

細胞周期進行を制御する NEDD8 修飾システムの発見

Discovery of a NEDD8 modification system regulating the cell cycle

蛋白解析グループ 逢坂文男

Fumio Osaka

During the large-scale *in vitro* translation analysis of full-length cDNA clones, we found that the ubiquitin (Ub)-like protein, NEDD8, was covalently linked to human cullin-family proteins (cullin-1,2,3,4A,4B,5) by a novel Ub-related system comprised of APP-BP1-hUba3 heterodimer (E-like enzyme) and hUbc12 (E2-like enzyme). In fission yeast, this novel post-translational modification system was essential for cell viability and function of cullins *in vivo*. Cullin-1 is a subunit of SCF complex (Skp1/cullin-1/F-box protein) which is Ub-ligase (E3) and regulates a lot of cellular phenomena including cell-cycle progression. We further show that dysfunction of the NEDD8 system for modification of cullin-1 results in impaired cell proliferation and marked stabilization of the CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitor Rum1, a target protein of SCF.

1. はじめに

mRNA から翻訳された蛋白質は、細胞内でそのままの形で存在するものもあるが、多くは種々のプロセッシング・修飾を受けている。このような翻訳後修飾は、細胞内での局在化、立体構造の安定化、代謝速度の調節などを介して、修飾された蛋白質の機能発現に寄与している。したがって、新規完全長 cDNA クローンによってコードされている蛋白質の機能を解析する場合にも、翻訳後修飾の関与を念頭におく必要がある。我々は、ヒト完全長 cDNA バンクの網羅的解析の一環として、インビトロ翻訳産物の電気泳動による解析を行っているが、その過程で、翻訳後修飾の結果生成したと思われる産物が、電気泳動ゲル上で観察される cDNA クローンをいくつか見出した。その中の一つが、NEDD8 をコードする cDNA である。NEDD8 (neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 8) は 1993 年にマウス神経芽細胞の分化に伴い発現が抑制される遺伝子群の一つとして報告された。NEDD8 はユビキチンと非常に高い相同性を持っていたが (図 1)、その機能は未知であった。

ユビキチンは真核生物に普遍的に存在する分子量 8kDa の蛋白質であり、その C 末端のグリシン残基で基質蛋白質のリジン残基とイソペプチド結合する。ユビキチンにより翻訳後修飾を受けた基質蛋白質は速やかに蛋白質分解酵素 26S プロテアソームに提示され、平均 7~9 残基までのペプチドに分解される。ユ

ユビキチン化を受ける基質蛋白質としては転写調節因子群 (p-53, c-myc 等)、細胞周期調節因子群 (CDK インヒビター、サイクリン等)、DNA 複製調節因子等を含む実に多様な短寿命蛋白質群が知られており、それらの代謝速度は生理的条件下でユビキチン/プロテアソーム系によって制御されている。

基質蛋白質へのユビキチン化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) の3種類の酵素群によって触媒される (図2)。これら酵素群の中で基質蛋白質と直接相互作用するのは E3 である。近年、E3 は多様な分子ファミリーを形成していることが明らかになり、その多様性が基質蛋白質の選択的な認識を可能としている。また、CDK インヒビターや β -カテニン等を含む多くの基質蛋白質のユビキチン化反応には、基質蛋白質のリン酸化が必須であり、ユビキチン/プロテアソーム系は細胞内情報伝達に応答して基質蛋白質の代謝速度を制御していると考えられる。

2. NEDD8 修飾系の発見¹⁾

NEDD8cDNA をウサギ網状赤血球ライセート中でインビトロ転写・翻訳した後、翻訳産物を SDS-PAGE にかけてみると、NEDD8 に由来する約 9kDa の分子量のバンド以外に、約 100kDa のバンドが見られた。このことは、NEDD8 翻訳産物がウサギ網状赤血球ライセート中の未知蛋白質と共有結合することを示唆した。そこで、NEDD8 をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーを行い、これらの NEDD8 結合性蛋白質の精製、及び精製蛋白質の機能解析を試みた (図3)。その結果、NEDD8 はカリン-4A に対する翻訳後修飾分子として機能し、その修飾反応は APP-BP1-hUba3 ヘテロダイマー (E1 様蛋白質、NEDD8 活性化酵素)、hUbc12 (E2 様蛋白質、NEDD8 結合酵素) の新規蛋白質群によって触媒された (図2)。この新規修飾系はユビキチンや他のユビキチン様蛋白質とは反応性がなく、従って、ユビキチン系とは独立した NEDD8 翻訳後修飾系の存在が示された。NEDD8 は哺乳動物、植物、酵母と広く保存されており、この修飾系が真核生物に普遍的なものであることが示唆される。

3. NEDD8 修飾系の基質蛋白質カリン²⁾

ヒトでは少なくとも6種類のカリン (Cul-1, 2, 3, 4A, 4B, 5) が存在し、表1に示すように細胞周期、免疫応答、低酸素応答等の非常に多様な生命現象を制御している。Cul-1 は E3 活性を持つ SCF (Skp1, Cul-1, F-box 蛋白質) 複合体の構成成分であり、他のカリンも同様の SCF 様複合体を形成すると推測されている。SCF の基質蛋白質としては CDK インヒビター、サイクリン D、

β -カテニン、I κ B α 等を含む多くの制御因子が知られている。SCF の中で基質蛋白質を直接認識するのは F-ボックス蛋白質であるが、F-ボックス蛋白質は分子ファミリーを形成しており(哺乳動物では約 500~1,000 種類存在すると推定されている)、その分子多様性が SCF の基質蛋白質群の選択的なユビキチン化反応を可能にしている。我々は NEDD8 修飾系の基質蛋白質として Cul-4A を同定したが、他の全てのヒトカリン (Cul-1、2、3、4B、5) についても NEDD8 による修飾を受けることを明かにした (図 4)。このことから NEDD8 はカリンの機能制御を通じて非常に多様な生命現象を支配する修飾系であることが推測される。

4. NEDD8 修飾系の生物学的意義³⁾

4-1. 分裂酵母の生存に必須である NEDD8 修飾系

遺伝学的手法を用いやすい分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を用いて NEDD8 修飾系の生物学的意義を調べた。分裂酵母から NEDD8、NEDD8 活性化酵素 (SpUba3)、NEDD8 結合酵素 (SpUbc12) の遺伝子を同定した後、それぞれの破壊株を作成し四分子分析を行なった結果、これら全ての遺伝子は生存に必須であることが示された。

4-2. カリンの機能に必須である NEDD8 修飾系

分裂酵母では、少なくとも 3 種類のカリン (SpCul-1、3、4) が存在し、細胞周期進行、ストレス応答等の様々な現象を制御している。我々は SpCul の C 末端領域の特異的リジン残基を NEDD8 による修飾部位として同定した (図 5)。このリジン残基をアルギニン残基に置換した SpCul 変異体は NEDD8 による修飾を受けず、SpCul 破壊株で観察される各種表現型を相補できなかった。従って、SpCul の細胞内での多様な機能には NEDD8 による修飾が必須であると考えられる。

4-3. ユビキチン E3 (SCF) の機能に必須である NEDD8 修飾系

分裂酵母 SCF は Rum1 (CDK インヒビター)、cdc18(DNA 複製調節因子) 等に対する E3 として機能し、ユビキチン化された Rum1、cdc18 は 26S プロテアソームによって速やかに分解される。細胞内で NEDD8 の発現を抑制させたり、NEDD8 欠損 SpCul-1 変異体 (K713R) を過剰発現させると、細胞周

期進行の阻害、並びに Rum1 蛋白質の安定化が起こり、SCF の機能障害が観察された (図6)。したがって細胞内での SCF の機能発現には SCF 複合体中 SpCul-1 の NEDD8 化が不可欠であると考えられる。

5. おわりに

真核生物に普遍的に存在する NEDD8 修飾システムはカリンファミリー蛋白質群の修飾を行ない、細胞周期をはじめとする非常に多様な生命現象に関与すると考えられる。近年、他のユビキチン様蛋白質である SUMO1 が Acs2-Uba2 ヘテロダイマー (E1 様蛋白質) により活性化され、Ubc9 (E2 様蛋白質) を経て、基質蛋白質である p53 (癌抑制因子) や核膜孔蛋白質 RanGAP1 を修飾して、それら基質蛋白質の安定性や局在性を制御していることが明らかになった。また、ユビキチン/プロテアソーム系においてはユビキチンの付加反応のみならず、ユビキチン化蛋白質の脱ユビキチン化反応によっても基質蛋白質の代謝速度は調節されており、酵母においては少なくとも xx 種類の脱ユビキチン化酵素が同定されている。ユビキチンとユビキチン様蛋白質翻訳後修飾系はリン酸化/脱リン酸化に匹敵する蛋白質機能制御系として今後更なる研究の進展が見られるであろう。SCF に注目すると、基質蛋白質の SCF によるユビキチン化反応には、基質蛋白質のリン酸化と、SCF 自身の NEDD8 化が必須であり、ユビキチン化という一つの修飾反応に対してリン酸化、NEDD8 化という更に二つの修飾反応が必須であることがわかる。今後、これらのユビキチン関連修飾系とリン酸化/脱リン酸化系の異なる制御システム間の相互作用並びに、それら周辺のシグナル伝達経路が理解されることにより、細胞内の蛋白質機能制御ネットワークの新しい一面が見えてくることが期待される。

