

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570160

研究課題名(和文) タンパク質分解の仕分け制御におけるユビキチンレセプターの調節機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of ubiquitin receptors on regulatory functions of protein degradation

研究代表者

小林 英紀 (KOBAYASHI, HIDEKI)

岡山大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：20150394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン依存タンパク質分解は、細胞内外の環境ストレス応答における制御システムに重要な役割を担っている。本件研究では、出芽酵母と葉緑体を用いて、ストレス応答とタンパク質分解の制御について解析した結果、酵母の塩ストレスではUBL-UBAユビキチンレセプターが、栄養ストレスではGタンパク質Gtr1-Gtr2複合体が、葉緑体の光ストレスではD1タンパク質分解とFtsH-チラコイド構造が分解制御に関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin-dependent protein degradation plays important roles in stress responses of extra- and intra-cellular environment. In this study, we analyzed the regulation of protein degradation in stress responses using budding yeast and chloroplast. The results indicate that UBL-UBA protein Dsk2 is involved in salt stress, Gtr1-Gtr2 complex is involved in nutrient stress, and FtsH-thylakoid structure is involved in D1 degradation in chloroplast.

研究分野：生物学

キーワード：細胞内タンパク質分解 ユビキチン 塩ストレス Gタンパク質 栄養ストレス 葉緑体 光ストレス

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン依存分解システムは、ユビキチン鎖をタンパク質に付加するユビキチン化、および、ユビキチン鎖で標識されたタンパク質の分解を行うプロテアソームからなる「ユビキチン-プロテアソーム経路」と、ユビキチン-プロテアソーム両経路を介在して、分解タンパク質を的確に識別しプロテアソームに運ぶ「配送経路」で構成される。

我々は、UBL-UBA タンパク質である出芽酵母 Dsk2 と Rad23 の機能解析とおして、タンパク質分解を正負に調節する新規の制御因子を同定し、解析を進めてきた。また、近年、ERAD 分解システムに Dsk2 が優先的に関与すること、ユビキチン鎖の種類・長さの選択性、Dsk2/Rpn10 によるタンパク質分解と隔離(Aggregation)の仕分制御等が国内外の研究により示唆されており、細胞環境ストレスにตอบสนองしてタンパク質を排除・隔離する制御システムにおいてもタンパク質分解の果たす役割の重要性が認識されるようになった。これら国内外の研究進展に鑑み、ユビキチン依存分解システムにおいて、ストレスにตอบสนองした分解タンパク質の識別と選択機能を担うユビキチンレセプターの役割を解明することは、ユビキチン依存分解システムの重要な研究課題の一つとなっている。

2. 研究の目的

ユビキチン依存タンパク質分解は、細胞周期などの細胞生理機能とともに、蛋白質の品質管理など細胞内外の環境ストレス応答において、分解タンパク質を識別・仕分けする制御システムの中心的役割を担っている。ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに運ぶ可動型のUBL-UBAユビキチンレセプターは、分解タンパク質の識別と配送の調節機能に加え、細胞ストレスにตอบสนองした分解タンパク質の仕分制御に関与することが示唆されているが、仕分制御の分子機構は未だよく分

かっていない。本研究では、分子遺伝学的手法の有用な出芽酵母を主な実験材料とし、植物葉緑体とほ乳類培養細胞の実験結果と比較解析することにより、ストレス応答におけるタンパク質分解の識別・仕分制御とUBL-UBAユビキチンレセプターの調節的役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母の遺伝学的解析により種々のストレス環境におけるDsk2ユビキチンレセプターの変異体をスクリーニングし、ストレスに耐性および感受性を示すDsk2と相互作用する新規遺伝子の分析を行った。同様に出芽酵母Gtr1とGtr2と相互作用する遺伝子を網羅的にスクリーニングし、栄養ストレス下における結合の様式を分子遺伝学的に解析した。

(2) 植物(ほうれんそう)の葉緑体を分離し、光ストレス下におけるD1タンパク質分解、FtsHプロテアーゼの動態とチラコイド膜の構造と動態、およびその関連性を分子整理学的手法により解析した。

4. 研究成果

UBL-UBA ユビキチンレセプター(Dsk2, Rad23)は、ユビキチン化した分解タンパク質をプロテアソームへ配送する生理機能に加え、細胞の環境ストレスにตอบสนองにした分解タンパク質の仕分と識別に関与することが示す結果を得た。

(1) 環境ストレスとタンパク質ユビキチン化の関係を解析するため、ユビキチンレセプターDsk2 と相互作用するタンパク質をtwo-hybrid法により分離して、出芽酵母の新規Dsk2結合タンパク質Irc22を同定した。Irc22はゲノムデータベースに機能未知として記載された遺伝子であった。Irc22の抗体

を作成して、ユビキチンレセプターとの相互作用、タンパク質分解、ストレス応答への影響について解析した結果、高塩ストレスに対して Dsk2 が正に、Irc22 が負に相互作用することにより、タンパク質分解を介してストレス応答に関与することが示された。(関口猛、小林英紀)

(2) 出芽酵母の G タンパク質 Gtr1-Gtr2 複合体は、細胞のアミノ酸シグナルにより栄養ストレスを感知するリン酸化酵素複合体 TORC1 を制御している重要なタンパク質である。Gtr1-Gtr2 複合体がどのような仕組みで TORC1 を制御しているかを明らかにするため、TORC1 と相互作用する他の制御因子 (Ego1-Ego3、Kog1-Tco89) と Gtr1-Gtr2 複合体間の結合様式を出芽酵母の遺伝学的解析を行った結果、TORC1 経路において、Gtr1-Gtr2 複合体と Ego1-Ego3 複合体の相互作用には、TORC1 コンポーネントの Kog1 と Tco89 の Gtr1 の GDP/GTP 型変換に依存した選択的結合を介して調節されていることが示された。(小林英紀、関口猛)

(3) 植物が強度の光ストレスにさらされると、光合成システム II の D1 タンパク質が損傷を受けて葉緑体のグラナで FtsH プロテアーゼによりタンパク質分解されることが明らかになっていた。この成果に基づいて本研究では、更に葉緑体の光ストレス応答の解析を進め、光合成を行っている葉緑体に過剰な光が照射されたとき、タンパク質分解にもなって葉緑体チラコイド膜上で光合成関連タンパク質が移動して凝集すること、また膜が本来持っている積み重なり構造が緩むことを示した。また、光照射に伴って引き起こされるチラコイド膜の構造変化と FtsH の分布変化を解析した。電子顕微鏡によりチラコイド膜を観察した結果、FtsH プロテアーゼの分布変化と構造変化の相関がみられた。光ス

トレスにより、チラコイド膜の凝集が緩んで FtsH プロテアーゼが D1 タンパク質にアクセスし易くなって D1 タンパク質が分解されるようになることが示された。本研究の構造的解析により、D1 タンパク質の凝集は光の強さに応じて変化し、光環境が強すぎる場合 (光ストレス) にはチラコイドの凝集と FtsH プロテアーゼの分布が不可逆的に起こることによって葉緑体の機能が阻害されることが示された。(小林英紀、山本泰)

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 10 件)

Sekiguchi T, Kamada Y, Furuno N, Funakoshi M and Kobayashi H. 2014. Amino acid residues required for Gtr1p-Gtr2p complex formation and its interaction with the Ego1p-Ego3p complex and TORC1 components in yeast. *Genes Cells*.19, 449-463.
DOI 10.1111/gtc.12145

Ishii T, Funakoshi M, Kobayashi H. and Sekiguchi T. 2014. Yeast Irc22 is a novel Dsk2p-interacting protein that is involved in salt tolerance. *Cells*. 3, 180-198. 10.3390/cells302018010

Rosli M.K.A., Syed-Shabthar S.M.F., Abdul-Patah P., Abdul-Samad Z., Abdul S.N, Burhanuddin M.N., Zulkifli N.A., Shukor M.N., Budsabong K., Changtragoon S., Sekiguchi T, Sasaki H, Md-Zain B.M. A New Subspecies Identification and Population Study of the Asian Small-clawed Otter (*Aonyx cinereus*) in the Malay Peninsula and Southern Thailand Based on Fecal DNA Method. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-11

10.1155/2014/457350

Yamamoto Y, Kai S, Ohnishi A, Tsumura N, Ishikawa T, Hori H, Morita N, Ishikawa Y. Quality Control of PSII: Behavior of PSII in the Highly Crowded Grana Thylakoids Under Excessive Light. Plant and Cell Physiology. 2014, 55(7) 1206-1215.
10.1093/pcp/pcu043

Yoshioka-Nishimura M, Nanba, D, Takaki, T, Ohba C, Tsumura N, Morita N, Sakamoto H, Murata K, Yamamoto Y: Quality control of Photosystem II: Direct imaging of the changes in the thylakoid structure and distribution of FtsH proteases in spinach chloroplasts under light stress. Plant Cell Physiol. 2014, 55(7) 1255-1265.
DOI; 10.1093/pcp/pcu079

Yoshioka-Nishimura M, Yamamoto Y. Quality control of Photosystem II: The molecular basis for the action of FtsH protease and the dynamics of the thylakoid membranes. J. Photochem Photobiol B. 2014, 137, 100-106.
DOI; 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.012

Sekiguchi T, Ito R, Hayakawa H, Sekiguchi M. Elimination and utilization of oxidized Guanine nucleotides in the synthesis of RNA and its precursors. J Biol Chem. 2013, 288(12): 8128-35.
DOI; 10.1074/jbc.M112.418723

Inokuchi H, Ito R, Sekiguchi T, Sekiguchi M. Search for Proteins Required for Accurate Gene Expression under

Oxidative Stress: Roles of Guanylate Kinase and RNA Polymerase. J Biol. Chem. 288, 2013. 32954-32962.
10.1074/jbc.M113.507772.

