

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590064

研究課題名（和文） 逆位相の膜陥入を伴う生命現象のユビキチン化による分子制御機構解

研究課題名（英文） Analyses of reverse membrane invaginations regulated by ubiquitination-dependent mechanism

研究代表者

藤田 英明（FUJITA HIDEAKI）

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80291524

研究成果の概要（和文）：

鉄の主要な受容体である Transferrin Receptor の新しい分解代謝制御機構が存在する事を明らかにした。また HIV-1 などレトロウイルスの細胞内増殖・出芽の宿主抑制因子である BST-2(Tetherin)の細胞内輸送およびHIVアクセサリタンパク質である Vpuによるその分解の分子機構について明らかにした。さらに新規美白化合物2種類についてその作用機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We found a novel mechanism of down-regulation of transferrin receptor. We characterized an intracellular logistics of BST-2/Tetherin, which is a host restriction factor of retrovirus. We found that Vpu, an accessory protein of HIV-1, counteracts a role of BST-2/Tetherin. We further analyzed the mechanisms of two novel whitening reagents in melanocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リソソーム・ユビキチン・タンパク質分解・小胞輸送・エンドソーム・トランスフェリン受容体・鉄代謝・細胞質分裂

1. 研究開始当初の背景

エンドソームは形質膜あるいはトランスゴルジ領域からリソソームへの中に位置する細胞内コンパートメントであり、限界膜がその内部に陥入し形成される内腔小胞を持つ多胞体様構造（MVB: multi vesicular body）と呼ばれる特徴的な構造を持つ。MVB

における内腔小胞は、細胞外からのエンドサイトーシスで形成される小胞や細胞内の輸送小胞の形成とはトポロジー（膜位相）的には逆位相であり、その形成の分子機構は未だ不明な部分が多い。このような逆位相の小胞形成はHIVをはじめとする一部のウイルスの形質膜上での出芽（Budding）と相関性がある。

ることが指摘されてきている。実際、SKD1・ESCRT 蛋白質複合体の中には、HIV ウイルスの形成に関与しているものが存在していることが複数のグループから報告されてきている。また、細胞質分裂 (cytokinesis) における親細胞から娘細胞の形成も、そのサイズは異なるものの膜位相的には MVB 内腔小胞あるいはウイルス粒子の出芽と同一であるとみなすことができる。最近、SKD1・ESCRT 蛋白質複合体分子の一部が cytokinesis における midbody に局在することや、それらの過剰発現やノックダウンが正常な細胞分裂を阻害し、多核の細胞を作り出してしまうことなどが報告されている。すなわち一連の逆位相の膜の陥入による小胞形成には SKD1 とその結合蛋白質を含む分子群が関与していることが明らかとなりつつある。興味深いことにこれらの生命現象にはいずれも蛋白質のユビキチン化が関与していることが示唆されている。ユビキチン化は、MVB 内腔小胞への膜蛋白質選別輸送シグナルあるいは、HIV ウイルス粒子の一部構成蛋白質の形質膜上への輸送シグナルとして機能していることが報告されている。さらに、cytokinesis 時にユビキチン化蛋白質および脱ユビキチン化酵素 (UBPY) が midbody へ局在することが報告されており、これら一連の生命現象にはユビキチンを中心とした共通の分子機構の存在が示唆されている。

2. 研究の目的

これまで我々は変異型 SKD1 (E235Q) の過剰発現により、エンドソーム内にユビキチン化された膜蛋白質が蓄積することを見出し、そこに蓄積したユビキチン化膜蛋白質の網羅的プロテオミクス解析に成功した。さらに同定された膜蛋白質について、そのユビキチン化制御機構、ユビキチンリガーゼの同定、ユビキチン化の生理的意義などについて研究を行ってきた。

本研究ではこれまでの知見をもとに、2つの逆位相の膜の陥入による小胞形成、すなわち HIV ウイルスの形質膜上での出芽、および細胞質分裂 (cytokinesis) における midbody 形成の分子機構について、特にユビキチン化・脱ユビキチン化による制御機構に着目して明らかにする。

(1) ユビキチン化による HIV ウイルスの形質膜上での出芽の制御機構の解明

HIV の構成蛋白質である Gag は単量体型 HECT 型ユビキチンリガーゼ Nedd4 と相互作用・ユビキチン化されることが知られているが、ウイルス粒子中の Gag 蛋白質のユビキチン化は 2%以下しか認められない。すなわち Gag 蛋白質はユビキチン化により細胞表面の出芽部位へと輸送されたのちに、速やかに脱ユビキチン化を受けていることを示している。これ

