

こと

### 3. 酵母 2 ハイブリッド方を用いて酸化 IDD ドメインを選択的に識別するユビキチンリガーゼ候補 HOIL-1 の同定

を明らかにしてきた。本年度は HOIL-1 の IRP2 蛋白質のユビキチン依存性分解における役割に関して研究を進めた。

## B. 研究方法

1. 細胞培養・トランスフェクション：HEK-293 細胞、Cos 細胞、RD4 細胞は DMEM+10%FBS にて培養した。HOIL-1 野生型および変異体 cDNA、IRP2 cDNA は Fugene6 トランスフェクション試薬を用いて細胞に導入した。

2. HOIL-1 抗体の作成：大腸菌を用いて発現させた GST-HOIL-1 キメラたんぱくを抗原として日本白色ウサギに免疫した。ウサギ血清を HOIL-1 カラムで精製したアフィニティー精製抗体を作成して実験に使用した。

3. in vitro ユビキチン化アッセイ：バキュロウイルス発現系を用いて作成した IRP2 蛋白質に試験管内でヘムと結合させ、基質として用いた。ユビキチン化反応は以前報告したごとく行った。

## C. 研究結果

### 1. HOIL-1 は IDD ドメインと鉄依存性に結合する。

昨年報告した様に HOIL-1 は 468 アミノ酸からなる蛋白質であり、N 末にユビキチン様ドメイン、C 末に RING フィンガードドメインを持つ蛋白質である。Cos 細胞を用いた overexpression 実験で HOIL-1 は IRP2 に鉄依存性に結合すること、HOIL-1 のユビキチン様ドメインが IRP2 との結合に重要な領域であることが示された。内在性の HOIL-1 と IRP2 との結合に関しては以下の実験系を用いた。ヒトには IRP2 と同様の機能を有し、高い相同性を有したファミリー蛋白質：IRP1 が存在する。IRP1、IRP2 とともに低鉄イオン

濃度下においてのみ RNA 結合活性を有する。IRP2 が鉄依存性分解によりその活性が制御されているのに対し、IRP1 は鉄濃度にかかわらず安定な蛋白質であり、鉄依存性の鉄-硫黄錯体の形成により制御されている。我々はヒト横紋筋肉腫細胞株 RD4 を用いた inducible-stable transformants を用いて相同領域に IDD ドメインを挿入した IRP1 変異体(IRP1+73)も IRP2 同様、鉄依存性に分解されることを示してきた。そこで IRP1、IRP1+73 を発現している RD4 細胞を用いて内在性 HOIL-1 と IRP2 との結合について抗 HOIL-1 抗体による免疫共沈法を用いて検索したところ、HOIL-1 は鉄存在下においてのみ、IRP2、IRP1+73 と結合した。それゆえ、HOIL-1 は IDD ドメインを鉄依存的に識別すると考えられた。

### 2. IRP2 はヘム結合蛋白質である。

IRP2 は鉄依存性に酸化修飾を受け、ユビキチン化することから、IRP2 は鉄濃度依存的に鉄と結合し、遺伝子発現を制御する鉄センサーとして機能する。鉄の蛋白質への結合にはヘム・鉄-硫黄錯体などが知られているが、IRP2 では鉄結合様式は明らかではなかった。IDD ドメインにはヘム結合に関与すると考えられるモチーフである CP モチーフ様の配列が存在するので、IRP2 にヘムが結合する可能性を検索した。バキュロウイルス発現系を用いて発現・精製した IRP2 に試験管内でヘムを添加したところ、ヘムの IRP2 への結合が確認された。また、培養液にヘムを添加して培養した IRP2 発現バキュロウイルス感染昆虫細胞から回収・精製した IRP2 に特異的なヘム結合が認められたことから、細胞内においても IRP2 にヘムが結合すると考えられた。また、試験管内において、ヘムは IDD ドメインに結合することから、ヘムは IDD ドメインで IRP2 に結合するものと考えられた。

### 3. HOIL-1 リガーゼはヘムにより酸化された IRP2 をユビキチン化する。

IRP2 にヘムが結合することから、HOIL-1

はヘムによって酸化された IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼである可能性が考えられる。そこで、試験管内でヘム結合 IRP2 を基質としたユビキチン化反応を行ったところ、HOIL-1 はヘム結合 IRP2 をユビキチン化したが、それ以外のユビキチンリガーゼではユビキチン化されず、リガーゼ活性を消失した HOIL-1 変異体もヘム結合 IRP2 をユビキチン化できなかった。また、HOIL-1 によるヘム結合 IRP2 のユビキチン化は酸素非存在下では有意に減弱された。

#### D. 考察

##### 1. IRP2 の鉄依存的ユビキチン化メカニズム

我々は昨年度、酵母 2 ハイブリッド法を用いて酸化 IDD ドメインを選択的に識別する蛋白質として HOIL-1 を同定していたが、本年度はその IRP2 のユビキチン化における役割について詳細な検討を進めた。その結果として、以下に示す IRP2 の鉄依存的ユビキチン化メカニズムの概略を明らかにできたと考えている。IRP2 はヘムを介して鉄を感知し、今回同定した IRP2 の酸化依存的ユビキチン修飾を担う HOIL-1 リガーゼはヘムと酸素の反応により酸化修飾を受けた IRP2 を選択的に識別しユビキチン化するというスキームである。IRP は哺乳類細胞における鉄代謝の主たる制御因子である。ヒトには IRP1 と IRP2 の 2 種の IRP が存在し、ともに低鉄イオン濃度下においてのみ、RNA 結合能を有することにより鉄代謝を制御している。IRP の RNA 結合活性は鉄により制御を受けている。IRP1 は鉄依存的な鉄-硫黄錯体の形成によって制御され留のに対し、IRP2 は我々の今回の発見で示されたごとく、ヘムによって制御を受けている。我々の基礎検討では細胞内において IRP2 は鉄-硫黄錯体合成により制御される IRP1 と同じ鉄イオン濃度で RNA 結合活性を失う。それゆえ、細胞のヘム合成と鉄-硫黄錯体合成とは細胞内鉄イオン濃度によって協調して制御されると考えられる。鉄代謝にはミトコン

ドリアが深く関与している。近年細胞質で鉄-硫黄錯体が生成される可能性も示唆されているが、原則的にはヘム・鉄-硫黄錯体ともにミトコンドリアにて形成される。ミトコンドリアで形成されるそれらの鉄の細胞質にある IRP による感知メカニズムの解明を通して、これまでに明らかにされていない、ヘム・鉄-硫黄錯体の輸送機構に迫りたいと考えている。

##### 2. HOIL-1 リガーゼによる酸化蛋白質の識別

今回の我々の発見の特筆すべきもう 1 つの点は HOIL-1 ユビキチンリガーゼが酸化修飾を識別するユビキチンリガーゼであることである。これまでに多くの蛋白質が酸化され、ダメージを受けることにより活性を消失し、分解されることが知られている。その分解系は神経変性疾患などに関与していると考えられており、ユビキチン系によると指摘されているが、その E3 は未同定である。一方、酸化修飾を受けた IRP2 が RNA 結合活性を保持していることから、IRP2 の酸化修飾は蛋白質ダメージではなく、機能変換シグナルである可能性もある。実際、バクテリア、酵母では酸化修飾が蛋白質の機能変換系として働いていることが知られている。それゆえ、HOIL-1 の酸化蛋白質 turnover における役割の検索により、酸化修飾の蛋白質機能制御の意義に迫れるのではないかと考えている。パーキンソン病などの神経変性疾患には酸化ストレス・ユビキチン系の関与が知られていることから、HOIL-1 リガーゼのそれら疾患における役割についての解析も進めたいと考えている。

#### E. 結論

我々が今回同定した HOIL-1 ユビキチンリガーゼは酸化蛋白質を選択的に識別するリガーゼとして初めて同定されたものであり、酸化修飾を選択的に識別するユビキチン修飾系の分子機構の少なくとも一部を明らかにしたものである。今後は酸化修飾を識別するユビキチン系のドパミン作動系神経における役割

の解析を進めてゆきたいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., Rouault, TA., Morishima, I., Minato, N., Ishimori, K. and Iwai, K. Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nature Cell Biology* in press.
- ② Sasaki, A., Masuda, Y., Iwai, K., Ikeda, K. and Watanabe, K. A RING finger protein Praj1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. *J. Biol. Chem.* 277: 22541-22546, 2002.
- ③ Amir, R. E., Iwai, K. and Ciechanover, A. The NEDD8 pathway is essential for SCF-beta-TrCP-mediated ubiquitination and processing of the NF- $\kappa$ B precursor p105. *J. Biol. Chem.* 277: 23253-23259, 2002.
- ④ Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K. and Tai, T. E3 ubiquitin-ligase that recognises sugar chains. *Nature* 418: 438-442, 2002.
- ⑤ Ashizuka, M., Fukuda, T., Nakamura, T., Shirasuna, K., Iwai, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano M. and Uchiumi, T. A novel translational control through Iron-Responsive Element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol. Cell. Biol.* 22:6375-6383, 2002.
- ⑥ 岩井 一宏, 恵 謙 pVHLユビキチンリガーゼとその基質認識メカニズム. 医薬ジャーナル 臨時増刊号 「Medical Front Line ユビキチン代謝系の破綻と疾病 —癌・免疫病から神経病まで—」 38: 34-39, 2002.

### 2. 学会発表

- ① 岩井 一宏, 徳永 文穂, 桐浴 隆嘉. 酸化蛋白質を識別するユビキチンリガーゼ:HOIL-1の解析. 第75回日本生化学会大会, 2002.
- ② Iwai, K. Identification of an ubiquitin-protein ligase recognizing oxidized proteins 3<sup>rd</sup> International Symposium of Autophagy, 2002.

# 研究成果一覽表

平成14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.	Cyclosporin-mediated amelioration of degeneration of dopaminergic neurons in experimental models of parkinsonism	Borlongan, C.V.	Immunosuppressant Analogs in Neuroprotection	Humana Press, Inc.	Totowa	2002	35-48
Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.	Blockade of late-onset reduction of muscarinic acetylcholine receptors by immunosuppressants in forebrain ischemia	Borlongan, C.V.	Immunosuppressant Analogs in Neuroprotection	Humana Press, Inc.	Totowa	2002	215-229

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
Higashi, Y., et al.	The p53-activated gene, PAG608, requires a zinc finger domain for nuclear localization and oxidative stress-induced apoptosis	J. Biol. Chem.	277	42224-42232	2002
Asanuma, M., et al.	Methamphetamine-induced increase in striatal p53 DNA-binding activity is attenuated in Cu, Zn-superoxide dismutase transgenic mice	Neurosci. Lett.	325	191-194	2002
Asanuma, M., et al.	Aggravation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic lesions in metallothionein-I and -II knock-out mouse brain	Neurosci. Lett.	327	61-65	2002

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
Yoshioka, M., et al.	The dopamine agonist cabergoline provides neuroprotection by activation of the glutathione system and scavenging free radicals	Neurosci. Res.	43	259-267	2002
Miyazaki, I., et al.	Age-related changes in expression of metallothionein-III in rat brain	Neurosci. Res.	43	323-333	2002
Tanaka, K., et al.	Neuroprotective and antioxidant properties of FKBP-binding immunophilin ligands are independent on the FKBP12 pathway in human cells	Neurosci. Lett.	330	147-150	2002
Tanaka, K., et al.	Effects of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in C6 glioma cells	Synapse	43	219-222	2002
Tanaka, K., et al.	GPII046 prevents dopaminergic dysfunction by activating glutathione system in the mouse striatum	Neurosci. Lett.	321	45-48	2002
Tanaka, K., et al.	Chronic cerebral hyperfusion induces striatal alterations due to the transient increase of NO production and the continuous depression of glutathione content	Neurochem. Res.	27	331-336	2002

## 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
Yamanaka, K., et al.	Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2	Nature Cell Biology			in press
Sasaki, A., et al.	A RING finger protein Praja1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1	J. Biol. Chem.	277	22541-22546	2002
Amir, R. E., et al.	The NEDD8 pathway is essential for SCF-beta-TrCP-mediated ubiquitination and processing of the NF-kappaB precursor p105	J. Biol. Chem.	277	23253-23259	2002
Yoshida, Y., et al.	E3 ubiquitin-ligase that recognises sugar chains	Nature	418	438-442	2002
Ashizuka, M., et al.	A novel translational control through Iron-Responsive Element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2	Mol. Cell. Biol.	22	6375-6383	2002
岩井一宏, 恵謙	pVHLユビキチンリガゼとその基質認識メカニズム	医薬ジャーナル	38	34-39	2002