

分裂酵母におけるユビキチン経路全体像の把握とプロテオーム構築

●山尾文明

国立遺伝学研究所分子遺伝研究系

研究の目的と進め方

蛋白質の選択的分解を担うユビキチン/プロテアソーム系は階層制を持ちながらファミリーを形成する酵素系群を構成する。それらすべての構成要素の遺伝子群は全ゲノムの2%にも達する。これはユビキチン/プロテアソーム蛋白質分解系がリボソームをはじめとする蛋白質合成系にも匹敵するもので、真核細胞を特徴づける極めて重要な制御系であることを示している。

ユビキチン系における基質の認識は、ファミリーを形成しそれぞれに異なる基質特異性を持つユビキチン結合酵素(E2)とユビキチンリガーゼ(E3)酵素群の分子的多様性とその組み合わせによる特異的なユビキチン経路の発現に依拠する。E2酵素群の集約は出芽酵母において13種類が確定し、各々のE2分子が機能的に分散していることがわかっている。しかし、出芽酵母以外にはその全体像が判明しているものではなく、事実上これを標準と見做している。本研究計画では分裂酵母でのE2、E3分子種をゲノムデータと連動させながら系統的にサーベイし、各々について遺伝学的にその機能を再検討することにした。各々の遺伝的、物理的、機能的リンケージの解析を行う。E2/E3のユビキチン経路を全体的に検証し、細胞機能を制御するユビキチン経路の把握を拡大、再構築することが目的である。

〈研究開始時の研究計画〉

ゲノム配列の公開された部分からE2の保存ドメインを指標に検索し、声まで得たものに加えて最終的に13種のE2遺伝子(ubcP1-P13)を同定し、既にその遺伝子とcDNAを分離した。これは出芽酵母のE2分子種の数に同じものであったが、先行するこれらの遺伝子の遺伝子破壊による機能の探索(14年度、一部は既に完了)の結果はそのほとんどは機能的には出芽酵母のそれと対応しないことが判明した。したがって、これらE2分子種の機能解析の続行とこれにリンクするE3の検索(15年度以降)を実施する。機能の探索はその遺伝子破壊による表現型の確定に依る。E3の検索はE2遺伝子を用いてのTwo-hybrid法、E2の温度感受性変異に対する抑制遺伝子の検索、E2遺伝子の過剰生産に感受性の変異の選択などによる。E3の探索は、その構成因子のモチーフであるF-boxモチーフ、Ringfingerモチーフ、Cullin蛋白質を検索することで行う。興味深い生命機能上を制御すると考えられるE2/E3経路について、その機能解析とそこに関わる種々のタンパク質群複合体の解析を行う。

〈研究期間の成果〉

1) これまでの我々の同定したものを含めて分裂酵母のゲノムデータとあわせて、Ubc14種を確定した。
2) これらの遺伝子破壊株の表現型の詳細な解析を行い、その一覧を作製した。種間で保存されたものもあるが、全く異なる奇異な表現型もいくつか観察された。その中には、これまで予想されてはいなかった表現型もいくつかあり、今後の課題となるべきユビキチン経路と考えら

れる。

3) 姉妹染色体分離と分裂時サイクリンの分解は細胞分裂を制御する重要なタンパク質分解系であるが、これに関わるユビキチン経路では、2種類のUbcが働き、その作用は重複したものではない事が明らかになった。これは分裂期サイクリンのユビキチン化反応のメカニズムが、これまで予想されていたような単純なものではなく、異なる複数のステップにUbcが必要である事を示している。
4) 興味深いものとして、Ubc7の経路を同定した。この経路を阻害すると、mitotic processで組み換え頻度が非常に高くなることから、これが遺伝的組み換えを負に制御していることが判明した。遺伝的組み換えを制御しているUbc7経路のE3機能をにう因子として、cullinの一つを同定した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

