

SCFユビキチンリガーゼの標的タンパク質の網羅的スクリーニング

● 岸 努

理化学研究所 岸独立主幹研究ユニット

〈研究の目的と進め方〉

タンパク質の合成と分解のバランスによる制御は、細胞機能を維持するために不可欠である。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、タンパク質分解系の一つであるユビキチン系の機能が低下すると、癌や免疫疾患をはじめとした様々な病態が引き起こされる。

ユビキチン系は、真核生物に普遍的に存在する蛋白質分解系である。このシステムは、分解すべき蛋白質（標的蛋白質）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、標的蛋白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蛋白質のユビキチン化を担当している。この中で、SCFユビキチンリガーゼ（Skp1、Cdc53、F-box蛋白質からなる複合体）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わかってきた。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蛋白質を明らかにし、次にその標的蛋白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は知られていない。本研究は、標的タンパク質同定のための手法を開発し、この系を用いて、出芽酵母のSCFユビキチンリガーゼの標的タンパク質の同定することを目的とした。

〈研究開始時の研究計画〉

- (1) 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実験系を構築する。SCFの標的タンパク質は、F-boxタンパク質により認識されることがわかっている。出芽酵母には20種類のF-boxタンパク質が存在し、それぞれが特有の標的タンパク質を識別する。従って、標的タンパク質をF-boxタンパク質と結合するタンパク質として同定できるはずである。すでに、F-boxタンパク質で細胞周期制御因子であるCdc4が、S期CdkインヒビターSic1を認識しユビキチン化に導くことが知られている。そこで、これらをモデルタンパク質として、F-boxタンパク質と結合するタンパク質として、標的タンパク質を同定するための実験系を構築する。
- (2) 次にこの系を用いて、F-boxタンパク質Cdc4によりユビキチン化が導かれる標的タンパク質を系統的にスクリーニングする。
- (3) 同定した標的タンパク質がユビキチン化されることの生物学的な意味を明らかにする。

〈研究期間の成果〉

- (1) Two-hybridシステムを実験系構築の基礎とした。まず、従来の方法で、F-boxタンパク質と標的タンパク質の結合を検出できるか検討した。モデルタンパク質を用いた実験では、F-boxタンパク質Cdc4とその標的タンパク質Sic1の結合を検出することができなかった。実際、これまで、Two-hybridシステムを用いて標的タンパク質が同定された例はほとんどない。その理由として、ユビキチン化の標的タンパク質は、一般的にその半減期がきわめて短いことが考えられる。すなわち、F-boxタンパク質とその標的タンパク質が結合しても、標的タンパク質の不安定性により、Two-hybridで用いているレポーター遺伝子の発現を維持できないと考えられる。そこで、標的タンパク質が安定化される条件で、Two-hybridスクリーニングを行うことを考えた。この目的のために、従来のシステムを再構築した。その結果、F-boxタンパク質Cdc4とその標的タンパク質Sic1の結合を検出することに成功した。同様な方法で、F-boxタンパク質Grr1とその標的タンパク質G1サイクリンCln2との結合も検出することができた。従って、F-boxタンパク質とその標的タンパク質の結合を検出する一般的な方法を構築することができたと考えられた。
- (2) 次に、実際にこの系で、新規標的タンパク質の同定ができるか検証した。酵母ライブラリーを用いて、F-box蛋白質Cdc4によりユビキチン化されるタンパク質のスクリーニングを行った。スクリーニングで得た候補遺伝子については、全てその遺伝子産物の半減期を、野生株とcdc4温度感受性変異株を用いて測定し比較し、野生株では不安定でcdc4温度感受性変異株で安定化されるものを選択した。その結果、すでに標的タンパク質であることが明らかとなっていたGcn4と新規標的タンパク質を4種類同定することに成功した。これらの新規標的タンパク質遺伝子をUSF1-4 (Ubiquitinated by SCF Cdc Four) と名付けた。以上のことから、この実験手法は、出芽酵母のSCFユビキチンリガーゼの標的タンパク質を明らかにする実験手法として有効であることが示された。この方法について特許申請を行った(2,3)。
- (3) 次にUsf1がユビキチン化により分解されることの生物学的な意味を明らかにすることを試みた。Usf1は細胞周期依存的に活性化する転写因子である。Usf1のユビキチン化は、核移行と核内でのリン酸化により制御されることを見いだした。さらにUsf1によって転写される遺伝子群の制御が、Usf1のユビキチン化および分解によってどのように制御されているのか調べた。この目的のために、cdc4温度感受性変異株と野生株で、Usf1によって転写される遺伝子の転写量を比較した。その結果、cdc4温度感受性変異株において、転写量が著しく増加した。このことは、Usf1の分解は、Usf1によって転写される遺伝

子の転写量を制限することに重要であることを示唆する。さらに安定化型 Usf1を過剰発現すると、野生株においても、コロニー形成能が失われた。以上のことから、Usf1の分解は細胞機能の維持のために必須であることが示唆された。

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。Usf2のユビキチン化は、Gsk3bによるリン酸化とカルシニューリンによる脱リン酸化によって制御されることを明らかにした。

〈国内外での成果の位置づけ〉

これまでの研究は、SCFユビキチンリガーゼを構成する因子の同定、機能解析、活性制御を明らかにする研究が中心で、標的タンパク質を直接的、かつ、系統的に明らかにされた研究例はない。これに対して、本研究では、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実験系を開発することに成功した。我々は、F-boxタンパク質Cdc4を用いてスクリーニングを行ったが、その他のF-box タンパク質にもそのまま応用できる点にも特徴がある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

SCFユビキチンリガーゼによるユビキチン化は標的タンパク質のリン酸化に依存して起こる。Usf1もUsf2のユビキチン化もリン酸化に依存することを確認した。これらのリン酸化を行うキナーゼの同定は、ユビキチン化の時期特異性を理解する上で重要であり、また、ユビキチン化を細胞内シグナルへの位置づけを行う上でも不可欠である。残念ながら、Usf1をリン酸化するキナーゼの同定は不十分である。それは、Usf1はユビキチン化のためのリン酸化以外にも、複数箇所リン酸化されており、これらを区別することが困難であること、また、ユビキチン化に必要なキナーゼも複数存在することが示唆されることである。このキナーゼの同定は今後の課題である。

〈今後の課題〉

本実験手法は、出芽酵母の標的タンパク質を明らかにすることに関しては有効である。この系を、高等生物の標的タンパク質の同定へ応用化することは今後の課題である。

また、上記のように、Usf1のユビキチン化に必須のキナーゼの同定も急務である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Seino, H., Kishi, T., Nishitani H., Yamao, F: Two ubiquitin-Conjugating Enzymes, UbcP1/Ubc4 and UbcP4/Ubc11, Have Distinct Functions for Ubiquitination of Mitotic Cyclin Mol. Cell. Biol. 23, 3497-3505 (2003).
2. 特願2004-279216 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をスクリーニングする方法
3. PCT/JP2005-018245 ユビキチン化の標的タンパク質をスクリーニングする方法