は MVB において選別を受けたユビキチン化膜蛋白質が速やかに脱ユビキチン化され、リソソームにおいてはユビキチン化が検出されない事象と非常に良く似ている。Gag 蛋白質のユビキチン化後の形質膜までの輸送・脱ユビキチン化のプロセスに SKD1・ESCRT 分子および MVB における脱ユビキチン化酵素 UBPY が膜蛋白質の選別同様に作用するという作業仮説を立て検証する。予備的実験により SKD1 (E235Q) および SBP3/Vps2/ESCRT-III の過剰発現が Gag-Pol 遺伝子の発現により形成される偽ウイルス粒子 (VLP: Virus like particle) の形成・出芽を阻害していることが確認できている (右図)。本研究は今後 HIV ウイルスの形成・細胞内増殖の新しい制御分子機構の解明につながるとともに、それらを標的とした新規の治療薬の開発などの研究につながることが期待される。

(2) ユビキチン化による細胞質分裂 (cytokinesis) における midbody 形成の制御機構の解明

ESCRT 分子あるいは一部の SNARE 分子の機能阻害による midbody 形成阻害は、エンドソームあるいは分泌小胞が midbody 形成の膜供給源となっていることを示唆している (下左図)。我々は予備的実験によりエンドソーム膜蛋白質であるトランスフェリン受容体 (TfR) は midbody に局在することや、SBP3/Vps2/ESCRT-III の過剰発現が有為に細胞質分裂を阻害するとともに、TfR の midbody への局在も阻害していることを見出した。さらに我々は前述のプロテオミクス解析で TfR のユビキチン化を見出し、その生理的意義を解析する目的でリジン残基変異体 (4KR-TfR) を作成した。興味深いことに野生型の TfR とは異なり 4KR-TfR は midbody へ局在しなかった (下右図)。さらに同調培養した HeLa 細胞において、細胞質分裂時には TfR のユビキチン化が亢進しており、細胞質分裂終了時には速やかに脱ユビキチン化されていることも見出した。そこで、細胞質分裂時のエンドソーム膜蛋白質のユビキチン化はエンドソーム小胞を midbody へと導くためのシグナルとして機能しているという作業仮説を立て、他のエンドソーム膜蛋白質についても細胞質分裂時にユビキチン化が亢進するかについて解析を行う。またそれらエンドソーム膜蛋白質のユビキチンリガーゼ・脱ユビキチン化酵素の同定を試み、細胞質分裂時におけるエンドソーム膜蛋白質のユビキチン化・脱ユビキチン化の制御について明らかにする。これまで細胞周期における蛋白質のユビキチン化は各種制御因子のプロテアソームでの分解シグナルとしてのみ考えられていた。本研究はユビキチン化による新しい細胞周期制御の分子機構の解明につながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン化による HIV ウイルスの形質膜上での出芽の制御機構の解明

SKD1 および SKD1 結合蛋白質群 (SBP1-3) のウイルス形成への関与についての解析:すでに予備的実験により SKD1(E235Q) および SBP3/Vps2/ESCRT-III の過剰発現が VLP の形成・出芽を阻害していることが確認できている。今後、さらに他の SBP1, SBP2 に関しても同様な実験を行う。また、Vps4B(human SKD1) および SBP1-3 の siRNA による発現抑制による影響もしらべる。

(2) ユビキチン化による細胞質分裂時 (cytokinesis) における midbody 形成の制御機構の解明

cytokinesis 時にユビキチン化エンドソーム膜蛋白質を midbody へと局在させる輸送制御因子の同定とその機能解析:一部の ESCRT 蛋白質は midbody に局在するとともにその過剰発現あるいは siRNA によるノックダウンが cytokinesis を阻害することが知られている。しかしながらその明確な阻害分子機構は明らかとなっていない。我々の予備的実験によりこの cytokinesis の阻害が、エンドソーム由来の小胞の midbody への局在 (TfR の midbody への局在) が阻害され、midbody への膜供給が抑制された結果であることが、少なくとも SBP3/Vps2/ESCRT-III の過剰発現の系において示唆されている (右図)。cytokinesis の阻害効果を示す他の ESCRT 蛋白質についても、TfR の midbody への局在を抑制しうるかについて解析を行い、われわれの作業仮説を検証する。

