

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23657088

研究課題名（和文）

細胞内部位特異的光架橋を用いた出芽酵母SCF複合体に対する基質同定法の開発

研究課題名（英文） Development of the substrate identification method against budding yeast SCF complex using site-specific photocross-linking in vivo

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は様々な生命現象に重要な働きをしている。基質特異性を決めるユビキチンリガーゼ（E3）の研究が盛んに行われている。しかしながら技術的困難さにより現時点までに E3 と基質の関係が明らかになっているのはごく僅かである。そこで本研究では、E3 に対する基質を、細胞内部位特異的光架橋法および免疫沈降法の組み合わせにより同定し、さらにはこれら酵素・基質関係により制御される分子機構を明らかにすることを目的としている。Hrd3 は Hrd1 と複合体を形成し E3 として機能する。Hrd3 の Hrd1 結合領域と予想される部位にアンバーコドンを導入し、紫外線照射による架橋反応の検討を行った結果、アンバーコドンの部位依存的に特異的タンパク質が結合してくる条件を見出した。これらの過程で、この方法は、相互作用することが明らかになっている分子間での最少結合部位を同定することに適しているが、新たな結合因子の同定には適していないことが判明した。この方法の代わりに酵母 two-hybrid 法を用いて SCF^{Met30} の新たな基質 p50 を同定した。p50 は SCF^{Met30} により細胞周期依存的にその安定性を制御されていることを明らかにした。現在 Met30 による p50 分解の意義を細胞生物学的に解析している最中である。

研究成果の概要（英文）：

Ubiquitylation and subsequent proteasomal degradation of regulatory proteins control a variety of cellular processes. The E3s are responsible for recognizing and recruiting target proteins for polyubiquitylation. Relationship between E3s and substrates are largely uncharacterized because of the technical difficulty. In this study, we perform site-specific photocross-linking in vivo to identify specific substrates of SCF complex. Hrd3 forms complex with Hrd1 and functions as a E3. We identify the specific binding region of Hrd3 with Hrd1 using site-specific photocross-linking in vivo. However, in these processes, we recognize that this method is not suitable for the detection of novel binding protein, because of the lacking of the binding region information. Then we perform yeast two-hybrid screening and identify p50 as a candidate of SCF^{met30} substrate. Stability of p50 is regulated by SCF^{met30} in the cell cycle dependent manner. We are currently investigating the functional meaning of this degradation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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。タンパク質へのユビキチン化反応には E1、E2 そして 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。われわれは Cullin 型 E3 を中心に研究を進めている。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いる。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 が存在し、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が明らかになっていることより、これら E3 に対する基質でわかっているのはごくわずかであると考えられている。そこでこの分野の当面の課題はこれら酵素-基質関係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。

架橋法は、タンパク質相互作用を解析する方法の一つであり、相互作用が弱い場合に有効であると考えられる。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。最近、スクリプス研究所のグループは、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 (細胞内部位特異的非天然アミノ酸導入法) を開発した。この方法には大きな利点がある。従来の単なる免疫沈降法を用いた実験系の場合、その操作の過程で相互作用が

弱いタンパク質は簡単に解離してしまい検出することができなかった。しかしながら、in vivo 部位特異的光架橋法を用いれば、非可逆的に相互作用するタンパク質と結合するため、SDS などの強い変性剤を用いて細胞抽出液を作製した後に免疫沈降法を用いても、相互作用するタンパク質の検出が可能になる。この条件で行うことにより非特異的に結合しているタンパク質を効率的に排除できる。また、系統的に非天然アミノ酸を導入することによって、相互作用する領域を特定することも可能である。

2. 研究の目的

本研究では、Cullin 型 E3 中でも出芽酵母 SCF 複合体に対する基質を同定し、さらにはこれら酵素・基質関係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。以前より酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法を用いた E3 に対する基質の検索は多くの研究者によって行われてきているが、あまりよい結果は得られていない。その原因として E3 と基質の相互作用が弱いためであると推測される。そこで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、出芽酵母 SCF 型 E3 と相互作用する因子 (基質) の検索を行う。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。本研究で提案している「細胞内部位特異的光架橋法と免疫沈降法の組み合わせを用いた Cullin 型 E3 の基質同定法」がうまくいけば、多くの E3 と基質の関係を明らかにすることができる。これらのデータが集積すれば、細胞周期制御、シグナル伝達、あるいは DNA 複製などの複雑な生命現象を、ユビキチンシステムによるタンパク質分解という新しい観点から系統立てて解明できる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、Cullin 型 E3、中でも出芽酵母 SCF 複合体に対する基質候補タンパク質を細胞内部位特異的光架橋法と免疫沈降法の組み合わせを用いて同定する。同定した基質候補タンパク質が本当に基質であるかどうかを、E3 との結合能、E3 の有無による安定性の違い、さらには試験管内での E3 によるユビキチン修飾反応などを調べることによ

り検討する。同定した基質が既報のタンパク質であれば、その報告を基に研究を進める。また未知のタンパク質であれば、ドメイン検索などでその機能を探る。最終的には、新たに同定した酵素・基質関係の生物学的意義を明らかにする。

(1) 紫外線照射による架橋反応の条件検討

紫外線照射による架橋反応の条件検討を行う。対数増殖期の細胞を回収し、シャーレ上で UV を照射する（強力長波長 UV ランプ B-100AP 型）。照射後、遠心によって細胞を回収し、TCA 法を用いて細胞抽出液を調製する。これを SDS-PAGE によって展開し、基質に付加したエピトプタグ（HA）に対する抗体でウェスタンブロッティングを行い、架橋産物を検出する。この条件検討に以下に示すタンパク質を用いる。小胞体膜タンパク質である Hrd3 と Hrd1 は複合体を形成し E3 として機能することが報告されている。Hrd3 部分欠失変異体を作製し、Hrd1 との結合に必要な領域を同定する。次にこの同定したアミノ酸領域をアンバー終止コドンに置換し、BPA が導入されるようにする。これを用いて紫外線照射による架橋反応により Hrd1 との安定な結合がみられる条件を決める。