UbcはヒトゲノムからもArabidopsisゲノムからも20種類程度しか見つからず、分裂酵母の14種類と基本的に大差ないことが判明した。遺伝解析の可能な分裂酵母Ubcの機能解析はその意味で重要である。系統関係から見て出芽酵母ではなく分裂酵母におけるその全体像の把握は意義深い。

その後のこの分野での研究は、Cullinタンパク質の機能解析で、ユビキチンの基本機能に絡むものが次第に明らかになりつつある。損傷DNAの修復や染色体の統合性維持に関わるものである。この課題でもその方向性を志向して、Cullin蛋白質の機能解析を行った。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

E2を用いた表現型からユビキチンの絡む機能を検索するのは比較的容易だが、その経路に関わるE3の同定は依然として簡便な方法はなく、既知の範囲内での特定モチーフのタンパク質の個別の解析を網羅的に検索する以外にはない。さらにE3からそのユビキチン化標的タンパク質の検索を一般化することにおいても同様である。

Ubc7の経路を阻害するとmitotic processで組み換え頻度が非常に高くなることから、これが遺伝的組み換えを負に制御していると判断した。またこの経路に関わるcullinの一つを同定した。しかし、この組み換え抑制の表現型が分裂酵母の株によっては観察されない事がわかり、この現象には更に未知の因子が関わっていると考えざるを得なくなった。現在なお、その因子の検索を続行している。株の系統が明確とされる分裂酵母においても、顕著な表現型に関わらない遺伝子変異の株依存性がある事になり、現象によっては新たな困難が生じる可能性がある事を示す教訓となった。

〈今後の課題〉

E2(Ubc)の検索結果が揃ったので、ユビキチン化でその基質認識に最も重要なE3の分子種の検索が必要である。特に、既知のモチーフだけに依存しない新たなユビキチンリガーゼサブファミリーの検索の可能性を検討す

る事が必要である。

既知のモチーフによるユビキチンリガーゼの最も一般的なサブファミリーはRing型リガーゼと呼ばれ、Cullinタンパク質をコアにして、その周りに活性中心としてのRing Fingerタンパク質、ユビキチン運搬体としてのUbc、基質認識のためのアダプター分子を配した複合体である。ヒト細胞には5ファミリー、6種のCullinが存在し、分裂酵母にはそのうちの3種の、出芽酵母には1種のみホモログが存在する。特異なRing型リガーゼとしてAPC (Anaphase-promoting Complex) がある。CUL1リガーゼ (SCF Complex), CUL2リガーゼ, APCの解析が進んでいる。CUL4リガーゼがDNA損傷修復に関わる事は最近のトピックである。しかし、これらリガーゼの機能的実体が完全に明らかになった訳ではない。例えば、COP9シグナロソーム複合体によりCullinは自身のNedd8による修飾を調節されていることがわかっている。COP9シグナロソームはDNA修復、チェックポイントに関連したシグナル受容体と想像されており、これらの領域に以下に上記リガーゼ群が関わるかは不明のままである。また染色体エピゲネティックスの様態にCullinリガーゼが関与する事を示す結果も散見される。したがって、これらリガーゼ群の分子的、機能的実態の更なる把握は極めて重要であると思われる。それらによるユビキチン化標的タンパク質の一般的、効率的検出法の工夫が必要である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) Mitsuzawa, H., Seino, H., Yamao, F. and Ishihama A. (2001). Two WD repeat-containing TATA-binding Protein-associated Factors in Fission Yeast That Suppress Defects in the Anaphase-promoting Complex. *J. Biol. Chem.* 276, 17117-17124

2) Seino, H., T. Kishi, H. Nishitani, and F. Yamao. (2003). Two Ubiquitin-Conjugating Enzymes, UbcP1/Ubc4 and UbcP4/Ubc11, Have Distinct Functions for Ubiquitination of Mitotic Cyclin. *Mol Cell Biol* 23, 3497-505.