6. 参考文献

1. Osaka, F., Kawasaki, H., Aida, N., Saeki, M., Chiba, T., Kawashima S., Tanaka, K. and Kato S. (1998) A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev.*, **12**, 2263-2268.
2. Hori, T., Osaka, F., Chiba, T., Miyamoto, C., Okabayashi, K., Shimbara, N., Kato, S. and Tanaka, K. (1999) Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene*, **18**, 6829-6834.
3. Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh-e, A., Kominami, K., Toda, T., Suzuki, T., Chiba, T., Tanaka, K. and Kato, S. (2000) Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J.*, **19**, 3475-3484.

human NEDD8	1-MLIKVKTTLTGKEIEIDIEPTDKVERIKERVEEKEGIPP-36
mouse NEDD8	MLIKVKTTLTGKEIEIDIEPTDKVERIKERVEEKEGIPP
C.elegans NEDD8	MLIKVKTTLTGKEIEIDIEPTDKVERIKERVEEKEGIPP
fission yeast NEDD8	MLIKVKTTLTGKEIEIDIEPTDKVERIKERVEEKEGIPP
human ubiquitin	MQIIVKTLTGKTIITLIEYEPDITIEEYKAKDQDKEGIPP
human NEDD8	37-QQRLIYSGKQMNDKTAADYKILGGSVLHLVLALRGG-76
mouse NEDD8	QQQRLIYSGKQMNDKTAADYKILGGSVLHLVLALRGG
C.elegans NEDD8	QQRLIYSGKQMNDKTAADYKILGGSVLHLVLALRGG
fission yeast NEDD8	QQRLIYSGKQMNDKTAADYKILGGSVLHLVLALRGG
human ubiquitin	QQRLIYSGKQMNDKTAADYKILGGSVLHLVLALRGG

Fig. 1. Sequence comparison between NEDD8 and ubiquitin.

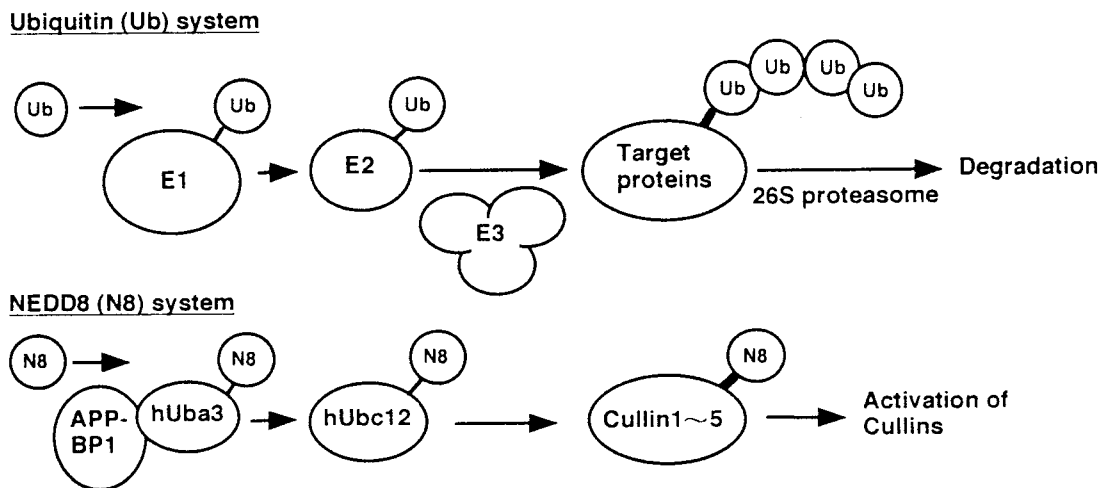


Fig. 2. Ubiquitin and NEDD8 pathway

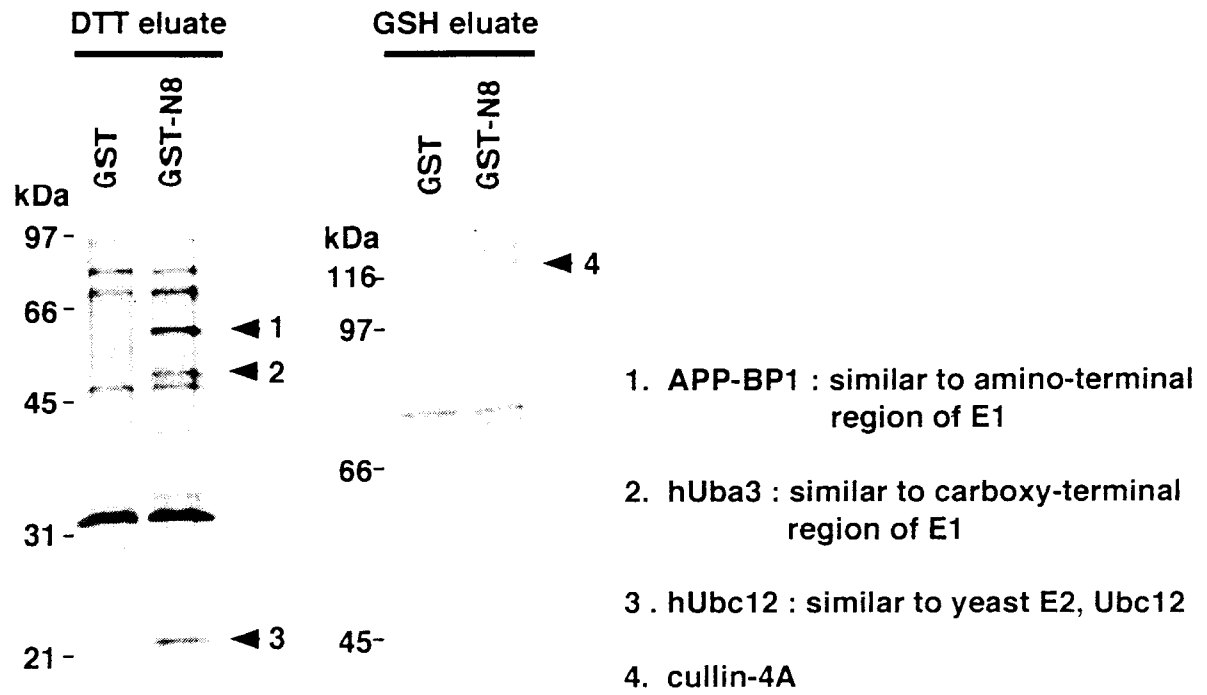


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of proteins purified by GST-NEDD8 affinity chromatography.

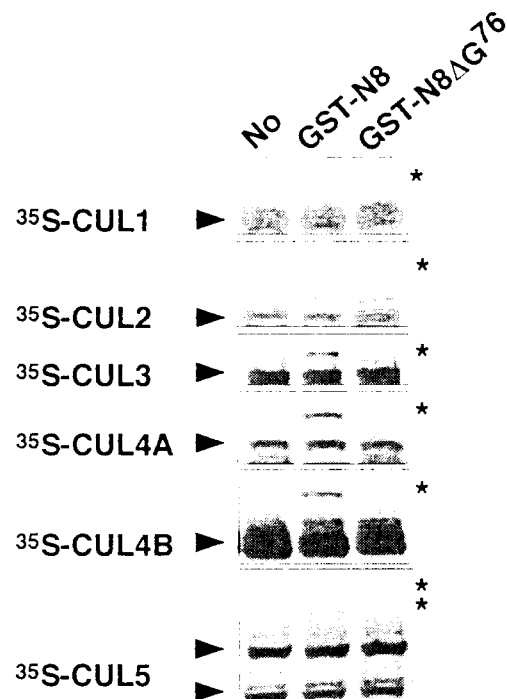


Fig. 4. Linkage of GST-NEDD8 to human cullin-family proteins.

A

```

Hs-CUL1      KLLIQAAIVRIMKMRKVLKHQQLLGEVLTQLSSRFKPRVPVIKKCIDILIEKEYLERVDGEKDTYSYLA 752
Hs-CUL2      KMYLQAAIVRIMKARKVLRHNALIQEVISQSRARFNPSPISMIKKKIEVLIDKQYIERSQASADEYSYVA 745
Hs-CUL3      KHEIEAAIVRIMKSRKKMQHNVLVAEVTQLKARFLPSPVVIKKRIEGLIEREYLARTPEDRKVYTYVA 768
Hs-CUL4A     QYQIDAAIVRIMKMRKTLGHNLLVSELYNQLK...FPVKPGDLKKRIESLIORDYMERDKDNPQYHYVA 659
Hs-CUL4B     QYQIDAAIVRIMKMRKTLSHNLLVSELYNQLK...FPVKPADLKKRIESLIORDYMERDKENPNQYNYIA 717
Hs-CUL5      ILRTQEAIQIMKMRKKISNAQLQTELVEILKNMFLPQKKMIKEQIEWLIHKYIRRDDESINTFIYMA 780
Cdc53        QIFLEACIVRIMKAKRNLPHTTLVNECIAQSHQRFNAKVSVMVKRAIDSLIQKGYLQRGDDG...ESYAYLA 815
Pcu1         KLLLQSAIVRIMKARRTLKHVVLVKETIDQIKSRFTPKVSDIKQCIDMLIEKEYLER...QGRDEYIYLA 767
Pcu3         KHQADACIVRVMKDRKVCENQLMAEVTRQLNPRFHPSPMMIKRRIEALIEREYLQRQADNGRIYEYLA 798
Pcu4         QFELQASIVRVMKQKEKMKHDOLVQYVINNVKDRGIPLVSDVKTAEKLEKEYLER...EDN...DIYTYVT 734
Pcu1K713R   -----R----- 767
Pcu4K680R   -----R----- 734
Pcu4K710R   -----R----- 734

```

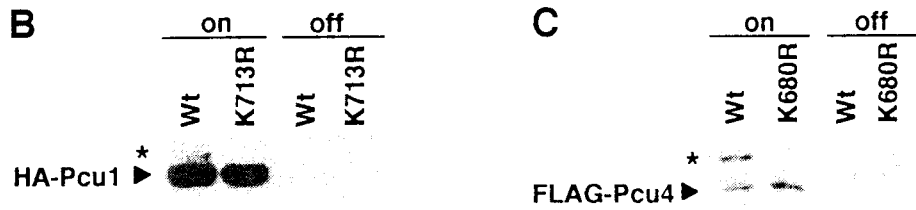


Fig. 5. Identification of a lysine residue modified by NEDD8 in Pcu1 and Pcu4.

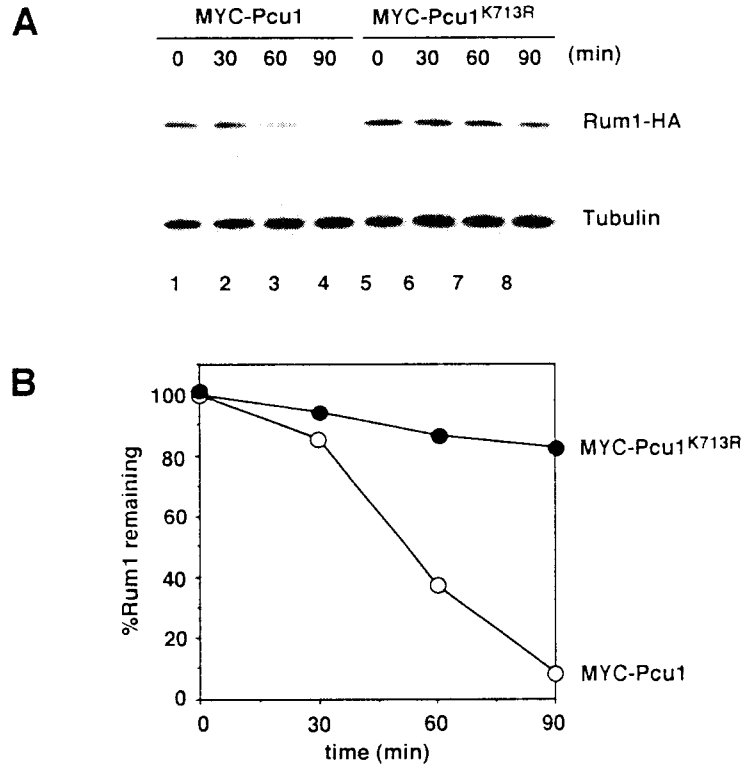


Fig. 6. Stabilization of Rum1 in the Pcu1^{K713R}-overexpressed cells.