

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22370051

研究課題名（和文）

出芽酵母 Cullin 型 E3 の機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of budding yeast Cullin based E3

研究代表者

嘉村 巧 (Takumi Kamura)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：40333455

研究成果の概要（和文）：

ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解が様々な生命現象に重要な働きをしている。出芽酵母には Cdc53、Cul3、Cul8 の 3 種類の Cullin が存在するが、最近われわれは Cdc53 型 E3 (SCF 複合体と呼ばれている) の活性制御因子 Lag2 を発見し報告した。そこで本課題では、Lag2 の更なる機能解析、および Cul3 および Cul8 型 E3 の機能解析を行った。Lag2 が 16 番目のリジンを介してユビキチン様小分子 Rub1 修飾を受けること、この修飾に Dcn1 が必要であることを明らかにした。Lag2 は SCF 複合体の活性を負に制御するが、このリジン変異体も SCF 複合体の活性を抑制した。出芽酵母には 4 種類の BTB タンパク質が存在しているが、Yil001w が Cul3 と結合することを明らかにした。さらには Yil001w が基質候補として同定した Okp1 と結合し、これらの分子の分解に関与していることを明らかにした。また Cul8 結合タンパク質を複数個同定し解析を進めている。これらの結果は、Cul3 や Cul8 は複合体を形成し E3 ユビキチンリガーゼとして機能していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Protein degradation via ubiquitin-proteasome system regulates a variety of cellular processes. In budding yeast, the cullin protein family includes three members: Cdc53, Cul3, and Cul8. Recently we have reported Lag2 as a novel regulator of SCF complex. In this study, we performed the functional analysis of Lag2, Cul3 and Cul8. We identify that a single lysine, K16, on Lag2 is a target of Rub1 conjugation and Dcn1 is required for this reaction. Like wild-type Lag2, Lag2 K16R mutant also negatively modulates the SCF function, indicating that Rub1 conjugation to Lag2 is not required for the function of Lag2. In budding yeast, the BTB protein family includes four members. We identify a BTB protein, Yil001w as a Cul3 binding protein and Okp1 as a candidate of Cul3-type E3. Furthermore, we identify several proteins as Cul8 binding proteins. These observations indicate that Cul3 and Cul8 form complexes and function as E3 ubiquitin ligases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞周期進行・シグナル伝達・DNA複製・神経変性疾患・免疫応答など多岐にわたる生命現象において、ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解が重要な役割を果たしていることが明らかになり大変注目を集めてきている。ユビキチンシステムの発見者である Hershko 博士、 Ciechanover 博士と Rose 博士の3氏に2004年ノーベル化学賞が授与されたことは記憶に新しい。タンパク質へのユビキチン化反応にはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の3種類の触媒酵素群が関与しているが、この中で E3 は特異的に基質を認識し分解に導くという重要な役割を担っている。ユビキチン化される標的タンパク質は非常に多く、それを特異的に認識する E3 も非常に多数存在することが推定されている。

E3 は大きく分けて、HECT 型、U-box 型、RING-finger 型に分類される。特に RING-finger 型 E3 は数が多く、様々な生命現象に重要な役割を果たすものが含まれている。RING-finger 型 E3 には単量体型と複合体型があり、後者の中に Cullin 型 E3 という複合体を形成する一群がある。Cullin 型 E3 は基本的に RING-finger タンパク質、Cullin、アダプタータンパク質、そして基質認識サブユニットからなる四量体で構成されており、哺乳類では、図 1B に示すように、それぞれの Cullin と複合体を形成する因子が明らかにされている。一方出芽酵母には、Cdc53 (哺乳類 Cul1 に相当する)、Cul3、そして Cul8 の3種類の Cullin がある。Cdc53 は SCF 複合体を形成することが知られており、他の Cullin も同様な複合体を形成することが予想されているが、現在までにどのような構成因子からなっているのかは明らかになっていない。これら Cullin 型 E3 の最も特徴的な点は、RING-finger タンパク質、Cullin、アダプタータンパク質は常に共通の構成因子であるのに対し、基質認識サブユニットは可変因子であり、これを交換することによって非常に多くの基質に対応できるようになっていることである。本研究申請者である嘉村巧は、Rbx1 の発見や Cul2 および Cul5 型 E3 複合体の解析を初めとしてこの分野の発展に多大な貢献をしてきている。データベース検索により、非常に多くの Cullin 型 E3 が存在することが明らかになっており、さらには個々の E3 が複数の基質を認識しユビキチ

ン化することより、多彩な生命現象を制御していると考えられている。そこでこの分野の課題はこれら Cullin 型 E3 の機能を明らかにすることであり、多くの研究者がその解明に取り組んでいる最中である。

## 2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母 Cullin 型 E3 の機能解明を行い、これら E3 により制御される生命現象を解明することを目的とする。具体的には、(1)われわれが最近報告した新規 SCF 複合体活性制御因子 Lag2 の機能解析、(2)Cul3 および Cul8 型 E3 の機能解析の2つに焦点を絞り研究を行なう。

(1) 新規 SCF 複合体活性制御因子 Lag2 の機能解析：Cullin はユビキチン様小分子 Rub1/Nedd8 修飾を受けることにより E3 活性を調節していることが知られているが、われわれは Lag2 も Cullin と同じように Rub1 修飾を受けることを見出している。そこでまず Dcn1 の変異体を作製し、Lag2 への Rub1 修飾に Dcn1 が必要であるかどうかを明らかにする。次に Lag2 に存在する約 30 個のリジンそれぞれをアルギニンに置換する変異体を作製し、どのリジンが Rub1 修飾を受けるのかを明らかにする。さらに Lag2 への Rub1 修飾が、SCF 複合体の活性調節にどのような影響を及ぼすのかを、リジン変異体を用いて検討する。

(2) Cul3 および Cul8 型 E3 の機能解析：Cul3 あるいは Cul8 結合タンパク質を酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法を用いて同定し、さらにどのタンパク質がアダプタータンパク質や基質認識サブユニットとして機能するのかを生化学的手法で検討する。SCF 複合体の基質認識サブユニットである F-box タンパク質群は共通に存在する F-box ドメインを介してアダプタータンパク質 Skp1 と結合することが知られている。新たに同定した Cul3 や Cul8 型 E3 の基質認識サブユニットとアダプタータンパク質との結合を調べることにより、F-box ドメイン用配列を同定する。この同定に成功すればデータベース検索により新たな基質認識サブユニットを見つけることが可能になる。これらの基質認識サブユニットと結合するタンパク質 (基質候補タンパク質) を酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法を行い同定する。そして同定したそれぞれの酵素・基質関係の生物学的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 新規 SCF 複合体活性制御因子 Lag2 の機能解析

#### ①. Lag2 への Rub1 修飾の分子機構の検討

Cullin はユビキチン様小分子 Rub1/Nedd8 修飾を受けることにより E3 活性を調節していることが知られているが、われわれは Lag2 も Cullin と同じように Rub1 修飾を受けることを見出しており、この分子機構を明らかにする。

#### ②. Lag2 への Rub1 修飾部位の同定

ユビキチン修飾と同様に Rub1 修飾も標的タンパク質のリジン残基を介して起こることが知られている。Lag2 には 31 個のリジンが存在するのでそれぞれのリジンをアルギニンに置換した変異体を作製し、出芽酵母に発現させ、どのリジンが Rub1 修飾を受けるのかを同定する。

#### ③. Rub1 修飾を受けない Lag2 変異体の SCF 複合体への影響の検討

われわれは、Lag2 が Cdc53 への Rub1 修飾を阻害することおよび E2 と SCF 複合体の結合を阻害することによって SCF 複合体の機能を制御することを明らかにしている。そこで 2. で同定した Lag2 変異体を用いることにより、Lag2 に対する Rub1 修飾の SCF 複合体への影響を検討する。具体的には試験管内および細胞内における Cdc53 に対する Rub1 修飾の度合いを野生型 Lag2 と比較する。さらには、試験管内および細胞内におけるユビキチン化活性に対する影響を、基質として Sic1 を用いて検討する。さらには試験管内で E2 と SCF 複合体の結合への影響も調べる。

#### ④. Lag2 の新たな結合タンパク質の同定および解析

Lag2 は寿命関連因子として報告されているがその分子機構は全くわかっていない。今回われわれが発見した SCF 複合体の機能調節を介して寿命に関与している可能性に加えて、まだ未同定の分子の関与も考えられる。そこで酵母 two-hybrid 法あるいは免疫沈降法および質量分析の組み合わせにより新たな Lag2 結合タンパク質を同定する。それらの中で生理的条件下で Lag2 との結合が確認できたタンパク質に焦点を絞って、細胞生物学的意義を明らかにする。

