酸素濃度応答にはタンパク質分解が必要？ Ubr1 様ユビキチンリガーゼの重要性

細胞内の酸化還元状態は一定レベルに維持されており、その乱れは疾病の一因ともなる。生存を酸素に依存する多くの生物では、ミトコンドリアでのATP生成時に生じる活性酸素種のほか、細胞内外のさまざまな酸化ストレスに常に対処している。微生物や植物では、雨天時の水没など逆に突発的な低酸素状況が起こりうる。さらに動物でも体内の酸素濃度は均一ではなく、哺乳類の骨髄中をはじめさまざまな組織の幹細胞が存在するいわゆる「幹細胞ニッチ」はほかよりも低酸素環境とされ、また血管が十分に発達せず酸素供給が不足する腫瘍組織内部でもがん細胞は旺盛に生育するなど、生物は低酸素状態に対応するすべも備えている。酸化ストレス時や低酸素状態では、通常の酸素濃度下の細胞とは遺伝子発現や細胞内代謝が劇的に変化するが、その応答に中心的な役割をもつ転写因子は、必要時以外は機能しないよう、タンパク質分解などにより厳密に制御されている。酸素濃度応答とタンパク質分解と言えば、哺乳類ではがん抑制遺伝子産物の von Hippel-Lindau (VHL) タンパク質を含むCul2複合体によるHIF- α (低酸素応答に必須の転写因子) の分解や、Keap1-Cul3複合体によるNrf2 (高酸化ストレス応答にかかわる転写因子) の分解がよく知られている^(1,2)。両転写因子の分解不全ががん化と密接に関係することからもタンパク質分解の重要性は明白だが、酵母など真核微生物や植物ではこれら因子が保存されていないことからすると、酸素濃度応答における分解の重要性は一般的ではないのだろうか？

発症に関する基質などの詳細はまだ不明だが、ヒトのJohanson-Blizzard syndromeはUbr1 タンパク質の機能低下が原因で起こる。Ubr1は真核生物に保存されたユビキチンリガーゼで、われわれが調べている分裂酵母*S. pombe*ではUbr1は生育に必須の遺伝子ではないが、その機能欠損細胞では高酸化ストレスにさらされていない条件でも一部の酸化ストレス応答遺伝子の発現量が増加することを見つけている⁽³⁾。抗酸化酵素を含むさまざまな遺伝子の発現に必要で酸化ストレス応答の鍵を握るbZIP型転写因子のPap1は、通常酸素濃度下では細胞質に存在するが、活性酸素種増加時など高酸化ストレス条件では核内に保持されるようになり、標的遺伝子の発現

を誘導する。しかしながら高酸化ストレスへの適応後は、この非常時の状態を維持し続けることは無駄であり、Pap1の活性化は終息に向かう。この際、Pap1の核から細胞質への移行促進に加え、核内のPap1はUbr1の機能に依存してプロテアソームで積極的に分解されている⁽³⁾ (図1, 分裂酵母)。ジエチルマレイン酸など一部の親電子性物質はPap1に共有結合し、その核外移行を積極的に妨げて核内にとどめ続けるため、二重の抑制機構をもつことは理に適っている。*ubr1*欠損細胞ではPap1タンパク質量が増加しているが、核外移行とタンパク質分解は実際にPap1機能の抑制に互いに補完的で、両経路がともに働かずPap1が恒常的に活性化すると酸化ストレスとは無関係に致死となる⁽³⁾。逆に低酸素状態での分裂酵母細胞の生存には、哺乳類のsterol regulatory-element binding protein (SREBP) に類似するSre1が小胞体膜上で切断され、そのN末端領域(Sre1N)が遊離して核に移行し、転写因子としてステロール合成を含めさまざまな遺伝子の発現を誘導することが必須である。細胞が通常の酸素濃度に戻るとSre1Nは不活性化されるが、興味深いことに、この際にもUbr1に依存してSre1Nが分解される⁽⁴⁾ (図1, 分裂酵母)。高酸化ストレス、低酸素と全く反対の応答とは言え、Pap1, Sre1Nのいずれも細胞内の酸素レベル変化に応じてUbr1に依存して分解されることから、ここでも酸素濃度応答とタンパク質分解の関連が示唆されたわけである。

