が中央部紡錘体においてユビキチン化と UBPY、AMSH による脱ユビキチン化をうけることが示され、細胞質分裂期の VAMP8 の機能がユビキチン化によって制御されていることが解明された。

本研究は、タンパク質のユビキチン化と脱ユビキチン化が細胞質分裂に深く関与することを世界に先駆けて示したものである。今後、中央部紡錘体でユビキチン化されるタンパク質の網羅的な同定により、ユビキチン化/脱ユビキチン化による細胞質分裂制御のより詳細な機構の解明が期待される。

(3) 脱ユビキチン化酵素 AMSH の基質特異性の構造的基盤 (Sato et al. 2008. Nature 455: 358-362)

AMSH-like protein の酵素活性欠失変異体と Lys63 結合型ユビキチン 2 量体の結晶構造を解明した。その結果、AMSH-like protein はユビキチン間のイソペプチド結合を形成する Lys63 の前後のトリペプチド配列 Gln62-Lys63-Glu64 を厳密に認識していることが明らかとなった。Lys48 前後のアミノ酸配列はこれとは全く異なっているため、AMSH は Lys48 結合型ユビキチン鎖に対する親和性が弱くなっていると予想された。以上、AMSH の基質特異性発現のメカニズムを解明した。

本研究は、脱ユビキチン化酵素とユビキチン鎖の複合体の構造解明に世界で初めて成功したものであり、Nature 誌に掲載されて大きなインパクトをもたらした。今後、AMSH

の基質特異性の生物学的意義についての細胞生物学的な解明が期待される。

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 9 件)

1. Endo A, Matsumoto M, Inada T, Yamamoto A, Nakayama KI, Kitamura N, Komada M. Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. J. Cell Sci. 122, 678-686 (2009) 査読有
Chosen as the cover image of the issue, and highlighted in the "In This Issue" section.
2. Ohno N, Terada N, Komada M, Saitoh S, Costantini F, Pace V, Germann PG, Weber K, Yamakawa H, Ohara O, Ohno S. Dispensable role of protein 4.1B/DAL-1 in rodent adrenal medulla regarding generation of pheochromocytoma and plasmalemmal localization of TSLC1. Biochim. Biophys. Acta 1793, 506-515 (2009) 査読有
3. 駒田雅之、向井明子「ユビキチン修飾系による細胞質分裂の制御」蛋白質核酸酵素 54, 11-19 (2009) 査読有
4. Mukai A, Mizuno E, Kobayashi K, Matsumoto M, Nakayama KI, Kitamura N, Komada M. Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis. J. Cell Sci. 121, 1325-1333 (2008) 査読有
5. Sato Y, Yoshikawa A, Yamagata A, Mimura H, Yamashita M, Ookata K, Nureki O, Iwai K, Komada M, Fukai S. Structural basis for selective cleavage of Lys63-linked

polyubiquitin chains. Nature 455, 358-362

(2008) 査読有

6. Kosaka T, Komada M, Kosaka K. Sodium channel cluster, betaIV-spectrin and ankyrinG positive "hot spots" on dendritic segments of parvalbumin-containing neurons and some other neurons in the mouse and rat main olfactory bulbs. Neurosci. Res. 62, 176-186 (2008) 査読有

7. Nakagawa H, Tamura A, Wakabayashi K, Hoshijima K, Komada M, Yoshida T, Kometani S, Matsubara T, Mikuriya K, Ishikawa T. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. Biochem. J. 411, 623-631 (2008) 査読有

8. Komada M. Controlling receptor downregulation by ubiquitination and deubiquitination. Curr. Drug Discov. Technol. 5, 78-84 (2008) 査読有

9. 向井明子、駒田雅之「エンドソームにおけるメンブレントラフィックと細胞質分裂の接点」蛋白質核酸酵素 増刊号「メンブレントラフィックの奔流」 53, 2094-2098 (2008) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 花房洋「LRRK1 は ESCRT-0 複合体と相互作用することで EGFR 細胞内トラフィックを制御している」日本生化学会/日本分子生物学会合同大会 BMB20082008. 2008 年 12 月 12 日、神戸
2. 佐藤裕介「AMSH ファミリーによる K63 結合型ポリユビキチン鎖特異的な切断活性の構造的基盤」日本生化学会/日本分子生物学会合同大会 BMB20082008. 2008 年 12

月 12 日、神戸

3. 遠藤彬則「脱ユビキチン化酵素 USP36 による核小体機能の制御」日本生化学会/日本分子生物学会合同大会 BMB20082008. 2008 年 12 月 11 日、神戸
4. 駒田雅之「中央部紡錘体における時空間的に制御されたタンパク質ユビキチン化」日本生化学会/日本分子生物学会合同大会 BMB2008. 2008 年 12 月 10 日、神戸
5. 向井明子「キイロシヨウジョウバエを用いた脱ユビキチン化酵素 UBPY の機能解析」第 60 回日本細胞生物学会. 2008 年 7 月 1 日、横浜
6. 駒田雅之「エンドソームと細胞質分裂の接点-ユビキチン化と脱ユビキチン化による調節」第 60 回日本細胞生物学会. 2008 年 7 月 1 日、横浜

[図書] (計 1 件)

1. 駒田雅之「増殖因子受容体の分解制御と制癌」バイオ研究のフロンティア 3-医療に向けた先端バイオ科学. 東工大出版会 (印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒田 雅之 (KOMADA MASAYUKI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授
研究者番号：10225568

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし