

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440070

研究課題名(和文) エンドソームにおけるユビキチンホメオスタシス制御

研究課題名(英文) Regulation of ubiquitin homeostasis at endosomes

研究代表者

木村 洋子 (Kimura, Yoko)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：80291152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Rfu1はエンドソームに局在し、脱ユビキチン化酵素 Doa4を阻害して単量体ユビキチン量を制御する。Doa4をエンドソームにリクルートするBro1はRfu1もリクルートした。Bro1とRfu1は直接結合し、Bro1のVドメイン(V)とRfu1のYPELが必須だった。哺乳類Alix VとYP(X)nLの結合と同様にBro1 VとRfu1の結合にも保存されたPheが必要だった。Rfu1は熱ストレス時にRsp5が関与する経路で分解され、Bro1 V過剰発現は分解を抑えた。さらにRim20とRim101の結合も、Rim20 VとRim101中のYPIKLを介した結合であることを明らかにした。

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, a class E vacuolar protein sorting protein that recruits Doa4 to endosomes, also recruits Rfu1 to endosomes by the direct interaction between a region containing the YPEL motif in Rfu1 and the V domain in Bro1, which could be analogous to the interaction between the mammalian Alix V domain and YPXnL motifs of target proteins. Overexpression of Bro1 and the V domain prevented Rfu1 degradation after heat shock. Rfu1 degradation partly involved the proteasome and Rsp5. Finally, we showed that Rim20, another yeast Bro1 family protein, binds to Rim101 through the interaction between the V domain and the YPIKL motif. These results suggest that interactions between V domains and YP(X)nL motifs are conserved from yeast to mammalian cells. We also showed the specificities of each V domain to their target protein.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ユビキチン ホメオスタシス エンドソーム タンパク質分解 脱ユビキチン化酵素 Rfu1 Bro1 熱  
ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは、真核細胞で保存された配列をもつ 76 個のアミノ酸からなる修飾因子である。ユビキチンは、分解タンパク質の目印となるだけでなく、タンパク質の機能を制御する修飾分子として幅広く機能し、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。ユビキチンの量を制御する機構としては、ユビキチン遺伝子の転写制御などが報告されていたが、研究代表者らは、出芽酵母 Cdc48 の温度感受性変異を抑える分子 Rfu1(Regulator for free ubiquitin chain) の解析から、Rfu1 が脱ユビキチン化酵素 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抑える機能があることを明らかにした (Cell 2009)。Doa4 はエンドソーム上で液胞に送られて分解されるユビキチン化タンパク質からユビキチンを回収する酵素である。種々の結果より、脱ユビキチン化酵素 (Doa4) とそのインヒビター (Rfu1) のバランスによって、ユビキチン量が制御されるというユビキチンホメオスタシスの新しい制御機構を提示した。さらに熱ショックストレス時には、Doa4 は増加し Rfu1 は分解されることを明らかにし、単量体ユビキチンが多く必要とされる熱ショック時に効率よくユビキチンが供給される仕組みを示した。

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た。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。そこで研究代表者は Bro1 と Rfu1 の関係につい

て調査を始めたところ bro1 欠損変異株では、Rfu1-GFP のエンドソームの局在が失われることがわかり、Bro1 が Rfu1 も制御していることを見出した。

## 2. 研究の目的

Bro1 がどのように Rfu1 を制御しているのかを解明することによって、エンドソームにおいて行われるユビキチン量の制御機構を明らかにする。Bro1 と Rfu1 は直接に結合していることをこれまでに明らかにしたので、その相互作用を詳細に解析する。また、Rfu1 の熱ストレスによる分解機構を解明し、Rfu1 の分解における Bro1 の関与を解明する。さらに Bro1-Rfu1 の相互作用と、他の Bro1 ファミリータンパク質とその基質との相互作用とを比較して、結合の特異性を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) Rfu1 と Bro1 相互作用部位の解析。

