

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570140

研究課題名（和文） ユビキチン-プロテアソーム経路におけるUBL-UBAタンパク質の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of UBL-UBA proteins in the ubiquitin-proteasome pathway.

研究代表者

小林 英紀 (KABAYASHI HIDEKI)

岡山大学・教育開発センター・教授

研究者番号：20150394

研究成果の概要（和文）：

ユビキチン依存タンパク質分解は、細胞周期など種々の細胞生理機能においてタンパク質の識別と分解の制御に重要な役割を担っている。分解タンパク質の配送識別に関与するUBL-UBAタンパク質(出芽酵母Dsk2)の制御のしくみを知るため、Dsk2と相互作用するプロテアソームタンパク質及び新規調節因子を同定しその機能解析を行った。本研究により、ユビキチン-プロテアソーム分解経路におけるUBL-UBAタンパク質の配送調節のしくみが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Ubiquitin-dependent protein degradation regulates the recognition and delivery of degradable proteins in various cellular functions including the cell cycle. To understand a functional role of UBL-UBA protein, yeast protein Dsk2, which is involved in the delivery process of protein degradation, we identified the Dsk2-interacting proteasome subunits and its accessory factors and analyzed their cellular functions. In this study, as a result, we clarified the regulatory function of UBL-UBA protein in the delivery system of the ubiquitin-proteasome pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内タンパク質分解・ユビキチン、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン依存タンパク質分解は、細胞周期、ストレス応答、蛋白質の品質管理などの

細胞生理機能においてタンパク質の選別と分解を制御する中心的役割を担っている。このユビキチン依存タンパク質分解経路は、

(1) ポリユビキチン鎖を分解タンパク質に付加するユビキチン経路と、(2) ポリユビキチン鎖で標識された分解タンパク質をプロテアソーム装置で分解する経路で構成されるが、ユビキチン経路とプロテアソームの両経路に比べ、分解タンパク質の配送と識別の分子機構はまだよく分かっていなかった。

UBL-UBA タンパク質は、N 末端に UBL(Ubiquitin-like) ドメイン、C 末端に UBA(Ubiquitin-associated) ドメインの特徴的な構造を持ったタンパク質である。我々は UBL-UBA タンパク質である出芽酵母 Dsk2 と Rad23 の機能解析を行って、C 末端 UBA ドメインの分解タンパク質ポリユビキチン鎖との結合及び N 末端 UBL ドメインの 19 S 粒子レセプター Rpn1 との相互作用を介して、UBL-UBA タンパク質がポリユビキチン化分解蛋白質をプロテアソームに配送する可動型の配送因子であることを明らかにした。これらの研究の背景と研究成果に基づき、ユビキチン-プロテアソーム分解系の「第3の経路」として位置付けられる配送経路と、分解タンパク質の選択性における配送因子の調節的役割を解明することは重要な研究課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、ユビキチン経路とプロテアソーム経路を介在する「第3の経路」; 分解タンパク質の識別・配送経路の分子機構を解明することを主な目的として、分解タンパク質の配送に関与する出芽酵母 Dsk2 の機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母の遺伝学的解析をとおして配送経路の調節に関与する新規因子を同定した。配送因子 UBL-UBA タンパク質 (出芽酵母 Dsk2) の抑圧変異株の分離とその変異遺伝子

の同定、変異株の解析をとおして、配送経路に関連する遺伝子のスクリーニングを行なった。Dsk2 と相互作用する出芽酵母の遺伝子を同定し、その変異表現型を利用して、同定した因子の諸性質を分子生物学的手法により調べた。

(2) 分子遺伝学的方法と平行して、UBL-UBA タンパク質と相互作用する結合タンパク質について、TAP タグなどの手法による網羅的検索とマスマスペクトログラフーペプチド解析を行い、プロテアソームタンパク質とユビキチンレセプターに対する新規の結合タンパク質を網羅的にスクリーニングした。

(3) UBL-UBA タンパク質 (Dsk2) の UBL(ubiquitin-like) ドメインの K 変異体を作成し、変異 UBL-UBA タンパク質とポリユビキチン鎖 (K29,K48,K63) との選択的相互作用の解析、プロテアソームとの結合能及びユビキチン依存タンパク分解に対する効果について、免疫沈降、Tag-pull down 結合実験等で調べた。また、ユビキチン鎖 (K29,K48,K63) 変異体を作成して細胞内で発現させ、ユビキチン依存タンパク分解に用いられるポリユビキチン鎖 (K29,K48,K63) の選択性を調べた。

4. 研究成果

(1) 過剰発現した Dsk2 は生育阻害を引き起こすことを利用して、その生育阻止を抑圧するサプレッサーを分離した。その温度感受性変異の致死を相補する遺伝子変異を解析し、プロテアソーム base の構成タンパク質 Rpt4 を同定した。また、そのマルチコピーサプレッサー Nas2 を同定した。Nas2-Rpt4 複合体が Base 前駆体を構成した。同様にして Nas2, Hsm3, Nas6, Rpn14 を介して Rpt1-6 の Base 複合体が形成されることを示した。

(2) 出芽酵母 Dsk2 と相互作用する新規の遺伝子 Dif1 を同定してその機能解析を行い、Dif1 タンパク質は、NaCl, KCl, CaCl₂ などの高塩濃度による浸透圧ストレスに対して感受性を示す配送因子の結合タンパク質であることを示した。

(3) タンパク質の配送を担う UBL-UBA タンパク質 Dsk2 自身がユビキチン化されていることが明らかになったのを踏まえ、ユビキチン鎖の選択と配送因子 Dsk2 のユビキチン化の配送経路における役割の解析を行った結果、UBL ドメイン内の K28 ユビキチン鎖が、配送因子 (Dsk2) 自身の分解と安定性とプロテアソームとの相互作用に関与することを示した。

(4) 出芽酵母の Gtr1-Gtr2 はヘテロ複合体で機能する。Gtr1, Gtr2 の各々が単独のタンパク質として細胞内で相互作用するタンパク質を、酵母 two hybrid 法に用いて網羅的に同定したところ、Gtr2 が不在酵母中で Gtr1 が Ego3 と結合した。また、Gtr1 が不在時 Gtr2 が Ego1 と結合した。ヘテロ 2 量体 G タンパク質の Gtr1、Gtr2 は単独で相互作用タンパク質 Ego1, Ego3 に結合することを示した。また、Gtr1, Gtr2 欠失株は、カフェインストレスに感受性を示した。ストレスにตอบสนองして分解される出芽酵母のスマール G タンパク Gtr2 の分解のしくみと配送経路との関係を解析し、Gtr1-Gtr2 複合体の TOR シグナル経路への関与が示唆された。

これらの解析結果は、ユビキチン-プロテアソーム分解経路の配送因子として働く UBL-UBA タンパク質が、プロテアソーム調節粒子の形成経路の調節的役割をもつこと、ま

た、配送因子 Dsk2 がストレス応答に関与することを示唆している。プロテアソーム粒子の生合成、及びタンパク質分解とストレス応答制御の今後の研究に重要な知見を供すると考えられる。

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 8 件)

① Hatanaka A, Chen B, Sun J-Q, Mano Y, Funakoshi M, Kobayashi H, Ju Y, Mizutani T, Shimyozu K, Nakayama J, Miyamoto K, Uchida H and Oki M. 2011. Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes Genet. Syst.* 86, 305-314.

② Sekiguchi T, Sasaki T, Funakoshi M, Ishii T, Saitoh Y, Kaneko S and Kobayashi H. 2011. Ubiquitin chains in the Dsk2 UBL domain mediate Dsk2 stability and protein degradation in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 555-561.

③ Yoshioka M, Nakayama Y, Yoshida M, Ohashi K, Morita N, Kobayashi H and Yamamoto Y. 2010. Quality control of Photosystem II: FtsH hexamers are localized near photosystem II at grana for the swift repair of damage. *J. Biol. Chem.* 285, 41972-41981.

④ Sekiguchi T, Funakoshi M, Furuno N and Kobayashi H. 2010. Gtr1 or Gtr2 of heterodimeric G proteins interacts to its interacting protein, Ego1 or Ego3. *Genes Genet. Syst.* 85, 425.

⑤ Funakoshi M, Tomko R Jr, Kobayashi H and Hochstrasser M. 2009. Multiple assembly chaperons govern biogenesis of the proteasome regulatory particle. Cell. 137, 887-899.

⑥ Wang Y, Kurihara Y, Sato T, Toh H, Kobayashi H and Sekiguchi T. 2009. Gtr1p differently associates with Gtr2p and Ego1p. Gene. 437, 32-38.

⑦ Horiike Y, Kobayashi H and Sekiguchi T. 2009. Ran GTPase guanine nucleotide exchange factor RCC1 is phosphorylated on serine 11 by cdc2 kinase in vitro. Mol. Biol. Rep. 36, 717-723.

⑧ Sekiguchi T, Kobayashi H and Wang Y. 2009. Leucine zipper motifs are essential for Gtr1-Gtr2 complex formation in yeast. Genes Genet. Syst. 84, 452.

[学会発表] (計7件)

① 関口猛、小林英紀、他、TOR(Target of Rapamycin) ネットワークの構造と機能 - 酵母遺伝学からのアプローチ」、日本遺伝学会第83回大会、2011年9月20日京都。

② 吉岡美保、中山洋輔、吉田真理、大橋研介、森田典子、小林英紀、山本泰、光化学系IIのquality control: 光・熱ストレスやチラコイド膜での存在場所に依存するFtsHプロテアーゼのサブユニット構造、第51回日本植物生理学会、2010年3月18-21日、熊本。

③ 関口猛、舟越稔、古野伸明、小林英紀、ヘテロ2量体Gタンパク質のGtr1, Gtr2は単

独で相互作用タンパク質Ego1, Ego2に結合する、日本遺伝学会第82回大会、2010年9月21-22日、長野。

④ 関口猛、舟越稔、古野伸明、小林英紀、ヘテロ2量体Gtr1-Gtr2複合体のGtr1もしくはGtr2と相互作用するタンパク質の同定、日本分子生物学会、2010年12月7-10日、神戸。

⑤ 関口猛、鎌田芳彰、大隅良典、王永剛、小林英紀、Gtr1-Gtr2複合体のTORシグナル経路における機能解析、日本分子生物学会、2009年12月10日、横浜。

⑥ 関口猛、王永剛、小林英紀、Gtr1-Gtr2複合体形成にロイシンジッパーモチーフが必須である、日本遺伝学会第81回大会、2009年9月16日、長野。

⑦ Takeshi Sekiguchi, Yonggang Wang, Naoyuki Hayashi, Hiroyuki Toh, Hideki Kobayashi, Characterization of Gtr1/2 small G proteins, The 23rd annual symposium of The Protein Society, 2009.07.27. Boston, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 英紀 (KABAYASHI HIDEKI)
岡山大学・教育開発センター・教授
研究者番号：20150394

(2) 研究分担者

山本 泰 (YAMAMOTO YASUSHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：40091251

(3) 連携研究者

関口 猛 (SEKIGUCHI TAKESHI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：60187846