

岸独立主幹研究ユニット

Kishi Initiative Research Unit

独立主幹研究員 岸 努
KISHI, Tsutomu

当研究ユニットは、タンパク質分解系の1つであるユビキチン系による細胞機能制御機構の全貌を分子のレベルで明らかにすることを目指す。

ユビキチン系が様々な生命現象を制御していることが分かってきたが、その一方で、どのタンパク質がユビキチン化による制御を受けるのか、そしてそのユビキチン化にはどのような意味があるのか、そのユビキチン化が時期特異的に起こるのはなぜか、さらにはユビキチン化を導くシグナルは何であるのかについてはあまりよく分かっていない。これはユビキチン化の標的タンパク質を同定するための一般的な方法論がなく、そのために標的タンパク質がほんの一部しか明らかになっていないことによる。

岸はユビキチン系の1つで、細胞周期、発生・分化に関与する SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を系統的に同定するための手法の開発に成功した。そこで当研究ユニットでは、この系を用いて標的タンパク質を系統的に同定し、これらの機能解析を通して、SCF ユビキチンリガーゼによる細胞機能制御機構を明らかにすることを目指す。

1. SCF によるユビキチン化の標的タンパク質の同定とその機能解析 (岸, 長尾, 三ツ橋, 池田)

タンパク質の合成と分解のバランスの制御は、細胞機能を維持するために重要である。このためタンパク質分解系の機能が破綻すると、細胞機能に異常を生じる。例えばガンや免疫疾患をはじめとした様々な病態が、タンパク質分解系の1つであるユビキチン系の機能が低下すると生じる。

ユビキチン系は、真核生物に普遍的に存在するタンパク質分解系である。このシステムは、分解すべきタンパク質(標的タンパク質)にユビキチン分子を共有結合(ユビキチン化)することによって、分解のシグナルを提示する。ここで、標的タンパク質の識別とユビキチン化を行う本体が、ユビキチンリガーゼである。細胞内には複数種のユビキチンリガーゼがあり、それぞれが特有の標的タンパク質のユビキチン化を担当している。この中で、ユビキチンリガーゼ SCF (Skp1, Cdc53, E-box タンパク質からなる複合体; 以下 SCF と記載) は、酵母からヒトまで高度に保存されており、細胞分裂周期、発生・分化、転写制御など、細胞増殖の重要な側面の制御に関わることが分かってきた。したがって、SCF による細胞機能制御を明らかにすることは、細胞増殖を総合的に理解する上で必須である。

このためには、まず SCF によるユビキチン化の標的タンパク質を明らかにし、次にその標的タンパク質がどのようなシグナルでユビキチン化されるのかについて明らかにする必要があるが、ユビキチン化の標的タンパク質についてはほとんど明らかにされていない。

これまでに我々は、SCF の標的タンパク質を系統的に同定するための実験系の開発に成功し、出芽酵母の SCF の新規な標的タンパク質を明らかにしている。本年度は、これらの新規標的タンパク質がユビキチン化により制御されることの生物学的な意味の解明を目指した。

Usf1 は細胞周期に依存して活性化される転写因子である。我々は Usf1 が、SCF に依存してユビキチン化され分解され

ることを明らかにした。実際、scf 変異株では Usf1 の転写の標的遺伝子の mRNA が著しく増加することを Northern blotting で明らかにした。このことは、Usf1 のユビキチン化によって、転写の標的遺伝子の発現レベルが制御されていることを意味する。

次に、Usf1 がユビキチン化により分解されることの意味を明らかにするために、安定化型の変異 Usf1 タンパク質を作製した。この安定化型 Usf1 を野生株で過剰発現すると、コロニー形成が阻害された。このことは、Usf1 の分解は細胞機能の維持のために必須であることが意味する。安定化型 Usf1 が細胞周期のどの段階の進行を阻害するのか調べたところ、G2 期の進行の遅延が観察された。この現象は、Usf1 の安定化によって Usf1 による転写の標的遺伝子が過剰発現し、その結果、細胞周期の進行が阻害されたと解釈できる。そこで、この Usf1 による転写の標的遺伝子の1つを遺伝学的に明らかにした。実際、この標的遺伝子の変異株では、細胞周期の進行阻害がみられなくなった。

以上のように、Usf1 のタンパク質量の制御は細胞周期の進行に重要であることを明らかにした。また昨年度、Usf1 のユビキチン化が Usf1 の核移行と、核内でのリン酸化という二段階で制御されることを明らかにしている。今後は、Usf1 のユビキチン化を制御するシグナルを明らかにすることにより、いかにして細胞が Usf1 量をコントロールしているのか明らかにしていく予定である。

Usf2 は、カルシウムシグナリングの制御因子をコードする。Usf2 の SCF によるユビキチン化は Usf2 のリン酸化に依存した。我々は、Usf1 のユビキチン化に必須なキナーゼを遺伝的手法を用いて明らかにした。実際、このキナーゼ変異株では Usf2 は安定化された。一方、リン酸化型 Usf2 を脱リン酸化するフォスファターゼも明らかにした。定常状態では、Usf2 はこのフォスファターゼによって安定化されていた。また、このフォスファターゼの変異株では、Usf2 は不安定化されていた。以上の解析を通して、Usf2 のユビ

キチン化が, Usf2 のリン酸化と脱リン酸化によって厳密に制御されていることを明らかにした。

これまでのスクリーニングが飽和している訳ではないので, 新たに2種類の異なるライブラリーを作製して標的タンパク質のスクリーニングも継続中である。

2. ユビキチン様タンパク質 SUMO1 の標的タンパク質を同定するための実験手法の開発 (岸, 三ツ橋)

ユビキチン様タンパク質 SUMO1 は, ユビキチンと同様に, 標的タンパク質に結合する。これまで SUMO1 化は, 標的タンパク質の細胞内の局在変化, 核輸送, 転写調節, 染色体分離, DNA 修復などに関与することが分かっている。また, アセチル化やユビキチン化と拮抗して, タンパク質の安定化に関与している例も報告されている。

出芽酵母では SUMO1 の欠損株が細胞周期 G2/M 期で増殖を停止する。このことは, 細胞周期 G2/M 期の進行の際に SUMO1 化されることが必須の標的タンパク質が存在することを意味する。これまで出芽酵母で明らかにされている SUMO1 化の標的タンパク質は, DNA 複製因子 PCNA, セブチン, トポイソメラーゼ II があるが, これらでは, SUMO1 の欠損株の表現型を説明できない。本研究では, 細胞周期 G2/M 期の進行の際に SUMO1 化されることが必須の標的タンパク質を, 出芽酵母を用いて明らかにすることを目標として, SUMO1 化されるタンパク質を遺伝学的に明らかにするための実験手法を開発した。

出芽酵母ライブラリーを用いてスクリーニングした結果, 232 個のポジティブクローンを得た。これらのうち, 実際 SUMO1 化されるクローンを, 酵母抽出液を用いた実験より選択した。その結果, 13 クローンを選択した。これらの遺伝子の塩基配列を決定した結果, 4 種類の遺伝子が含まれていることが分かった。

これらの遺伝子が SUMO1 化されることの生物学的な意味については, 現在解析中である。

This unit aims to elucidate how the ubiquitin/proteasome pathway contributes to cellular regulation. To this end, we are trying to construct a genetic system that is able to identify proteins to be ubiquitinated.

The ubiquitin/proteasome pathway is involved in the regulation of many basic cellular processes. In this system, ubiquitin is covalently linked to substrate proteins (this reaction is referred to as ubiquitinylation), and serves as a signal for degradation by the proteasome, which specifically recognizes ubiquitinated substrates. Ubiquitinylation is catalyzed by the ubiquitin ligases. The SCF ubiquitin ligase, which is composed of Cullin Skp1 and F-box proteins, is one of the ligases. Genetic analyses reveal that the SCF ubiquitin ligase controls irreversible reactions such as cell cycle transition, development, and differentiation. It

is important to find regulator proteins that are to be ubiquitinated during those processes, and to elucidate how the substrates are ubiquitinated in a specific and controlled manner. However, only a few proteins have been identified as substrates of the SCF ubiquitin ligase.

To date, there is no common way to identify proteins to be ubiquitinated by the SCF ubiquitin ligase because of the short-lives of the substrates. We have recently developed a novel method that could identify substrates of the SCF ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. Screening of the substrates is now underway. To date, we have identified several substrates.

Research Subjects

1. Identification and characterization of proteins to be ubiquitinated by SCF ubiquitin ligases
2. Role of the SUMO1 modification system in cell cycle regulation

Staff

Head

Dr. Tsutomu KISHI

Members

Ms. Rina NAGAO

Ms. Chisa MITSUHASHI

Ms. Akemi IKEDA

Assistant

Ms. Satomi YAMAMOTO

口頭発表 Oral Presentations

(国内会議)

岸努, 池田明美, 長尾里奈, 三ツ橋知沙: “SCF ユビキチンリガーゼによるユビキチン化の標的タンパク質の同定”, 日本遺伝学会第 76 回大会, 吹田, 9 月 (2004).

松本謙一郎, 高瀬和真, 吉瀬智康, 仲下英雄, 新井祐子, 長尾里奈, 村田隆明, 島田浩章, 田口精一, 土肥義治: “高活性型人工進化酵素を用いた遺伝子組み換えシロイヌズナによるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 合成の効率化”, 日本生物工学会平成 16 年度大会, 名古屋, 9 月 (2004).

岸努, 三ツ橋知沙, 長尾里奈, 池田明美: “SCF ユビキチンリガーゼの標的タンパク質を同定するための実験手法の開発”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).