

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580114

研究課題名（和文）糖鎖認識 F-box 蛋白質の新奇な機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel roles of F-box protein that recognizes sugar chain.

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:私達が糖鎖を認識する F-box 蛋白質として発見した Fbs1 は SCF 型ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットとして糖蛋白質をユビキチン化し、細胞における品質管理機構である小胞体関連分解に関わるものとして機能することを報告してきた。本研究では、Fbs1 がユビキチンリガーゼとして機能するばかりではなく、血管新生に関わる蛋白質 Amot と複合体を形成していることを見出し、その機能について解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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 蛋白質・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

蛋白質の選択的分解の中心的役割を果たすプロテアソームはユビキチン鎖を認識することで蛋白質分解を行うものであるが、この分解の高い基質特異性を担うのがユビキチンリガーゼでありヒトでは数百種類のもの存在するものと考えられている。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 蛋白質, 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。ヒトでは 69 種類の F-box 蛋白質が存在する。これまで報告されている F-box 蛋白質の大部分は SCF 型リガーゼを形成するものである。申請者はマウス脳より新糖鎖結合蛋白質のスクリーニングの過程で、糖蛋白質糖鎖を認識する F-box 蛋白質 Fbs1 (*F-box protein that recognizes sugar chain 1*) を見し、それが細胞外蛋白質の品質管理機構の一環である小胞体関連分解 (ERAD) に

関わるユビキチンリガーゼとして機能することを報告している (*Nature*, 418, 2002)。ERADとは、膜蛋白質や分泌蛋白質などの細胞外蛋白質が小胞体における立体構造形成時に生じた構造に異常をもつ蛋白質や余剰サブユニットを細胞質へ逆行輸送しユビキチン・プロテアソーム系により分解する機構である。細胞外蛋白質は翻訳と共役して小胞体に入り多くのものは高マンノース型糖鎖が付加されるが、Fbs1は細胞質において高マンノース型糖鎖を認識することで異常蛋白質を見分けユビキチン化し分解に導くものと考えられた (*J. Biochem*, 134, 2003)。Fbs1の結晶構造解析より、Fbs1は高マンノース型糖鎖の根元のキトビオース (N-アセチルグルコサミン2糖からなる構造) を認識することが判明している (*Nature Struct. Mol. Biol.*, 11, 2004)。さらに、SCF型リガーゼとしての立体構造も解析済みである。糖鎖の根元の構造は、通常は糖蛋白質のペプチド鎖に覆われており外から蛋白質が認識するのは困難と考えられるが、変性した蛋白質の場合は糖鎖の根元が露出しFbs1に認識され得るようになるのではないかと考え、それを実証することに成功した (*EMBO Rep.*, 6, 2005)。Fbs1が特異的に認識する糖鎖の根元のキトビオース構造は高マンノース型糖鎖に限らずすべてのN結合型糖鎖が共通にもつ構造であるが、糖蛋白質が変性さえしていればFbs1はどのようなN結合型糖鎖をもつ蛋白質とも結合でし得ることも判明している。

Fbs1他のF-box蛋白質と同様にユビキチンリガーゼを形成するものと報告してきた (*Nature*, 418, 2002)。実際、試験管内再構成系でも複合体を形成しリガーゼ活性を示し、細胞内に発現させた Skp1, Cullin1, Fbs1, Rbx1は免疫沈降実験により複合体を形成していることを報告している。しかし、Fbs1が高発現している脳の神経細胞においては多くのFbs1はSCF複合体を形成しておらず単体のFbs1もしくはFbs1-Skp1の二量体で存在することが判明している (*J. Biol. Chem.*, 282, 7137, 2007)。さらにこれら単体、二量には変性

した糖蛋白質の凝集体形成を阻害するシャペロン活性があることも見出している。

ユビキチン・プロテアソーム系は、細胞周期・アポトーシス・代謝調節・シグナル伝達・ストレス応答・品質管理など多様な生体反応において重要な役割を担っているため、非常に活発に研究が行われている分野である。中でもこの系の鍵を握るユビキチンリガーゼは多くの研究者の参入があり、その標的分子の解析は競争の激しい分野であるが、これまで、酵母の遺伝学が中心に行われてきた例が多い。