もともとUbr1は、タンパク質の安定性とそのタンパク質自身のN端のアミノ酸のみの違いで劇的に異なる現象の分子基盤である、タンパク質分解のN末端則経路(N-end rule pathway)に必須のユビキチンリガーゼとして発見された。真核生物のN末端則は、基質タンパク質のN末端アミノ酸をUbr1様タンパク質が認識してユビキチン化し、プロテアソームで分解することで起こる⁽⁵⁾。その基質や生理機能については理解が進みつつあるが、N末端則経路の必須因子(Ubr1に相当するPtr6など)を欠くシロイヌナズナが、低酸素応答遺伝子群を恒常的に発現していることが見いだされた^(6,7)。これらの遺伝子は、低酸素応答に重要な一群の転写因子、VII型ERF(ethylene response factor)により転写誘導さ

れるが、Rap2.12などのVII型ERFを野生型植物に強制発現しても、標的遺伝子の発現量は低酸素条件下でのみ増加するため、酸素濃度による制御機構に興味をもたれた。VII型ERFは翻訳後にN端のメチオニンが切断され、本来2番目のシステインが成熟タンパク質のN端になるが、通常の酸素濃度ではN端システインのSH基が酸化され、この酸化システインが目印となって転写因子がN末端側経路でユビキチン化されて分解されていた^(6,7) (図1, 植物)。一部のVII型ERF転写因子 (HRE2など) は低酸素状態で安定化しタンパク質量が増加するが、N末端側経路を欠損する植物では、分解不全が原因でVII型ERF群が常に安定化するために通常酸素濃度でも恒常的な低酸素応答を示す。N端システインをアラニンに置換した変異転写因子は通常酸素濃度でも分解されずに標的遺伝子を活性化した。これら安定型転写因子を発現する植物は低酸素状態での生存性が向上しており、これはN末端側経路の必須遺伝子欠損による安定化でも同様だった⁽⁶⁾。調べた生育段階や評価方法の違いで単純な比較は難しいが、安定型転写因子を強発現した植物体の成育は酸素濃度によらず野生型より悪いとの報告もあり⁽⁷⁾、低酸素応答が不必要時にまで恒常的に続くと細胞の酸化還元状態のホメオスタシスにアンバランスが生じ、生育をかえって阻害するのかもしれない。哺乳動物でも、酸素や一酸化窒素の存在下でN端のシ

ステインが酸化されたRGS4 (三量体Gタンパク質の活性制御因子) などがN末端側経路で分解されることが報告されており⁽⁸⁾ (図1, マウス・ヒト)、N端システインの酸化状態とN末端側経路による分解が酸素のセンサーとして働く可能性が指摘されている。

しかしながら、通常酸素濃度条件下でのN端システインの酸化が受動的に起こるのか、あるいは酸素濃度により何らかの制御を受けているのかは定かではない。また、ほかのVII型ERF転写因子とほぼ同じN端部の配列をもちながら、イネのSUB1Aは*in vitro*の分解評価系では通常酸素濃度でも安定な一方で、シロイヌナズナのHRE1は低酸素下の植物体でも安定化しない (ただしN末のアラニン変異体は通常酸素濃度でも安定化する) など個々の転写因子で挙動が異なっており⁽⁶⁾、分解の制御は一様ではないことが示唆されている。局在による制御も見られ、前出のRAP2.12 (VII型ERF) は実は恒常的に発現していながら、低酸素にさらされる前は Acyl CoA binding protein (ACBP) と結合して細胞膜にアンカリングされて分解から保護されており、低酸素下で核内移行し活性化したRAP2.12のみが、植物体が通常酸素濃度に戻った後にN末端側経路で分解される⁽⁷⁾。分裂酵母でも、Pap1の核局在は分解の必要十分条件ではなく⁽³⁾、またSre1Nの分解にも別のタンパク質 (Ofd1) が必須であり⁽⁴⁾、分解はより高度な制御を受けているらし

