ユビキチンシグナリングとその生物学的意義

村田 茂穂¹⁾²⁾ 田中 啓二¹⁾

〈要 約〉 ユビキチンは真核生物に高度に保存された76アミノ酸からなる小さなタンパク質である。ユビキチンはタンパク質に共有結合することにより、翻訳後修飾分子として作用するが、ユビキチンの結合の仕方には多様性が存在し、それぞれの伝えるシグナルが異なることが明らかとなってきた。最もよく知られているのが、ユビキチンの48番目のアミノ酸のリジン残基(K48)を介したポリユビキチン鎖がプロテアソームによる分解のシグナルになることである。このいわゆるユビキチン・プロテアソームシステムは細胞周期、シグナル伝達、免疫応答、タンパク質品質管理をはじめとした細胞のあらゆる現象に関与していると言っても過言ではない。一方で、最近急速に脚光を浴びつつあるのがユビキチン化が分解以外のシグナルを伝えることである。この場合はK48ではなくK63を介したポリユビキチン鎖やモノユビキチン化が、クロマチン制御、エンドサイトーシス、小胞輸送、DNA修復、キナーゼの活性化など実に多彩なシグナルの仲介因子となることが明らかになってきた。しかし、なぜこれらのユビキチン化がシグナルとなりうるのか、詳細なメカニズムは依然として謎に包まれたままであり、今後の研究の発展が待たれる。

Key words: ユビキチン, タンパク質分解, クロマチン制御, 膜輸送

(日老医誌 2004; 41: 254—262)

はじめに

ユビキチン(Ub)は76アミノ酸からなる小さなタンパク質で、その名のとおりに全ての真核生物にubiquitousに存在する。およそ20年前にユビキチンシステムがATP依存性タンパク質分解を司ることが明らかになって以来、その生物学的重要性はとどまることを知らない勢いで明らかにされつつある。それは細胞周期、癌、シグナル伝達をはじめ、あらゆる生命現象に及ぶ。さらに近年、ユビキチンがタンパク質分解以外に、エンドサイトーシス、キナーゼの活性化、クロマチン制御など様々な機能を仲介することが明らかになり、現在新たな局面を迎えている。本稿では、従来型の情報伝達分子のシグナル伝達に勝るとも劣らぬ多様な機能をユビキチンが媒介することから、ユビキチン修飾による機能変換を「ユビキチンシグナリング」と名付け、この単純な分子が如何にして多彩な機能を発揮するかについて概説したい。

ユビキチン

ユビキチンは酵母からヒトに至るまで非常に高度に保存された一次構造を有した8.6kDaの小さなタンパク質で、長短2個の α ヘリックスと5個の β シートが $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ の順に配位した、いわゆる“ユビキチンフォールド”構造を持っている(Fig. 1)。ユビキチンはリボソームタンパク質のN末端に融合した形でコードされた遺伝子と、ユビキチンがタンデムに複数個コードされたポリユビキチン遺伝子からいずれも前駆体として合成された後に、ユビキチンC末端加水分解酵素によって76番目のアミノ酸であるグリシンが露出するように切り出されることにより生成される。前者のリボソームと融合したユビキチンは、ユビキチンの生成のみならずリボソームの生合成を助ける¹⁾。また後者のポリユビキチン遺伝子は熱ショックなどの細胞ストレスに際し著しく転写が亢進し、ユビキチン分子が一気に大量合成される。これはユビキチンがストレス応答に非常に重要な役割を担うことを意味している。

ユビキチンがその存在価値を発揮するのは、標的タンパク質に共有結合し、シグナル分子として働くことによる。すなわち、ユビキチンのC末端のグリシン残基のカルボキシル基と標的タンパク質中のあるリジン残基(現在のところユビキチン化されるリジン残基に関して

The biological significance of the ubiquitin signaling

1) Shigeo Murata, Keiji Tanaka: 東京都臨床医学総合研究所・分子腫瘍学研究部門

2) Shigeo Murata: 独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ

```

*****.****:****:*****
sc MQIFVKILTKTTITLEVESDTIDNVKSKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGG
ce MQIFVKILTKTTITLEVEASDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGG
dm MQIFVKILTKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGG
hs MQIFVKILTKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGG
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....

```

Fig. 1 Alignment of ubiquitin from various eukaryotes and the tertiary structure of ubiquitin (upper panel) The conserved lysine residues are highlighted and enclosed with boxes.

sc, *Saccharomyces cerevisiae*; ce, *Caenorhabditis elegans*; dm, *Drosophila melanogaster*; hs, *Homo sapiens*

(lower panel) The conserved lysine residues are depicted.

特定のモチーフは知られていない)のεアミノ基が縮重してイソペプチド結合する。さらにこのタンパク質に結合したユビキチン中のリジン残基に新たなユビキチン分子のC末端が共有結合するという反応を繰り返すことにより“ポリユビキチン鎖”が形成される。ここで重要な点が、ユビキチン分子中に7個あるリジン残基(6, 11, 27, 29, 33, 48, 63番アミノ酸)のうちのどのリジン残基を用いてポリユビキチン鎖を形成するかにより、ユビキチンが意味するところが全く異なるということである。従来は7個のうちの5個(6, 11, 29, 48, 63)を介したユビキチン化が実際に知られていたが、最近酵母のプロテオーム解析により7個のリジン残基のすべてが利用されていることが判明した²⁾。しかし、それぞれが意味すること、すなわちどのようなシグナルとなっているのかはごく一部しか明らかになっていない。その中でも、最もよく知られているのが48番目のリジン残基(K48)を介したポリユビキチン鎖がプロテアソームへのターゲティングシグナルとなり、標的タンパク質を分解に導く“分解シグナル”になることである。また最近、

63番目のリジン残基(K63)を介したポリユビキチン鎖が分解とは全く関係のないシグナルとなることが次々と明らかとなってきた。一方、ユビキチンはただ一つの分子が標的タンパク質に共有結合した“モノユビキチン化”の状態でもさまざまな機能を発揮することが知られるようになり、分解以外のユビキチンの機能が次々と明らかになり始めている。

ユビキチンシステム

さて、どのタンパク質を、どのタイミングで、どのような形式のユビキチン化を行うかを決定するのが、ユビキチンシステムである。

ユビキチン化反応はE1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)、E3(ユビキチンリガーゼ)の三種類の分子による連続的な酵素反応により行われる(Fig. 2)³⁾。まずATP依存的にUbのC末端のグリシンとE1の活性中心のシステイン残基の間に高エネルギーチオエステル結合が形成され、ユビキチンが“活性化”される。活性化されたユビキチンはさらにATP依存的

Fig. 2 The ubiquitin system

The ubiquitylation of a target protein involved a sequential cascade of enzymatic activities that results in the formation of an isopeptide bond between the G76 residues of ubiquitin and the ϵ -amino group of a lysine residue in the target protein. This process starts with E1, which forms a thioester linkage with the G76 residue of ubiquitin. In the next step, the ubiquitin is passed to E2 through a thioester linkage. The E2 carries the activate ubiquitin to the ubiquitin ligase (E3), which facilitates the transfer of the ubiquitin to a lysine residue in the target protein. Subsequent round of conjugation add polyubiquitin chains to the target, with the type of chain formed determining the fate of the target protein. The action of de-ubiquitylating enzymes is responsible for recycling the ubiquitin back into the pool of free ubiquitin.

に E2 の活性中心であるシステイン残基に転移される。そして E3 は一般に標的タンパク質認識部位とともに E2 をリクルートするドメイン構造を併せ持っており、活性化された状態で E2 に保持されているユビキチン分子を標的タンパク質へ共有結合させるのに必須の分子である。E1 は酵母からヒトに至るまで Uba1 と呼ばれるた

だ一種類の酵素が担っている。E2 はヒトにおいてはゲノム上に十数種類存在する。ほとんどの E2 が E3 と協調して K48 ポリユビキチン鎖形成を主として触媒する一方、Ubc13 は Mms2 (Uev1A) という E2 様分子とヘテロダイマーを形成して、特定の E3 と協調して K63 ポリユビキチン鎖の形成を触媒する。このように多段階の

酵素反応にすることによって、高度の選択性と柔軟性を獲得しているといえる。

ユビキチン化反応において最も調節的な役割を果たすのが E3 であり、ヒトゲノム上に 1,000 種類近く存在すると推定される。この分子が標的タンパク質（基質）の選択とユビキチン化のタイミングを決定する。ほとんどの場合、E3 は標的タンパク質が何らかの修飾を受けた形を認識することが知られる。これまで明らかになっているのが標的タンパク質の特定の部位のリン酸化、水酸化、酸化、N 型糖鎖修飾などであり、細胞外シグナルや細胞内の環境に応じた標的タンパク質の修飾を認識して、E3 が標的タンパク質を捕捉しユビキチン化する^{4)~8)}。なお E3 と標的タンパク質の対応は必ずしも一対一ではなく、一つの E3 が複数のタンパク質を標的にしたり、逆に一種類のタンパク質が複数の E3 によりユビキチン化されることが知られている。このような場合の多くは E3 あるいは標的タンパク質は、局在が異なっていたり、標的タンパク質の修飾形態、ひいてはユビキチン化のタイミングが異なっていたりして、全くパラレルな経路が複数存在しているのではなく、状況に応じて使い分けられていると考えられる^{9)~12)}。

また標的タンパク質をユビキチン化する以外に、E3 自体が自己をユビキチン化することにより、自らを分解に導き機能する例も知られる¹³⁾。

E3 に関しては、ここ数年国内外で鎬を削る研究が展開されてきた。その結果、現在、ユビキチンリガーゼは活性ドメインの構造から大きく二つに分類される。一つは HECT 型 E3 で、もうひとつが RING 型 E3 である¹⁴⁾。HECT 型 E3 は、ユビキチンとチオエステル結合する活性システイン残基を含む約 350 アミノ酸からなる HECT 配列を有するリガーゼ群であり、ヒトゲノム上に 20 種類近くコードされている。RING 型 E3 は、亜鉛を結合するモジュール構造である RING-finger ドメインを有するリガーゼの総称名であり、ヒトゲノム上にはおよそ 300 種類コードされていると考えられている。この RING 型 E3 には構造的に類似する亜型が存在する。すなわち RING-finger に立体構造的に類似した U-box ドメインをもつ U-box 型 E3（7 種類）や PHD-finger ドメインを持つ PHD 型 E3（約 80 種類）である。ただし、PHD に関しては、RING と同様に Zn イオンを配位するような“亜型” PHD と古典的な PHD とで立体構造が異なると考えられ、前者が E3 活性を有するものと思われる¹⁵⁾。さらに、E3 は単一の分子ではなく複合体として機能を果たすことも多い。代表的な例が Cullin（Cul）ファミリーによる E3 複合体である。Cul はヒトでは Cul1、

2、3、4A、4B、5 の 6 種類が知られている。いずれの Cul も Rbx1（または Roc1）という小さな RING-finger 型タンパク質が複合体中に含まれ、E3 の活性中心を担っているが、注目すべきはこの複合体の基質認識サブユニットに大きな多様性が存在する点である。Cul1 ベースの E3 複合体には Skp1、Rbx1 の他に F-box ドメインを有するタンパク質が Skp1 依存的に会合し、いわゆる SCF 複合体を形成する¹⁶⁾。そしてこの SCF 複合体の基質認識は F-box タンパク質がもつ他のドメイン（WD40、ロイシンリッチリピートなど）により行われる。F-box タンパク質はヒトゲノム上に約 60 種類存在する。また Cul2、Cul5 は ElonginB、ElonginC、Rbx1 とともに SOCS-box タンパク質（8 種類）が基質認識サブユニットとして、Cul3 では BTB タンパク質（約 130 種類）が基質認識サブユニットとして働くことが知られる^{17)~21)}。Cul4 に関しては F-box、SOCS、BTB に相当するドメイン構造は未だ同定されていない。以上のようにゲノム上には夥しい数のユビキチンリガーゼと推定される遺伝子がコードされていることになる。ただし、当然のことながら、これらのモチーフを有する分子が必ずしもすべてユビキチンリガーゼであると証明されているわけではない。

また、これらのいずれにも類しない別種の E3 も報告されている。TAF_{II}250 は E1、E2 活性を内在すると考えられ、単独でヒストン H1 をモノユビキチン化する²²⁾。また脱ユビキチン化酵素として知られる UCH-L1 は逆反応によりユビキチン化酵素として働くことも知られ、この際には K63 ポリユビキチン鎖を形成する²³⁾。現在、E3 研究はタンパク質のタンパク質による修飾に基づいた機能変換の中心的役割を担う酵素として注目されており、研究の進展に伴って今後ますます E3 ファミリーは増大していくものと思われる。

さて、E3 の種類が非常に多いものの、いくつかの型に分類できることや、特定のドメインを持つこともわかってきた。しかし依然として、その E3 がどのタンパク質を標的とするのか、またどのようなパターンのユビキチン化を施すのかは現時点では一次配列からは全く予測できず、個々の E3 について労力と時間をかけて解析せざるを得ない。しかも期待通りに基質が得られる保証がないのが現状であり、この問題点を解決するブレークスルーが待たれる。

また E3 と E2 の組み合わせはどのように決定されるのか、ユビキチン化に際して、モノユビキチン化かポリユビキチン化かという決定はどのような仕組みでなされるのか、などユビキチン化についてはまだまだ解明すべ

き点が数多く残されている。

ユビキチン化が伝達するシグナル

1. 分解シグナル

既述の通り、K48 ポリユビキチン鎖はプロテアソームへのターゲティングシグナルとなり、標的タンパク質を分解へと導く。このポリユビキチン鎖が分解シグナルとなるためには4個以上のユビキチンが連なることが必要である²⁴⁾。これが如何にしてプロテアソームにより認識されるかであるが、大きく二つの経路に分類できる。ひとつが直接プロテアソームにより認識される経路で、現在19S複合体中のサブユニットであるRpn10とRpt5が直接ポリユビキチン鎖を捕捉すると考えられている²⁵⁾²⁶⁾。特にRpn10に関してはUIM (ubiquitin interacting motif) と呼ばれるドメインが存在し、ユビキチン表面のLeu8, Ile44, Val70からなる疎水性パッチと相互作用することが明らかとなっている。もう一つの経路がポリユビキチン鎖を認識するアダプター分子によりプロテアソームまで運ばれる経路である。アダプター分子としてRad23 (酵母)/hHR23 (ヒト) やDsk2 (酵母)/PLIC1・PLIC2 (ヒト) はポリユビキチン結合ドメインとしてUBA (ubiquitin-associated) ドメインを持つと同時に、Ubl (ubiquitin-like) というユビキチンと構造上高度に類似したドメインを併せ持ち、このドメインで19S複合体のRpn1サブユニットに結合することにより、UBAで捕捉したポリユビキチン化タンパク質をプロテアソームによる分解に導く。UBAドメインもUIMと同様にユビキチンの疎水性パッチと相互作用する^{27)~29)}。酵母においてRpn10欠損とRad23欠損の二重変異株はタンパク質分解に関し単独変異より強い表現系を示すことからRpn10とRad23は機能を一部補完しあっていることが推定されている^{30)~32)}。このようにしてプロテアソームに到達したK48ポリユビキチン化されたタンパク質は、19S中のATPaseサブユニット群により解きほぐされ、プロテアーゼ活性を有する複合体である20Sプロテアソームの内腔へと送り込まれ、タンパク質をオリゴペプチドまで分解する。また主要な形態ではないと考えられるが、K29ポリユビキチン鎖も分解シグナルとなることが知られる³³⁾。

ユビキチン・プロテアソームシステム (UPS) により分解される基質の種類は数限りない。おそらく大半の核内、細胞質タンパク質はこの経路により分解されると考えられる。また小胞体膜上または内腔で合成されるタンパク質のうち異常な構造を取ったものは、細胞質へ放り出されやはりユビキチン化されプロテアソームにより分

解される。これをERAD (endoplasmic reticulum associated degradation) と呼ぶ。UPSは細胞周期、シグナル伝達、タンパク質品質管理といったあらゆる細胞機能制御システムに深く関与しているのである。

2. 非分解シグナル

いわゆる“ユビキチン・プロテアソームシステム”と呼称されるように、ユビキチン化と分解はセットになっているかのような印象を強く与えていたのだが、近年になり分解以外の役割が次々と明らかになり始めており、現在ユビキチンの分野で非常にホットな話題となっている。

a. クロマチン制御

ヒストンH2AとH2Bがモノユビキチン化を受けていることは30年前から知られていたが、その意味するところは長い間謎であった。最近、Rad6 (E2) とRING-finger型E3であるBre1がヒストンH2Bの123番目のリジン残基をモノユビキチン化することが明らかとなり、さらにこのユビキチン化がヒストンH3の4番目と79番目のリジン残基のメチル化と、それに引き続く遺伝子発現抑制に必須であることが明らかとなった^{34)~37)}。そのメカニズムとしては、H2Bのモノユビキチン化はAPIS複合体 (プロテアソーム19S複合体の6つのATPaseサブユニットのみが形成した複合体)³⁸⁾をクロマチンにリクルートするために必要で、APIS複合体によるATP依存的なシャペロン作用によりクロマチン構造が緩まりメチル化酵素がアクセスしやすくなっていると推測されている³⁹⁾。また転写因子であるTFIIDのサブユニットの一つであるTAF (TATA-binding protein associated factor) II250は典型的なリガーゼドメインを持たないものの、ヒストンH1をモノユビキチン化する。このステップはショウジョウバエの発達において秩序正しい遺伝子発現に必須であることが知られる²²⁾。

b. 膜輸送

様々な細胞外からのシグナルは細胞表面の受容体チロシンキナーゼ (Receptor tyrosine kinases; RTKs) により細胞内へ増幅されながら伝達され、増殖シグナルや生存シグナルを伝える。その一方でこのシグナリングを終結させることは、細胞のトランスフォーメーションを抑制するために必須の機構である。それは、受容体のエンドサイトーシスとリソソームによる分解によって行われるが、このいずれにもユビキチン化が深く関わっている。例えばEGF受容体にリガンドであるEGFが結合すると、受容体の細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化され、それをRING-finger型ユビキチンリガーゼであるc-Cblが認識して複数のリジン残基でモノユビキチン化

(マルチモノユビキチン化) または K63 ポリユビキチン化される。ユビキチン化のシグナルを膜輸送変換するアダプター分子が Eps15 や epsin, Hrs と呼ばれる分子である。Eps15 や epsin は UIM によってユビキチンに結合すると同時に、クラスリンのアダプターである AP2 複合体と結合することにより、受容体をクラスリン被覆小胞へと取り込ませ、細胞膜から細胞質側へとエンドサイトーシスさせる⁴⁰⁾⁴¹⁾。このエンドサイトーシスの過程に必要なユビキチンシグナルはモノユビキチン化で十分であることが示されている^{42)~44)}。UIM がユビキチンに結合すると、ユビキチンの K48 を覆い隠し、K48 ポリユビキチン化を抑制し、プロテアソームによる分解経路に乗るのを防いでいると考えられている⁴⁵⁾。さらに興味深いことに UIM を有する分子自体がさらにモノユビキチン化を受けることが膜輸送に必須であることが知られており、“ユビキチンネットワーク”によりエンドサイトーシスを促進していることが示唆されている⁴⁶⁾。やがてクラスリンがはずれた小胞はエンドソームと融合するが、エンドソームにおいては、限界膜から小胞が内腔側に向かって陥入、出芽し、multivesicular body (MVB: 多胞体) が形成される。この際に、エンドサイトーシスされたタンパク質が限界膜に残るか、内腔へ向かうかの選別においてモノユビキチン化が重要な役割を果たしている。すなわち、エンドソーム上のタンパク質が細胞質側でモノユビキチン化されていると、Tsg (tumor susceptibility gene) 101 (哺乳類)/Vps23p (酵母) の UEV (ubiquitin E2 variant) ドメインと呼ばれる、E2 様の構造を持つが E2 活性を持たないドメインにより認識され、ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-I, II, III と呼ばれる複合体の働きにより MVB 小胞へ積み込まれる (Tsg101 も ESCRT-I のサブユニットのひとつである)。このことはトポロジー的に考えると、未だ細胞質側に露出されていた RTK の活性ドメインを遮断し、シグナルを終結させるという意味で非常に重要である。実際 c-Cbl の RING-finger の変異体は癌原遺伝子として働くが、この変異体発現細胞では RTK のエンドサイトーシスは正常に行われるものの、MVB 小胞への積み込みに異常を来している。MVB はやがてリソソームと融合し、積み荷タンパク質は分解される。

実は、MVB 小胞とトポロジー的に相同な現象がレトロウイルスの出芽である。つまりいずれの場合も中味が細胞質の小胞が細胞質外へ放出される。そして驚いたことに、ウイルスの出芽の際に MVB 形成と同じく ESCRT が利用されていることが明らかとなった^{47)~53)}。すなわち HECT 型 E3 である NEDD4 によりモノユビキチン化を

受けた gag タンパク質は ESCRT 複合体を細胞膜にリクルートし、それを利用してウイルス粒子が細胞外へと飛び出していくのである。HIV-1, HTLV-1, Ebola ウィルスなどがこの経路を利用していることが示されている。

c. キナーゼの活性化

NF κ B の活性化のためには TNF α や IL-1 などの炎症性サイトカインによる刺激に応答して、IKK (I κ B kinase) が I κ B をリン酸化し、リン酸化 I κ B は SCF ^{β TRCP} ユビキチンリガーゼ複合体により認識され、K48 ポリユビキチン化を受けた後にプロテアソームにより分解される。その結果、活性型 NF κ B がリリースされるというストーリーはよく知られるところであった。しかし驚いたことに、この過程に TRAF6 による自己 K63 ポリユビキチン化が必要であることが明らかとなった。IL-1 受容体に IL-1 β が結合すると、受容体に TRAF6 がリクルートされオリゴマー化し、引き続いて IKK が活性化される。この TRAF6 を介した IKK の活性化に必要な二種類の複合体を生化学的に精製すると、そのひとつが Ubc13/Uev1A の E2 複合体であった。そして TRAF6 の RING-finger 依存的に、TRAF6 自身が Ubc13/Uev1A の働きにより K63 ポリユビキチン化を受ける。もう一つの複合体は TAB1, TAB2, そして MAP3KK のひとつである TAK1 からなる複合体であった。TAB2 は TAK1 を TRAF6 へリクルートする役割を持ち、TRAF6 の K63 ポリユビキチン化依存的に TAK1 が活性化される。この TAK1 がさらに IKK を活性化するのである⁵⁴⁾⁵⁵⁾。この一連の TAK1 活性化経路にはプロテアソームは関与しない。即ち TRAF6 のユビキチン化はタンパク質分解に無関係である。しかし K63 ポリユビキチン鎖がいかにして TAK1 の活性化も引き起こすかは、まだ解明されていない。K63 ポリユビキチン鎖にも K48 ポリユビキチン鎖と同様に特異的なレセプターが存在するのか否かは未解明であるが、ユビキチンの K48 は自身の C 末に対して約 90° の位置に存在することから、K48 ポリユビキチンはコンパクトな形態をし、さらに open conformation と closed conformation の間で平衡状態にあって、open conformation をとり疎水性パッチを露出したときに認識されると考えられ、構造が特異的認識に一役買っていると考えられるが⁵⁶⁾、一方 K63 は C 末に対して正反対の位置にあり、K63 ポリユビキチン鎖は“伸びた”構造を取り K48 ポリユビキチン鎖とは全く異なった構造をとることが示されており⁵⁷⁾、認識機構も大きく異なると考えられている。

d. DNA 修復と複製

酵母の遺伝学から、K63 ユビキチン化とそれを司る Ubc13/Mms2 が DNA 損傷の修復に必須であることがわかってきた⁵⁸⁾⁵⁹⁾。そして最近、Ubc13 と Mms2 のヘテロダイマーは DNA 損傷に応答した PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の K63 ポリユビキチン化に必要であり、DNA の複製後修復に必須であることが明らかとなった。Rad6 (E2)/Rad18 (E3) がまず PCNA をモノユビキチン化するが、モノユビキチン化は error-prone 複製に向かわせる。さらに Ubc13/Mms2 と Rad5 (E3) により K63 ポリユビキチン鎖が伸張されると、error-free 複製に向かうのである⁶⁰⁾。このユビキチン鎖がどのようなメカニズムで DNA 修復に影響するかは不明である。

Fanconi 貧血の原因遺伝子のひとつ FANCD2 のモノユビキチン化は FANCL 遺伝子がコードする PHD-finger 型 E3 である PHF9 により行われるが、このモノユビキチン化が FANCD2 の核内 DNA 修復中心 (foci) および BRCA1/BRCA2 との共局在化に必要であり、DNA 損傷修復に働いていることが示されている¹¹⁾⁶¹⁾⁶²⁾。

e. その他

リボソーム L28 サブユニットの K63 ポリユビキチン化がリボソーム機能に重要な役割を果たしていることや⁶³⁾、Rsp5 (HECT 型 E3) による K63 ポリユビキチン化 (標的不明) がミトコンドリア遺伝に必須であることが知られている⁶⁴⁾。

また BRCA1/BARD1 E3 複合体による BRCA1 の自己ユビキチン化は K6 ポリユビキチン鎖であることが明らかとなり、少なくとも分解シグナルとして働いていないことが示されている⁶⁵⁾⁶⁶⁾。

BAG-1 は Hsp70 のコシャペロンの一つであるが、U-box 型ユビキチンリガーゼ CHIP により K11 ポリユビキチン化を受ける。これも分解シグナルとはならず、プロテアソームとの結合性を高めていると考えられている⁶⁷⁾。

おわりに

本稿では紹介できなかったが、ユビキチンシグナルを考える上で重要な点がユビキチン化は可逆的な反応であるということである。すなわち細胞内には数多くの種類の脱ユビキチン化酵素が存在し、ヒトゲノム上には約 60 種類コードされている。脱ユビキチン化酵素も基質特異性のある程度備えていると考えられており、一層巧妙かつ繊細にユビキチンシグナルが調節されていると予想される。またユビキチンと構造的に類似したユビキチン様修飾タンパク質がいくつか知られており、特に NEDD8

は Cul-based E3 の機能に必須であり、SUMO は独自の機能の他に、ユビキチン化と拮抗することも知られている。これらが複雑に絡み合っユビキチンシグナルを形成している。

K48 ポリユビキチン鎖の役割とそのメカニズムは、特異的受容体が見つかっていることもありかなり明確であるが、K63 ポリユビキチン鎖の果たす役割は既述の通り実に多岐にわたる現象に及び、統一的なメカニズムが非常に考えづらい。一つの要因は K63 ポリユビキチン鎖特異的な受容体が見つからないことにあろう。しかしそのようなものは存在せず、例えばユビキチン化タンパク質のコンフォメーションを変換することにより作用しているのかもしれない。その他のリジン残基を介したポリユビキチン化については全く手つかずの状態といっても過言ではなく、今後さらに解析が進むにつれ、ますますユビキチンシグナルの持つ意味の重要性が増大してくることが予想される。

文 献

- 1) Finley D, Bartel B, Varshavsky A: The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 1989; 338: 394—401.
- 2) Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, et al.: A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 921—926.
- 3) Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425—479.
- 4) Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al.: Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468—472.
- 5) Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al.: HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292: 464—468.
- 6) Yamanaka K, Ishikawa H, Megumi Y, Tokunaga F, Kanie M, Rouault TA, et al.: Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 336—340.
- 7) Iwai K: An ubiquitin ligase recognizing a protein oxidized by iron: implications for the turnover of oxidatively damaged proteins. *J Biochem (Tokyo)* 2003; 134: 175—182.
- 8) Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, et al.: E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 2002; 418: 438—442.
- 9) Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S: Degradation of p27 (Kip1) at the G₀-

- G (1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 48937—48943.
- 10) Nastasi T, Bongiovanni A, Campos Y, Mann L, Toy JN, Bostrom J, et al. : Ozz-E3, a muscle-specific ubiquitin ligase, regulates beta-catenin degradation during myogenesis. *Dev Cell* 2004 ; 6 : 269—282.
- 11) Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, et al. : Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 2003 ; 112 : 779—791.
- 12) Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W : Parc : a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 2003 ; 112 : 29—40.
- 13) Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD : Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000 ; 288 : 874—877.
- 14) Pickart CM : Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001 ; 70 : 503—533.
- 15) Swanson R, Locher M, Hochstrasser M : A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* 2001 ; 15 : 2660—2674.
- 16) Deshaies RJ : SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999 ; 15 : 435—467.
- 17) Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y : Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* 2003 ; 5 : 1001—1007.
- 18) Geyer R, Wee S, Anderson S, Yates J, Wolf DA : BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 2003 ; 12 : 783—790.
- 19) Krek W : BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* 2003 ; 5 : 950—951.
- 20) Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin TH, Vidal M, et al. : BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* 2003 ; 425 : 316—321.
- 21) Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JL, Srayko M, Kurz T, et al. : The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* 2003 ; 425 : 311—316.
- 22) Pham AD, Sauer F : Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 2000 ; 289 : 2357—2360.
- 23) Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT, Jr. : The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002 ; 111 : 209—218.
- 24) Piotrowski J, Beal R, Hoffman L, Wilkinson KD, Cohen RE, Pickart CM : Inhibition of the 26 S proteasome by polyubiquitin chains synthesized to have defined lengths. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 23712—23721.
- 25) Hofmann K, Falquet L : A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 2001 ; 26 : 347—350.
- 26) Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM : A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 2002 ; 416 : 763—767.
- 27) Wilkinson CR, Seeger M, Hartmann-Petersen R, Stone M, Wallace M, Semple C, et al. : Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 2001 ; 3 : 939—943.
- 28) Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, et al. : Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 2002 ; 4 : 725—730.
- 29) Kleijnen MF, Shih AH, Zhou P, Kumar S, Soccio RE, Kedersha NL, et al. : The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 409—419.
- 30) Saeki Y, Saitoh A, Toh-e A, Yokosawa H : Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 293 : 986—992.
- 31) Lambertson D, Chen L, Madura K : Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1999 ; 153 : 69—79.
- 32) Chen L, Madura K : Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 4902—4913.
- 33) Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A : A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 17442—17456.
- 34) Robzyk K, Recht J, Osley MA : Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 2000 ; 287 : 501—504.
- 35) Sun ZW, Allis CD : Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 2002 ; 418 : 104—108.
- 36) Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD : A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* 2003 ; 11 : 261—266.
- 37) Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, et al. : Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 2003 ; 11 : 267—274.
- 38) Sun L, Johnston SA, Kodadek T : Physical association of the APIS complex and general transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 296 : 991—999.
- 39) Ezhkova E, Tansey WP : Proteasomal ATPases Link Ubiquitylation of Histone H2B to Methylation of Histone H3. *Mol Cell* 2004 ; 13 : 435—442.

- 40) Shih SC, Katzmann DJ, Schnell JD, Sutanto M, Emr SD, Hicke L : Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 2002 ; 4 : 389—393.
- 41) Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madhus IH, Stang E, Stenmark H : Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* 2002 ; 4 : 394—398.
- 42) Hicke L, Dunn R : Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003 ; 19 : 141—172.
- 43) Hicke L : Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 195—201.
- 44) Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I : Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 2003 ; 28 : 598—603.
- 45) Shekhtman A, Cowburn D : A ubiquitin-interacting motif from Hrs binds to and occludes the ubiquitin surface necessary for polyubiquitination in monoubiquitinated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 296 : 1222—1227.
- 46) Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, et al. : A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 2002 ; 416 : 451—455.
- 47) Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG : AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 2003 ; 114 : 689—699.
- 48) Goila-Gaur R, Demirov DG, Orenstein JM, Ono A, Freed EO : Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* 2003 ; 77 : 6507—6519.
- 49) Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD : Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* 2003 ; 77 : 4794—4804.
- 50) Pornillos O, Alam SL, Rich RL, Myszkowski DG, Davis DR, Sundquist WI : Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *Embo J* 2002 ; 21 : 2397—2406.
- 51) Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, et al. : Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001 ; 107 : 55—65.
- 52) Perez OD, Nolan GP : Resistance is futile : assimilation of cellular machinery by HIV-1. *Immunity* 2001 ; 15 : 687—690.
- 53) Bonifacino JS, Traub LM : Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 2003 ; 72 : 395—447.
- 54) Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. : Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000 ; 103 : 351—361.
- 55) Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ : TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001 ; 412 : 346—351.
- 56) Varadan R, Walker O, Pickart C, Fushman D : Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol* 2002 ; 324 : 637—647.
- 57) Varadan R, Assfalg M, Haririnia A, Raasi S, Pickart C, Fushman D : Solution Conformation of Lys63-linked Di-ubiquitin Chain Provides Clues to Functional Diversity of Polyubiquitin Signaling. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 7055—7063.
- 58) Hofmann RM, Pickart CM : Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999 ; 96 : 645—653.
- 59) Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D : A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 1995 ; 15 : 1265—1273.
- 60) Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S : RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002 ; 419 : 135—141.
- 61) Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, et al. : Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002 ; 109 : 459—472.
- 62) Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, et al. : A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2003 ; 35 : 165—170.
- 63) Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D : Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 2000 ; 102 : 67—76.
- 64) Fisk HA, Yaffe MP : A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 1999 ; 145 : 1199—1208.
- 65) Wu-Baer F, Lagraron K, Yuan W, Baer R : The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 34743—34746.
- 66) Nishikawa H, Ooka S, Sato K, Arima K, Okamoto J, Klevit RE, et al. : Mass Spectrometric and Mutational Analyses Reveal Lys-6-linked Polyubiquitin Chains Catalyzed by BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 3916—3924.
- 67) Alberti S, Demand J, Esser C, Emmerich N, Schild H, Hohfeld J : Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 45920—45927.