(3) 同調培養 HeLa 細胞を用いた cytokinesis 時にユビキチン化を受けるエンドソーム膜蛋白質およびその midbody への輸送制御因子、ならびにユビキチンリガーゼ・脱ユビキチン化酵素の網羅的解析:

予備的実験により、Aphidicolin/Nocodazole 処理で M 期に同調させた HeLa 細胞内では TfR のユビキチン化が有為に増加し、その後 180 分以降でこれらは速やかに脱ユビキチン化されていることを見出した (右図)。そこで M 期細胞の膜面分を調整、膜蛋白質を可溶化後、ユビキチン化膜蛋白質を抗ユビキチン抗体によりアフィニティ精製する。得られた蛋白質をトリプシン消化・HPCL 分離後、Mass/Mass 解析により同定する。この解析により TfR 以外に M 期に於いてユビキチン化されエンドソーム小胞を midbody へと導く他のエンドソーム膜蛋白質の同定が期待される。その際に安定同位体で標識されたアミノ酸を含む培養溶液で培養した細胞 (M 期から 180 分後以降) を内部標準として用いることでユビキチン化の定量的な増減についても知見が得られることが期待される。さらに可溶化前の膜面

分から Urea 等による変性で抽出されるエンドソーム膜表在型蛋白質についても同定を試みる。この面分には ESCRT 蛋白質をはじめとするユビキチン化シグナルに結合する分子が含まれているため、新規の輸送制御因子が同定されてくることが期待できる。同定された膜蛋白質に関しては midbody への局在の有無・リジン残基変異体の発現による midbody への局在や cytokinesis への影響について解析を行う。同様に同定されたエンドソーム膜表在型蛋白質については過剰発現や siRNA によるノックダウンによる機能評価を行う。この解析によりさらにユビキチンリガーゼ・脱ユビキチン化酵素が同定されてくことも期待される。同定されてくるユビキチンリガーゼ・脱ユビキチン化酵素の cDNA 発現ベクターの構築、抗体作成、siRNA 作成などを行い、過剰発現 (不活性型・deletion 体などによるドミナントネガティブ効果)・発現抑制時の TfR の midbody 局在や cytokinesis への影響について解析をおこなう。

4. 研究成果

(1) 鉄の主要な受容体である Transferrin Receptor (TfR) が鉄イオン濃度依存的にユビキチン化を受け、徐々にリソソームでの分解を受けているという新しい TfR の代謝・発現量制御機構が存在する事を報告した (*Genes to Cells*, 2011)。さらに膜結合型ユビキチンリガーゼである MARCH (Membrane Associated Ring-CH) ファミリー蛋白質のひとつが TfR を基質として認識し、そのユビキチン化によるリソソームでの分解に関与することなどを明らかにした (第 84 回日本生化学会大会、日本薬学会第 132 年会・シンポジウム、投稿論文準備中)。

(2) TfR が細胞周期 M 期前半においてユビキチン化を受け、細胞質分裂時には徐々に脱ユビキチン化されてくる。この TfR ユビキチン化は分裂溝へエンドソーム由来の小胞が局在することと密接に関連している。従って、TfR のユビキチン化には少なくとも 2 つの異なる生理的役割があることが示唆された。さらに別の鉄輸送体である DMT1 (Divalent Metal Transporter-1) が、やはり細胞周期に依存したユビキチン化を受けることも見出した (投稿論文準備中)。

(3) Trans-Golgi network 膜タンパク質 TGN46 の細胞内輸送および局在化の分子制御機構について解析を行ない、新規のタンパク質選別輸送の分子機構が存在することを明らかにした (第 84 回日本生化学会大会、投稿論文準備中)。

(4) HIV-1 などレトロウイルスの細胞内増殖・出芽の宿主抑制因子である BST-2 (Tetherin) の細胞内輸送について報告した (*J. Biol.*

Chem. (2009))). また HIV アクセサリータンパク質である Vpu による BST-2 (Tetherin) のダウンレギュレーションの分子機構について明らかにした (*Communicative & Integrative Biology* (2010)、*J. Biol. Chem.* (2009))). さらに BST-2 (Tetherin) の細胞内ロジスティクスに関する総説を報告した (Current HIV Research, in press).

