

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570184

研究課題名(和文) ユビキチンの動態を制御する因子 Rfu1 の機能制御

研究課題名(英文) Functional analysis of Rfu1 that regulates ubiquitin homeostasis

研究代表者

木村 洋子 (KIMURA, Yoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：80291152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：ユビキチンはタンパク質の機能を制御する必須の修飾分子である。ユビキチンの発現は環境に応じて変動し適切な量に調節されており、ユビキチン量が調節されていること(ユビキチンホメオスタシス)は、生命活動の維持に重要である。出芽酵母において、我々の同定した分子 Rfu1 は、エンドソームに局在し脱ユビキチン化酵素 Doa4 を阻害することによって、細胞内の単量体ユビキチンレベルを制御している。Doa4 はエンドソームで働く分子 Bro1 によってもその局在と活性が制御されているが、我々は Bro1 は Rfu1 の局在と分解も制御していることを明らかにした。さらに Rsp5 が Rfu1 の分解の関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Yeast Rfu1 (Regulator for free ubiquitin chain 1) localizes to endosomes and plays a role in ubiquitin homeostasis by inhibiting the activity of Doa4. We showed that Bro1 that recruits Doa4 to endosomes and stimulates Doa4 deubiquitinating activity, also recruits Rfu1 to endosomes. This recruitment is mediated by a direct interaction between the YPEL motif in the Rfu1 carboxyl-terminus and the V domain in Bro1. Furthermore, overexpression of Bro1, particularly the V domain, prevents Rfu1 degradation in response to heat shock. Thus, Bro1 regulates both the localization and stability of Rfu1. Rfu1 degradation involved the proteasome and a ubiquitin ligase Rsp5, suggesting that Rfu1 stability is regulated by ubiquitin-proteasome pathways.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ユビキチン エンドソーム Bro1 Rfu1 蛋白質分解 ユビキチンリガーゼ 脱ユビキチン化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは、76個のアミノ酸からなるタンパク質で、真核細胞で保存された配列をもつタンパク質修飾因子である。最も理解されているユビキチンの機能は、ユビキチン化したタンパク質をプロテアソームによって認識、分解されるように導く「分解タグ」としての役割である。しかし、近年、ユビキチンは細胞内輸送やシグナル伝達においてもターゲティングやシグナルのタグとして働くことが解明され、現在ではタンパク質の機能を広く制御する修飾分子として認識されている。そして、ユビキチンによるタンパク質の修飾は、細胞周期、DNA 修復、シグナル伝達・転写調節、細胞内品質管理など非常に数多くの生命現象において、重要な役割を果たしている。

ユビキチンは細胞内に豊富に存在するため、過剰に存在すると考えられてきた。しかし、最近の研究によって、ユビキチンの量は細胞の環境や状態に応じて変化し、又適切な量で存在しなければならないことがわかってきた。大抵の生物はユビキチンをコードする遺伝子を数個有するが、マウスでは9個のユビキチンがタンデムに連結したポリユビキチンをコードする *Ubc* 遺伝子のみ欠損で胎生致死になる。また、4個のユビキチンが連結したポリユビキチンをコードする *Ubb* 遺伝子の欠損においても不妊、肥満、神経変性変異を起こす。出芽酵母でも、ポリユビキチン遺伝子 *UBI4* の欠損によって、ストレス感受性になり胞子形成能が失われる。さらに、Ubp6, Doa4 などのユビキチン化タンパク質からユビキチンを回収する脱ユビキチン化酵素 (Dub) をコードする遺伝子の変異株では単量体ユビキチン量が減り、アミノ酸アナログに対して感受性になるが、これはユビキチンの大量発現によって回復する。一方、ユビキチンは不足するだけでなく、過剰にあっても細胞に悪い影響を与える。出芽酵母では、

ユビキチンの大量発現はカドミウムなどのストレスに対して感受性になることが報告されている。

したがって、ユビキチンの量的制御は大変重要である。この制御機構については未知の部分が多いが、幾つか報告されている。まず、ポリユビキチン遺伝子の発現がストレスによって転写誘導されることである。ストレス時には変性したタンパク質が増え、それを分解するために多くのユビキチンが必要とされる。ポリユビキチンになっていると一回の転写、翻訳で複数のユビキチンを迅速に合成できる。またプロテアソームによる制御も報告されている。プロテアソームに結合してユビキチン化タンパク質からユビキチンを回収する Dub の Ubp6 は、細胞内のユビキチンが減少すると発現量が増える。その結果、Ubp6 が結合しているプロテアソームを増え、Ubp6 によるユビキチンの回収が増え、ユビキチンが積極的にリサイクルされる。

