

氏名 (本籍)	伊藤賢一 (愛知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 480 号
学位授与日付	平成 13 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	N-terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8
審査委員	(主査) 教授 岡野 幸雄 (副査) 教授 中島 茂 教授 森脇 久隆

## 論文内容の要旨

ユビキチン-プロテアソーム系蛋白分解システムは細胞周期, 転写, DNA 修復, 抗原提示, 癌化, アポトーシスなど, 様々な生命現象に関与している。この蛋白分解系は, まず 76 アミノ酸より構成されるユビキチンがユビキチン活性化酵素 (E1) とエネルギー依存的に結合した後, ユビキチン結合酵素 (E2) の活性 Cys 残基に転移し, チオエステル結合する。続いて標的タンパク質が E2 より直接あるいはユビキチンリガーゼ (E3) を介してユビキチン化され, ATP 依存性プロテアーゼであるプロテアソームにより分解される。酵母では 10 種類の E2 が存在し, その中で UBC4, UBC5 は熱ショック, ストレス応答に必須である。申請者らがクローニングした UBE2E2 及び UBE2E3 は UbcH6 と共に UBC4 と相同性の高い UBC ドメインを持ち, N 末端側に伸長したヒトクラス III E2 ファミリーを形成している。UBE2E3 と UbcH6 のマウスホモログである UbcM2 および UbcM3 は UBC4/UBC5 変異酵母株に対して相補性を示す。また, UbcM2 は核輸送担体 importin-11 と会合し, その過剰発現は細胞増殖を抑制することが明らかになっているが, このファミリーの生物学的な役割についてはほとんど解明されていない。そこで, 本研究では, クラス III E2 の機能解析を目的として, UBE2E2 と相互作用する蛋白質を yeast two-hybrid 法にてスクリーニングを行い, 得られた RING-finger 蛋白をコードする 2 種の cDNA (ARA54, RNF8) について機能解析し, 以下の結果を得た。

### 研究方法

- (1) UBE2E2 と相互作用する分子をクローニングするために yeast two-hybrid スクリーニングを行った。UBE2E2 を pAs (DNA 結合ドメイン), B 細胞 cDNA ライブラリーを pAct (転写活性化ドメイン) の各ベクターにクローニングしてスクリーニングした。また同様な手法にて E2 と RING-finger 蛋白の会合特異性を試験した。
- (2) RING-finger 蛋白の *in vitro* 自己ユビキチン化にはバキュロウイルスによる昆虫細胞発現系で調製した蛋白を用いた。すなわち, RING-finger 蛋白の cDNA を組み込んだプラスミドを大腸菌内で組み換え, 得られた DNA を Sf9 細胞に感染させ蛋白を大量発現した。なお E1, E2 は *E. coli* (BL21) にて調製した。
- (3) RING-finger 蛋白の *in vivo* 自己ユビキチン化における COS7 細胞への遺伝子導入はリポフェクションにより行った。HA 付加ユビキチンを同時に発現させ, Ni ビーズで His タグ付加蛋白を精製し, ウェスタンブロットティングにより, ユビキチン蛋白を検出した。

### 結果と考察

- (1) B 細胞 cDNA ライブラリーを用いて UBE2E2 を bait として yeast two-hybrid スクリーニングを行った結果, RING-finger 蛋白をコードする 2 種の cDNA (ARA54, RNF8) を得た。ARA54 はアンドロゲン受容体 (AR) のコアクチベーターとしてリガンド依存的に AR に結合し, その転写を活性化することが知られている。
- (2) 種々の E2 を用いて yeast two-hybrid assay により ARA54, RNF8 と E2 の会合特異性を検討した。ARA54, RNF8 はクラス III E2 (UBE2E2, UbcH6, UBE2E3) と特異的な会合が認められたが, その他の E2 (UbcH5, UbcH7, UbcH10, hCdc34, hBendless) のいずれとも会合しなかった。特に ARA54 は UBE2E2 及び

UbcH6と、一方、RNF8はUBE2E2と強い会合を示した。またUBE2E2の部分欠損蛋白を用いた実験により、ARA54、RNF8はいずれもUBE2E2のUBCドメインと会合することが分かった。ヒトクラスIII E2はUBCドメイン内で90%以上の相同性を示すが、N末端側の伸長部分の相同性は著しく低い。UBE2E3はこれらのRING蛋白と強く会合しないことから、ARA54、RNF8とクラスIII E2の相互作用には、N末端側の伸長部分も影響を与えていることが示唆された。

(3) ARA54、RNF8の種々の部分欠損体、及びRINGドメイン中のCys残基をSer残基に置換した変異体を用いたtwo-hybrid assayでE2との会合領域を調べた。RINGドメインの欠損体、Cys→Ser変異体において会合を認めなかったことから、E2との相互作用にはRINGドメインが重要であることが明らかとなった。

(4) 最近、癌遺伝子産物MDM2をはじめ、RING型E3が相次いで報告された。これらはRING-fingerドメインを介してE2と結合しており、このドメインがE3活性のみならず自己ユビキチン化活性にも重要であることが明らかにされた。そこで、ARA54、RNF8の*in vitro*での自己ユビキチン化活性を検討したところ、昆虫細胞に発現させた野生型ARA54、RNF8はクラスIII E2依存的に自己ユビキチン化され、また、RING変異型ARA54、RNF8では抑制されたことから、ARA54、RNF8がRING型E3として機能することが示された。

(5) COS-7細胞に発現させた野生型ARA54、RNF8はユビキチン化が認められ、プロテアソーム阻害剤MG132の添加により分解が抑制された。さらにRING変異ARA54、RNF8も分解が抑制された。このことは、ARA54、RNF8の発現量がユビキチン-プロテアソーム分解系で制御されていることを示すとともに、RING変異による自己ユビキチン化の抑制が自己分解の抑制に連係していることを表している。

(6) GFP融合蛋白を発現させたCOS-7細胞においてARA54は細胞全体に広がり、RNF8は主に核に局在していたことから、これらのRING-finger蛋白質は核内蛋白の機能に関与していると考えられた。

## 結語

以上の結果から、RING-finger蛋白ARA54、RNF8はクラスIII E2及びRING依存的に自己ユビキチン化されることが明らかとなった。さらに、これらはRING型E3として、クラスIII E2と共に核内蛋白のユビキチン化、分解を介して細胞機能の調節に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果と要旨

申請者 伊藤賢一は、yeast two-hybrid法によりUBE2E2と相互作用するcDNAの探索を行い、RING-finger蛋白をコードする2種のcDNA (ARA54, RNF8)を得た。ARA54, RNF8がヒトUBE2E2及びRINGドメイン依存的に自己ユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解されることや細胞内局在を明らかにした。これらの知見は今後、クラスIII E2を介したユビキチン化の細胞生物学的機能を解明する上で少なからず寄与するものとする。

---

### [主論文公表誌]

N-terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8

2001年 Eur. J. Biochem. 268 : 2725-2732