様式Ｃ－１９

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１７日現在

機関番号：８２６０９
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：２１５８０１２１
研究課題名（和文）　新規小胞体関連分解ユビキチンリガーゼの基質認識機構の解析

研究課題名（英文）　Analysis of substrate-recognition mode by novel ubiquitin ligase related to endoplasmic reticulum-associated degradation pathway.

研究代表者
吉田　雪子(YOSHIDA YUKIKO)
財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員
研究者番号：90271543

研究成果の概要（和文）：これまで報告してきた２つの糖鎖認識 F-box 蛋白質（ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニット）Fbs1, 2 に加え、糖鎖結合能のない Fbxo44b が Fbs1, 2 とは異なる機構で糖蛋白質の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明らかとした。また、第三の糖鎖認識 F-box 蛋白質 Fbs3 が高マンノース型糖鎖のみならず複合型糖鎖を認識することから、小胞体関連分解に加え未知の経路で細胞質に現れる糖蛋白質の分解に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have reported previously that Fbs1 and Fbs2 are glycoprotein-specific F-box proteins, which are identified as the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)-linked ubiquitin ligase component. Here we report that Fbxo44b, which does not have sugar-binding activity, is involved in ubiquitylation of glycoproteins under the ERAD pathway. In addition, we analyzed the third F-box protein recognizing *N*-glycoproteins, Fbs3. Fbs3 can interact with glycoproteins modified with not only high-mannose but also complex-type glycans, suggesting that participates in unknown function of glycoproteins endocytosed from the cell surface but not through the ERAD pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	800,000	240,000	1,040,000
２０１０年度	1,500,000	450,000	1,950,000
２０１１年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総　計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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・応用生物化学
キーワード：F-box 蛋白質・ユビキチンリガーゼ・小胞体関連分解・*N*型糖鎖・基質認識

１．研究開始当初の背景

蛋白質の選択的分解において中心的役割を果たすユビキチン-プロテアソームシステムは、分解されるべく基質に付加されたポリユビキチン鎖を 26S プロテアソームが認識することで蛋白質分解を行うものである。この分解システムにおいて、高い基質特異性を担うのがユビキチンリガーゼである。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, Roc1 の４量体から構成される SCF 型ユビキチンリガーゼである。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、基質結合サブユニットである。申請者はマウス脳より新規糖鎖結合蛋白質をスクリーニングする過程で、糖蛋白質糖鎖を認識するF-box蛋白質 Fbs1(*F*-*b*ox protein that recognizes *s*ugar chain 1)を発見し、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。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異常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品質管理機構である。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。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）を認識することを報告している。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。しかし、変性した蛋白質の場合は糖鎖の根元が露出し Fbs1 に認識されるようになるのではないかと推定される結果を報告している。

多くのF-box蛋白質はSCF型リガーゼを形成するが、Fbs1に関しては小胞体に結合した極わずかの分子のみSCF型リガーゼを形成し、大部分の Fbs1 は細胞質中に Fbs1 もしくは Fbs1-Skp1 の二量体で存在し、凝集体形成を阻害するシャペロンとして機能する。Fbs1が他のF-box蛋白質と異なりSCF複合体を形成しないのは、F-box ドメインと基質結合ドメインの間の２６アミノ酸よりなるリンカー配列によるものである。そこで、このことを利用して様々な標的分子が未知のF-box蛋白質に Fbs1 のリンカー配列を導入し、ユビキチンリガーゼ活性を持たない安定なF-box蛋白質を作製し標的分子のスクリーニングを行ったところ、Fbxo44b がカルボキシペプチダーゼの一種 CPVL と結合することを見出した。CPVLは小胞体に存在する糖蛋白質であり、Fbxo44bは糖鎖がはずれたCPVLを細胞質で補足しユビキチン化するリガーゼとして機能する、すなわち新しいタイプの ERAD ユビキチンリガーゼであることを示唆する結果を得ている。

２．研究の目的

Fbxo44bはFbs1とは異なり、大部分がSCF型複合体として存在しユビキチンリガーゼとして機能する。これまでにFbxo44bがプロテアソーム阻害剤存在下でのみ糖鎖が除去された CPVL と選択的に結合することを見出している。本研究では、Fbxo44b がどのように糖鎖が除去された基質を選択的に補足するのかその基質認識機構を知ることを第一の目標として、そのためにプロテアソーム阻害剤存在下で形成されるFbxo44bを含む複合体の全体像を明らかとする。また、他のF-box蛋白質についても ERAD に関係するものがないかのスクリーニングを並行して行っていき、ERADを受けることが報告されているモデル基質を用いてこれまで報告のあった小胞体膜結合型の ERAD に関わるユビキチンリガーゼや Fbs1 との比較を含め、詳細に検討していく。

