

腎細胞癌株 UOK111 細胞由来の cDNA library を transform し、-Trp, -Leu, -His plate で 4 日間培養した。生存クローンを -Trp, -Leu, -His plate に植え替え、さらに嫌気下で 4 日間培養した。生存クローンから常法を用いて plasmid を回収し、ABI377 DNA シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

## C. 研究結果

### 1. IDD ドメインと酸素依存性に結合する分子の同定

我々はすでに酸化 IRP2 を選択的にユビキチン化するユビキチンリガーゼ (IRP2-E3) 活性は、IDD ドメインに酸化依存性に結合することを見いだしていた。そこで、酵母 2 ハイブリッドスクリーニング法を改良した機能的なスクリーニング法を用いて IRP2-E3 遺伝子の同定を試みた。出芽酵母はグルコース存在下では酸素存在下、非存在下のいずれの状態においても生存が可能である。酸化反応には酸素の存在が不可欠であることから、我々は IRP2-E3 は酸素存在下では IDD ドメインと結合するが、非存在下では結合しないのではと考え、酸素存在下、非存在下での酵母 2-ハイブリッドスクリーニングにより IRP2-E3 の同定を目指した。IDD ドメイン cDNA を transform 済みの出芽酵母 AH109 株に  $1.4 \times 10^6$  クローンのヒト腎細胞癌株 UOK111 細胞由来の cDNA library を transform した。約 500 個の生存クローンを -Trp, -Leu, -His plate に植え替え、さらに嫌気下で 4 日間培養し、生存クローンから plasmid を回収し、DNA 塩基配列を決定した。ユビキチンリガーゼに関しては近年研究が急速に進展し、RING フィンガー蛋白質の多くが E3:ユビキチンリガーゼであることが示されつつある。そこで、回収されたクローンの中で RING フィンガー蛋白質をコードしている cDNA を検索したところ、クローン H3 が RING フィンガー蛋白質をコードしていた。そこで、我々は H3 を

HOIL-1 (heme oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1) と名付け、その機能を検索することにした。HOIL-1 は全長 468 アミノ酸の蛋白質であり、N 末側にユビキチン様ドメイン、C 末側に RING フィンガードメインを有している。

HOIL-1 cDNA と IRP2 cDNA とを Cos 細胞にトランスフェクトし、両者の結合を確認したところ、鉄キレートで処理した細胞では結合しなかったが、鉄、ヘムで処理した細胞では結合が確認され、両者の結合は鉄イオンに依存することが示された。

前述のように HOIL-1 は RING フィンガードメインのみならず、その N 末側にユビキチン様ドメインを有している。そこで、RING フィンガードメイン、ユビキチン様ドメインの IRP2 への結合への関与を検索する目的で、HOIL-1 の RING フィンガードメイン (HOIL-1  $\Delta$ RING)、ユビキチン様ドメイン (HOIL-1  $\Delta$ Ubl) 欠失変異体を作成し、Cos 細胞を用いた IRP2 との結合実験を行ったところ、HOIL-1  $\Delta$ Ubl は IRP2 と結合しなかったが、HOIL-1  $\Delta$ RING は弱いながらも結合した。以上よりユビキチン様ドメインが、IRP2 との結合に重要である可能性が示唆された。

### 2. HOIL-1 は IRP2 を鉄依存性にユビキチン化するユビキチンリガーゼである。

HOIL-1 は RING フィンガードメインを持ち、鉄存在下でのみ IRP2 と結合することから、IRP2-E3 であることが強く示唆される。それゆえ、我々はすでに酸化 IRP2 の E3 ソースとして HeLa 細胞のライセートを用いた in vitro ubiquitination assay を樹立していたので、同アッセイ系を用いて HOIL-1 の IRP2-E3 活性を検索した。バキュロウイルス発現系を用いて、レコンビナント野生型 HOIL-1、HOIL-1  $\Delta$ Ubl、HOIL-1  $\Delta$ RING 蛋白質を大量発現し、精製標品を得た。レコンビナント E1、E2 (UbcH5c)、ATP、ユビキチン存在下で酸化 IRP2 のユビキチン化を検索

したところ、野生型 HOIL-1 存在下では酸化 IRP2 のユビキチン化は促進されたが、HOIL-1  $\Delta$ Ubl、HOIL-1  $\Delta$ RING 絵は促進されなかったことから、HOIL-1 は IRP2 の酸化変化を識別し、鉄依存性にユビキチン化するユビキチンリガーゼであると考えられた。

#### D. 考察

##### 1. HOIL-1 ユビキチンリガーゼによる酸化蛋白質認識

蛋白質の酸化は代表的な蛋白質ダメージの1つであり、酸化蛋白質はユビキチン修飾系で選択的に分解されることが知られているが、そのユビキチン化を担うユビキチンリガーゼは同定されていなかった。今回我々は初めて、酸化蛋白質を選択的に識別するユビキチンリガーゼ HOIL-1 を同定した。HOIL-1 cDNA はこれまでも同定されていたが、ユビキチンリガーゼであることは示されていなかった。HOIL-1 は全ての臓器に発現しており、また酵母にも低いながらも相同性を有した遺伝子が存在していることから、広く酸化蛋白質を識別し、蛋白質の品質管理に関与するリガーゼである可能性が示唆される。それゆえ、次年度には酸化ストレスによってダメージを受けた蛋白質の turnover における HOIL-1 の役割の解析を進めたい。

##### 2. HOIL-1 のドパミン神経系脱落への関与

種々の神経変性疾患においてはユビキチン陽性の蛋白質封入体の形成が認められ、ドパミン神経系の脱落による疾患であるパーキンソン病ではユビキチン、 $\alpha$ -シヌクレインを含有したレビー小体特徴的である。また若年型家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物の Parkin 蛋白質がユビキチンリガーゼであることからパーキンソン病におけるユビキチン修飾系の重要性はよく知られている。結果の項でも示したように、HOIL-1 は全長 468 アミノ酸であり、N 末側にユビキチン様ドメイン、C 末側に RING フィンガードドメインを有

している。一方、Parkin も 465 アミノ酸、N 末側にユビキチン様ドメイン、C 末側に RING-IBR ドメインを有しており、HOIL-1 は Parkin と相同性を有した蛋白質である。また、パーキンソン病の特徴の1つは鉄沈着であり、HOIL-1 が鉄代謝の制御因子 IRP2 の鉄依存性分解をになうユビキチンリガーゼである事実は鉄代謝異常の観点から考えて非常に興味深く、HOIL-1 がドパミン神経系脱落に関与している可能性も考えられよう。この点に付いても次年度の研究で積極的に取り組みたいと考えている。

#### E. 結語

我々が鉄代謝の制御因子である IRP2 を酸化依存的に識別するユビキチンリガーゼとして同定した HOIL-1 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子の1つである Parkin ユビキチンリガーゼと相同性を有しているリガーゼである。パーキンソン病における鉄代謝異常を考えるに HOIL-1 のドパミン神経系脱落への関与の可能性が示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ①LaVaute, T., Smith, S., Cooperman, S., Iwai, K., Land, W., Meyron-Holtz, E., Drake, S. K., Miller, G., Abu-Asab, M., Tsokos, M., Switzer III, R., Grinberg, A., Love, P., Tresser N, and Rouault, T. : Targeted deletion of iron regulatory protein 2 causes iron overload and neurodegenerative disease in mice. *Nature Genet.* 27:209-214, 2001.
- ②Ciechanover, A., Gonen, H., Bercovich, B., Cohen, S., Fajerman, I., Israel, A., Mercurio, F., Kahana, C., Schwartz, A.L., Iwai, K. and Orian, A. : Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF-kappaB1 precursor protein p105. *Biochimie* 83: 341-349, 2001.

- ③Kawakami, T., Chiba, T., Suzuki, T., Yamanaka, K., Iwai, K., Minato, N., Hidaka, Y., Shimbara, N., Suzuki, H., Osaka, F., Omata, M., and Tanaka, K. : NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *EMBO J.* 20: 4003-4012, 2001.
- ④Okuda, H., Saitoh K., Hirai S.-I., Iwai, K., Takaki, Y., Baba, M., Minato N., Ohno, S. and Shuin, T. : The Von Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor Protein mediates Ubiquitination of Activated Atypical Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 276: 43611-43617, 2001.
- ⑤岩井 一宏, 齋藤 耕二郎 : pVHL ユビキチンリガーゼと発癌 実験医学・増刊号 タンパク質分解の最前線 19:44-49, 2001.
- ⑥山中 宏二, 岩井 一宏 : 鉄イオン代謝制御蛋白 IRP2 の活性制御メカニズム 別冊・医学のあゆみ 酸化ストレス フリーラジカル医学生物学の最前線 65-68, 2001.

## 2. 学会発表

- ①Iwai, K., Minato, N., and Yamanaka, K. Isolation of the candidate of E3, which recognizes oxidized IRP2. FASEB summer research conference "Ubiquitin and intracellular protein degradation" 2001 June, Saxton River, Vermont
- ②岩井 一宏, 山中 宏二, 湊 長博。 酸化 IRP2 を認識するユビキチンリガーゼ候補の同定。第 74 回日本生化学会大会、シンポジウム 2001。
- ③岩井 一宏。 IRP2 の鉄依存性酸化メカニズム と酸化 IRP2 を認識するユビキチンリガーゼの同定。文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究(B) : モディファイアータンパク質によるタンパク質分解の制御、公開シンポジウム : 蛋白質分解の最前線 2001。

# 研究成果一覽表

平成13年度 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ogawa, N. and Tanaka, K.	Potential of immunophilin-ligands for neuronal cell rescue.	Abe, K.	Molecular mechanism and therapeutics of amyotrophic lateral sclerosis	Elsevier	Amsterdam	2001	341-348
山中宏二, 岩井一宏	鉄イオン代謝制御蛋白IRP2の活性制御メカニズム	吉川敏一	酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線	医歯薬出版	東京	2001	65-68
浅沼幹人, 小川紀雄	酸化ストレスによる神経障害とその防御	吉川敏一	酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線	医歯薬出版	東京	2001	177-181

雑誌-1

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Asanuma, M., et al.	Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals.	J. Neurochem.	76	1895-1904	2001
Kondo, F., et al.	Progressive cortical atrophy after forebrain ischemia in diabetic rats.	Neurosci. Res.	39	339-346	2001
Aoki Sogawa, C., et al.	Localization, regulation, and function of metallothionein-III/growth inhibitory factor in the brain.	Acta Med. Okayama	55	1-9	2001

雑誌-2

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka, K., et al.	Immunosuppressive and non-immunosuppressive immunophilin ligands improve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced cell damage by increasing glutathione levels in NG108-15 cells.	Brain Res.	889	236-239	2001
Tanaka, K., et al.	FK506 ameliorates the discrimination learning impairment due to preventing the rarefaction of white matter induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats.	Brain Res.	906	184-189	2001
Tanaka, K., et al.	Molecular mechanism in activation of glutathione system by ropinirole, a selective dopamine D2 agonist.	Neurochem. Res.	26	31-36	2001
Hironaka, N., et al.	Memory related acetylcholine release from the rat prefrontal cortex and hippocampus: A microdialysis study.	Brain Res.	901	143-150	2001
Haque, Md.E., et al.	Relationship between locomotor activity and monoamines following single and double transient forebrain ischemia in gerbils.	Neurochem. Res.	26	401-406	2001
LaVaute, T., et al.	Targeted deletion of iron regulatory protein 2 causes iron overload and neurodegenerative disease in mice.	Nature Genet.	27	209-214	2001

## 雑誌-3

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ciechanover, A., et al.	Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF-kappaB1 precursor protein p105.	Biochimie	83	341-349	2001
Kawakami, T., et al.	NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase.	EMBO J.	20	4003-4012	2001
Okuda, H., et al.	The Von Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor Protein mediates Ubiquitination of Activated Atypical Protein Kinase C.	J. Biol. Chem.	276	43611-43617	2001
浅沼幹人, 小川紀雄	フリーラジカルと脳障害	Clinical Neuroscience	19	555-559	2001
小川紀雄, 浅沼幹人	酸化ストレスと神経細胞死	Clinical Neuroscience	19	665-667	2001
岩井一宏, 齋藤耕二朗	pVHLユビキチンリガーゼと発癌	実験医学	19	44-49	2001