(5) 新規美白化合物 2 種類についてその作用機構を明らかにした。(*Experimental Dermatology* (2011)、*J. Investig. Dermatol.* (2009))

(6) HECT 型 ユビキチンリガーゼ Nedd4 のアダプター分子である Nedd4 interacting protein 2 (NDFIP2) が Nedd4 によるコネクシンの分解を負に制御 (競合阻害) していることを明らかにした (*Biol. Pharm. Bull.* (2010))。

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. H. Fujita, K. Fujimoto, K. Tokunaga and Y. Tanaka “ Intracellular logistics of BST-2/Tetherin ” *Curr HIV Res.* (2012) in press. (査読有り)
2. R. Tachiyama, D. Ishikawa, M. Matsumoto, K. I. Nakayama, T. Yoshimori, S. Yokota, M. Himeno, Y. Tanaka and H. Fujita* “Proteome of ubiquitin/MVB-Pathway: Possible involvement of Iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation”, *Genes to Cells* (2011) **16**, 448-466 ***Correspondence author.** (査読有り)
3. H. Fujita, M. Hongo, M. Mochizuki, K. Yokoyama and Y. Tanaka “Inhibitory effects of 16-hydroxy-9-oxo-10E, 12E, 14E-octadecatrienoic acid (Corchorifatty acid B) isolated from *Melissa officinalis* Linné on melanogenesis” *Experimental Dermatology* (2011) **20**, 420-424 (査読有り)
4. Y. Iwabu, M. Kinomoto, M. Tatsumi, H. Fujita, M. Shimura, Y. Tanaka, Y. Ishizaka, D. Nolan, S. Mallal, T. Sata, and K. Tokunaga “ Differential Anti-APOBEC3G Activity of HIV-1 Vif Proteins Derived from Different Subtypes ” *J. Biol. Chem.* (2010) **285**, 35350-35358 (査読有り)
5. C. Ohzono, S. Etoh, M. Matsumoto, K. I.

Nakayama, Y. Hirota, Y. Tanaka and H. Fujita[§] “Nedd4-interactin protein 2 (NDFIP2), a short half-life lysosomal membrane protein, negatively controls down-regulation of connexin43 ” *Biol. Pharm. Bull.* (2010) **33***, 951-957 [§]

Correspondence author.
***Highlighted and selected for a cover in this issue.** (査読有り)

6. Y. Iwabu, H. Fujita, Y. Tanaka, T. Sata, and K. Tokunaga “Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu,” *Communicative & Integrative Biology* (2010) **3:4**, 366-369; July/August (査読有り)
7. Y. Iwabu, H. Fujita, M. Kinomoto, K. Kaneko, Y. Ishizaka, Y. Tanaka, T. Sata, and K. Tokunaga “ HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes ” (査読有り) *J. Biol. Chem.* (2009), **284**, 35060-35072
8. N. Masuyama, T. Kuronita, R. Tanaka, T. Muto, Y. Hirota, A. Takigawa, H. Fujita, Y. Aso, J. Amano and Y. Tanaka “HML24 is internalized from lipid rafts by clathrin-mediated endocytosis through interaction with alpha-adaptin.” *J. Biol. Chem.* (2009) **284**, 15927-41. (査読有り)
9. H. Fujita, T. Motokawa, T. Katagiri, S. Yokota, A. Yamamoto, M. Himeno and Y. Tanaka “ Inulavosin, a melanogenesis inhibitor, leads a mistargeting of tyrosinase to lysosome and accelerates its degradation ” *J. Investig. Dermatol.* (2009) **129**, 1489-99. (査読有り)

[学会発表] (計 17 件)

1. 藤田英明、岩部幸枝、佐多徹太郎、徳永研三、田中嘉孝「膜結合型ユビキチンリガーゼ MARCH8 によるトランスフェリン受容体ダウンレギュレーションの分子機構」日本薬学会第 132 年会・シンポジウム「メタロミクス研究の新展開 -金属元素の1細胞分析から疾患との関連まで-」札幌、2012 年 3 月 (招待講演)
2. 藤田英明、岩部幸枝、佐多徹太郎、徳永研三、田中嘉孝「膜結合型ユビキチンリガーゼ MARCH8 によるトランスフェリン受容体のユビキチン化お

