

## 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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657034

研究課題名（和文）

In vivo 部位特異的光架橋法による E3 リガーゼの基質認識メカニズムの解析

研究課題名（英文）

In vivo site-specific cross-linking analysis of substrate recognition mechanisms of membrane-associated E3 ligase enzymes

研究代表者

中務 邦雄 (NAKATSUKASA KUNIO)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：90547522

研究成果の概要（和文）：

ユビキチンリガーゼ（E3 リガーゼ）による基質の特異的な認識メカニズムを高次構造の観点から解明することは極めて重要である。しかし、X線結晶構造解析や NMR 解析が困難である場合や大腸菌での発現も困難な E3 リガーゼについて、基質の認識メカニズムを解析するためには、技術的なブレイクスルーが必要である。我々は、小胞体関連分解（ERAD）に関与する膜貫通型 E3 リガーゼ Hrd1 および Doa10 について、機能-構造情報を得るために、in vivo 部位特異的光架橋法という新しい手法の導入を試みた。最初に、デグロンと呼ばれる酵母の Deg1 配列を適当なレポーター遺伝子に融合して、酵母細胞のサイトゾルで発現させ、Doa10 との相互作用の追跡を試みた。過去の研究によると、Deg1 配列中の両親媒性ヘリックスが認識に重要という知見があり、その部位へアンバーコドンの導入を始めた。しかしながら本年度の途中で、従来考えられていた Deg1 認識のメカニズムとは異なる新しい概念（N末端のアセチル化が Doa10 による認識に関与する）が報告された。現在は Deg1 の解析を継続しているが、同時に Hrd1-Hrd3 相互作用の解析を開始した。我々は遺伝学的スクリーニングによって、Hrd1 の 2 番目の膜貫通ドメインが Hrd3 と相互作用している可能性が高いことを見出した。そこで、Hrd1 の 2 番目の膜貫通領域に光架橋性アミノ酸を導入して、Hrd3 との相互作用を解析している。この相互作用が ERAD の反応を停止させた時にどのように変化するか調べる予定である。

研究成果の概要（英文）：

It is important to obtain detailed structural insight into substrate recognition mechanisms by E3 ubiquitin ligases. However, X-ray crystallography and NMR analysis are not suitable for proteins that are prone to aggregate in vitro and recombinant proteins that are not expressed well in bacteria or other organisms. One such E3-ligase enzyme is Doa10 in the yeast ER. Doa10 has 14 transmembrane regions and are thought to recognize both misfolded proteins and N-degron containing proteins. To begin to analyze the mechanism by which Doa10 recognizes these proteins, we tried to introduce the in vivo site-specific crosslinking method. Previous studies have suggested that Doa10 specifically recognizes Deg1, an N-terminal sequence of Matalpha2. In fact, model proteins that are fused with Deg1 at their N-terminus are degraded by the proteasome in Doa10 dependent manner. We first introduced amber codons in Deg1 and tried to introduce photoreactive amino acids. However, in the course of this study, other group reported an essential role of N-acetylation of Deg1 in recognition by Doa10. Currently we are trying to see the effects of depletion or overexpression of N-acetylation enzymes on the recognition of Deg1 by Doa10 using in vivo site-specific crosslinking method. We also started to analyze other ER membrane E3 ligase Hrd1. We have shown that the second transmembrane region of Hrd1 is critical

for binding to Hrd3, a substrate recognition subunit of Hrd1. We are currently analyzing how the interaction between Hrd1 and Hrd3 changes during substrate recognition and ubiquitination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：膜タンパク質 小胞体 分解 光架橋 構造

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は細胞周期、シグナル伝達、DNA 修復、品質管理など多くの細胞機能を制御している。ユビキチン化は、E1 (活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) の連続的な酵素反応によっておこる。これらの酵素群は反応系の下流にいくにつれてその多様性を増大する。基質の特異的な認識を担う E3 リガーゼは、これまでに 600 種類以上の遺伝子が同定されている。個々の E3 リガーゼによる基質の特異的な認識メカニズムを高次構造の観点から解明することは、ユビキチン修飾系の多様な機能を理解する上で極めて重要である。

小胞体膜を 14 回貫通する Doa10 は、約 66 アミノ酸からなるデグロン (特異的な分解シグナル) をもった基質 (酵母 Matalpha2) の分解に関わり、転写を制御する E3 リガーゼとして単離された。一方申請者は、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構を研究する過程で、Doa10 は分子シャペロンに依存してミスフォールディングした基質も認識することを明らかにした (*Nakatsukasa et al., Cell 2008*)。このように Doa10 は「デグロン」と「ミスフォールディング」の両方を認識するユニークな E3 リガーゼであるが、認識のメカニズムは全く明らかにされていない。その主たる理由は、Doa10 は大腸菌での発現が困難で、試験管内における生化学的な解析に不向きだからである。このような試験管内で扱いにくい酵素について、アミノ酸レベルで基質の認識メカニズムを解析するには、技術的なブレークスルーが必要であった。

2. 研究の目的

我々は、E3 リガーゼによる基質の特異的な認識メカニズムの解析に、in vivo 部位特異的光架橋法という新しい手法を初めて導入することを試みた。本研究では小胞体膜 E3 リガーゼ Doa10 に着目するが、これに成功すれば、X 線結晶構造解析や NMR 解析が困難な他の E3 リガーゼについても、基質の認識メカニズムを高次構造の観点から解析することが可能になると期待できる。

架橋法は X 線結晶構造解析や NMR 解析とは異なった切り口で、タンパク質相互作用を解析する方法の一つである。特にサブプレッサー tRNA 法を用いた部位特異的架橋法は、架橋基を目的タンパク質内の任意の部位に導入した後に、紫外線照射により架橋を行う方法で、タンパク質相互作用をアミノ酸残基レベルで解析できる極めて強力な手法である。

近年、スクリプス研究所の Schultz らのグループは、酵母細胞内で目的タンパク質に部位特異的に光架橋側鎖をもつ非天然アミノ酸 (BPA (p-benzoyl-L-phenylalanine)) を導入するシステム (in vivo 部位特異的非天然アミノ酸導入法) を開発した。この方法にはいくつかの利点がある。たとえば、細胞内で機能状態にあるタンパク質の「直接的」な相互作用を検出することができることである。また、系統的に非天然アミノ酸を導入することによって、相互作用する領域の特定が可能である。さらに、反応をスケールアップすることによって、未知因子の同定にもつながる可能性もある。本研究では異なった性質をもつ分解基質に BPA を導入し、その認識メカニズムを解析する。本研究が成功すれば、

逆に E3 リガーゼ側に BPA を導入して E3 コンポーネント同士の相互作用を詳細に調べることが可能になり、X 線結晶構造解析や NMR 解析が困難な他の E3 リガーゼ複合体について、詳細な相互作用情報が得られると期待できる。

本研究で対象とする E3 リガーゼ Doa10 は、小胞体関連分解 (ERAD) の中核をなす因子であり、「特異的なデグロン配列」をもった基質、および「ミスフォールド」した基質を認識するユニークな酵素である。特にミスフォールディングした基質と Doa10 の相互作用には、分子シャペロンが必要であることが分かっている (*Nakatsukasa et al., 2008 Cell*)。しかし、具体的な分子シャペロンの作用機序は分かっていない。たとえば、「基質の構造を保つことにより、Doa10 による認識を助ける受動的な役割 (基質の凝集の阻止、または相互作用面の提示の補助)」をもつのか、「基質と Doa10 の両方と同時に相互作用して、物理的に橋渡しする積極的な役割」をもつのか不明である。今後もし、in vivo 部位特異的架橋反応によって Doa10-シャペロンの直接的な相互作用が検出できれば、後者のモデル (シャペロンによるブリッジ仮説) の証明に近づく可能性もある。

### 3. 研究の方法

本研究では、最近開発された in vivo 部位特異的光架橋法という新手法を用いて、Doa10 が「デグロン」と「ミスフォールディング」をそれぞれ、同じ領域で認識するのか、異なる領域で認識するのか明らかにする。また、基質を Doa10 にターゲティングする因子の検索もおこなうことを目標とした。具体的には、デグロン融合モデル基質として Deg1-DHFR-His-FLAG、および構造異常モデル基質として Ura3 変異体を使用する。それぞれの基質において、任意のアミノ酸残基に対応するコドンアンバーコドン置換し、酵母細胞内で BPA を導入する。紫外線照射によって架橋反応を行う。Doa10 との相互作用を検出できれば、Doa10 に TEV 切断サイトを導入し、TEV プロテアーゼで切断して、Doa10 の中で基質と相互作用している領域を同定する。また、サイトゾルで基質が相互作用している因子も、反応系のスケールアップによって同定することを目標とした。

### 4. 研究成果

デグロンと呼ばれる酵母の Deg1 配列を適

当なレポーター遺伝子に融合して、酵母細胞のサイトゾルで発現させ、Doa10 との相互作用の追跡を試みた。過去の研究によると、Deg1 配列中の両親媒性ヘリックスが認識に重要という知見があり、その部位へアンバーコドンの導入を始めた。しかしながら最終年度の途中で、従来考えられていた Deg1 認識のメカニズムとは異なる新しい概念 (N 末端のアセチル化が Doa10 による認識に関与する) が報告された。このアセチル化酵素の過剰発現株や欠失株などを使って現在、非天然アミノ酸が組み込まれた Deg1 の解析を進める準備を行なっている。またそれと同時に、Hrd1-Hrd3 相互作用の解析を開始した。我々は遺伝学的スクリーニングによって、Hrd1 の 2 番目の膜貫通ドメインが Hrd3 と相互作用している可能性が高いことを見出した。そこで、Hrd1 の 2 番目の膜貫通領域に光架橋性アミノ酸を導入して、Hrd3 との相互作用を解析している。この相互作用が ERAD の反応を停止させた時にどのように変化するか調べる予定である。

### 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 1 件)

① Liu Y\*, Nakatsukasa K\*, Kotera M, Kanada A, Nishimura T, Kishi T, Mimura S, Kamura T (\*equal contribution)

Non-SCF type F-box protein Roy1/Ymr258c interacts with a Rab5-like GTPase Ypt52 and inhibits Ypt52 function.

Molecular Biology of the Cell 22 2011 1575-1584 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① Nakatsukasa K, and Kamura T  
ERAD における小胞体膜ユビキチンリガーゼ複合体の機能解析  
第 11 回 蛋白質科学会年会 (招待講演)  
2011 年 6 月 7 日大阪

② Nakatsukasa K  
Molecular dissection of the ER-associated degradation  
Global COE Mini-symposium: Toward Systems

Glycobiology-Biosynthesis and catabolism of  
glycoproteins (招待講演)  
2011年11月7日名古屋

[図書] (計1件)

中務邦雄 嘉村巧  
実験医学 2011年増刊 (103-107ページ) 羊  
土社 2011

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中務 邦雄 (NAKATSUKASA KUNIO)

研究者番号 : 90547522

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :