

50. タンパク質分解による代謝制御機構の解明

中務 邦雄

*名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻

Key words : タンパク質分解, ユビキチン・プロテアソーム系, 代謝酵素, 細胞周期

緒言

ユビキチン・プロテアソーム系は特異的なタンパク質の分解系であり、細胞周期、癌、品質管理など、様々な細胞機能の制御に関わっている。ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) と呼ばれる 3 種の酵素の連続的な反応によって基質タンパク質に付加される。特に 48 番目のリジン残基を介して形成されたポリユビキチン鎖は、プロテアソームによって分解されるシグナルとなることが知られている。これらの酵素群の中で基質を認識する役割を担っているのがユビキチンリガーゼである。ユビキチンリガーゼは E1、E2 に比べて種類が多く、出芽酵母では約 100 種類、哺乳類では約 700 種類が知られている。ユビキチン・プロテアソーム系の生理的な役割を明らかにするには、ユビキチンリガーゼによって認識される特異的な分解基質の同定が不可欠である。

細胞内の代謝経路は、環境変化に応答して様々な制御を受けている。代謝酵素の活性調節機構として古くから知られているのが、アロステリック制御、フィードバック制御、フォワードフォワード制御などである。分子生物学の発展以降、代謝酵素の転写、翻訳による合成段階の制御も明らかにされてきた。興味深いことに、過去 5~10 年の間に、ユビキチン・プロテアソーム系によって制御される代謝酵素、および代謝経路が次々に報告された。たとえば、解糖系と糖新生のスイッチング、グリオキシル酸回路の活性、ステロール合成経路の活性などは、鍵となる代謝酵素 (多くの場合は律速酵素) がプロテアソームによって分解されることで調節される¹⁾。しかしながら、ユビキチン・プロテアソーム系による代謝制御の研究は散発的であり、これまでに系統的に調べられた例はなかった。代謝の新しい制御機構を明らかにできれば、ヒトでは疾患の予防と克服を目的とした医学分野への貢献が期待され、微生物では有用物質の生産を目指した代謝工学への貢献が期待される。本研究では、出芽酵母をモデルに、ユビキチン・プロテアソーム分解系によって制御される代謝酵素と分解に関わるユビキチンリガーゼを同定し、分解のメカニズムと生理的意義の解明を目的とした。

方法および結果

1. ユビキチン・プロテアソーム分解系によって制御される代謝酵素の同定

出芽酵母データベースから、「ユビキチン修飾」、「短寿命」、「高等動物との保存性」、「細胞内局在」などを指標に、分解制御を受ける可能性が高い代謝酵素を選び出した。次に、それぞれの代謝酵素に内在性のエピトープタグを付加して、シクロヘキシミドチェイス法によって安定性を実験的に検証することで、候補タンパク質を絞り込んだ。エピトープタグの付加は、細胞内タンパク質を簡便に検出する手段ではあるが、タンパク質の安定性に影響を与えることがある。そこで最終確認として、特異的抗体 (ウサギポリクローナル抗体) を網羅的に作製して、内在性タンパク質の安定性を直接調べた。ここでは、本研究期間内に解析を進めた p103、p85、p42、p43 について報告する。

2. p103 のリン酸化制御機構の解析

特異的抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、p103 は近接した二本のバンドとして検出された。シクロヘキシミドチェイス実験を行うと、泳動度の遅い上のバンドのみが減少した (この分子種を p103-A とする)。

より詳細に解析するために、通常使用する縦6 cmのゲルではなく、15 cmのゲルで泳動した結果、二本のバンドを完全に分離できた。再びシクロヘキシミドチェイス実験を行うと、p103-Aの減少はプロテアソーム阻害剤MG132、およびプロテアソームの温度感受性変異によって抑制された(図1)。さらに、ユビキチンリガーゼSCF複合体の温度感受性変異株(*cdc53-1*, *skp1-11*)、およびユビキチン結合酵素*CDC34*の温度感受性変異株(*cdc34-2*)でも安定化した。

さらに詳細に解析すると、確かにp103-Aの分子種はチェイスとともに減少するが、それに伴って泳動度の早い下のバンド(p103-B)の分子種が増加することが明らかになった。そして、p103のタンパク質量は全体として変化しないことも分かった。