- よびダウンレギュレーションの分子機構」第84回日本生化学会大会、京都、2011年、9月
3. 藤本景子、吉永奈央、平井祥一、藤田英明、廣田有子、田中嘉孝「Trans-Golgi network 膜タンパク質 TGN46 の細胞内輸送および局在化の分子制御機構」第84回日本生化学会大会、京都、2011年、9月
 4. 藤田英明、立山諒、石川大輔、松本雅記、中山敬一、横田貞記、吉森保、姫野勝、田中嘉孝(シンポジウム口演)「ユビキチン化による金属輸送体の細胞内輸送制御」日本薬学会第131年会・特別シンポジウムE「トキシコメタロミクスの新機軸 -元素分析・イメージングと金属輸送・創薬のイノベーション-」2011年3月*震災のため口演中止
 5. 藤田英明、立山諒、松本雅記、中山敬一、吉森保、姫野勝、横田貞記、田中嘉孝「鉄濃度依存的なトランスフェリン受容体のユビキチン化による代謝回転制御に関する研究」第27回日本薬学会九州支部大会 長崎大学、2010年 12月
 6. 廣田有子、藤本景子、栗原俊祐、阿佐絵里佳、池田一彦、佐野孝一、神吉将之、関二郎、藤田英明、田中嘉孝「物誘発性リン脂質症の分子機構に関する研究」第27回日本薬学会九州支部大会 長崎大学、2010年 12月
 7. 藤本景子、吉永奈央、平井祥一、廣田有子、静川直子、藤田英明、田中嘉孝「Trans-Golgi network 膜タンパク質 TGN46 の細胞内輸送および局在化の分子制御機構に関する研究」第27回日本薬学会九州支部大会 長崎大学、2010年 12月
 8. H. Fujita, Y. Iwabu, K. Tokunaga, T. Sata, K. Fujimoto, R. Tachiyama, D. Ishikawa, M. Matsumoto, K. I. Nakayama, and Y. Tanaka “The endosomal vesicles carrying ubiquitylated cargos selectively localizes to the cleavage furrow during cytokinesis.” BMB2010 (第83回日本生化学会大会/第33回日本分子生物学会年会) 神戸、2010年 12月
 9. 岩部幸枝、藤田英明、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三「BST-2/tetherin の downregulation における HIV-1 Vpu の cofactor 要求性」BMB2010 (第83回日本生化学会大会/第33回日本分子生物学会年会) 神戸、2010年 12月
 10. H. Fujita, Y. Iwabu, K. Tokunaga, T. Sata, K. Fujimoto, R. Tachiyama, D. Ishikawa, M. Matsumoto, K. I. Nakayama, and Y. Tanaka “Targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow requires ubiquitylation of membrane proteins.” AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY Special Symposium “BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY OF ESCRTS IN HEALTH AND DISEASE” (October, 2010), Snowbird Ski and Summer Resort, Utah, USA
 11. Y. Iwabu, H. Fujita, Y. Tanaka, T. Sata, and K. Tokunaga “Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by HIV-1 Vpu” CRM 2010 - Centennial Retrovirus Meeting (April, 2010), Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic
 12. Y. Iwabu, H. Fujita, M. Kinomoto, K. Kaneko, Y. Ishizaka, Y. Tanaka, T. Sata and K. Tokunaga “HIV-1 Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin and leads it to lysosomes” The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010) (February, 2010) San Francisco, CA, USA
 13. M. Hongo, H. Fujita, M. Mochizuki, T. Kato, K. Yokoyama, Y. Tanaka, “Inhibitory effect of active compound isolated from *Melissa officinalis* Linné (*Labiatae*) on melanogenesis and phagocytosis” 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, **Workshop**, Fuluoka, 2009年、12月
 14. 岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三「BST-2/Tetherin と HIV-1 Vpu の相互作用における結合領域の同定」第32回日本分子生物学会年会 横浜、2009年 12月
 15. 岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三「HIV-1 Vpu と BST-2/Tetherin の Transmembrane 領域間における相互作用」第57回日本ウイルス学会 東京、2009年 10月
 16. 岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三「HIV-1 Vpu によるウイルス放出抑制因子

BST-2/Tetherinの細胞内分解経路の
解明」第57回日本ウイルス学会 東
京、2009年 10月

17. 藤田英明、立山諒、石川大輔、松本
雅記、中山敬一、横田貞記、吉森保、
姫野勝、田中嘉孝「過剰鉄によるユ
ビキチン化がトランスフェリン受容
体のリソソームでのダウンレギュレ
ーションを引き起こす」第82回日本
生化学会大会、神戸、2009年、10月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 英明 (FUJITA HIDEAKI)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：80291524

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

徳永 研三 (TOKUNAGA KENZO)
国立感染症研究所・感染病理部・
主任研究官
研究者番号：50342895