

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ユビキチン修飾による蛋白質機能変換機構の解析

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

岩井 一宏 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)

主たる共同研究者

石森 浩一郎 (北海道大学大学院理学研究院 教授) (平成 14 年 4 月～)

吉田 雪子 ((財)東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 研究員) (平成 15 年 4 月～)

岩井 裕子 (京都大学大学院生命科学研究科 助教授) (平成 17 年 4 月～)

3. 研究内容及び成果:

ユビキチン修飾系はE1(活性化酵素)/E2(結合酵素)/E3(ユビキチンリガーゼ)の3種の酵素群の働きにより、ATP依存的に標的たんぱく質にユビキチンを結合させる。多くの場合、連続的なユビキチン付加によって生じるポリユビキチン鎖がマークとなりタンパク質の機能・運命を制御する。ユビキチン修飾系は発見の契機となったたんぱく質分解以外にも、幾多の様式でたんぱく質機能を制御し、数多くの生命現象を調節する重要なたんぱく質翻訳後修飾系であると認識されている。そのようなユビキチン修飾系の多彩な機能は、生体内に数100種類存在すると考えられているE3:ユビキチンリガーゼが、時を得て選択的に標的たんぱく質を識別出来ることによる。E3による選択的識別には標的たんぱく質の翻訳後修飾が重要な役割を果たしていることが知られている。本CREST研究では、1. たんぱく質の酸化(岩井・石森・岩井裕子グループ)、2. N型糖鎖付加(吉田グループ)がトリガーとなるユビキチン修飾系に焦点を絞って研究を進め、以下の成果を得た。

### 1. たんぱく質の酸化がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

[岩井グループ]

哺乳類の鉄代謝の中核を担うたんぱく質である IRP2(iron regulatory protein 2)が、鉄存在下にてユビキチン依存的に分解されることにより活性が制御されること、IRP2 に特異的な 73 アミノ酸からなる IDD(iron-dependent degradation)ドメインに生じると考えられる鉄存在下での酸化修飾が選択的なユビキチン識別のシグナルとして機能することを示していた。本研究では IRP2 へのヘムの結合が、選択的なユビキチン修飾の第1ステップとなることを示すとともに、IRP2 に結合したヘムと、分子状酸素との反応によって酸化修飾を受けた IDDドメインを選択的に識別するユビキチンリガーゼとして HOIL-1 を同定した。

[岩井・石森グループ]

IRP2 は IDDドメインに存在する HRM(heme regulatory motif:ヘムによって制御を受けるたんぱく質のヘム結合部位)でヘムと結合すること、その HRM の Cys201 で  $\text{Fe}^{3+}$ -ヘムと結合し、局所で鉄イオンを還元して His204 で  $\text{Fe}^{2+}$ -ヘムと結合し、その結果としてヘムによるたんぱく質の酸化を引き起こす HRM のサブタイプであることを示した。これらの研究から、ヘムを介して鉄濃度の変化を感知するシステムの存在を明確にした。IRP2 が活性中心であるヘムを着脱し、自身のアミノ酸側鎖を基質とするオキシゲナーゼの可能性を考慮しつつ、ヘムと酸素により IRP2 が酸化されるメカニズムに関して検索を進めている。

[岩井グループ]

HOIL-1 リガーゼの機能解析を進め、HOIL-1 のアイソフォームである HOIL-1L と HOIP からなる LUBAC 複合体が、これまでのユビキチン研究の概念を超越した N 末端のメチオニンの・-アミノ基を介した直鎖状ポリユビキ

チン鎖を形成することを世界で初めて示すとともに、リガーゼ複合体によって直鎖状ユビキチン化される基質たんぱく質を同定した。また、HOIL-1、HOIP のノックアウトマウスの解析を進めている。

[岩井グループ]

IRP2 の過剰発現は反応性に富んだ鉄の蓄積を生じることに着目して脳特異的に発現する IRP2 トランスジェニックマウスを作製し、酸化ストレスの亢進により神経変性疾患が発症すること、薬剤性パーキンソン病モデルに高感受性であることを示し、鉄代謝異常と疾患との関連も明らかにした。

[岩井・岩井裕子グループ]

IRP2 の鉄依存的な酸化による分解機構の解析は、図らずも細胞の鉄感知機構においてヘムを介する経路の存在を明確にした。ヘムは最終的にミトコンドリアのマトリックスで生成され、細胞質に存在する IRP2 によって感知されるが、ヘムの細胞内輸送メカニズムは明らかでない。岩井裕子グループは平成17年度から遺伝学的手法を用いた細胞内ヘム輸送系の解析に着手し、遺伝学的スクリーニング系を樹立した。

## 2. N 型糖鎖がシグナルとなるユビキチン修飾系の解析

[吉田グループ]

N 型糖鎖を選択的に識別する F-Box たんぱく質:Fbs1 を同定した。F-Box たんぱく質は SCF 型ユビキチンリガーゼの基質識別サブユニットであり、SCF<sup>Fbs1</sup>複合体は N 型糖鎖を識別してたんぱく質をユビキチン化する。正常にフォールディングしない N 型糖鎖を持つ膜・分泌たんぱく質は小胞体から逆行輸送され、小胞体関連分解(ERAD)と呼ばれる機構で細胞質においてユビキチン依存性に分解されるが、SCF<sup>Fbs1</sup>はこの ERAD 系に関与することを示してきた。Fbs1 の構造解析の結果、Fbs1 は全ての N 型糖鎖に共通したたんぱく質結合にあずかる糖鎖の基部を選択的に識別すること、Fbs1、Fbs2 は変性糖たんぱく質により強い結合能を有することも明らかにし、Fbs1、Fbs2 は小胞体から逆行輸送された、変性した糖たんぱく質の選択的識別に適した識別様式を持つことを示した。

[岩井・吉田グループ]

Fbs1 は Fbs1-5 の 5 種類からなるファミリーたんぱく質であり、ユビキタスに発現する Fbs2 も SCF<sup>Fbs2</sup>リガーゼを形成し、ERAD に関与することを示した。さらに、Fbs たんぱく質群の生体における役割の研究を進めるために Fbs ファミリーのノックアウトマウスの作成を進めており、すでに Fbs2 ノックアウトマウス、Fbs1-3 ノックアウトマウスの作成に成功しており、現在解析を進めている。

## 4. 事後評価結果:

### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表、国内:7件、海外:28件、口頭発表、国内:57件、海外:8件、であるが、特許出願は国内、海外ともない。

ユビキチン修飾系は世界的に大きく発展している分野であり、競争も激しい。その中で本研究チームはオリジナリティの非常に高い研究を展開し、その成果をNature Cell Biology(HOIL-1ユビキチンリガーゼの発見)、Molecular Cell(酸化を引き起こすヘムの結合様式、ヘムを介する鉄感知機構の発見)、Nature Structural and Molecular Biology(Fbs1による糖鎖識別様式)などのトップジャーナルに掲載してきた。また、実験手技書として著名なCurrent Protocols in Cell Biologyのユビキチン-プロテアソーム系の章を共同執筆するなど、世界のユビキチン研究の進展に貢献した点も評価できる。本研究の成果は、今後、医療への応用も期待される知見であり、近い将来に特許が取得できるものと期待している。

### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本チームの研究はこれまでに記載がされていなかった翻訳後修飾による選択的なユビキチン化の研究であり、ユビキチン化の研究の結果を介してヘムを介する鉄感知経路などの新規の生命現象の発見へと繋がった点は高く評価できる。また、ユビキチン修飾系自体でも、直鎖状ポリユビキチン鎖が翻訳後に形成されること、その基質たんぱく質を同定するなどオリジナリティのみならず、ユビキチン研究の新たなパラダイムを形成した点はインパクトが大きく、特筆されるべき成果である。また、本研究中に直鎖状ポリユビキチン化が種々の疾患と関与する可能性、鉄代謝異常と神経変性疾患との関連を示す知見も得ており、近い将来、臨床の現場に成果が還元できる可能性があり、それらに関する特許の取得を期待したい。当初の研究計画の進展に加えて、想定外の成果の1つは直鎖状ポリユビキチン鎖を生成するLUBACリガーゼの同定である。HOIL-1Lは一次構造から単体型で機能すると考えられたが、分子サイズの検討など、形成されるポリユビキチン鎖の質量分析計による検索など基本的な解析をきっちりと行った結果がLUBACの発見に繋がった。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

石森浩一郎 北海道大学・大学院理学研究科・教授に就任(平成17年4月)

吉田雪子 日本農芸化学会奨励賞(平成16年度)