

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 20 年 ～ 平成 21 年

課題番号：20770140

研究課題名（和文）：複製因子 PCNA が制御する、タンパク質ユビキチン化反応の分子機構の解析

研究課題名（英文）：Molecular mechanism of protein ubiquitylation, regulated by replication factor, PCNA.

研究代表者：塩見 泰史（YASUSHI SHIOMI）

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：80380567

研究成果の概要（和文）：① パキウイルスを用いた昆虫細胞発現系からユビキチンリガーゼ CRL4^{Cdt2}を精製し、*in vitro*ユビキチン化反応系を構築した。この反応系を用いて、CRL4^{Cdt2}による Cdt1、p21 のユビキチン化を直接的に示した。② CRL4^{Cdt2}によるユビキチン化の標的となるには PIP box内にある TD 配列と、PIP boxから+3、+4 アミノ酸下流にある 2 つ並んだ塩基性アミノ酸が必要であることを明らかにした。この結果から、基質が PCNA と複合体となった時、TD 配列と 2 つの塩基性アミノ酸が外側に向かって立体配置をとり、基質となるシグナル（デグロン）を CRL4^{Cdt2}に提示する立体構造モデルを示した。③ 細胞内 CRL4^{Cdt2}と相互作用する因子を質量分析により解析した結果、新規のユビキチン化標的因子の候補を見いだした。

研究成果の概要（英文）：① We have constructed baculovirus expression system of CRL4^{Cdt2} ubiquitin ligase, and *in vitro* ubiquitylation system for Cdt1, p21. ② We have demonstrated that two conserved amino acid residues within and downstream of the PIP-box are required for degradation in mammalian cells. TD amino acid residues in the PIP-box, and the presence of basic amino acids at +3 and +4 downstream of the PIP box create a degron for CRL4^{Cdt2}. ③ We have analyzed the proteins which interacts with CRL4^{Cdt2} *in vivo* by mass spectrometry, and found candidates for ubiquitylation by CRL4^{Cdt2}.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：細胞周期、DNA 複製、ユビキチン化、タンパク質分解、PCNA

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のユビキチン化は、その標的タンパク質を分解系に進めるためのマーカーとなるだけでなく、タンパク質の量的制御やタンパク質そのものの性質や機能を変換するために機能しており、様々な生体機能を積極的にコントロールする制御系であることが明らかにされている。本研究で解析対象とした、細胞周期の安定なS期進行に機能するヒトの新規ユビキチンリガーゼ複合体、Cul4-DDB1-Cdt2 (CRL4^{Cdt2})の活性は複製因子PCNAに依存しているのが特徴で、PCNA結合因子をユビキチン化の基質とする。しかし、ヒトにおいて50を超えるPCNA結合因子の中で基質となるものは、複製のライセンス化因子Cdt1と、私たちの解析から明らかにしたCDKインヒビター-p21のみである。また、もう一つの特徴として、CRL4^{Cdt2}は紫外線に应答して活性化され、ユビキチン化活性を示す。このS期進行と紫外線に应答したCRL4^{Cdt2}の活性化と基質のユビキチン化・分解は細胞内の現象としては示されているものの、どのような分子機構で制御が行われているのかについては明らかでなかった。

2. 研究の目的

CRL4^{Cdt2}によるユビキチン化の制御には酵素と基質の他に第三の因子PCNAが介在している。そこで、これらの因子から成るユビキチン化反応の分子機構を明らかにするため、以下の項目を目的とした。

1) CRL4^{Cdt2}によるPCNAを介したユビキチン化 *in vitro* 反応系の構築

2) PCNA結合タンパク質の中でCRL4^{Cdt2}によりユビキチン化されるものと、そうでないものの認識機構

3) 新規ユビキチン化基質の検索

3. 研究の方法

1) 組換えタンパク質の発現と精製、およびユビキチン化反応系の構築

ヒトCRL4^{Cdt2}によるユビキチン化反応系に必要なタンパク質を、バキュロウイルスによる昆虫細胞発現系を用いて構築した。発現させたタンパク質は高純度に精製を行った。

精製タンパク質を用いて、*in vitro*ユビキチン化反応系を構築した。*in vivo*での解析結果から示されている、PCNAの要求性について検討を行った。

2) CRL4^{Cdt2}による標的タンパク質認識機構の解明

PCNA結合タンパク質の中でもCRL4^{Cdt2}に認識されユビキチン化による分解を受けるものと、そうでないものの違いを明らかにするため、ユビキチン化されるタンパク質のPCNA結合モチーフ(PIP box)をユビキチン化されないタンパク質のPIP boxと入れ替えたキメラタンパク質や、Cdt1、p21のPIP box周辺に変異を導入したタンパク質を用いて、ユビキチン化に必要な構造を解析した。以上より、CRL4^{Cdt2}によるPCNAに結合した標的タンパク質認識機構のモデル化を行った。

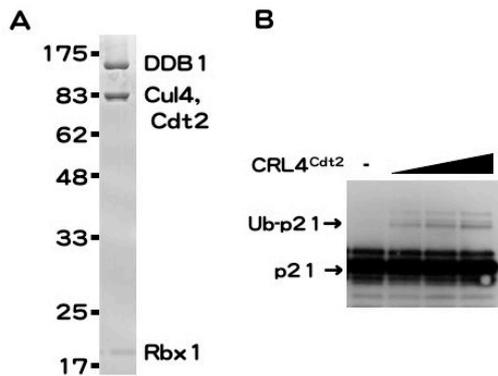
3) CRL4^{Cdt2}による新規ユビキチン化因子の検索

ヒトPCNA結合因子として複製、修復、クロマチン形成などに関わる50種以上のタンパク質が知られているが、それらの中でユビキチン化され分解系に進むのはCdt1とp21を除き知見がない。そこで、CRL4^{Cdt2}、PCNAの両方と相互作用するタンパク質という視点から、新規ユビキチン化基質の候補となり得るものを検索した。タグを付加したCRL4^{Cdt2}の基質認識サブユニット、Cdt2をヒト細胞に導入した安定発現株を用いて、その細胞抽出液中からCRL4^{Cdt2}と共沈降する因子を質量分析で網羅的に検索した。この時、紫外線照射の有無や細胞周期の同調など、CRL4^{Cdt2}が機能する条件下とそうでない条件下での結合タンパク質の比較を行った。

4. 研究成果

1) CRL4^{Cdt2}のユビキチン化反応系の再構築に必要なタンパク質の、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞発現系を構築した。この発現系において、CRL4^{Cdt2}は安定な複合体を形成することがわかり、この細胞抽出液からのCRL4^{Cdt2}の精製法を確立した。精製したタンパク質を用いてユビキチン化反応系構築のための条件検討を行い、CRL4^{Cdt2}によるCdt1、p21のユビキチン化を直接的に証明した(下図および発表論文3)。

この時、PCNAの反応系への明確な要求性は見いだせなかった。このことから、CRL4^{Cdt2}によるユビキチン化反応のPCNA依存性は、細胞内の他の因子や紫外線应答時に特異的にみられるPCNAの化学修飾が関与している可能性が示唆された。



A) バキュロウイルス発現系から精製したCRL4^{Cdt2}複合体。
B) CRL4^{Cdt2}によるp21の*in vitro*ユビキチン化。

2) ユビキチン化される Cdt1 の PCNA 結合モチーフ (PIP box) をユビキチン化されないタンパク質の PIP box と入れ替えたキメラタンパク質や、Cdt1、p21 の PIP box 周辺に変異を導入したタンパク質を用いて、ユビキチン化に必要な要素を解析した。その結果、CRL4^{Cdt2} によるユビキチン化の標的となるには PIP box 内にある T と D が並んだ配列と、PIP box から 3 アミノ酸下流にある 2 つ並んだ塩基性アミノ酸が必要であることが明らかとなった。この結果に基づき、基質が PCNA と複合体となった時、TD 配列と 2 つの塩基性アミノ酸が外側に向かって立体配置をとり、基質となるシグナル (デグロン) を CRL4^{Cdt2} 側に提示するとその立体構造モデルを示した (論文投稿中)。

3) CRL4^{Cdt2} による新たなユビキチン化標的因子の検索を目的に、細胞内から CRL4^{Cdt2} を精製し、これと相互作用する因子を質量分析により解析した。その結果、新規のユビキチン化標的因子の候補を見いだした。現在は、この因子のユビキチン化の解析を *in vitro* 反応系を用いて、反応への PCNA の要求性を含めた直接的な証明を進めている。

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 4 件)

① 塩見 泰史、西谷 秀男、釣本 敏樹. (2009) CDK インヒビター-p21 の分解による細胞周期の制御. *生体の科学*. 60 (6) :527-32. **査読無**

② 塩見 泰史、釣本 敏樹. (2009) 染色体複製における多重クランプ・ローダー系の役割. *生化学*. 81 (5) :386-9. **査読無**

③ Hideo Nishitani*, Yasushi Shiomi*, Hiroka Iida, Masato Michishita, Toshihiro Takami, Toshiki Tsurimoto. (2008) CDK inhibitor p21 is degraded by a PCNA coupled Cul4-DDB1-Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation. *J Biol Chem*. 283(43):29045-52. (*These authors contributed equally to this work) **査読無**

④ 西谷 秀男、塩見 泰史. (2008) Pre-RC 形成および再複製抑制制御機構. *細胞工学*. 27(10) :980-4. **査読無**

[学会発表] (計 4 件)

① 塩見 泰史、石井 健士、村上 裕輔、中山 潤一、西谷 秀男「紫外線に応答したヒト Cul4-DDB1^{Cdt2} による細胞周期連係因子のユビキチン化と分解機構」第 32 回 日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜市、パシフィコ横浜

② 塩見 泰史、西谷 秀男「紫外線に応答したヒト Cul4-DDB1^{Cdt2} による Cdt1 のユビキチン化と分解機構」第 20 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2009 年 11 月 1 日-3 日、彦根市、琵琶湖コンファレンスセンター

③ Yasushi Shiomi and Hideo Nishitani "STUDY OF *IN VITRO* UBIQUITINATION OF HUMAN CDT1 AND P21 BY CUL4-DDB1-CDT2 COMPLEX" EUKARYOTIC DNA REPLICATION AND GENOME MAINTENANCE、2009 年 9 月 1 日-5 日、Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

④ 塩見 泰史、岸 ちひろ、道下 雅人、西谷 秀男「細胞周期進行に依存したヒト Cdt1 ユビキチン化と分解制御機構の解析」第 31 回 日本分子生物学会年会、第 81 回 日本生化学会大会 合同大会、神戸市、神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 9-12 日

[図書] (計 0 件)

[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

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biosig/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 泰史（ YASUSHI SHIOMI ）

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：80380567

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：