

平成 22 年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19770080  
 研究課題名（和文）ユビキチンリガーゼ SCF Fbs 複合体構造解析による糖蛋白質分解品質管理機構解析  
 研究課題名（英文）Structural analysis of the quality control mechanism of glycol proteins by SCF Fbs ubiquitin ligase.  
 研究代表者  
 水島 恒裕 (MIZUSHIMA TSUNEHIRO)  
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授  
 研究者番号：90362269

## 研究成果の概要（和文）：

SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体は糖鎖を認識することにより糖蛋白質品質管理を行っている。糖鎖認識による合理的な蛋白質認識およびユビキチン化機構の解明を目指し、Skp1-Fbs1 複合体、Fbs1 糖鎖認識ドメイン(SBD)-糖蛋白質(RNaseB)複合体、Skp1-Fbg3 複合体の X 線結晶構造解析を行い、それぞれ 2.4、2.7、2.6 Å 分解能で立体構造を決定した。これらの立体構造を基に SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体のモデルを作製し糖蛋白質の糖鎖を認識しユビキチンを付加する反応機構を考察した。

## 研究成果の概要（英文）：

The ubiquitin ligase complex SCF<sup>Fbs1</sup>, which contributes to the ubiquitination of glycoproteins, is involved in the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway. To elucidate the structural basis of SCF<sup>Fbs1</sup> function, we determined the crystal structures of the Skp1-Fbs1 complex, the sugar binding domain (SBD) of the Fbs1-RNaseB complex and Skp1-Fbg3 complex at 2.4, 2.7 and 2.6 Å resolutions, respectively. The structure of the Skp1-Fbs1 complex illustrated the SCF<sup>Fbs1</sup> ubiquitin ligase model.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000		1,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン(Ub)-プロテアソーム経路は不要蛋白質を特異的に分解することで生体内

の制御や蛋白質品質管理の役割を担っており、この経路の異常は神経変性疾患など様々な疾病を引き起こす。この経路において

SCF<sup>Fbs1</sup> は異常な糖蛋白質を選択し分解経路に送り込む役割を担っており、病気との関連性も高い。このことから、Fbs1による糖鎖を利用した蛋白質分解機構の理解を目指し、SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体の糖鎖認識サブユニット Fbs1の糖鎖認識ドメイン(SBD)の立体構造を決定した。

## 2. 研究の目的

糖鎖を認識することにより行われる、糖蛋白質の認識および分解機構の解明、糖鎖をシグナルとすることにより得られる異常な糖蛋白質認識における合理性の理解を目指し、これまでにを行ったドメインによる解析だけではなく複合体として SCF<sup>Fbs1</sup> の構造解析を行うと共に、基質となる糖蛋白質との複合体も作製し構造生物学的手法を用いた解析を行う。また、Fbs1にはファミリーとして Fbs2、Fbg3等が存在し認識する糖鎖の特異性の異なるものや認識部位のホモロジーの低いものが見付かっている。本研究ではそれらファミリーの構造解析を行い、基質認識特異性と立体構造の相関の解析を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) Skp1-Fbs1 複合体の構造解析による SCF<sup>Fbs1</sup> ユビキチンリガーゼの蛋白質分解機構解明: Skp1-Fbs1 複合体の X線結晶構造解析を行い、報告された立体構造を用いたモデル作製により機能状態である SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体の立体構造を決定する。

(2) SBD-RNaseB 複合体の構造解析による糖蛋白質結合機構解明: SBD-RNaseB 複合体の X線結晶構造解析を行い糖蛋白質との相互作用様式を解析する。

(3) Skp1-Fbs1 複合体、SBD-RNaseB 複合体の構造による糖蛋白質ユビキチン化機構の解明: (1),(2)による立体構造をもとに複合体モデルを作製し、基質認識およびユビキチン化機構をモデル、変異体より解析する。

(4) Skp1-Fbg3 複合体の構造解析による糖鎖認識特異性の解明: Fbs1ファミリーである Fbg3の立体構造を決定し、基質認識特異性の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) Skp1-Fbs1 複合体構造: Skp1-Fbs1 複合体を X線結晶構造解析により 2.4Å 分解能で決定した。(図 1)

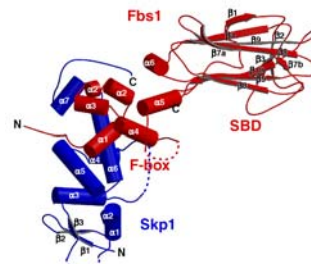


図 1 Skp1-Fbs1 複合体構造

(2) SBD-RNaseB 複合体構造: SBD-RNaseB 複合体を X線結晶構造解析により 2.7Å 分解能で決定した。(図 2)

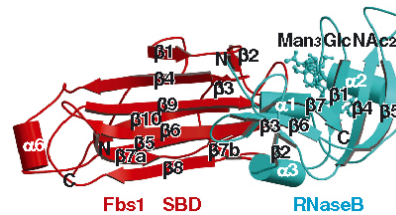


図 2 SBD-RNaseB 複合体構造

決定した複合体構造より、Fbs1は標的となる糖蛋白質の認識において、N型糖鎖の根元部分の GlcNAc 2分子と Man 2分子を認識しており、蛋白質領域とは特異的な結合を形成していないことを示した。

(3) Skp1-Fbs1 複合体、SBD-RNaseB 複合体の構造による糖蛋白質ユビキチン化機構解析: 結晶構造を基に生体内で機能する状態である SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体のモデル(図 3)を作製し、その反応機構の解析を行った。その結果、基質認識部位とユビキチン結合部位の間の空間に標的蛋白質を提示しユビキチンを付加していることを示した。また、SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体は糖蛋白質ユビキチン付加において、基質認識部位の構造変化により多様な基質に対してユビキチンを付加している可能性が示された。

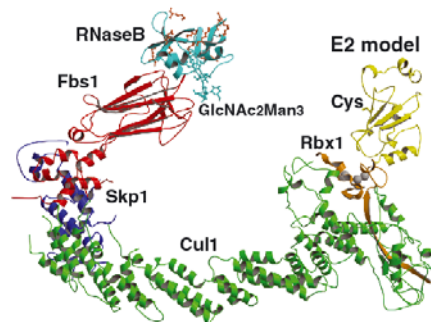


図 3 SCF<sup>Fbs1</sup>-RNaseB 複合体構造モデル

(4) Skp1-Fbg3 複合体の結晶化: Skp1-Fbg3 複合体の結晶化を行い、シーディングを繰り返すことにより低分解能の反射しか与えなかった多結晶を改善し、構造解析可能な結晶を作製した。

(5) Skp1-Fbg3 複合体構造解析: Skp1-Fbg3 複合体を X 線結晶構造解析により 2.6Å 分解能で決定した。Fbg3 の立体構造は全体として Fbs1 と類似していたが、基質認識部位に違いがみられた。

(6) Skp1-Fbs2 結晶化: Skp1-Fbs2 複合体の発現系、精製条件の検討を行い結晶化に成功した。しかし、得られた結晶は結晶格子が大きく回折データ収集が困難であったことから、現在データ収集、解析を行っている。

#### 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 12 件)

①Kim S, Saeki Y, Fukunaga K, Suzuki A, Takagi K, Yamane T, Tanaka K, Mizushima T, Kato K, Crystal Structure of Yeast Rpn14, a Chaperone of the 19S Regulatory Particle of the Proteasome., J. Biol. Chem. 査読有, 2010, 印刷中

②Nishio M, Kamiya Y, Mizushima T, Wakatsuki S, Sasakawa H, Yamamoto K, Uchiyama S, Noda M, McKay AR, Fukui K, Hauri HP, Kato K, Structural basis for the cooperative interplay between the two causative gene products of combined factor V and factor VIII deficiency, Proc Natl Acad Sci U S A., 査読有, 107, 2010, 4034-4039

③Kumanomidou T, Nakagawa T, Mizushima T, Suzuki A, Tokunaga F, Iwai K, Yoshida Y, Tanaka K, Yamane T, Crystallization and preliminary X-ray characterization of the Skp1-Fbg3 complex., Acta Crystallographica Section F, 査読有, 66, 2010, 95-98

④Nishio K, Kim SW, Kawai K, Mizushima T, Yamane T, Hamazaki J, Murata S, Tanaka K, Morimoto, Crystal structure of the deubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain., Biochem Biophys Res Commun., 査読有, 390, 2009, 855-860

⑤八代田英樹、水島恒裕、出芽酵母 20S プロテアソーム形成に関わるシャペロン複合体 Dmp1/Dmp2 の立体構造解析、細胞工学、査読無、27、2008、474-475

⑥Okazaki S, Suzuki A, Mizushima T, Kawano T, Komeda H, Asano Y, Yamane T, The novel structure of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent fold-type I racemase, alpha-amino-epsilon-caprolactam racemase from *Achromobacter obae*.,

Biochemistry, 査読有, 48, 2008, 941-950

⑦Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou Y, Mizushima T, Ezaki, J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M, Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy, J. Biol. Chem, 査読有, 283, 2008, 22847-22857

⑧Okazaki S, Suzuki A, Mizushima T, Komeda H, Asano Y, Yamane T, Structure of D-amino-acid amidase complexed with L-phenylalanine with L-phenylalanine amide: insight into D-stereospecificity of D-amino-acid amidase from *Ochrobacterum anthropi* SV3, Acta Cryst. D, 査読有, 64, 2008, 331-334

⑨Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K, Kameyama T, Hayashi H, Kishimoto T, Niwa S, Kasahara M, Kurimoto E, Sakata E, Takagi K, Suzuki A, Hirano Y, Murata S, Kato K, Yamane T, Tanaka K, Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes, Nat Struct Mol Biol., 査読有, 15, 2008, 228-236

⑩Mizushima T, Tatsumi K, Ozakai Y, Kawakami T, Suzuki A, Ogasahara K, Komatsu M, Kominami E, Tanaka K, Yamane T, Crystal structure of Ufc1, the Ufm1-conjugating enzyme, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 362, 2007, 1079-1084

⑪Mizushima T, Yoshida Y, Kumanomidou T, Hasegawa Y, Suzuki A, Yamane T, Tanaka K, Structural basis for the selection of glycosylated substrates by SCF<sup>Fbs1</sup> ubiquitin ligase., Proc Natl Acad Sci U S A., 査読有, 104, 2007, 5777-5781

⑫Shinzawa-Itoh K, Aoyama H, Muramoto K, Terada H, Kurauchi T, Tadehara Y, Yamasaki A, Sugimura T, Kurono S, Tsujimoto K, Mizushima T, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S, Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase., EMBO Journal, 査読有, 26, 2007, 17131-1725

[学会発表] (計 8 件)

①水島恒裕、金相佑、佐伯泰、田中啓二、加藤晃一、プロテアソーム制御因子複合体形成シャペロンの X 線結晶構造解析、特定領域研究 超分子構造 第 6 回公開シンポジウム、2009 年 12 月 1-2 日、大阪

②水島恒裕、熊埜御堂太一、鈴木淳巨、山根隆、加藤晃一、ユビキチンリガーゼによる糖タンパク質品質管理における糖鎖認識機構の解析、糖鎖科学名古屋拠点 第 7 回「若手の力」フォーラムおよび拠点共同研究報告会、2009 年 9 月 30 日、名古屋

③水島恒裕、鎖認識ユビキチンリガーゼ Fbs ファミリーの構造と反応機構、第 4 回プロテオミクス・構造生物学講演会、2009 年 1 月 30 日、岡崎

④ Mizushima T., Yoshida Y., Kumanomidou T., Yamaguchi Y., Yamane T., Tanaka K., Kato K., STRUCTURE BASIS FOR RECOGNITION OF GLYCOSYLATED SUBSTRATES BY SCF<sup>Fbs1</sup> UBIQUITIN LIGASE, ZOMES V, 2008年11月13日, Yokohama, Japan

⑤ Mizushima T., Yoshida Y., Kumanomidou T., Hasegawa Y., Suzuki A., Yamane T., Tanaka K., X-ray Structure of the Skp1-Fbs1 glycoprotein complex, FEBS Congress & IUBMB Conference, 2008年6月30日, Athens, Greece

⑥ 水島恒裕、八代田英樹、田中啓二、プロテアソームシャペロン Dmp1-Dmp2 複合体による 20S プロテアソーム分子集合機構、日本蛋白質科学会、2008年6月12日、東京

⑦ Mizushima T., Yoshida Y., Kumanomidou T., Hasegawa Y., Suzuki A., Yamane T., Tanaka K., X-ray Structure of the Skp1-Fbs1 glycoprotein complex, ASCA2007, 2007年11月4-8日, Taipei, Taiwan

⑧ 水島恒裕、吉田雪子、熊埜御堂太一、田中啓二、山根隆、SCF<sup>Fbs1</sup> ユビキチンリガーゼによる糖蛋白の選択的認識機構、日本蛋白質科学会、2007年5月26日、仙台

〔図書〕(計2件)

① 水島恒裕、田中啓二、共立出版、蛋白質核酸酵素 融合発展する構造生物学とケミカルバイオロジーの最前線 (巨大で複雑な蛋白質分解装置の形成機構 分担執筆) 2009、1716 (1670-1675)

② 水島恒裕、吉田雪子、羊土社、実験医学増刊号 タンパク質の分解機構 (SCF<sup>Fbs1</sup>の構造と機能 分担執筆)、2008、233 (81-86)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0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0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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA TSUNEHIRO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：90362269

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：