この分野が注目されているにもかかわらず、糖鎖を認識する本ユビキチンリガーゼが高等動物の神経細胞にしか発現していないためにこれまで見逃され、申請者の偶発の発見に繋がったものと考えられる。Fbs1を含む SCF リガーゼは糖鎖を認識する品質管理リガーゼとして注目され最近いくつかの標的蛋白質も報告されてきているが、現在までのところいずれもそれら標的蛋白質のERADリガーゼとしてであり、申請者らの研究を支持する結果である (*J. Biol. Chem.*, 279, 11615, 2004; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5600, 2005)。

最近、申請者は Fbs1 の糖鎖と結合できない変異体を発現させた EC 細胞は接着性が変化し神経細胞に分化できないことを見出した。F-box 蛋白質はその中の F-box ドメインを介して Skp1 と結合し SCF 複合体を形成するが、Fbs1 においては Skp1 以外にも F-box ドメインを介して複合体を形成する蛋白質の存在を示唆する結果も得ている。

これまでの結果に基づきこの現象を考えると、Fbs1はSCF型ユビキチンリガーゼ複合体とは異なる複合体としても存在し、その未知の複合体におけるFbs1の標的糖蛋白質が神経細胞への分化に関わる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

これまでの研究において、Fbs1 は SCF 型ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットとして糖鎖を認識することにより糖

蛋白質をユビキチン化し、細胞における品質管理機構・小胞体関連分解におけるユビキチンリガーゼとして機能することを報告してきた。本研究に於いては、Fbs1のユビキチンリガーゼ複合体以外での生物機能を見出すことを目的とする。すなわち、基質としてではなくFbs1と相互作用する分子の探索を行いその複合体の機能解析を行うものである。

3. 研究の方法

(1) Fbs1と相互作用する分子群の同定と解析：Fbs1は糖蛋白質と高いアフィニティを有するため、多くの基質が結合してくる。基質との結合を回避するため、糖鎖との結合に必要な2アミノ酸に置換を導入したYW変異体を用い、神経細胞など種々の細胞を用いて、YW変異体に結合する蛋白質を現在までに8種類取得しそのうちの数個は同定を終了している。その中にSkp1に競合してF-boxドメインを介して相互作用する分子amotも見出している。しかし、*in vitro*で結合を調べた結果、amotは直接Fbs1結合しないことから、何らかの分子を介しての結合をしていると考えられる。そこで、①これまで取得した結合蛋白質の同定クローニングを進め、直接F-boxドメインに結合する蛋白質がないか探す。②①でなかった場合、タグ付きYW変異体と別のタグ付きamotの2つの共発現細胞から、両タグで精製を試み、介在蛋白質の同定・クローニングを行う。蛋白質の同定についてはTOF-MSを用いて行う。

(2) Fbs1相互作用分子がEC細胞の神経様細胞への分化に与える影響の解析：YW変異体を恒常的に発現する293T細胞は接着性が弱まり、細胞増殖も阻害される。また、EC細胞P19にYW変異体を発現させると、レチノイン酸で神経細胞に分化させる際、凝集体の形成が行われなくなる。293T細胞においてもP19細胞においてもYW変異体はamotとの結合がみられることから、Skp1もしくはamotを含む複合体が接着性に影響を及ぼしているものと考えられる。そこで、Skp1, amot, 1で同定したamotとFbs1を繋ぐ分子などのshRNAによるノックダウ

ンを行い、同様な表現型が得られるかどうか解析を行う。また、YW変異体のF-boxドメインを欠いたものではこのような表現型が見られないことも確認する。もし、予想に反して接着異常が認められた場合は、Fbs1に糖鎖以外の標的がある可能性が出てくることから、その標的のスクリーニングも行う。

(3) Fbs1-amot複合体を構成する蛋白質の抗体の作製：2の実験及び今後の実験に必要な上記蛋白質の抗体の作製を行う。Fbs1, Skp1に対する抗体は既に作成済みであるため、amot並びに相互作用分子の組み換え蛋白質を大腸菌などで取得、精製しポリクローナル抗体の作製を行う。

(4) Fbs1-amot複合体及びFbs1-Skp1複合体の挙動の解析：これまで、Fbs1はマウス脳及び神経細胞内でSkp1との2量体で存在することを示してきた。また、細胞を用いた発現系では、Skp1とamotのFbs1への結合は競合することが認められている。そこで、マウス脳や内在のFbs1が発現しているPC12細胞などではどのような存在形態でいるのかを、密度勾配遠心法を用いたウエスタンブロット解析や複合体精製物のブルーネイティブPAGEなどで解析を行う。

(5) Fbs1-amot複合体におけるFbs1標的分子の解析：Fbs1が発現していない293T細胞やP19細胞ではFbs1を安定に発現させた細胞株は何も野生株と変化が認められず、YW変異体を発現させたもののみ細胞接着に影響が認められる。そこで、その標的取得する。293T細胞やP19細胞にFbs1を発現させFbs1を精製した場合には非常に多くの種類の糖蛋白質がSkp1と共に精製されてくる。そこで、①最初にSkp1に結合するFbs1複合体を除去してから、Fbs1-amot複合体の精製を行う。②第一段階でamotをタグを利用して精製し、第二段階でFbs1の精製を行う。のいずれかの方法で標的分子の取得を試みる。同定はTOF-MSを用いて行い、その情報をもとにクローニングを行う。

(6) 標的分子の抗体の作製

(7) 標的分子及びFbs1-amot複合体の細胞内局在の解析：作製した抗体を用いて共

焦点レーザー顕微鏡を用いて上記蛋白質の局在の解析を行う。さらに標的分子がFbs1-amot 複合体に結合することでどのような挙動をとるのか生化学的手法を用いて解析を行う。

4. 研究成果

本研究は、Fbs1のユビキチンリガーゼ複合体以外での生物機能を見出すこと、すなわち、基質としてではなくFbs1と相互作用する分子の探索を行いその複合体の機能解析を行うものである。Fbs1が糖鎖と相互作用するのに必要な残基に変異を導入し、糖蛋白質と結合しない変異体を用いてこれと相互作用する分子を同定したところ、Amotという血管新生に関わる分子が、本来はSkp1と結合するF-boxドメインを介してFbs1と結合することを発見した。Amotの抗体を作製し、実際にFbs1が発現しているマウス脳においてもFbs1-Amot複合体が存在することも示した。さらに、Fbs1-Amot複合体の形成とSCF型ユビキチンリガーゼの形成は競合的であることも見出した。しかし、試験管内の結合実験により、Fbs1とAmotの結合は直接的ではないようなので、今後、両者を結ぶ分子の同定を進め、Fbs1-Amot複合体の全貌を明らかとしていく。さらに、Fbs1-Amot複合体の標的分子がSCF型ユビキチンリガーゼとは異なり特異的なものである可能性について解析を進め、本複合体の脳における機構を解明する。そのために、Amotの抗体を作製し、実際にFbs1が発現しているマウス脳においてもFbs1-Amot複合体が存在することも示した。実際にマウス脳において、Fbs1-Amot複合体の全貌とこれら複合体に特異的に結合する糖蛋白質を質量分析により同定しているところであるが、Fbs1抗体とAmot抗体に交差する物質が存在するため、まだ同定に至っていない。今後、免疫沈降に使用できる抗体を再度作製するなど系を改良する予定である。本研究を継続することでFbs1のユビキチンリガーゼとしての機能以外の脳における機能を解明していきたい。

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^{Fbs1}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
 - ③Y. Yoshida, F-box proteins that contain sugar-binding domains. Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, 2623-2631, 2007, 査読有り
 - ④Y. 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
 - ⑤T. Mizushida, et al., Structural basis for the selection of glycosylated substrates by SCF^{Fbs1} ubiquitin ligase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 104, 5777-5781 2007, 査読あり
 - ⑥Y. 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^{Fbs1} 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
 - ④Y. 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/yysida.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