

## 学位論文題名

新規ユビキチン結合タンパク質シンテニンの  
生化学的解析

## 学位論文内容の要旨

**【背景と目的】** ユビキチン化は真核細胞においてタンパク質にユビキチン (Ub : ubiquitin) が付加する翻訳後修飾であり、タンパク質の寿命の決定や細胞内輸送など多様な生命活動に重要な役割を果たしている。ユビキチンは、活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2) およびリガーゼ (E3) から構成されるユビキチンシステムによって標的タンパク質に共有結合される。一方、ユビキチンに結合するタンパク質 (ユビキチン結合タンパク質) がこれまで同定されている。ユビキチン結合タンパク質はユビキチン化されたタンパク質上のユビキチンに非共有結合で相互作用し、ユビキチン化タンパク質の機能、安定性、または局在の決定などに重要な役割を果たしている。その中、モノユビキチン化されることにより、ユビキチン化タンパク質がエンドサイトーシスされる報告があるが、モノユビキチンタンパク質のメカニズムに関しては不明な点が多い。本研究ではプロテアソームへのターゲットシグナル以外のユビキチンの役割、特にモノユビキチン化の機能を明らかにするため、モノユビキチン結合タンパク質の同定を試みた。

**【材料と方法】** 酵母株 L40 を使用して酵母 two hybrid 法スクリーニングを行った。酵母 two hybrid 法の bait はユビキチン変異体 Ub (K48R/G76A) であり、ライブラリーはマウス T 細胞リンパ腫 cDNA ライブラリーである。哺乳類細胞内結合を検討するため、HEK293T 細胞株に FLAG-syntenin と HA-Ub を導入し、免疫沈降し、ウエスタンブロット解析を行った。タンパク質の安定性を検討するため、HEK293T 細胞に FLAG-syntenin を導入し、cycloheximide で処理後、各時間におけるタンパク質抽出液を調整しウエスタン解析を行った。

**【結果】** Ub (K48R/G76A) に結合するタンパク質を  $8 \times 10^5$  個のマウス T 細胞リンパ腫 cDNA ライブラリーからスクリーニングした結果、9 個の陽性クローンが得られた。このうち二つはマウスのシンテニンと同一であった。哺乳類細胞内でシンテニンとユビキチンの結合を検討するために、HEK293T 細胞に FLAG-syntenin と HA-Ub を導入し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 HA 抗体でウエスタン解析を行った。この結果、シンテニンがユビキチンと共有結合および非共有結合で哺乳類細胞内では結合していることが示唆された。これらの結合はユビキチンの 48 番目のリシン依存性かどうかを検討した結果、ユビキチンの 48 番目のリシン以外の部位でも行われていることが示唆された。シンテニンとユビキチンの非共有結合はユビキチンの C 末端のグリシン依存性かどうか

かを検討するためユビキチン変異体 Ub ( $\Delta$ GG) (75 と 76 番目の Gly を欠損させたもの) 作製した。免疫沈降実験により検討した結果、シンテニンのユビキチンとの非共有結合はユビキチンの C 末端部分のグリシン依存性であった。シンテニンのユビキチン結合部位を同定するため、PDZ 欠損シンテニンと N 末欠損シンテニンの変異体を作製した。免疫沈降実験により検討した結果、シンテニンがユビキチンと非共有結合で相互作用するドメインはシンテニンの N 末部分であることが示唆された。次に、ポリユビキチン鎖を特異的に認識する抗体 FK2 を利用して、哺乳類細胞内でシンテニンとユビキチンとの結合を解析した結果、細胞内でシンテニンは内在性もしくは外来性いずれのユビキチンによってもポリユビキチン化を受けていることが示唆された。シンテニンの安定性を調べた結果、cycloheximide 処理 24 時間後でもシンテニンは安定して存在していることがわかった。シンテニンのポリユビキチン化は分解シグナルではないことが示唆された。

【考察】ユビキチン結合タンパク質はユビキチンと非共有結合で相互作用することによってユビキチン化タンパク質の機能や寿命を決定し、さまざまな細胞プロセスに関与している。シンテニンは細胞内でモノユビキチン化タンパク質として機能することが示唆された。しかし、これまでに、ユビキチン結合タンパク質のユビキチン結合ドメインがいずれの UBD もユビキチンの 44 番目のイソロイシンを中心とする疎水性バッチの  $\beta$  シート面に結合するものであった。これに対して、シンテニンが結合するユビキチンの C 末端は新規の結合部位である。一般にタンパク質のユビキチン化修飾もユビキチンの C 末端を介することから、シンテニンは、ユビキチンの C 末端以外で相互作用している他のユビキチン結合タンパク質にユビキチンを介して結合している可能性が考えられる。シンテニンは構造上の特徴は二つの PDZ ドメインで膜タンパク質の C 末部分と細胞質側で相互作用しエンドサイトーシスなどの細胞膜輸送、細胞骨格と膜の編成、癌転移、シナプス伝達、そして軸索伸長などさまざまな細胞活動に関与することが報告されている。シンテニンはモノユビキチンと結合することによってこれらの現象を調節している可能性が考えられた。リサイクリングとリソゾームへの輸送は膜タンパク質による時空間的なシグナル伝達を制御する重要な過程と考えられる。ユビキチンと PDZ タンパク質はリソゾームとリサイクリングへの輸送に関与している。膜タンパク質のユビキチン化はリソゾームへのシグナルであり、PDZ タンパク質と膜タンパク質の相互作用は膜タンパク質をリサイクリングするシグナルであると考えられている。PDZ タンパク質としてのシンテニンも膜タンパク質シンテニンのリサイクリング制御することがわかっている。本研究により、シンテニンはユビキチンとの相互作用を介して、これら二つの細胞内輸送を直接調整する可能性が示唆された。シンテニンがユビキチンと相互作用して、膜タンパク質—シンテニン—ユビキチン—ユビキチン結合タンパク質のネットワークを形成して、膜タンパク質の細胞内輸送を制御するかもしれない。このようにシンテニンは膜タンパク質とユビキチン化タンパク質を連結させるという新しい役割を行っているかもしれない。シンテニンは乳癌、胃癌およびメラノーマの癌組織中に高発現し、これらの癌細胞の転移能を高めることが報告されている。シンテニンはメラノーマで、FAK の自己リン酸化を高めて癌転移を調節することが知られているが、FAK とシンテニンは直接的な相互作用はない。シンテニンはユビキチンとの相互作用を介して FAK の自己リン酸化を調節している可能性があるかもしれない。また、シンテニンは異なる種類の癌細胞においては異なるシグナル経路に関与している可能性がある。本研究においてシンテニンのポリユビキチン化は