最近、我々は、ユビキチンホメオスタシスが、Dub とそのインヒビターによって制御されるという全く新たなメカニズムを見いだした。ユビキチンは他のユビキチンを修飾できるため、ユビキチンの鎖を形成できる。この性質によって、ユビキチンは、細胞内で単量体、タンパク質が結合した型 (ユビキチン化タンパク質) またはタンパク質が結合していない鎖状ユビキチンの、いずれかの型をとっている。我々は、分子シャペロン Cdc48 の機能解析の研究過程で、新規の分子 Rfu1 (Regulator for free ubiquitin chain 1) を同定した (Cell 2009)。そして、Rfu1 は Dub である Doa4 のインヒビターであり、Doa4 がフリーのユビキチン鎖を単量体ユビキチンに変える働きを阻害することを明らかにした。また、熱ショック時にはフリーのユビキチン鎖が消失するが、これは Rfu1 が減少し Doa4 が増加する事によって、Doa4 によるフリーのユビキチン鎖からの単量体ユビキチ

ンが産生が起きるといふ制御モデルを示した。さらに、平常時に存在するフリーのユビキチン鎖が、不必要なユビキチンのリザーバー型である可能性を示した。

## 2 . 研究の目的

本研究の目的は、Rfu1 の機能解析および分解機構についての解析である。

第1に、Rfu1 は熱ショックストレスにより分解されるが、その分解機構を解明する。熱ショックストレスにより Rfu1 が分解されると、Rfu1 による阻害がなくなった Doa4 によって、フリーのユビキチン鎖が単量体ユビキチンに変えられ、ユビキチン化反応に必要な単量体ユビキチンが供給される。したがって、Rfu1 が分解されることは熱ショック時に重要な制御機構である。第2に、他の Rfu1 の制御機構を解析する。

## 3 . 研究の方法

プロテアーゼ阻害剤などの様々な薬剤を酵母に処理した実験をおこない、Rfu1 の分解に影響がみられるかを調べた。また60種類以上のユビキチンリガーゼをコードする非必須遺伝子の破壊株や、必須のユビキチンリガーゼである Rsp5 の高温変異株を用いて Rfu1 の分解を調べた。

Doa4 は、Rfu1 によって負に制御されているが、エンドソームで働く ESCRT 因子 Bro1 にも制御されることが報告されている。この場合、Bro1 は Doa4 の正の制御因子であり、Doa4 をエンドソームにリクルートし、また Doa4 の脱ユビキチン化活性を活性化する。Bro1 の効果を、Bro1 の変異株や Bro1 過剰発現によって調べた。

## 4 . 研究成果

Rfu1 の分解に関わる因子を同定するために、まず阻害剤を添加して分解を阻害する阻害剤を調べた。プロテアソームの阻害剤である MG132 処理によって、部分的ながら Rfu1 の分解は阻害された。さらにプロテアソームをコードする遺伝子の高温変異株では、やは

り部分的ながら Rfu1 の分解は阻害された。また 液胞のプロテアーゼ、及びカルパインの酵母ホモログの遺伝子の破壊株では Rfu1 の分解は阻害されなかった。以上の結果よりユビキチン・プロテアソーム系の因子が Rfu1 の分解に関与していることが示されたので、さらに詳細な解析を進めた。60種類以上のユビキチンリガーゼをコードする非必須遺伝子の破壊株では、Rfu1 の分解は阻害されなかった。そこで、必須のユビキチンリガーゼである Rsp5 の高温変異株を用いて調べてみると、Rfu1 の分解が遅延することが分かった。

今回の研究では、Bro1 が Rfu1 を制御していることも見出した。Bro1 と Rfu1 は直接結合し、Bro1 中の V ドメインと Rfu1 中の YPEL 配列がその結合に必須だった。Rfu1 の YPEL 配列に変異を入れると、Rfu1 のエンドソーム局在が失われ、ユビキチンホメオスタシスも失われた。さらに、Bro1 の V ドメインの過剰発現は、熱ショックストレスによる Rfu1 の分解を抑えた。したがって、Bro1 は、Doa4 の制御因子だけでなく、Rfu1 の局在と分解を制御している因子であることが明らかになった。そして Rfu1 によるユビキチンのホメオスタシスがエンドソームで行われていることが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. [Kimura Y.](#), Fukushi J., Hori S., Matsuda N., Okatsu K. Kakiyama Y., Kawawaki J. Kakizuka A., and Tanaka K. Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. *Genes to Cells* 査読有 **18**:1131-1143 . 2013