図1 ■ 酸素濃度変化応答制御におけるUbr1様ユビキチンリガーゼの役割

酸素濃度変化によるN端のシステインの酸化 (*Cys) がシグナルとなり、Ate1の転移活性によりさらにアルギニンが新たに付加された後 (Arg*Cys), N末端側経路 (NeRP) のユビキチンリガーゼ (動物はUbr1/Ubr2, 植物ではPrt6) が標的タンパク質をポリユビキチン化してプロテアソームによる分解を誘導する。分裂酵母ではシステインの酸化とN末端側経路には無関係だが、酸素濃度変化応答を制御する転写因子の分解にはUbr1の機能が必要。

い。動植物においてN末端の酸化システインがN末端則経路による分解シグナルになる場合、実際には酸化システインのN端にAte1がさらにアルギニンを付加し、Ubr1はこの新たなN端のアルギニンを認識して分解を誘導する⁽⁵⁾。Ate1によるアルギニン付加は、N端のアスパラギン(酸)かグルタミン(酸)がN末端則経路分解シグナルの場合でも必須である。Ubr1様タンパク質によるユビキチン化反応やN末端則経路による分解自体が酸素濃度による調節を受けているかは未解明だが、3価の鉄を含む heme (Fe^{3+} -heme) がAte1と結合してその転移酵素活性を阻害する(2価の Fe^{2+} -hemeでは阻害されない)など、Ate1の機能がheme中の鉄の酸化状態に影響される可能性が示されている⁽⁹⁾。またhemeはUbr1とも結合し、少なくとも*in vitro*ではN末端酸化システインとは無関係な基質(出芽酵母のCup9)の認識を妨げるため⁽⁹⁾、Ubr1-N末端則経路による分解は間接的に酸素濃度の影響を受けるのかもしれない。

動植物とは異なり、実は酵母ではN端システインの酸化はN末端則経路の分解シグナルではない⁽⁵⁾。さらに分裂酵母のN末端則経路は、相同性は高いがUbr1とは機能の重複がないUbr11が担っており、Ubr1自体はN末端則経路には関与しないが、Ubr1は低酸素条件下での分裂酵母の生育に必須であり(未発表)、真核生物に保存されたUbr1様ユビキチンリガーゼの重要性がうかがわれる。分解される標的タンパク質やN末端則経路の

関与など状況は個々の生物で異なっているとはいえ、動物・植物・微生物(分裂酵母)のいずれでも共通に見つかった酸素濃度応答制御におけるUbr1様ユビキチンリガーゼの関与が、単なる偶然の一致か、あるいは何らかの必然性が隠れているのか、今後の課題である。

- 1) 中山 恒: 実験医学, **29**, 141 (2011).
- 2) 村上昌平, 本橋ほづみ: 細胞工学, **31**, 144 (2012).
- 3) K. Kitamura *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **80**, 739 (2011).
- 4) C. Y. Lee *et al.*: *Mol. Cell*, **44**, 225 (2011).
- 5) A. Varshavsky: *Protein Sci.*, **20**, 1298 (2011).
- 6) D. J. Gibbs *et al.*: *Nature*, **479**, 415 (2011).
- 7) F. Licausi *et al.*: *Nature*, **479**, 419 (2011).
- 8) R. G. Hu *et al.*: *Nature*, **437**, 981 (2005).
- 9) R. G. Hu *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 76 (2008).

(北村憲司, 広島大学自然科学研究支援開発センター)

プロフィール

北村 憲司 (Kenji KITAMURA)

<略歴> 1986年大阪市立大学理学部生物学科卒業/1988年大阪市立大学理学研究科前期博士課程修了, 同年後期博士課程中途退学(1993年理学博士)/1988~1994年大阪市立大学医学部助手/1994年~現在, 広島大学遺伝子実験施設(2003年自然科学研究支援開発センターに改組)<研究テーマと抱負>ユビキチン依存性タンパク質分解による生理機能制御。酵母という単純ながら奥の深い微生物を使ってユビキチンリガーゼの機能のほか、細胞内の複雑な現象に迫りたい<趣味>読書, 散歩