分解シグナルではないことが示唆された。シンテニンのポリユビキチン化の具体的な生物学的意義を解析することは、今後の重要な課題である。

**【結論】** シンテニンは、ユビキチンと非共有結合および共有結合で結合していることが判明した。このシンテニンとユビキチンの相互作用はシンテニンの N 末部分とユビキチンの C 末端のグリシンに依存している。シンテニンが有するさまざまな機能がユビキチンとの相互作用により調整されている可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 笠 原 正 典  
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

## 新規ユビキチン結合タンパク質シンテニンの 生化学的解析

ユビキチン化は、真核細胞においてタンパク質にユビキチン (Ub: ubiquitin) を付加する翻訳後修飾であり、タンパク質の寿命の決定や細胞内輸送などの多様な生命活動に重要な役割を果たしている。ユビキチンは、活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2) およびリガーゼ (E3) から構成されるユビキチンシステムによって標的タンパク質に共有結合される。近年、多くのユビキチンに結合するタンパク質 (ユビキチン結合タンパク質) が同定されている。ユビキチン結合タンパク質はユビキチン化されたタンパク質上のユビキチンに非共有結合で相互作用し、ユビキチン化タンパク質の機能、安定性、または局在の決定などに重要な役割を果たしている。例えば、モノユビキチン化されることにより、ユビキチン化タンパク質がエンドサイトーシスされる報告があるが、モノユビキチン結合タンパク質の関与には不明な点が多い。本研究ではプロテアソームへのターゲットシグナル以外のユビキチンの役割、特にモノユビキチン化の機能を明らかにするため、モノユビキチン結合タンパク質の同定を試みた。

ユビキチン変異体 Ub (K48R/G76A) をベイトとし、酵母 two hybrid スクリーニングを行った。スクリーニングの結果、9 個の陽性クローンが得られ、このうち二つはマウスのシンテニンと同一であった。哺乳類細胞内でシンテニンとユビキチンの結合を検討するために、HEK293T 細胞に FLAG タグ-シンテニンと HA タグ-ユビキチンの発現ベクターを導入し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 HA 抗体でウエスタン解析を行ったところ、シンテニンがユビキチンと共有結合および非共有結合で哺乳類細胞内では結合していることが示唆された。シンテニンとユビキチンの非共有結合はユビキチンの C 末端のグリシン依存性かどうかを検討するためユビキチン変異体 Ub ( $\Delta$ GG) (75 と 76 番目の Gly を欠損させたもの) を検討した結果、シンテニンとユビキチンの非共有結合には、ユビキチンの C 末端部分のグリシン

ンが重要であることが判明した。シンテニンのユビキチン結合部位を同定するため、シンテニンの変異体を作製したところ、ユビキチンと非共有結合で相互作用する領域は、シンテニンの N 末部分であることが示唆された。また、シンテニンの安定性を調べた結果、cycloheximide 処理 24 時間後でもシンテニンは安定して存在していることがわかり、シンテニンのポリユビキチン化は分解シグナルではないことが示唆された。

口頭発表において、渡辺雅彦教授より、酵母ツーハイブリッドスクリーニングで同定された他のクローンについて、シンテニンに注目した理由、シンテニンの組織発現特異性、非共有結合によるユビキチンとの結合についての質問があった。これらの質問に対し、他に UCH-L3 が同定されたが、シンテニンが膜タンパク質の動態制御に関連することからシンテニンに注目したこと、さらに PDZ タンパク質が豊富な神経組織等にも存在していること、そしてユビキチンとの非共有結合に関する分子論的解説を述べた。ついで、笠原正典教授より、これまでに報告されているユビキチン結合タンパク質、およびユビキチンの C 末端がシンテニンとの結合に関与することの新規性についての質問があった。これらの質問に対し、これまでに報告されているユビキチン結合ドメイン（モチーフ）を説明し、今回の結合様式はこれまでにない分子間結合に依ることを述べた。さらに、畠山鎮次教授より、シンテニンのユビキチン結合領域におけるドメインの検索、およびエンドサイトーシスにシンテニンのユビキチン化もしくはユビキチン化認識が重要であることを証明する実験に関する質問があった。これらの質問に対し、ユビキチンと非共有結合する領域には既知のドメイン構造はないこと、さらにシンデカンなどの膜タンパク質の動態を細胞生物学的に解析することの重要性を述べた。

この論文は、北海道医学雑誌で高く評価され、今後、エンドサイトーシスを含む細胞内膜輸送の分野において、膜タンパク質のユビキチン化の重要性を認識させることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。