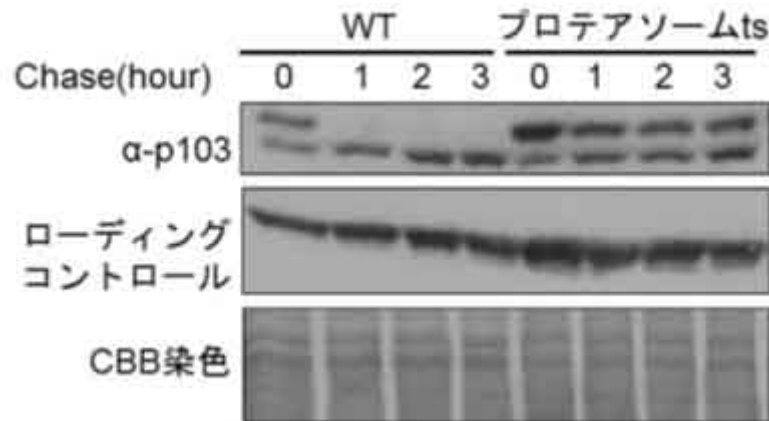


図1. p103のシクロヘキシミドチェイス実験

出芽酵母をシクロヘキシミド処理して、細胞を経時的に回収した。ウエスタンブロッティングによってp103を検出した。泳動度が遅いp103の上のバンド(p103-A)の減少はプロテアソームの温度感受性変異によって抑制された。

p103はサイクリン依存性キナーゼによってリン酸化状態、および活性が制御されることが報告されていた。実験を進めた結果、現在は以下のようなモデルを考えている。細胞をシクロヘキシミド処理すると、短寿命タンパク質であるサイクリンが減少する。その結果、サイクリン依存性キナーゼの活性も低減するので、p103は脱リン酸化状態(p103-B)にシフトしてしまう。このとき、SCF複合体およびプロテアソームの活性を阻害すると、シクロヘキシミド処理してもサイクリンが分解されないため、p103は脱リン酸化されずにリン酸化状態(p103-A)のままとどめられる、というモデルである。では、p103を脱リン酸化する酵素はなにか？脱リン酸化酵素の様々な変異株をシクロヘキシミド処理してp103の脱リン酸化を観察した結果、細胞周期関連因子Cdc14の温度感受性変異株でp103-Aの減少が抑制された(図2)。現在、p103の活性化と不活性化におけるCdc14の役割を検討している。

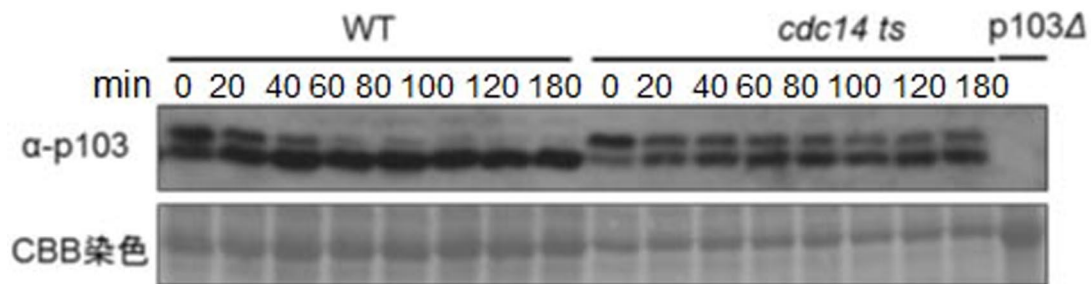


図2. シクロヘキシミド添加による p103-A の減少は Cdc14 に依存する

酵母をシクロヘキシミド処理して細胞を経時的に回収した後、ウエスタンブロッティングによって p103 を検出した。p103-A の減少は *CDC14* の温度感受性変異によって抑制された。

3. p85 の分解制御機構の解明

特異的抗体を用いてウエスタンブロッティングを行うと、p85 は単一のバンドとして検出された。シクロヘキシミドチェイス実験によって、p85 は半減期約 2 時間で分解される短寿命タンパク質で、プロテアソーム阻害剤 MG132、およびプロテアソームの温度感受性変異によって安定化することが明らかになった。すなわち、p85 はプロテアソーム依存的な分解基質であることが示された。次に、分解に関わるリガーゼを同定するために、ユビキチンリガーゼの様々な変異株で p85 のシクロヘキシミドチェイス実験を行った。その結果、SCF 複合体の構成因子 *CDC53*、*SKP1* の温度感受性変異株 (*cdc53-1*、*skp1-11*) で p85 の分解が抑制された。さらに、SCF 複合体と結合するユビキチン結合酵素 (E2) *CDC34* の温度感受性変異株 (*cdc34-2*) でも安定化した (図 3)。

ユビキチンリガーゼ SCF 複合体には、基質認識を担う可変因子 (F ボックスタンパク質) が含まれる。出芽酵母には F ボックスタンパク質が約 20 種類あると推定されている。p85 の分解が SCF 複合体に依存したことから、複合体の可変因子であり基質認識を担う F ボックスタンパク質を絞り込んだ。その結果、*CDC4* の温度感受性変異株 *cdc4-1* で p85 が安定化した。現在、p85 のユビキチン化が SCF^{Cdc4} に依存する可能性について *in vivo* と *in vitro* の系で検討を進めている。