Rfu1 と Bro1 の相互作用を *in vivo* と *in vitro* の解析で行った。まず、*in vitro* の解析では、リコンビナント GST-Bro1 と MBP-Rfu1 及び種々の変異体の精製タンパク質を用意し、2 者のタンパク質間の結合を pull-down によって検定した。この方法によって、Rfu1 と Bro1 双方の結合部位を同定する。In vivo の解析としては、Rfu1 に Flag タグをつけた Rfu1-3F を酵母に発現させ、免疫沈降実験を行った。

(2) Rfu1 と Bro1 相互作用とユビキチンホメオスタシスの関係。

Rfu1 の Bro1 結合部位が同定後、それらの部位の変異によって Rfu1 の局在やユビキチンホメオスタシスがどのようになるかを調べた。Rfu1 の局在は Rfu1-GFP の融合タンパク質の局在で調べた。

(3) Rfu1 の分解における Bro1 の役割

熱ショック時の Rfu1 の分解は、MG132 処理によって部分的ながら抑えられ、またユビキチン化酵素 Rsp5 の温度感受性株中でも抑えられる。またプロテアソームの構成因子であ

る Rpt1 の温度感受性株でも分解が若干遅延した。したがって、Rfu1 は、Rsp5 を介してユビキチン・プロテアソーム系で分解される可能性がある。Bro1 及び種々の Bro1 変異体を過剰発現させて、熱ショックストレスによる Rfu1 の分解への効果を見た。

(4) Bro1-Rfu1 の相互作用と、他の Bro1 ファミリータンパク質とその基質との相互作用の比較。

Rim20 は、V 字型構造の V ドメインを持つ Bro1 ファミリータンパク質であり、アルカリストレスにおけるアダプターとして働く。哺乳類のホモログ Alix の V ドメインはターゲットタンパク質の YP(X)nL モチーフに結合して機能を果たし、V ドメイン中の疎水性のくぼみにある Phe 残基が結合に必要であることが他のグループにより報告されていた。酵母 Bro1 及び Rim20 の V ドメインと Alix V ドメインでは全体のアミノ酸配列はあまり保存されていないが Phe の周辺配列は比較的保存されていることを見出した。そこで、Rim20 および Rim20 の結合タンパク質である Rim101 のリコンビナントタンパク質、及び Alix の V ドメインを精製し、結合を調べた。

#### 4. 研究成果

In vitro の Rfu1 と Bro1 相互作用部位の解析により、Rfu1 においては、Rfu1 の C 側に結合部位があり、さらに Alix V ドメインの基質部位である YP(X)nL モチーフに合致する YPEL モチーフが結合に必須であることがわかった。すなわち、この YPEL モチーフを他のアミノ酸に置換した Rfu1 の変異体では、in vitro 及び in vivo において Bro1 との結合能が著しく減少した。また、変異体では Rfu1-GFP のエンドソームへの局在、ユビキチンのホメオスタシスも失われることがわかった。Bro1 においては、その V ドメインが Rfu1 の結合部位であることを示した。Doa4 は Bro1 の C 末に結合することが他のグループより報告されており、Bro1 における Doa4

と Rfu1 の結合部位は異なることを明らかにした。

また、Rfu1 の熱ストレスにおける分解においては、Bro1 を過剰発現させることにより、分解が遅延することがわかった。さらに、Bro1 の変異体の解析により、V ドメインの過剰発現でも、Rfu1 の分解が遅延することがわかった。したがって、Rfu1 の分解時には Bro1 が分解を抑える方向に働いていることが示唆された。

さらに、今回、Bro1 V ドメインと YPEL モチーフを持つ Rfu1 との結合にも、V ドメイン中の保存されている Phe が重要であることがわかった。V ドメインと YP(X)nL モチーフを持つタンパク質との結合が酵母においても保存されているかをさらに確かめるために、Rim20 V ドメインと Rim101 との結合をみた。すると Rim20 と Rim101 の結合も、Rim20 V ドメインと Rim101 中の YPIKL モチーフを介した結合であること、さらに Rim20 V ドメインの Phe が結合に重要であることがわかった。さらにこれらの変異では、Rim101 の限定プロセッシング及びアルカリストレス応答が弱くなることが示された。したがって、酵母の V ドメインも YP(X)nL モチーフに結合し、V ドメイン内の保存された Phe が結合に重要であることがわかった。