３．研究の方法

(1)Fbxo44b が ERAD のユビキチンリガーゼとして機能するかの解析

①Fbxo44bによるCPVLのユビキチン化及び分解速度の解析

Fbxo44b は種々の培養細胞で発現しているのでこれをノックダウンした際に CPVL が安定化すること、Fbxo44b の過剰発現でCPVL のユビキチン化がMG132存在下で増強するかなどをウエスタンブロッティングにより解析する。またFbxo44bノックダウン時と過剰発現時の CPVL の分解速度をパルスチェイス実験により解析する。

②Fbxo44bによるCPVL結合部位の特定

CPVL の欠失変異体及び糖鎖付加変異体を作成し免疫沈降・ウエスタンブロッティング法により結合に必須な部分を解析する。

③既知の ERAD 基質の分解への Fbxo44b の寄与

膜結合型の ERAD モデル基質（CFTR Δ508F など）や分泌蛋白質の分解に及ぼす影響を Fbxo44b の過剰発現系、ノックダウン系を用いたパルスチェイス実験により検討する。

(2) Fbxo44bと相互作用する蛋白質の解析

①糖鎖除去酵素PNGaseとの相互作用解析

Fbxo44bは４カ所のN結合型糖鎖を持つが、Fbxo44bと結合するのは糖鎖を持たないCPVLのみである。これは、細胞質にあるN結合型糖鎖除去酵素 PNGase により糖鎖がはずされたCPVLをFbxo44が選択的に補足しているものと考えられる。そこで、Fbxo44 と PNGase との相互作用がないかどうかを免疫沈降法により明らかとする。また、PNGaseを過剰発現させ、糖鎖が除去された CPVL を増やした場合、Fbxo44bと結合するCPVLの量が増えるか、また、分解が促進されるかどうかなども合わせて検討する。

②Fbxo44bとの相互作用分子群の同定

Fbxo44bはMG132存在下でのみ糖鎖のない

CPVL と小胞体上で結合する。MG132 の有無で小胞体画分の Fbxo44b の複合体形成に影響がないか、はじめに密度勾配遠心を用いたウエスタンブロッティングにより解析を行う。次に、タグの付いた Fbxo44b を発現させ、MG132 の存在・非存在下で免疫沈降を行い、Fbxo44b と結合する分子の違いを２次元ゲル電気泳動法などにより検討し、TOF-MS を用いて結合蛋白質の同定を行う。

(3)Fbs1 ホモログの糖鎖結合能の解析

これまで、Fbs1 は強い糖鎖結合能がみられていたものの、糖鎖結合能があると報告した Fbs2 ですら Fbs1 に比べ糖蛋白質との結合能が非常に弱いものであった。蛋白質の発現系やアッセイ系を変えることで他のホモログも糖鎖結合能が検出できる可能性を考え改善を図る。

① F-box 蛋白質の安定発現系の作成

Skp1 や Skp1 変異体、Cul1 などの共発現で局在や発現性に変化がないか解析する。

② Fbs1,2 その他の糖鎖認識 F-box 蛋白質の網羅的基質解析

①で作成した安定発現系を用いて F-box 蛋白質に結合する糖蛋白質を LC-MS により網羅的に解析・同定し基質に指向性がないかどうか解析を行う。

４．研究成果

(1) 新規 ERAD ユビキチンリガーゼ Fbxo44b の解析

これまでに報告してきた糖鎖を認識する F-box蛋白質Fbs1及びFbs2は、構造が異常な蛋白質を分解に導く小胞体関連分解機構に於いて働くユビキチンリガーゼを構成する基質認識サブユニットである。これらは異常蛋白質の糖鎖を認識するものである。一方、Fbs1,2と相同性の高いF-box蛋白質Fbxo44はFbs1,2と異なり糖鎖結合能を持っていないためその機能解析を行うために基質のスクリーニングを行った。その結果、Fbxo44の特にスプライシングバリアントであるFbxo44bは小胞体に存在する糖蛋白質CPVLを基質とすることが判明した。詳細にFbxo44bのCPVLの認識機構を検討した結果、Fbxo44bは細胞質に存在する糖鎖除去酵素PNGaseと複合体を形成しており、小胞体から細胞質へ戻されたCPVLの糖鎖がPNGaseによりはずされたものを選択的に認識してユビキチン化する可能性が高いことが判明した。これまで、異常糖蛋白質がプロテアソームにより分解を受ける際、糖鎖の除去とユビキチン化がどのような順序で起きるのかはっきりしていなかった。今回の実験に於いて、Fbs1やFbs2によるユビキチン化が糖鎖除去に先行するのに対し、Fbxo44bによるユビキチン化はPNGaseによる糖鎖除去の後に起こることが示唆された。小胞体関連におけるユビキチン化はこれまでHrd1やDoa10など酵母からヒトまで保存されたリガーゼが担っていると考えられてきたが、哺乳類に於いてはこのようにさらに多くの複雑な経路が存在することがわかってきた。