(2) 改変型酵母 two-hybrid 法を用いた SCF 複合体の基質の同定

(1)の方法がうまくいかない場合は、改変型酵母 two-hybrid 法を用いる。従来の酵母 two-hybrid 法では E3 の基質同定が困難であったが、その理由として内在性の E3 が基質を分解してしまうことが考えられる。そこで Cdc53 変異による温度感受性酵母株を用いて two-hybrid スクリーニングを行う。この酵母では SCF 複合体の活性が低下しており、より基質が同定できる可能性があると考えられる。Bait として F-box タンパク質 Met30 を用いる。

(3) 新規基質候補のクローニングおよび発現ベクターの作製

データベースを利用して新規基質候補タンパク質を検索しこれらの遺伝子を PCR 法でクローニングする。さらにこれらタンパク質に対する大腸菌、哺乳類および出芽酵母用発現ベクターを作製する。

(4) 新規基質候補および Met30 に対する抗体の作製

市販で抗体が手に入らない場合は、大腸菌の発現系を用いて新規基質および Met30 のリコンビナントタンパク質を作製する。ウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製する。

(5) 新規基質候補と Met30 の結合の検討

新規基質と Met30 を出芽酵母に過剰発現させ、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と F-box タンパク質が結合するかどうかを検討する。

(6) Met30 の新規基質候補タンパク質の安定性に及ぼす影響の検討

野生型酵母株、Met30 を欠失している酵母株、あるいは野生型 F-box タンパク質を過剰発現している酵母株において、内在性新規基質候補タンパク質の半減期への影響を検討する。本当の基質であるのならば、野生型の F-box タンパク質の過剰発現で、その安定性は低下し、Met30 欠失株では、その安定性は亢進するはずである。これらの実験により同定したタンパク質が本当の基質であるかどうかの選別ができる。

(7) 新規基質に対する細胞内分解の検討

Met30 と新規基質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。ユビキチン化された新規基質は梯子状に（付加するユビキチンの数によって分子量が段階的に増加するため）認められる。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。

(8) 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。Met30 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变化が現れるかを解析する。

4. 研究成果

本研究では、まず紫外線照射による架橋反応の条件検討を行った。小胞体膜に存在する Hrd3 は Hrd1 と複

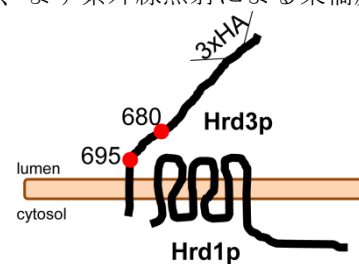


図1 Hrd1-Hrd3 E3の模式図

合体を形成し E3 として機能する (図 1)。Hrd3 の部分欠失変異体を作製し Hrd1 との結合に必要な領域を検討した。その結果、Hrd3 の 680-695 アミノ酸領域が結合に必要であることを明らかにした。次に Hrd3 の 680-695 アミノ酸領域に光架橋性の非天然アミノ酸を *in vivo* で導入した。UV 照射後、Hrd3 を HA 抗体で免疫沈降した。図 2 は HA 抗体によるウエスタンブロットを示している。UV に依存

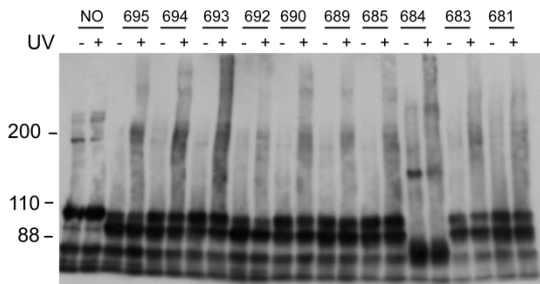


図2 *in vivo*部位特異的光架橋反応

して、Hrd3 より高分子量側に複数の架橋産物が観察された。これらは Hrd3 と相互作用している Hrd1 および新規因子と予想される。現在架橋相手の同定を試みている。またこれらの過程で、紫外線照射による架橋反応を用いた方法は、すでに相互作用することが明らかになっている分子間ではアンバー終止コドンを導入するアミノ酸領域を絞り込むことができ、更なる結合領域の決定には有効な手段であるが、新規結合因子の同定には、アンバー終止コドンの導入部位の指標がないため、適当ではないことが判明した。

次に改変型酵母 two-hybrid 法を用いて SCF^{Met30} の基質の同定を行った。その結果、機能未知の分子量 50kDa のタンパク質 p50 を同定した。内在性のタンパク質レベルで Met30 と p50 は結合した。p50 の発現量はプロテアソーム阻害剤 MG132 により増加した。シクロヘキシミドチェイス実験により、Met30 欠失株では p50 の安定性が著明に亢進した。また同様に SCF 複合体の構成因子 Cdc53、Skp1 そして E2 Cdc34 の温度感受性株で非許容温度下で、p50 の安定性が亢進した。Met30 は細胞周期の中で G1 および G2/M 期の進行に必要であるが、p50 は G1 および G2/M 期に分解され S 期では安定であった。これらの結果は p50 が SCF^{Met30} により細胞周期依存的に分解を受けていることを示唆するものである。現在、SCF^{Met30} による p50 の分解の意義を細胞生物学的に解析している最中

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 6 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

[学会発表] (計 12 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：Cu12 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 β -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）

〔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