

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19044049  
 研究課題名（和文）糖鎖認識ユビキチンリガーゼの構造変換に基づく F-box タンパク質の標的分子探索  
 研究課題名（英文） Screening for the targets of F-box proteins by using dominant-negative mutants.  
 研究代表者  
 吉田 雪子 (YOSHIDA YUKIKO)  
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
 研究者番号：90271543

研究成果の概要：様々な生体反応において重要な役割を担うユビキチン・プロテアソーム系において最も重要な分子ユビキチンリガーゼ。その中で最も良く研究されている SCF 型ユビキチンリガーゼの基質認識ユニットの F-box タンパク質の標的分子探索を行う系を確立した。この系を用いて糖鎖を認識する F-box タンパク質 Fbs ファミリーに属する Fbxo44 の基質を同定し、その機能を明らかとした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,400,000	0	3,400,000
2008年度	3,400,000	0	3,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	6,800,000	0	6,800,000

研究分野：分子生物学、糖鎖生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物科学

キーワード：F-box タンパク質・ユビキチンリガーゼ・N型糖鎖・標的分子

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン・プロテアソーム系による選択的タンパク質分解は、様々な生体反応において重要な役割を担っている。この系において、最も重要な分子は分解を受けるべく標的タンパク質を見分け、それにタイミング良くユビキチンを連結させる酵素‘ユビキチンリガーゼ’であり膨大な数存在することが知られている。その中で最も良く研究されているファミリーのひとつが Skp1, Cullin1, F-box タ

ンパク質, Rbx1 の4量体から構成される SCF 型リガーゼである。F-box 蛋白質はこれら SCF 構成蛋白質の中で唯一の可変因子であり基質と結合するサブユニットである。ヒトには約 70 種類の F-box タンパク質が存在するが、標的タンパク質が決定されているものは少ない。申請者は、通常は細胞の外側にしか存在しない糖タンパク質糖鎖を認識してユビキチン化する糖鎖結合分子として Fbs1 を細

胞質画分より見出し、標的分子の同定と糖鎖構造の解析及び結合場所の解析から、‘小胞体関連分解 (ERAD)’ に関わるリガーゼであることを報告した (*Nature*, 2002)。Fbs1 の立体構造解析より Fbs1 は糖鎖の根元の構造を認識すること、また、哺乳類には Fbs1 と相溶性の高い 4 種類の F-box タンパク質が存在するが、そのうちの 2 種類は Fbs1 と同様に小胞体で付加される高マンノース型糖鎖を認識するが、Fbxo44 と Fbx17 は糖タンパク質との結合は認められない (*J. Biol. Chem.*, 2003)。最近、申請者は Fbs1 が生体内ではごく僅かしか SCF 複合体を形成しておらず、大部分のものは Skp1 との二量体として存在することを見出した。この現象は Fbs1 に特徴的なリンカー配列によるものであり、この配列を導入することで他の F-box タンパク質も非常に安定に SCF 複合体としてではなく Skp1 との二量体として存在させることができる。F-box タンパク質はそれ自身が不安定なことや、他のユビキチンリガーゼと同様にプロテアソーム阻害剤を用いても安定に基質との複合体を再現させることが難しいことが多いため、F-box タンパク質側からその未知の標的分子を同定した例はほとんどない。

## 2. 研究の目的

F-box タンパク質に Fbs1 のリンカー配列を導入することでユビキチンリガーゼとして機能しない安定な F-box タンパク質を作製し、第一にこれまで標的分子が未知の Fbxo44 と Fbx17 の標的分子を明らかとしその機能解析を進める。さらに、他のグループの機能未知の F-box タンパク質についても同様の手法を用いて標的分子の解析を行なうことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Fbs1 ホモログの標的分子スクリーニング

のための系の確立： Fbs1 のホモログのうち標的分子が未知の Fbx44, Fbx17, Fbx27 について、Fbs1 の N 末領域と各々の基質結合領域を融合したタンパク質にタンデムタグを付加したタンパク質を発現するベクターを作成し、種々の細胞での恒常的発現株を取得する。これらの細胞からタグを利用し、タンパク質を精製することで標的タンパク質を取得する。これらの F-box タンパク質と標的タンパク質が結合したものは SDS-PAGE で分離後、TOF-MS を利用して同定する。

(2) 単離した F-box タンパク質の標的分子の確認： 1 で同定したタンパク質について cDNA のクローニングを行い、タグ付きの発現ベクターに導入し、各々の変異型 F-box タンパク質と共発現させ、免疫沈降実験・ウエスタンブロットング実験により、特異的結合を確認する。

