

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18076006

研究課題名（和文） ユビキチンシステムの個体生物学

研究課題名（英文） Biology of the Ubiquitin System

研究代表者

千葉 智樹 (CHIBA TOMOKI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00311423

研究分野：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：ユビキチン、ユビキチン様タンパク質、タンパク質分解、プロテアソーム

### 1. 研究計画の概要

ユビキチンシステムは細胞内の選択的タンパク質分解を制御しており、その破綻ががんや神経変性疾患などの難治性疾患の原因となることが知られる。そのため、ユビキチンシステムを構成する因子の遺伝子改変動物を作製し、その高次機能解析を行うことは上記の難治性疾患の病態および原因究明に重要である。ユビキチンシステムの中で最も重要な酵素は基質識別を担うユビキチンリガーゼであり、その中でも Cullin 型ユビキチンリガーゼは種類が豊富であり、様々な疾患の原因遺伝子産物をコードすることで注目されている。そこで本研究では、Cullin 型ユビキチンリガーゼの多様性と活性制御機構を解明することを目的として、その新たな厚生因子（基質識別サブユニットなど）や活性制御因子の同定とその機能解析を行う。また、Cullin 型ユビキチンリガーゼを含めた様々なユビキチンリガーゼの機能を解析する上で重要となるプロテアソーム活性化因子ノックアウトマウスの基盤整備を並行して進める。プロテアソーム活性化因子は多様であり、プロテアソームがユビキチン化タンパク質を分解する際に、どの活性化因子を介しているのかを解析する。

### 2. 研究の進捗状況

(1)Cullin 型ユビキチンリガーゼの構成因子の同定と機能解析

①新規 Cullin 型複合体の同定とその機能解析。多細胞生物に保存されている新規 Cullin 型複合体に関して、その構成因子の同定、基質探索、生化学的活性の制御、細胞機能の解析を行っている。

②Cullin 型複合体に相互作用する脱ユビキチン化酵素の解析。脱ユビキチン化酵素がユビキチンリガーゼと物理的に相互作用していることは、ユビキチン化反応が可逆的に制御されていることを示唆する。しかし、Cullin 型ユビキチンリガーゼの細胞機能に対して当該脱ユビキチン化酵素が拮抗的に機能しているかについては議論が分かれている。そこで、これを遺伝学的に明らかにする目的で条件的遺伝子破壊マウスの作成と shRNA によるノックダウン実験を進めている。また、脱ユビキチン化酵素の基質探索、脱ユビキチン化活性の活性制御を解析している。

③Cullin 型複合体の機能を制御する新規因子の探索。Cullin 複合体に相互作用する新たな因子を酵母ツーハイブリッド法で探索し、複数の因子を同定している。同定された因子について、Cullin 型複合体の複合体形成制御、NEDD8 翻訳後修飾制御、ユビキチンリガーゼ活性制御に対する役割を解析する。上記の解析のために組換えタンパク質による NEDD8 翻訳修飾制御の試験管内再構築系を構築した。

(2)プロテアソーム活性化因子の遺伝子改変マウス解析。プロテアソーム活性化因子の遺伝子改変マウスを作成し、免疫に対する役割、細胞レベルでのストレス応答などの表現型解析を進めている。その他、数系統の作成を準備している。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

新たな制御因子の同定、遺伝子単離、機能解析は順調に進んでいる。得られた結果に基づいた新たな研究も進展しているので、その点

は当初の計画以上とも言える。ノックアウトマウス作成については計画通りに進んでいる。

#### 4. 今後の研究の推進方策

(1)Cullin 型ユビキチンリガーゼの新たな構成因子の同定と機能解析

①新規 Cullin 型複合体の構成因子の同定とその機能解析

同定された新規 Cullin 型複合体の基質探索と細胞機能（ストレス応答など）の解析を行う。またノックアウトマウス作成を準備する。

②Cullin 型複合体に相互作用する脱ユビキチン化酵素の解析

ノックアウトマウスの作成と細胞生物学的な解析を継続して進める。

③Cullin 型複合体の機能を制御する新規因子の探索とその解析

同定された新規因子について、NEDD8 翻訳後修飾制御およびユビキチンリガーゼ活性制御への役割を解析する。さらに酵母の変異体を用いた遺伝学的解析を開始する。

(2)ユビキチン関連分解の遺伝子改変マウス解析

新たに作成された系統の表現型を解析する。作成準備中の系統は、作成を継続する。Cullin 型ユビキチンリガーゼの関与する様々な生命現象（炎症応答、紫外線応答、酸化ストレス応答、サイトカイン応答、タンパク質品質管理、飢餓応答、免疫応答、細胞周期進行など）について、その表現型を解析する。

#### 5. 代表的な研究成果

（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 20 件）

1.Ooki Y,Konishi N,Funatsu N,Chiba T. The mechanism of poly-NEDD8 chain Formation *in vitro*.査読有 **B.B.R.C.**381, 443-447(2009)

2.Shima Y,Shima T,Chiba T,Irimura T, Pandolfi PP,Kitabayashi I.PML activates Transcription by protecting HIPK2 and P300 from SCFFbx3-mediated degradation.査読有 **Mol Cell Biol.**28,7126-7138 (2008)

3.Kim M,Nakamoto K,Nishimori S, Tanaka K,Chiba T.A novel ubiquitin ligase involved in p57kip2 proteolysis regulates Osteoblast cell differentiation.査読有 **EMBO rep.**9,878-884(2008)

4.Yao I (他 14 名). SCRAPPER-Dependent Ubiquitination of Active Zone Protein RIM1 Regulates Synaptic Vesicle Release. 査読有 **Cell** 130,943-957(2007)

5.Ohtake F, (他 11 名). Diosin receptor is

a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase.査読有 **Nature** 446,562-566(2007)

6.Satake E,Yamaguchi Y,Miyauchi Y,Iwai K,Chiba T,Saeki Y,Matsuda N,Tanaka K,Kato K.Direct interactions between NEDD8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes upregulate cullin-based E3 ligase activity. 査読有 **Nat.Struct.Mol.Biol.** 14,167-168(2007)

〔学会発表〕（計 17 件）

1.大木優、船津憲一、小西なつみ、千葉智樹。ポリ NEDD8 鎖形成機構の解明 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 2008 年 12 月 9-12 日、神戸市

2.佐藤晃嗣、米川博通、林純一、千葉智樹。マウス初期胚における精子ミトコンドリア排除とおとファジー 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 2008 年 12 月 9-12 日、神戸市

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~tchiba/>