以上の解析により、哺乳類で示された V ドメインと YPX(n)L モチーフを持つ蛋白質の相互作用が、酵母 V ドメインにおいても働いていることが初めて示された。Alix の V ドメインは、細胞内輸送や HIV などのウイルスの出芽に必要な働きをしている YPX(n)L モチーフを持つタンパク質と相互作用しことが示されている。酵母から得られるさらなる結果が哺乳類の研究にも知見を与える可能性が示された。

#### 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 4 件)

\* ; 責任著者を示す

1. Kimura Y\*, Tanigawa M, Kawawaki J, Takagi J, Mizushima T, Maeda T, and Tanaka K. Conserved mode of yeast Bro1 family V domains for interaction with YP(X)nL motif-containing proteins. *Eukaryotic Cell* 14:976-982. 2015 (表紙に写真掲載) (査読有)
2. Ohmura Y, Kimura Y\*, Takata T, Tanaka K, and Kakizuka A\*, VCP/Cdc48 rescues the growth defect of a GPI10 mutant in yeast. *FEBS Letters* **589**:576-589, 2015 (査読有)
3. Kimura Y\*, Kawawaki J, Kakiyama Y, Shimoda A. and Tanaka K. The ESCRT-III adaptor protein Bro1 controls functions of regulator for free ubiquitin chains 1 (Rfu1) in ubiquitin homeostasis. *J. Biol. Chem.* **289**:21760-21769. 2014 (査読有)
4. Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M. Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon E, Trempe J, Saeki Y, Tanaka K and Matsuda N. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**:162-166. 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 竹田航平、石井彩音、加藤寛之、川井理仁、木村洋子 「出芽酵母における持続的な熱ストレス応答の解析」第 39 回日本分子生物学会年会 2016.11.30-12.2 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
2. Yoko Kimura Analysis of interaction between yeast Bro1 V domains and YP(X)nL motif-containing target proteins. 14<sup>th</sup> International Conference on Yeasts. 2016 9.11-15, Awaji Yumebudai, Awaji, Hyogo, Japan
3. 木村洋子、谷川美頼、川脇純子、高木賢治、水島恒弘、前田達哉、田中啓二 「酵母 Bro1 V ドメインと YP(X)nL モチ

ーフを持つターゲットタンパク質との相互作用の解析」BMB2015 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会) 2015.12.1-4 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市

4. 木村洋子、谷川美頼、川脇純子、高木賢治、水島恒弘、前田達哉、田中啓二 「酵母 Bro1 および Rim20 の V ドメインの解析」酵母遺伝学フォーラム 2015. 8.31-9.2 広島大学、広島県東広島市
5. 木村洋子 「タンパク質の構造と遺伝」静岡ライフサイエンスシンポジウム静岡若手フォーラム 2015.3.6 (招待講演) 静岡大学、静岡県静岡市
6. 木村洋子、川脇純子、田中啓二 「エンドソーム関連タンパク質 Bro1 とユビキチンの量的制御因子 Rfu1 の相互作用の解析」第 37 回日本分子生物学会年会 2014.11.25-27 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
7. 大沼洋平、木村洋子、川脇純子、田中啓二、垣塚彰 「VCP/Cdc48 過剰発現スクリーニングから得られた *gpi10* 変異体の解析」酵母遺伝学フォーラム 2014.9.4 東京大学、東京都文京区

〔その他〕

ホームページ等

<http://kimurapqchs.agr.shizuoka.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 木村 洋子 (KIMURA, Yoko)  
静岡大学・農学部・教授  
研究者番号：80291152