Yamamoto Y, Hori H, Kai T, Ishikawa A, Ohnishi N, Tsumura N, and Morita N. Quality control of photosystem II: Reversible and irreversible protein aggregation decides the fate of photosystem II under excessive illumination. Frontiers in Plant Science. 2013, 4, Article 433 (1-9).
10.3389/fpls.2013.00433

Chan T, Shimizu Y, Pospíšil P, Nijo N, Fujiwara A, Taninaka Y, Ishikawa T, Hori H, Nanba D, Imai A, Morita N, Yoshioka-Nishimura M, Izumi Y, Yamamoto Y, Kobayashi H, Mizusawa N, Wada H, and Yamamoto Y. 2012. Quality Control of Photosystem II: Lipid Peroxidation Accelerates Photoinhibition under Excessive Illumination. PLOS ONE, 7, e52100.
DOI; 10.1371/journal.pone.0052100

[学会発表](計 11件)

関口猛、鎌田芳彰、古野伸明、舟越稔、小林英紀。ヘテロ2量体Gタンパク質のGtr1-Gtr2複合体におけるEgo1p-Ego3p複合体とTor複合体1との相互作用に必要なアミノ酸残基の同定。第4回TOR研究会 2014.9.17. 岡崎

Miho Nishimura, Daisuke Nanba, Takashi Takaki, Kazuyoshi Murata, Hiroataka

Sakamoto, Yasusi Yamamoto. Action of FtsH proteases and structure of spinach thylakoids under light stress. 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学, 2014年3月18 20日

難波大介, 西村美保, 坂本浩隆, 村田和義, 高木孝士, 山本泰. 光化学系II のquality control : 光ストレス下でのホウレンソウ葉緑体のグラナ膜構造の変化. 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学, 2014年3月18 20日

甲斐卓, 大西厚輝, 津村和, 石川靖夫, 山本泰. 光化学系II のquality control : 強光ストレス下でのチラコイド膜のダイナミクスと光化学系II複合体の挙動. 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学, 2014年3月18 20日

伊東理世子, 井口八郎, 関口猛, 関口睦夫. 大腸菌における8-オキソグアニンを含むヌクレオチドの排除機構, 日本遺伝学会第85回大会 2013.09.19. 横浜

井口八郎, 伊東理世子, 関口猛, 関口睦夫. 酸素ストレス下の遺伝子発現機構, 日本遺伝学会第85回大会 2013.09.19. 横浜

Sekiguchi T, Itoh R, Hayakawa H, Sekiguchi M. Elimination of oxidized nucleic acid, 第86回日本生化学会大会, 2013.09.11. 横浜

西村美保, 難波大介, 山本泰. 光ストレス下におけるチラコイド膜の構造変化とFtsHプロテアーゼの動態. 日本植物学会第77回大会, 北海道大学, 2013年9月13日 - 15

日

難波大介, 西村美保, 坂本浩隆, 村田和義, 高木孝士, 山本泰. 光化学系II のquality control : 光ストレス下でのホウレンソウ葉緑体チラコイド膜構造変化の電子顕微鏡による観察. 日本植物学会第77回大会, 北海道大学, 2013年9月13日 - 15日

Sekiguchi T, Ito R, Hayakawa H, and Sekiguchi M. Specific cleavage of oxidatively damaged RNA for accurate protein synthesis, Gordon Research Conferences, Newport (USA), 2012.08.23.

関口猛, 早川浩, 関口睦夫, HeLa細胞に導入したグアニンヌクレオチドの運命, 九州大学(福岡)遺伝学会第84回大会, 2012.09.25.

〔雑誌論文〕(計 件)

〔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〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者

小林英紀 (KOBAYASHI HIDEKI)
岡山大学・教育開発センター・教授
研究者番号：20150394

(2)研究分担者

関口猛 (SEKIGUCHI TAKESHI)
研究者番号：60187846

(3)連携研究者

山本泰 (YAMAMOTO YASUSHI)
研究者番号：40091251