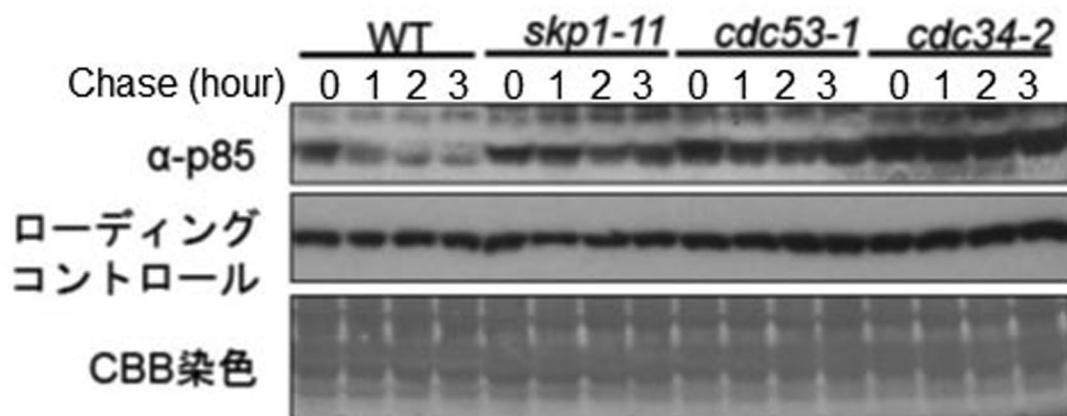


図3. p85 の分解は SCF 複合体に依存する

酵母細胞を許容温度で培養後、制限温度にシフトした。シクロヘキシミドを添加後、細胞を経時的に回収した。ウエスタンブロッティングによって p85 を検出した。p85 の分解は *cdc53*、*skp1*、*cdc34* の温度感受性変異株で抑制された。

4. メチオニン代謝に関わる p42、p43 のユビキチン化

p42 と p43 はアミノ酸配列の相同性が高く、共にメチオニン代謝に関わる代謝酵素である。質量分析で翻訳後修飾を網羅的に解析したデータベースによると、p42 と p43 はともにユビキチン修飾を受けることが報告されていた。そこで生化学的に調べたところ、確かに p42 と p43 はユビキチン修飾されていることが分かった (図 4)。特異的抗体を作製して半減期を調べた結果、興味深いことに両方とも極めて安定なタンパク質であることが分かった。

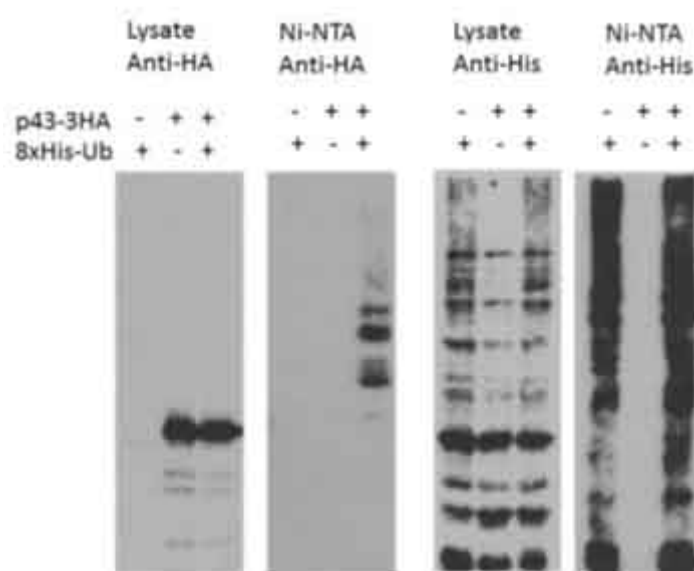


図 4. p43 はユビキチン修飾を受ける

HA タグを付加した p43 および 8xHis タグを付加したユビキチンを図のような組み合わせで発現させた。ニッケルカラムによってユビキチン化タンパク質を濃縮した。p43 を抗 HA 抗体で、ユビキチン化タンパク質を抗 His タグ抗体で検出した。

考 察

本研究期間内に新たに 4 種類の代謝酵素について、半減期とユビキチン修飾を解析した。現在までに、p103 の脱リン酸化が Cdc14 の変異によって抑制されることが分かった。今後は、精製した Cdc14 を用いて *in vitro* の系で脱リン酸化を再構成して証明しなければならない。p85 はユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることが明らかになり、ユビキチンリガーゼの同定まで進んだ。今後は、SCF^{Cdc4} による p85 の認識機構について、*in vitro* で解析していく予定である。p42 と p43 は明らかにユビキチン化を受けるにもかかわらず、ほとんど分解されない安定なタンパク質であることが分かった。p42 と p43 のユビキチン化がメチオニン代謝においてどのような意義をもつのか、今後検討する必要がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻の嘉村巧教授である。最後に、本研究をご支援くださいました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Nakatsukasa K, Okumura F, Kamura T. Proteolytic regulation of metabolic enzymes by E3 ubiquitin ligase complexes: lessons from yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(6):489-502. doi: 10.3109/10409238.2015.1081869. Epub 2015 Sep 11. PMID: 26362128