2. Takata T, Kimura Y\*, Ohnuma Y, Kawawaki J, Kakiyama Y, Tanaka K, and Kakizuka A\*. Rescue of growth defects of yeast *cdc48* mutants by pathogenic IBMPFD-VCPs. *J. Struct. Biol.* 査読有 **179**:93-103. 2012
  3. Weiss K, Kimura Y, Lee W, and Littleton T. Huntingtin aggregation kinetics and their pathological role in a *Drosophila* Huntington's disease model. *Genetics* 査読有 **190**:581-600. 2012
  4. 木村洋子\* 脱ユビキチン化酵素の制御機構 実験医学 査読なし **29**:1945-1949. 2011
- [学会発表](計 13 件)
1. 木村 洋子 ユビキチンホメオスタシスの制御機構 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム「タンパク質の品質管理と疾患」横浜 平成 25 年 9 月 13 日
  2. 木村 洋子、川脇純子、柿山幸恵、田中啓二 単量体ユビキチンの量を制御する Rfu1 の局在と分解は Bro1 に依存している 第 46 回酵母遺伝学フォーラム 仙台 平成 25 年 9 月 10 日
  3. Yoko Kimura, Akira Kakizuka, and Keiji Tanaka. Dynamics of normal and pathogenic p97/VCP upon mitochondria stress 1<sup>st</sup> International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo Japan 平成 25 年 2 月 1 日
  4. 木村洋子、垣塚彰 田中啓二 ミトコンドリアストレスにおける変異 VCP の動態解析 第 85 回日本生化学会 福岡 平成 24 年 12 月 16 日
  5. 木村洋子 ミトコンドリアストレスにおける VCP の動態解析 新学術領域[修飾シグナル病]若手ワークショップ 湯河原 平成 24 年 10 月 4 日
  6. 高田尚寛、木村洋子、大沼洋平、川脇純子、柿山幸恵、田中啓二、垣塚彰 疾患型 VCP は酵母 *cdc48* 変異体の増殖欠損を抑圧する 第 45 回酵母遺伝学フォーラム 京都 平成 24 年 9 月 5 日
  7. Kimura Y., Takata, T., Kakizuka A., and Tanaka K. Rescue of growth defects of yeast *cdc48* mutants by pathogenic IBMPFD-VCPs. FASEB Summer Research Conference (Ubiquitin and Cellular Regulation) Vermont Academy, Saxtons River, Vermont, USA 平成 24 年 6 月 24 日-7 月 1 日
  8. 木村洋子 田中啓二 ミトコンドリアストレスにおける正常型と疾患型 VCP の動態変化 新学術領域「修飾シグナル病」研究交流会 東京大学 平成 24 年 1 月
  9. Yoko Kimura<sup>1</sup>, Akira Kakizuka, and Keiji Tanaka Dynamics of normal and pathogenic p97/VCP upon mitochondria stress Oral presentation The 9<sup>th</sup> International Conference on AAA proteins Kumamoto, Japan 平成 23 年 11 月 9 日
  10. 木村洋子、川脇純子、下田鮎美、柿山幸恵、田中啓二 単量体のユビキチン量を制御する因子 Rfu1 の制御機構 第 44 回酵母遺伝学フォーラム 福岡 平成 23 年 9 月
  11. 木村洋子 ユビキチンホメオスタシスの制御機構 新学術領域「修飾シグナル病」第一回領域推進会議 東京大学 平成 23 年 7 月
  12. 木村洋子 ユビキチンホメオスタシスの制御機構 新学術領域「修飾シグナル病」第 2 回研究交流若手ポスター発表会 東京大学 平成 23 年 7 月
  13. 木村洋子 Regulatory mechanism of ubiquitin homeostasis 「奈良先端未来開拓コロキウム」シンポジウム 奈良

先端科学技術大学 平成 23 年 6 月

〔図書〕(計 1 件)

1. 木村洋子 垣塚彰 タンパク質の品質  
管理と神経変性 Annual Review 神経  
p206-211.2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村 洋子 (KIMURA, Yoko)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・  
生体分子先端研究分野・主任研究員  
研究者番号：80291152