Pirh2 interacts with and ubiquitylates signal recognition particle receptor β subunit

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安部, 健滋 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/85

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　５０６号	学位授与年月日	平成２０年　３月１７日
氏　　名	安　部　健　滋		
論文題目	Pirh2 interacts with and ubiquitylates signal recognition particle receptor beta subunit (Pirh2 はシグナル認識粒子受容体ベータサブユニットと結合し、ユビキチン化する)		

博士(医学)　安 倍 健 滋

論文題目

Pirh2 interacts with and ubiquitylates signal recognition particle receptor beta subunit
(Pirh2はシグナル認識粒子受容体ベータサブユニットと結合し、ユビキチン化する)

論 文 の 内 容 の 要 旨

[はじめに]

Pirh2はRINGフィンガードメインを持つユビキチンリガーゼであり、これまでにp53、histone deacetylase1(HDAC1)、ε-coatomer complex(ε-COP)が基質として報告されている。さらに最近の我々の研究により、Pirh2がcyclin dependent kinase inhibitor(CKI)であるp27^{kip1}をユビキチン化し、分解に導いていることが明らかとなった。このようにPirh2は細胞周期、転写、メンブレントラフィックに関与する分子をユビキチン化ターゲット基質としており、生体内で様々な生理活性機能を持つ、極めて重要な分子であると考えられる。そこで、このPirh2の新たな基質を見つけるために、Pirh2をベイトとして酵母two-hybrid法を行った結果、Pirh2新規結合分子として、小胞体膜蛋白質であるsignal recognition particle receptor beta subunit(SRbeta)を同定した。本研究において、SRbetaがPirh2の新規ユビキチン化ターゲットであるかどうかを検討した。

[材料ならびに方法]

1. Pirh2とSRbetaが実際に動物細胞で結合するのかどうかを、培養細胞にそれぞれの発現プラスミドをトランスフェクションし、免疫沈降法を用いて調べた。また、細胞に過剰発現させたPirh2とSRbetaの細胞内での局在を免疫蛍光染色により調べた。
2. Pirh2がSRbetaをユビキチン化する活性があるのかどうかを、野生型Pirh2とRINGフィンガードメインに変異をいれた変異型Pirh2を用いて、*in vivo*または*in vitro*でのPirh2によるSRbeta のユビキチン化アッセイを行った。
3. Pirh2によるSRbetaのユビキチン化が分解シグナルであるのかどうかを以下の方法で検討した。まず、細胞にSRbetaとともにPirh2を共発現させたときの、SRbetaの安定性に与える影響を蛋白質合成阻害剤であるcycloheximideを処理して、経時的にSRbetaの分解速度に及ぼす影響について調べた。また、Pirh2 siRNAを細胞にトランスフェクションし、内因性のPirh2の発現を抑制した時の、SRbetaの発現量に与える影響を調べた。
4. Pirh2によるSRbetaのユビキチン化が、ユビキチンの何番目のリジンを介してポリユビキチン鎖を形成しているのかを調べた。ユビキチンの各リジンをアルギニンに置換した変異型ユビキチンを作製し、これを用いて*in vitro*でユビキチン化アッセイを行った。

[結果]

1. Pirh2とSRbetaは、動物細胞においても結合が確認できた。また、Pirh2を単独で細胞に発現させた時は、Pirh2は細胞全体に発現しているのに対して、SRbetaを共発現させると、Pirh2とSRbetaは小胞体で共局在した。このことから、Pirh2はSRbetaを小胞体でユビキチン化していることが示唆された。
2. *in vivo*あるいは*in vitro*の系において、Pirh2はSRbetaをユビキチン化した。また、RINGフィンガード

メイン変異型Pirh2にはSRbetaをユビキチン化する活性がなかったことから、このユビキチン化はRINGフィンガードメイン依存的なユビキチン化であることが確認できた。さらに、ユビキチンのリジン残基をすべてアルギニンに置換した変異型ユビキチンでは、Pirh2によるSRbetaのポリユビキチン化が見られなかったことから、Pirh2によるSRbetaのユビキチン化は、複数のリジンサイトで起きているモノユビキチン化ではなく、1ヶ所のリジンサイトでのポリユビキチン化であることが明らかとなった。

3. Pirh2を細胞に共発現させても、SRbetaの発現量に変化は見られなかった。また、内因性Pirh2の発現量を抑制しても内因性SRbetaの発現に対して何の影響も与えなかったことから、Pirh2はSRbetaをユビキチン化するが、そのユビキチン化はSRbetaを分解に導いてはいないということが示唆された。
4. Pirh2によるSRbetaのポリユビキチン化は、ユビキチンの6番目、あるいは29番目のリジンをアルギニンに置換した変異型ユビキチンを用いた場合において、顕著に抑制された。このことから、SRbetaのポリユビキチン化はユビキチンのリジン6と29を介して起きていることが示唆された。プロテアソーム依存的な蛋白質分解にはリジン48を介したポリユビキチン化が関わっていることから、この結果はPirh2がSRbetaの安定性に影響を与えないという結果を裏付けるものであると考えられる。

［考察］

本研究において、SRbetaはPirh2の新たなユビキチン化ターゲット基質であることが明らかとなった。SRbetaはSRP、またSRalphaと協調して、分泌蛋白質の生合成経路の初期段階である、新生ポリペプチド鎖のリボソームから小胞体への移行に関わっていることが報告されている。Pirh2がSRbetaをユビキチン化し、そのユビキチン化が分解シグナルではないことから、Pirh2はSRbetaの機能的な制御を介して、分泌蛋白質の合成機構に関与している可能性が考えられる。今後、Pirh2のSRbetaユビキチン化における細胞生物学的な影響を明らかにすることで、生命活動に必須の蛋白質分泌の成熟制御機構の解明に繋がり、さらにはホルモン分泌の異常等による様々な疾患の理解に繋がる可能性があり、Pirh2を標的とした分子標的治療への応用も期待できる。

［結論］

Pirh2は分泌蛋白質合成に関与している小胞体膜蛋白質であるSRbetaをユビキチン化し、そのユビキチン化はリジン6と29を介したポリユビキチン化である。

論文審査の結果の要旨

蛋白翻訳後修飾は生命機能を維持する上で重要な意味を持っている。中でも蛋白のユビキチン化はその蛋白質の質・機能に関わる最も重要な修飾と考えられる。申請者らの研究成果を含めてここ10年間の成果には目を見張るものがあるとともに更に機能的意義に着目した解析が進行中である。

Pirh2はRINGフィンガードメインを持つユビキチンリガーゼ（E3）であり、これまでにもp53、histone deacetylase1（HDAC1）、e-coatomer complex（ε-COP）が基質として報告されている。さらに申請者らの研究により、最近Pirh2がcyclin dependent kinase inhibitor（CKI）である$p27^{kip1}$をユビキチン化し、分解に導いて生命現象の根幹機能である細胞周期の調節に関わっていることが明らかとなった。このようにPirh2は細胞周期、転写、メンブレントラフィックに関与する分子をユビキチン化ターゲット基質としており、生体内で様々な生理活性機能を持つ、極めて重要な分子であると考えられる。

申請者らはこのPirh2の機能解明に迫る新たな基質を見つけるために、Pirh2をベイトとして酵母two-hybrid法を行い、Pirh2新規結合分子として、小胞体膜蛋白質であるsignal recognition particle receptor beta subunit（SRbeta）を同定した。そしてその相互作用を*in vivo*で再確認するとともにSRbetaがPirh2の新規ユビキチン化ターゲットであるかどうかを詳細に検討し分泌機構におけるSRbetaのユビキチン化の機能解明に迫る基礎を築いた。

酵母two-hybrid法で同定したPirh2相互作用分子SRbetaが、動物細胞においても結合していることを確認した。また、Pirh2を単独で細胞に発現させた時は、Pirh2は細胞全体に発現しているのに対して、SRbetaを共発現させると、Pirh2とSRbetaは小胞体で共局在した。このことから、Pirh2はSRbetaを小胞体でユビキチン化していることが示唆された。

*in vivo*あるいは*in vitro*の系において、Pirh2はSRbetaをユビキチン化することを証明した。また、RINGフィンガードメイン変異型Pirh2にはSRbetaをユビキチン化する活性がなかったことから、このユビキチン化はRINGフィンガードメイン依存的なユビキチン化であると判明した。さらに、ユビキチンのリジン（K）残基をすべてつぶした変異型ユビキチンでは、Pirh2によるSRbetaのポリユビキチン化が見られなかったことから、Pirh2によるSRbetaのユビキチン化はマルチサイトでおきているモノユビキチン化ではなく、ポリユビキチン化であることを明らかにした。またPirh2によるSRbetaのポリユビキチン化は、ユビキチンの6番目、あるいは29番目のKをアルギニン（R）に置換した変異型ユビキチンを用いたときに顕著に抑制されることを見出し、SRbetaのポリユビキチン化がユビキチンのK6とK29を介して起きていることを示した。

一方、Pirh2を細胞に強発現させても、SRbetaの発現量に変化は見られず、また、内因性Pirh2の発現量をRNAiノックダウン法で抑制しても内因性SRbetaの発現に対して何の影響も与えなかったことから、Pirh2はSRbetaをユビキチン化するが、そのユビキチン化はSRbetaの分解制御ではないということが示唆された。このことはSRbetaのポリユビキチン化がユビキチンのK6とK29を介していて、プロテアソーム依存的な蛋白質分解に関わるK48を介したポリユビキチン化と機能的意義の点で異なることが示唆された。

以上、審査委員会は申請者がE3であるPirh2の新たな基質を同定しその相互作用様式、ユビキチン化機構について詳細な検討を加えるとともに、ユビキチン化の機能的意義について今後新たな展開を示すと期待される現象を見出した点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

1） 今回酵母two-hybrid法で同定したPirh2相互作用分子にはこの他にどのようなものがあったか
2） Pirh2の細胞内局在について
3） Pirh2が相互作用する機構には一定の法則はないのか
4） Pirh2によるユビキチン化シグナルはあるのか、あるとすればそれはなにか
5） 免疫沈降法-イムノブロット法や蛍光抗体法で内因性のPirh2とSRbetaとの相互作用は確認できたか
6） 実験によって培養細胞を適宜換えている理由は何か
7） 強発現したPirh2がSDS-PAGEで、バンドが2本観察された原因は何であると考えられるか
8） RINGフィンガードメインに変異を加えた場合でもモノユビキチン化がみられるのはなぜか
9） 免疫沈降法を2回繰り返した実験の手技の詳細と理由はなにか
10） SRbetaユビキチン化の分泌過程おける機能的意義を今後どのように解析していくか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　上田啓次
副査　蓑島伸生　副査　最上秀夫