(2) F-box 蛋白質の細胞内安定化機構の解析

これまで、Fbs1 に比べ Fbs2 の糖鎖結合能は非常に微弱なものであると私達も他のグループも報告してきた。顕微鏡観察により Fbs1 以外の F-box 蛋白質は非常に発現レベルが低いことが判明し、これは細胞内での不安定性が原因であり、これまでの方法では Fbs2 の蛋白質の構造自体が正しくないため糖鎖結合能も正しく評価されていない可能性が考えられた。F-box 蛋白質を Skp1 アダプター蛋白質の Skp1 と共発現させることで、いくつかの F-box 蛋白質の例外はあるものの多くは安定に発現するようになることが明らかとなった。また、局在も単独で発現させた場合と異なるものもあった。この系を用いることで、Fbs1 と Fbs2 の糖鎖結合能がほぼ同レベルであること、また、Fbxo27 も糖鎖結合能があることが明らかとなった。

(3)新規糖鎖結合 F-box 蛋白質 Fbxo27 の解析

これまでERADにおけるユビキチンリガーゼのサブユニットとして報告してきたFbs1, Fbs2に加え第三の糖鎖認識F-box蛋白質 Fbxo27/Fbs3を見出したため、Fbs3もERADに関与するかどうかの解析を行った。Fbs3の発現は小胞体関連分解のモデル基質として知られるCFTR Δ508Fの分解を促進させるが、糖鎖結合能を欠く変異型Fbs3は影響を与えないことから、Fbs3も糖蛋白質のERAD系に関与することが示唆された。一方で、Fbs1,Fbs2,Fbs3の結合糖蛋白質のプロテオミクス解析を行ったところ、共通する基質蛋白質は多くあるものの、それぞれのF-box蛋白質と特異的に結合する糖蛋白質をいくつか見出した。その結果、共通する基質蛋白質は多くあるものの、それぞれのF-box蛋白質と特異的に結合する糖蛋白質質をいくつか見出した。特異的に結合する基質糖蛋白質の糖鎖の解析などの結果、Fbs3はFbs1,2とは異なり、高マンノース型糖鎖のみならず、ゴルジ体で付加される複合型糖鎖も結合できることを明らかとした。一方で、Fbs3が認識する複合体糖鎖をもつ蛋白質が細胞質に現れる経路は不明である。今回の研究ではFbs3がどのような経路において複合体糖鎖を認識するのかを明らかにする事はできなかったが、Fbs3の特異的基質解析からこ

の全く未知な経路をみつけることが今後の課題である。

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４件）
① Yoshida,Y.,Murakami,A.,Tanaka,K.:Skp1 stabilizes the conformation of F-box proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 401. 24-28 (2011) 査読有り
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.098
② Gong, B. et al.(員数７，５番目)：SCFFbx2-E3-ligase-mediated degradation of BACE1 attenuates Alzheimer’s disease amyloidosis and improves synaptic function. Aging Cell, 9, 1018-1031 (2010) 査読有り
DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00632.x
③ Kumanomidou, T. et al. (員数 9, 7 番目)：Crystallization and preliminary X-ray characterization of the Skp1-Fbg3 complex. Acta Crystallogr. Sect. F. Struct Biol. Cryst. Commun. 66, 95-98 (2010) 査読有り
DOI: 10.1107/S1744309109050581
④ Yoshida, Y., Tanaka, K.: Lectin-like ERAD players in ER and cytosol. Biochimica et Biophysica Acta, 1800, 172-180 (2010) 査読有り
http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.029

〔学会発表〕（計３件）
①吉田雪子ら Characterization of Fbs3 that is the third N-glycoprotein specific F-box protein. 第 34 回日本分子生物学会年会，2011 年 12 月 15,16 日 パシフィコ横浜（神奈川県）
② 吉田雪子ら In vivo function of glycoprotein-specific F-box proteins. （招待講演）BMB2010, 2010 年 12 月 7 日 神戸ポートアイランド（兵庫県）
③吉田雪子ら 小胞体関連分解に関わる新しいタイプのユビキチンリガーゼ．第 32 回日本分子生物学会年会，2009 年 12 月 11 日 パシフィコ横浜（神奈川県）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/

６．研究組織
(1)研究代表者
吉田 雪子（YOSHIDA YUKIKO）
財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員
研究者番号：90271543

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし