最近の研究から

糖鎖認識ユビキチンリガーゼの立体構造から明らかになった
蛋白質分解のための糖鎖の役割

名古屋大学大学院工学研究科、科学技術振興機構さきがけ 水島恒裕

Tsunehiro MIZUSHIMA: The Role of Sugar Residues in Molecular Recognition by Ubiquitin Ligase

SCF^{Fbs1} is a ubiquitin-ligase that plays a role in the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. Fbs1/Fbx2, a member of the F-box proteins, recognizes high-mannose oligosaccharides. The structure of the sugar-binding domain-chitobiose complex includes hydrogen bonds between Fbs1 and chitobiose and insertion of the methyl-group of chitobiose into a small hydrophobic pocket of Fbs1. We propose that Fbs1 interacts with the chitobiose in unfolded *N*-glycoproteins, pointing the protein moiety toward E2 for ubiquitination.

1. はじめに

生体内においてリボソームより合成された蛋白質には、多くの折りたたみ異常が発生する。これら異常蛋白質が細胞外へ分泌されたり、細胞内に蓄積したりすることは細胞にさまざまな異常を引き起こす。小胞体内ではUPR (unfolded protein response) と小胞体関連分解 (ERAD) と呼ばれる厳格な蛋白質の品質管理機構がある。そしてUPRでは蛋白質の修復と合成抑制を行い、ERADでは異常蛋白質を積極的に細胞質に逆行輸送した後、プロテアソームが分解することにより排除している。SCF型ユビキチンリガーゼ (SCF^{Fbs1}) は、骨格分子 Cullin1、標的識別サブユニット F-box 蛋白質、F-box と Cullin1 のアダプター分子 Skp1、ユビキチン結合酵素と結合する Rbx1 からなるヘテロ4量体を形成した酵素である。SCF^{Fbs1} は標的識別サブユニット F-box が Fbs1 のものであることを示し、F-box を置換することにより多様性を獲得する。SCF^{Fbs1} はERADにおいて細胞質に逆行輸送された糖蛋白質に分解シグナルであるユビキチンを付加する役割を担っている^{3),4)}。SCF^{Fbs1} は分解すべき糖蛋白質の認識を行う際に品質管理においてトリミングされたN型糖鎖を目印にしており (図1)、蛋白質分解のために糖鎖を利用するという点でこれまでにない新しいタイプのユビキチンリガーゼであった。このように、SCF^{Fbs1} は生体内環境維持のため細胞質に戻された異常な糖蛋白質を、その糖鎖を目印として認識しユビキチンを付加することで分解へ導く酵素である。そしてこの新しく見つかった糖鎖の役割は細胞内環境を維持するために非常に重要であるだけでなく、その反応機構もこれまでに構造の知られているレクチンとは異なり糖鎖の根元部分を認識し結合しており構造生物学的にも興味深

図1 小胞体関連分解 (ERAD) の概略図. (Mechanism of the ERAD.) 小胞体で新生された蛋白質は小胞体シャペロンによりフォールディングを受け、正しい立体構造のものはゴルジ体以降の分泌経路に、ミスフォールディング蛋白質は細胞質に逆行輸送されユビキチンプロテアソーム系により分解される。■はGlcNAc, ●はマンノース, ▲はグルコースを示す。

い。そこで、本稿ではX線結晶構造解析により決定したSCF^{Fbs1}の糖鎖認識部位の立体構造⁵⁾と構造を基に行った、糖鎖認識機構およびSCF^{Fbs1}の機能の解明に関して紹介する。

2. 小胞体関連分解 (ERAD)

細胞内においてリボソームより合成された新生蛋白質の多くが高次構造の形成に失敗している。そのため細胞内にはシャペロンが存在し高次構造形成の補助を行っている。特に小胞体は分泌経路の入り口であるため異常蛋白質は細胞内に蓄積したり細胞外に分泌されたりした場合、生体にとって有害となる。そのため小胞体には高次構造形成

に失敗した蛋白質を選別し再生や分解を行うさまざまな機構が備わっており、その仕組みは品質管理と呼ばれている。品質管理機構はUPRと呼ばれる分子シャペロンによる構造修復、新生蛋白質合成の抑制機構、そしてERADと呼ばれる異常蛋白質の細胞質内への輸送およびプロテアソームによる分解機構から形成されている(図1)。そしてERADにおいて小胞体内の異常蛋白質の識別は多くの分子シャペロンが行っていると考えられている。これらの反応系に関してはまだ明確ではないが、糖蛋白質に関してはEDEM (ER-degradation enhancing α -mannosidase like protein) と呼ばれるマンノシダーゼ活性をもたないマンノシダーゼ様タンパク質が機能していることが知られている。そして、EDEMにより識別された異常蛋白質はSec61により小胞体に逆行輸送された後、ユビキチンリガーゼにより蛋白質分解シグナルであるユビキチンが付加されプロテアソームにより分解される。

3. ユビキチンシステム

細胞質に逆行輸送された異常蛋白質を識別する役割を担う反応系がユビキチンシステムである。ユビキチンシステムは分子量8,600 Daの小さな蛋白質ユビキチンを構造異常蛋白質など分解すべき不要蛋白質に付加していく反応である。この反応は、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)が以下の順に働いて行われる。^{6),7)} ①E1がユビキチンのC末端の活性化を行う。②E2がE1からユビキチンを受け取る。③E2がE3と複合体を形成するか、もしくはE3にユビキチンを渡す。④E3が不要蛋白質を認識し分解シグナルユビキチンの付加を行う。そして、①から④の反応を繰り返すことにより標的蛋白質に多数のユビキチンがつながったポリユビキチン鎖が形成される。ユビキチン鎖の結合した

図2 ユビキチン-プロテアソーム分解経路。(The ubiquitin-proteasome pathway.) Ub: ユビキチン, 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。

標的蛋白質はプロテアソームによりペプチドに分解される(図2)。この反応系においてE3は蛋白質のリン酸化、水酸化、蛋白質の変性などを目印にしていることがこれまでに報告されており、ユビキチンリガーゼの立体構造としてはリン酸化^{8),9)} や水酸化^{10),11)} を認識する構造が報告されている。

4. 試料調製、結晶化および構造解析

Fbs1の糖鎖認識部位(SBD: アミノ酸残基番号117-297)は数種類の欠失変異体を作製し精製蛋白質の糖鎖結合活性が確認できたうちの最小のものをを用いた。SBDはpET15b (Stratagene社)ベクターを用いて大腸菌による大量発現系を構築し構造解析に使用した。結晶化に用いた試料は大腸菌を37℃で培養し、超音波により破碎した後Hisタグを利用したアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを順に行い精製した。このように、精製した試料は透析、濃縮を行い蛋白質濃度約20 mg/mlに調製し結晶化に用いた。

Fbs1-SBDの結晶は1.7 M 硫酸アンモニウム、10 mM 塩化ニッケル、0.1 % PEG400、0.1 M Tris-HCl (pH8.5)を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法により作製した。得られた結晶は実験室系の測定装置RU-200 (RIGAKU)、R-Axis-IV (RIGAKU)を用いて回折実験を行い2.0 Å分解能までのデータを収集した。次に、Fbs1-SBDと基質であるキトビオースとの複合体結晶はソーキングや共結晶化では得られなかったため、Fbs1-SBD C132A変異体を用いた共結晶化により作製した。Fbs1-SBD、C132A変異体の結晶化は1.4 M 塩化ナトリウム、1.7 M 硫酸アンモニウム、0.1 M PIPES (pH 7.0)、30 mM キトビオースで行い2.4 Å分解能までのデータを収集した。結晶はFbs1-SBDが空間群P3₂2₁、格子定数 $a = b = 62.4$, $c = 117.2$ Åで非対称単位中に1分子、Fbs1-SBD C132Aキトビオース複合体は空間群P4₃2₁2、格子定数 $a = b = 63.8$, $c = 147.8$ Åで非対称単位中に1分子であった。構造解析は本酵素が新規構造であるため、重原子誘導体を作製し位相決定を行った。用いた重原子はHgが2種類、Au, Sm, Osの5種類でそれぞれ10 mMの濃度で3時間から1晩ソーキングし回折データを収集した。また、データ収集は重原子誘導体結晶の同型性を保つため室温で行った。位相決定はCCP4¹²⁾のプログラムMLPHAREにより行い、決定した位相はDMにより位相改良および2.0 Å分解能まで位相拡張を行った。その後ARP/wARPにより43-55番のループ領域を除いてモデルを構築した。このループ領域はFbs1-SBD基質複合体の構造解析では結晶系が異なったために構造決定することができ、複合体のループ構造を基にFbs1-SBDのループ領域の構造も決定した。しかし、この領域は高い温度因子を取っていた。基質複合体構造はFbs1-SBD構造をサーチモデルとしてAMoReによる分子置換法で決定した。それぞれ

表1 SBD データ収集と精密化. (Data collection, phasing and refinement statics.)

	Native	PCMBs ¹	NaAuCl ₄	SmCl ₃	OsCl ₃	HgNO ₃	Complex
Space group	<i>P</i> 3 ₂ 21						<i>P</i> 4 ₂ 2 ₂
Resolution Range (Å)	20-2.0 (2.11-2.00)	20-2.5 (2.64-2.50)	20-2.7 (2.85-2.70)	20-2.5 (2.64-2.50)	20-2.7 (2.85-2.70)	20-2.2 (2.32-2.20)	20-2.4 (2.53-2.40)
Observations	192305	100271	80395	59131	79742	96045	93981
Unique Reflections	18483	9577	7689	9633	7695	13725	12611
Completeness (%) (last shell)	99.9 (99.9)	99.8 (99.8)	99.8 (99.8)	99.8 (99.8)	99.8 (99.8)	98.6 (98.6)	99.8 (99.8)
Redundancy (last shell)	10.4 (10.1)	10.5 (10.6)	10.5 (10.6)	6.1 (6.2)	10.4 (10.5)	7.0 (6.9)	7.5 (7.2)
<i>R</i> _{sym} ¹ (%) (last shell)	9.5 (27.8)	12.5 (30.6)	9.9 (24.0)	13.5 (22.7)	14.3 (28.0)	14.4 (26.4)	8.5 (18.4)
<i>I</i> / σ (last shell)	4.4 (2.5)	4.4 (2.3)	6.0 (2.9)	3.9 (3.0)	3.7 (2.3)	3.2 (2.6)	6.4 (3.6)
MIR-AS phasing :							
Resolution (Å)		2.5	2.7	2.5	2.7	2.2	
Heavy atom sites		3	2	2	1	2	
Phasing power		1.37	0.89	0.76	1.71	3.31	
<i>R</i> _{culis} ²		0.8	0.84	0.88	0.69	0.46	
Refinement statistics :							
	Resolution (Å)	Reflections	Total Atoms	<i>R</i> -factor (%)	<i>R</i> _{free} (%)	Bond (Å)	Angle (°)
SBD	20-2.0 (2.05-2.00)	17470 (1241)	1602	15.5 (18.3)	19.2 (24.1)	0.022	1.8
SBD C132A + Chitobiose	20-2.4 (2.46-2.40)	11950 (847)	1562	20.0 (22.6)	25.6 (31.6)	0.038	2.9

¹ PCMBs: p-chloromercuriphenylsulfonic acid² $R_{sym} = \sum_h \sum_j |I_{hj} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_j I_{hj}$, where *h* represents a unique reflection and *j* is symmetry equivalent indices. *I* is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the mean value of *I*.³ $R_{culis} = \sum ||F_{phl}| \pm |F_{phl}| - |f_{phl}| / \sum ||F_{phl}| \pm |F_{phl}|$

の構造はREFMACを用いてFbs1-SBDは $R = 0.155$, $R_{free} = 0.192$, Fbs1-SBD 基質複合体は $R = 0.200$, $R_{free} = 0.256$ まで精密化を行った。また、Fbs1-SBDと基質複合体の立体構造は結晶系の違いにより生じる分子間相互作用によりN末端側の α ヘリックスの構造が少し異なっていたが、その部分を除いたr.m.s.dは主鎖で0.53 Åとほぼ同一であった。結晶学的データおよび精密化の統計値を表1に示す。

5. 全体構造

Fbs1-SBDの全体構造は楕円形で、基本構造は10本の逆平行 β シートからなる β サンドイッチ構造(図3)であった。このとき $\beta 7$ には途中で折れ曲がりが存在しシート構造が壊れていた。 β シート以外にはN末端、 $\beta 4$ と $\beta 5$ の間に2本の α ヘリックスが存在し、それらはともに基質結合側と反対に位置していた。また、Fbs1-SBDの立体構造中には結晶作製時に用いたNi原子がN末端のヘリックスに結合していた。そして、Fbs1-SBDの立体構造はこれまでに明らかにされたSCFユビキチンリガーゼにおけるリン酸化蛋白質を認識する基質認識部位のいずれの構造とも異なっていた。

Fbs1-SBDは新規ユビキチンリガーゼとして立体構造を決定したことから、全体構造の相同性を調べるためDALIサーバー¹³⁾を用いた類似構造検索を行った。その結果Galectin-3 carbohydrate recognition domain,¹⁴⁾ family 4 carbohydrate-binding modules of xylanase 10A¹⁵⁾といった糖鎖と結合する機能をもった蛋白質が見つかり、それぞれのr.m.s.dはともに2.8 Åであった(図4)。これら類似構造をもつ蛋白質はFbs1-SBDでは5本と5本の逆平行 β シートであったのに対し5本と6本の β シートで β サンドイッチ構造を形成していた。また、一次構造上はGalectin-3

図3 Fbs1 糖鎖認識部位の立体構造. (Tertiary structure of SBD in Fbs1.) (a) Fbs1 糖鎖認識部位のリボンモデル. (b) Fbs1, Fbs2 基質結合部位の一次構造比較. 一次構造の下に示した二次構造はFbs1の立体構造より決定したもの. 活性部位のアミノ酸は丸印で示している。

ートであったのに対し5本と6本の β シートで β サンドイッチ構造を形成していた。また、一次構造上はGalectin-3

図4 Family 4 carbohydrate-binding modules of xylanase 10A と Galectin-3 carbohydrate recognition domain の立体構造. (Structures of family 4 carbohydrate-binding modules of xylanase 10A and Galectin-3 carbohydrate recognition domain.) (a) Family 4 carbohydrate-binding modules of xylanase 10A の立体構造 (PDB ID: 1K42). (b) Galectin-3 carbohydrate recognition domain の立体構造 (PDB ID: 1A3K). これらは DALI による検索から見つかった Fbs1 基質認識部位と類似構造をとる蛋白質であり、それぞれ点線で示した β シート領域で基質と結合する. 右側は糖鎖結合部位を横から見た図を示している. (a) のボールアンドスティックモデルは基質結合に関与するアミノ酸 (b) のボールアンドスティックモデルは基質を示している.

carbohydrate recognition domain との類似性はほとんど見られなかったのに対し family 4 carbohydrate-binding modules of xylanase とではおよそ 20 % であった.

6. 糖鎖認識機構

Fbs1-SBD の糖鎖認識機構はキトビオースとの複合体による共結晶構造解析により明らかにした. 図5で示すようにキトビオースは SBD の先端領域のループに結合していた. これまでに立体構造の決定されたレクチンにおいて β サンドイッチ構造をとるものは DALI サーバーより見つかった以外にも多数報告されている. しかし, 分子中にカルシウムをもたないタイプではそのほとんどが β サンドイッチ構造中の β シート部分が大きく曲がった構造をとり (図4), その β シート領域で糖鎖と結合する. このことから SBD の糖鎖との結合様式は珍しいものであるといえる. 通常のレクチンが糖蛋白質の糖鎖の先端部分を認識しているのに対して SBD は根元部分のキトビオースを認識することで, 糖蛋白質の蛋白質領域と余分な相互作用を避けていると考えられる.

SBD によるキトビオース認識の分子機構は先端のループを形成する Phe177, Tyr279, Trp280, Lys281 で行われていた (図6). キトビオースは2分子の N-アセチルグル

図5 Fbs1 糖鎖認識部位基質複合体の立体構造. (Structure of SBD in complex with chitobiose.) 蛋白質の先端にあるループ領域で基質 (キトビオース) と複合体を形成.

コサミン (GlcNAc) が β 1-4 結合した構造をもつ2糖である. そして, キトビオースとこれらの残基の結合機構はキトビオースの片側の GlcNAc (A) が SBD の Trp280 の側鎖に重なって結合し, もう一方の GlcNAc (B) は NAc のアセチル基が Tyr177, Phe279, Lys281 から形成された小さい疎水性のポケットに入るといったものであった (図6a). 両者の結合の主要な相互作用はこれら疎水性相互作用であった. また, それ以外にも GlcNAc (A) は Lys281 の主鎖のカルボニルの O と, また水を介して Trp280 と水素結合

図6 Fbs1 活性部位の構造. (Active site structure of SBD in Fbs1.) (a) 活性部位の表面構造. (b) 活性部位のボールアンドスティックモデル. (c) 基質結合の有無による立体構造の違い. (d) Fbs1 基質結合部位の構造と糖蛋白質の糖鎖の構造. 標的となる糖蛋白質のマノース部分は Gly160, Thr215, Ala217 と相互作用する.

を形成し GlcNAc (B) では Lys281 の主鎖の N との水素結合が見られ、これらの水素結合により SBD と結合するキトビオースの配向が一定に維持されていた (図 6b). 通常蛋白質と結合しているキトビオースはそれぞれの NAc 基がトランス構造をとっている.¹⁶⁾ SBD に結合したキトビオースではトランス構造をとるとともに 2 つの GlcNAc 間で水素結合を形成することでより厳密に配向した結合となっていた. このように SBD がキトビオースの認識において厳密に糖鎖の配向を維持していることは、ユビキチンリガーゼとして糖蛋白質の蛋白質領域と糖鎖部分を決まった方向に提示するため不可欠な認識機構だと考えられる. また、SBD はキトビオース認識において分子表面の小さな疎水性ポケットで GlcNAc のアセチル基を認識することにより糖蛋白質のもつ糖鎖構造中のマノースと GlcNAc の識別を行っていた.

この疎水性ポケットは SBD に基質が結合することでポケットを形成する 3 つのアミノ酸 Phe177, Tyr279, Lys281 のうち Lys281 の側鎖が構造変化し図 6c で示すように側鎖がキトビオースのアセチル基を囲むようにポケットを形成していた. しかし Lys281 に関しては後述する変異体実験の結果より Ala にした場合にも糖鎖との結合活性が失われなかったこと、Lys281 とキトビオースの間に形成される水素結合は主鎖部分であることから、結晶構造で見られた側鎖の構造変化はキトビオースの結合に対してほとんど関与していなかった. 今回構造解析により見られた Trp に糖鎖が重なるような相互作用は蛋白質と糖鎖の結合様式として一般的であり、^{17), 18)} Fbs1 の SBD ではル

ープ領域という通常とは異なる場所で糖鎖と結合するが、その認識機構はよく知られたものであった.

Fbs2 は Fbs1 と同様にキトビオースと相互作用を示す Fbox 蛋白質として報告されている. これらは組織局在が異なるものの同じ働きをすると考えられている. しかし、その糖鎖結合活性は Fbs1 のほうが Fbs2 より強くキトビオースに結合することがわかっていた. この結合力の違いに関しても今回の構造解析よりその理由が推定できた. 図 3b に示すように一次構造上の活性部位における Fbs1 と Fbs2 の違いとして Fbs1 では Tyr279 の部位が Fbs2 では Phe になっている. Fbs1 の SBD 構造解析より Fbs1 では Tyr の側鎖 OH 基が Glu178 と水素結合を形成することにより疎水性ポケットが安定化されているのに、Fbs2 では側鎖が Phe であることから、水素結合が形成されずキトビオース結合のための疎水性ポケットの状態が異なるため結合が弱いと考えられる.

Fbs1 は糖蛋白質との結合において糖鎖のキトビオース部分を認識しており、キトビオースを含まないマノースだけでは結合しない. しかしキトビオースだけの場合よりその先に 3 分子のマノースが結合した糖鎖のほうが SBD との親和性が強くなることがわかっている. そのため SBD の構造中にはマノースを認識する低親和性の糖鎖結合部位が存在し糖鎖と糖蛋白質の配向を一定にしていると考えられる. そこで、SBD を用いてキトビオースだけの場合とキトビオースにマノースが 3 分子つながった糖鎖の場合との構造変化を NMR により測定した. その結果キトビオースだけでは構造変化を起こさず、マノース

ス加わった場合にのみ動きの見られたアミノ酸として Gly160, Thr215, Ala217が見つかった(図6d). 本来SBDはキトビオースのみでも、決まった配向に結合するがこの実験結果よりマンノース部分を認識することでより厳密な結合を行うとともに糖鎖との親和性を向上させていることが考えられる。

7. 活性部位変異体と活性

Fbs1のSBD構造解析より決定した立体構造を基に活性部位のアミノ酸変異体を作製し活性に与える影響を測定した(図7). SBDの糖鎖結合に関与するアミノ酸は立体構造から Phe177, Tyr279, Trp280, Lys281であったためそれらのアミノ酸をそれぞれAlaに変異させ、糖蛋白質との結合活性と *in vitro*でのユビキチン化活性を測定した. 活性測定はRNaseBをゲルに固定したプルダウンアッセイで行い、ユビキチン化活性は昆虫細胞より精製したSCF複合体を用いてGlcNAc-terminated fetuinのユビキチン化を測定した. その結果Trp280をAlaに変異させた物ではほとんど活性が消失しており Phe177, Tyr279の変異体でも結合活性は大きく減少していた. しかし、前述したようにLys281変異体では糖蛋白質に対する結合の減少が見られずLys281側鎖による疎水性ポケットの形成は補助的な役割であり、活性に影響するのは主鎖の水素結合のみであった. また、今回の構造解析では基質複合体結晶作製のためCys132のAla変異体を用いたことから、その活性も測定したがCys132ではWild Typeと同様のユビキチン化活性が見られ、機能に対する影響は見られなかった。

図7 Fbs1変異体における糖蛋白質との結合活性. (Residues required for interaction of Fbs1 and glycoproteins with high-mannose oligosaccharides.) (a) Fbs1変異体の糖蛋白質結合活性. (b) Fbs1変異体のSCF複合体形成時のユビキチン化活性.

8. SCF^{Fbs1} 複合体構造

Fbs1は本来SCF^{Fbs1}複合体として四量体を形成して機能している. Fbs1の役割は標的蛋白質と間違いなく結合し、その標的蛋白質のLys残基にユビキチンが付加されるように、SCF^{Fbs1}と複合体を形成したE2のユビキチンが結合した位置に正しく提示することである. そして、これまでにSCFユビキチンリガーゼの立体構造はFbox蛋白質としてSkp2,¹⁹⁾ Cdc4,⁸⁾ β-TrCP⁹⁾をもつものが報告されており、その結果Fbox蛋白質の基質結合領域とE2の活性部位Cys間の距離は約60 Åであることが示されている. SCFではこの空間に分解すべき標的蛋白質が位置することでユビキチン化が行われている. 今回構造を決定したSBDの立体構造では複合体を形成するために必要なFboxドメインを含んでいないため正確な複合体モデルを形成することはできない. しかし、糖鎖結合部位とE2の活性部位を約60 Åになるように配置した場合図8のような配置になると考えられる. このときキトビオース部分を認識することはキトビオースが糖蛋白質の最も蛋白質に近い部分の糖鎖であることから結合した標的蛋白質の配向を維持するためにキトビオースより先に位置するマンノースと結合するより適しているためだと考えられる.

また、最近の実験よりFbs1による糖蛋白質との結合は正しく折りたたまれた蛋白質より変性させた蛋白質において強く見られることが明らかとなった. これは、糖蛋白質が変性することにより修飾された糖鎖の根元部分のキトビオースが分子表面に現れるためであると考えられる. このようにFbs1による変性糖蛋白質を分解するための識別機構は非常に合理化されたものであることが示された.

図8 SCF^{Fbs1}複合体モデル. (Model of the SCF^{Fbs1}-E2 complex.) Fbs1は図のように複合体を形成することにより、ほかのSCFユビキチンリガーゼと同様に基質認識部位とE2の活性部位の距離が約50 Åとなる.

9. おわりに

ユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解経路は生体内において細胞周期の制御や品質管理など、蛋白質を分解することでさまざまな役割を担っている。特にユビキチンリガーゼは分解すべき蛋白質を特定する役割をもつことから、この反応経路中で最も興味深く活発に研究が進められている。今回われわれはX線結晶構造解析により SCF^{Fbs1} の糖鎖認識部位の立体構造を解析することに成功した。この構造は蛋白質分解のために糖鎖を利用するという新しい反応機構を構造学的に示すと同時に、糖鎖を認識することにより得られるさまざまな合理性を明らかにした。

本来 SCF ユビキチンリガーゼは複合体として機能する酵素であり、ここで示した構造では十分に理解できない部分も残っている。そのため現在複合体としての構造解析を行っており、それにより本研究では明確に示すことができなかった複合体構造などより詳細な反応機構の理解が深まることが期待される。

謝 辞

本研究は東京都臨床医学総合研究所、田中啓二副所長、吉田雪子博士、大阪大学蛋白質研究所、月原富武教授、名古屋市立大学、加藤晃一教授のグループによる共同研究として行われた結果であります。また、研究を進めるにおいてお世話になった多くの方々に感謝いたします。

文 献

- 1) B. Tsai, Y. Ye and T. A. Rapoport: *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 246 (2002).
- 2) L. Ellgaard and A. Helenius: *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181 (2003).
- 3) Y. Yoshida, T. Chiba, F. Tokunaga, H. Kawasaki, K. Iwai, T. Suzuki, Y. Ito, K. Matsuoka, M. Yoshida, K. Tanaka and T. Tai: *Nature* **418**, 438 (2002).
- 4) Y. Yoshida, F. Tokunaga, T. Chiba, K. Iwai, K. Tanaka and T. Tai: *J Biol Chem* **278**, 43877 (2003).
- 5) T. Mizushima, T. Hirao, Y. Yoshida, S. J. Lee, T. Chiba, K. Iwai, Y. Yamaguchi, K. Kato, T. Tsukihara and K. Tanaka: *Nat Struct Mol Biol* **11**, 365 (2004).
- 6) A. Herskho, A. Ciechanover and A. Varshavsky: *Nat Med* **6**, 1073 (2000).

- 7) C. M. Pickart: *Annu Rev Biochem* **70**, 503 (2001).
- 8) S. Orlicky, X. Tang, A. Willems, M. Tyers and F. Sicheri: *Cell* **112**, 243 (2003).
- 9) G. Wu, G. Xu, B. A. Schulman, P. D. Jeffrey, J. W. Harper and N. P. Pavletich: *Mol Cell* **11**, 1445 (2003).
- 10) J. H. Min, H. Yang, M. Ivan, F. Gertler, W. G. Kaelin Jr and N. P. Pavletich: *Science* **296**, 1886 (2002).
- 11) P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe: *Science* **292**, 468 (2001).
- 12) *Acta Cryst. D* **50**, 760 (1994).
- 13) L. Holm and C. Sander: *J Mol Biol* **233**, 123 (1993).
- 14) J. Seetharaman, A. Kanigsberg, R. Slaaby, H. Leffler, S. H. Barondes and J. M. Rini: *J Biol Chem* **273**, 13047 (1998).
- 15) P. J. Simpson, S. J. Jamieson, M. Abou-Hachem, E. N. Karlsson, H. J. Gilbert, O. Holst and M. P. Williamson: *Biochemistry* **41**, 5712 (2002).
- 16) A. J. Petrescu, S. M. Petrescu, R. A. Dwek and M. R. Wormald: *Glycobiology* **9**, 343 (1999).
- 17) N. K. Vyas: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 732 (1991).
- 18) F. A. Quiocho: *Annu Rev Biochem* **55**, 287 (1986).
- 19) B. A. Schulman, A. C. Carrano, P. D. Jeffrey, Z. Bowen, E. R. Kinnucan, M. S. Finnin, S. J. Elledge, J. W. Harper, M. Pagano and N. P. Pavletich: *Nature* **408**, 381 (2000).
- 20) N. Zheng, B. A. Schulman, L. Song, J. J. Miller, P. D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D. M. Koepp, S. J. Elledge, M. Pagano, R. C. Conaway, J. W. Conaway, J. W. Harper and N. P. Pavletich: *Nature* **416**, 703 (2002).

プロフィール

水島恒裕 Tsunehiro MIZUSHIMA
名古屋大学大学院工学研究科、科学技術振興機構
さきがけ
Graduate School of Engineering, Nagoya University
〒464-8603 名古屋市千種区不老町
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan
e-mail: mizushi@hix.nagoya-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士後期過程修了（1999年）
専門分野：構造生物学、蛋白質結晶学
現在の研究テーマ：ユビキチン-プロテアソーム
システムの構造生物学的研究