### (2) Cul3 および Cul8 型 E3 の機能解析

#### ①. 酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法による出芽酵母 Cul3 あるいは Cul8 との結合タンパク質 (アダプタータンパク質) の同定

データベースを利用して出芽酵母 Cul3 および Cul8 遺伝子をクローニングする。酵母

two-hybrid 法に用いる bait 用ベクターおよび免疫沈降法用ベクターを作製する。これらのベクターを用いて酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法および質量分析の組み合わせにより結合タンパク質を同定する。前述しているように Cullin 型 E3 は、RING-finger タンパク質、Cullin、アダプタータンパク質、そして基質認識サブユニットからなる四量体で構成されているが、中でもアダプタータンパク質は Cullin と基質認識サブユニットをブリッジする役割を担っている。まず同定したタンパク質が出芽酵母細胞内で Cullin と生理的条件下で結合するかどうかを検討する。さらに大腸菌あるいは昆虫細胞の発現系を用いてリコンビナントタンパク質を作製し、試験管内での Cullin との直接結合を確認する。

#### ②. Cul3 あるいは Cul8 型 E3 の基質認識サブユニットの同定

1. で同定したアダプタータンパク質を bait として、酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法および質量分析の組み合わせにより結合タンパク質を同定する。1. と同様な方法を用いて、アダプタータンパク質との結合を再確認する。一般的に Cullin 型 E3 の基質認識サブユニットは複数個存在しており、F-box ドメインや SOCS-box ドメインのようなそれぞれの基質認識サブユニットに共通に存在する領域を介してアダプタータンパク質と結合する。ここで同定した複数の基質認識サブユニットの欠失変異体を作製しアダプタータンパク質との結合を調べることにより、Cul3 あるいは Cul8 型 E3 の基質認識サブユニットに共通に存在すると予測される F-box ドメイン様配列を同定する。この同定に成功すれば、データベースサーチにより新たな基質認識サブユニットを見出すことが可能になる。

#### ③. Cul3 あるいは Cul8 型 E3 の基質候補タンパク質の同定

2. で同定した基質認識サブユニットを bait として、酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法および質量分析の組み合わせにより結合タンパク質 (基質候補タンパク質) を同定する。

#### ④. 新規基質候補タンパク質と基質認識サブユニット間の結合の検討

新規基質候補タンパク質と基質認識サブユニットを出芽酵母に過剰発現させ、プロテアソーム阻害剤存在下で、免疫沈降およびウェスタンブロットにより結合を確認する。過剰発現系で結合を確認できたら、次に内在性タンパク質レベルで新規基質候補タンパク質

と基質認識サブユニットが結合するかどうかを検討する。ここで再度結合を確認できた基質候補タンパク質に焦点を絞って以後の研究を進めていく。

#### ⑤. 新規基質に対する試験管内ユビキチン化反応の検討

野生型あるいは変型新規基質を大腸菌で発現させリコンビナントタンパク質を精製する。バキュロウイルス発現系を用いて Cul3 あるいは Cul8 型 E3 複合体を精製し、ユビキチン化反応に必要な酵素 E1 と E2 そしてユビキチンさらに ATP を加え新規基質と反応させることにより、試験管内で新規基質へのユビキチン化反応を起こすことができるかどうかを検討する。

#### ⑥. 新規基質に対する細胞内分解の検討

野生型あるいは変異型の新規基質と基質認識サブユニット群を出芽酵母に発現させ、新規基質に対する抗体を用いて免疫沈降する。SDS-PAGE で展開した後、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行う。また、パルスチェイス法により新規基質の半減期を測定する。

#### ⑦. 新規基質の分解制御による細胞生物学影響の検討

新規基質のアミノ酸配列よりその酵母内での機能を予測する。基質認識サブユニットの過剰発現あるいは遺伝子欠失によって新規基質の発現を制御することにより、どのような細胞生物学的変化が現れるかを解析する。