(3) 標的分子の挙動の確認： 野生型 F-box 存在下で標的タンパク質の分解が促進されることなどをウエスタンブロットングやパルスチェース実験などを用いて確認する。

(4) 同定した標的分子の抗体の作成： 標的タンパク質を大腸菌を用いて組換え体を取得精製し、これを抗原に抗体を作成する。大腸菌で純度の高いタンパク質が取得できない場合はペプチドに対する抗体を作成する。

(5) F-box タンパク質の内在性の標的分子の挙動並びに機能の解析： はじめにそれぞれの F-box タンパク質が発現している細胞株のスクリーニングをノザンブロットなどにより行う。スクリーニングで得られた細胞株をプロテアソーム阻害剤で処理したときに、標的分子の存在量が増加することなどを 4 で作成した抗体を用いてウエスタンブロットングなどにより解析する。その標的分子のどこが、どのような修飾が F-box タンパク質により識別されるかなどを種々の組換え体

を作成し解析する。

(6) Fbs1 とそのホモログの結晶構造解析による構造比較: Fbs1 が SCF 複合体を形成しにくいことは生化学的には証明済みであるが、構造学的に説明が付いていない。そこで、水島博士との共同研究により、Fbs1 のホモログの F-box タンパク質で SCF を作るものの構造解析を行うことでリンカー領域の構造比較を中心に解析する。一部の F-box の結晶化は既になされているので解析は可能である。

#### 4. 研究成果

Fbxo44 と Fbxo17 の標的分子スクリーニングの系を立ち上げ、いくつかの標的分子を同定した。Fbxo44 には 2 種類のオルタナティブスプライシングフォームが存在するが、それら Fbxo44a 及び Fbxo44b は C 末端側半分が全く異なるアミノ酸配列を持つ。これらの中で、Fbxo44b の標的分子であるビテロネクチン様カルボキシペプチダーゼ (CPVL) を中心にその細胞内における挙動を解析し、Fbxo44 が糖鎖非依存的に CPVL を小胞体においてユビキチン化することを見出した。また、Fbxo44a については RNA 結合配列をもつ複数のタンパク質と結合することを見出した。

Fbxo44b と CPVL の関係を詳細に検討した結果、Fbxo44b は細胞質に存在するペプチド N グリカナーゼ (PNGase) により糖鎖が取り除かれたタンパク質を特異的にユビキチン化することと異なるとは異なる新しいタイプの小胞体関連分解に関わるリガーゼを形成していることを明らかとした。Fbxo44a 及び Fbxo17 に関しては、引き続き基質の解析を継続し、その機能の解明を行う予定である。

#### 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 6 件)

- ① 吉田雪子, Fbs1、キーワード: 蛋白質の一生. 蛋白質核酸酵素臨時増刊、5 3 巻、1050 頁、2008年、査読無し
  - ② 水島恒裕、吉田雪子、SCF<sup>Fbs1</sup>の構造と機能、実験医学臨時増刊「細胞内の輪廻転生. タンパク質の分解機構」、2 6 巻、81-86頁、2008年、査読無し
  - ③ Y. Yoshida, F-box proteins that contain sugar-binding domains. Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, 2623-2631, 2007, 査読有り
  - ④ Y. Yamaguchi et al., Fbs1 protects the malfolded glycoproteins from the attack of peptide:N-glycanase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 362, 712-716, 2007, 査読あり
  - ⑤ T. Mizushida, et al., Structural basis for the selection of glycosylated substrates by SCF<sup>Fbs1</sup> ubiquitin ligase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 104, 5777-5781 2007, 査読あり
  - ⑥ Y. Yoshida, et al., A neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. , J. Biol. Chem. 282, 7137-7144, 2007 査読あり
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 中川朋子ら、ノックアウトマウスを用いた N 型糖鎖を認識する SCF<sup>Fbs1</sup> ユビキチンリガーゼの解析、BMB2007、2007, 12, 13、横浜
  - ② 吉田雪子、田中啓二、糖鎖認識 F-box タンパク質 Fbs1 の神経細胞における機能の解析 BMB2007、2007, 12, 13、横浜
  - ③ 丸岡裕子ら、新規 F-box タンパク質の標的分子の探索、BMB2007、2007, 12, 13、横浜
  - ④ Y. Yoshida & K. Tanaka., Novel functions of a

neural-specific F-box protein Fbs1. EMBO Conference' Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation', 2007.9.24

- ⑤Y.Maruoka et al., Structural basis for the selection of glycosylated substrates by SCFFbs1 ubiquitin ligase. EMBO Conference' Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation', 2007.9.23

[その他]

研究成果データベース

<http://www.rinshoken.or.jp/database/yyosida.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 雪子 (YOSHODA YUKIKO)  
財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号：90271543

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者