### 4. 研究成果

本研究では出芽酵母 Lag2 および Cul3、Cul8 型 E3 の機能解析を行った。

#### (1) Lag2 の機能解析

われわれは出芽酵母 SCF 複合体を負に制御する因子として Lag2 を発見した。その過程で Lag2 がユビキチン様小分子 Rub1 修飾を受けることを見出した。Rub1 は SCF 複合体の構成因子である Cdc53 の C 末側のリジン残基とイソペプチド結合し、SCF 複合体の活性を制御している。Cdc53 への Rbu1 修飾には Dcn1 が必要であることが報告されている。そこで Dcn1 欠失株を作製し、Lag2 への Rub1 修飾を調べたところ、この変異株では Lag2 への Rub1 修飾も起こらないことを明らかにした。このことより LAG2 への Rub1 修飾にも Dcn1 が必要であることがあきらかになった。Lag2 には 31 個のリジンが存在しているが、個々のリジンをアルギニンに置換した変異酵母株を作製し、どのリジンが Rub1 修飾を受けているのかを検討した。その結果として、16 番目の

リジンが Rub1 修飾の標的であることを明らかにした。次にこの変異の SCF 複合体の活性に及ぼす影響を検討したが、有意な影響を見出すことはできなかった。Lag2 は SCF 複合体と結合するが、その際に 2 次的に Rub1 修飾を受けていることが考えられるが、まだ検出できていない影響がある可能性も残っているので、更なる解析を続けている。Lag2 は哺乳類 Cand1 と似通った性質を有している。構造解析の結果、Cand1 は Cul1 (Cdc53 の哺乳類ホモログ) のほぼ全長と結合することにより、Cul1 の N 末側での Skp1-F-box タンパク質との結合、さらには C 末側での Nedd8 (Rub1 の哺乳類ホモログ) 修飾の両方を阻害する。われわれは Lag2 は Cdc53 の Rub1 修飾は阻害するが Skp1-F-box タンパク質との結合は阻害しないと報告しており、その理由としては Cand1 が分子量 120kDa であるのに対し Lag2 が 80kDa と小さいため、Cullin の全長と結合できないためと推測している。しかしながら同時期に他のグループは Skp1-F-box タンパク質との結合も阻害すると報告している。われわれは内在性の Lag2 と相互作用しているタンパク質を免疫沈降法及び質量分析法で調べ、F-box タンパク質 Cdc4、Met30 さらには Grr1 を同定した。このことはわれわれの正当性を裏付けるものである。また同時に多くの結合タンパク質を同定しており、それらの細胞生物学的意義を現在解析中である。

#### (2) Cul3、Cul8 型 E3 の機能解析

出芽酵母には 3 種類の Cullin、Cdc53、Cul3 そして Cul8 が存在している。このなかで Cdc53 は SCF 複合体を形成し E3 として機能することがよく知られているが、Cul3 や Cul8 の機能はあまり明らかにされていない。そこで本研究では Cul3 および Cul8 の機能解明を試みた。哺乳類 Cul3 (出芽酵母 Cul3 のホモログ) は BTB タンパク質と結合することが知られているが、免疫沈降及び質量分析により BTP タンパク質 YIL001w を Cul3 の結合タンパク質として同定した。出芽酵母には 4 種類の BTP タンパク質、YIL001w、Ydr132c、Ylr108c そして Whi2 が存在しているので、これらのタンパク質と Cul3 の結合を調べたところ、Yil001w のみが結合することを明らかにした。次に YIL001w も用いて、酵母 Two-hybrid スクリーニングを行い、Okp1 を結合タンパク質として同定した。Okp1 はプロテアソーム阻害剤により発現量が増加した。さらに、Cul3 や YIL001w 欠失株において Okp1 の発現量が亢進した。これらのことより Okp1 は Cul3 型 E3 の基質であることが示唆され、現在詳細な解析を進めているところである。

Cul8 と相互作用するタンパク質の解析を行い、Mms1、Mms22、Esc4、Orc5、Ctf4 そして Esc2 を同定した。また Cul8、Mms1 そして Mms22 がテロメアのサイレンシング制御に関与していることを明らかにした。

#### 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 7 件)

1. Nakatsukasa, K., Brodsky, J.L., Kamura, T.: A stalled retrotranslocation complex reveals physical linkage between substrate recognition and proteasomal degradation during ER associated degradation Mol Biol Cell in press doi: 10.1091/mbc.E12-12-0907 (2013) 査読有
2. Okumura, F., Okumura, A.J., Uematsu, K., Hatakeyama, S., Zhang, D.E., Kamura, T.: Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation J Biol Chem., 288(4):2839-47. doi: 10.1074/jbc.M112.401851 (2013) 査読有
3. 奥村 文彦、奥村 晶子、中務 邦雄、嘉村 巧: Elongin BC 型 E3 ユビキチンリガーゼと細胞機能制御 生化学 85(2):76-88 (2013) 査読有
4. Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K., Kamura, T.: The role of Elongin BC-containing ubiquitin ligases. Frontiers in Oncology, 2:10 doi: 10.3389/fonc.2012.00010 (2012) 査読有
5. Liu, Y., Nakatsukasa, K., Kotera, M., Kanada, A., Nishimura, T., Kishi, T., Mimura, S., Kamura, T.: Non-SCF type F-box protein Roy1/Ymr258c interacts with a Rab5-like GTPase Ypt52 and inhibits Ypt52 function. Mol. Biol. Cell, 22: 1575-1584 doi: 10.1091/mbc.E10-08-0716 (2011) 査読有
6. 中務邦雄、嘉村 巧: Cullin 型 E3 リガーゼの機能と制御機構. 実験医学 (増刊)「細胞内のリノベーション機構 タンパク質分解系による生体制御」29(12): 1933-1937 (2011) 査読無
7. 劉 媛、嘉村 巧: ユビキチンリガーゼの制御機構 細胞工学 29(12):1195-1199 (2010) 査読無

[学会発表] (計 21 件)

1. Fumihiko Okumura, Takumi Kamura: Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by

interferon stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates cap-dependent translation.

1st International Symposium on "Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling", February 1~2, 2013, University of Tokyo (Tokyo)

2. 嘉村巧: ユビキチンリガーゼによる選択的基質識別メカニズム. 「ユビキチンネオバイオロジー: 拡大するタンパク質制御システム」kick-off シンポジウム, 2012 年 9 月 26 日、京都大学 (京都市、京都府)

3. 中務邦雄、ジェフ・ブロードスキー、嘉村巧: Hrd1 ユビキチンリガーゼ複合体の動的な会合制御は小胞体の恒常性維持に必須である. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場 (福岡市、福岡県)

4. 奥村文彦、奥村晶子、畠山鎮次、ザン・ドンガー、嘉村巧: double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) は interferon stimulated gene 15 (ISG15) 修飾により活性化され、キャップ構造依存性のタンパク質翻訳を抑制する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場 (福岡市、福岡県)

5. 金田晃、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧: 酸化ストレス下における Rab5 様 GTPase Ypt53 の役割. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場 (福岡市、福岡県)

6. 植松桂司、奥村文彦、中務邦雄、嘉村巧: Cul2 型ユビキチンリガーゼ ZYG11B の機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場 (福岡市、福岡県)

7. 西村崇、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧: 複合体型 SCFY1r224w E3 リガーゼの新規基質 p40 の同定. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場 (福岡市、福岡県)

8. 松崎真理子、嘉村巧: SCF Met30 E3 ユビキチンリガーゼ新規基質 p35 の同定. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日、福岡国際会議場 (福岡市、福岡県)

9. Kunio Nakatsukasa and Takumi Kamura: Snapshots of the ubiquitinated substrates and the membrane-associated E3 ligase complex during the ER-associated degradation. "Quality Control 2011: Folding and Degradation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum" September 11-16, 2011, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland

10. 奥村文彦、奥村晶子、松本雅記、中山敬一、嘉村巧、畠山鎮次: TRIM8 regulates

Nanog via Hsp90  $\beta$ -mediated nuclear translocation of STAT3 in embryonic stem cells. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日～16 日、パシフィコ横浜 (横浜市、神奈川県)

11. Yuan Liu, Satoru Mimura, Tsutomu Kishi, Takumi Kamura: A longevity protein, Lag2, interacts with SCF complex and regulates SCF function. 2010 Yeast Genetics & Molecular Biology Meeting, July 27 - August 1, 2010, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

12. 嘉村 巧: ユビキチンリガーゼの制御機構 ユビキチンシンポジウム 2010 年 8 月 21 日、東京ガーデンパレス (東京都)

13. Takumi Kamura and Yuan Liu: A longevity protein, Lag2, interacts with SCF complex and regulates SCF function. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸ポートアイランド (神戸市、兵庫県)

[その他]

ホームページ

<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~2kamura/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

嘉村 巧 (Takumi Kamura)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40333455

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし