

氏名	めぐみ 恵	ゆずる 謙
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)	
学位記番号	医 博 第 2927 号	
学位授与の日付	平成 18 年 1 月 23 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻	
学位論文題目	Multiple roles of Rbx1 in the VBC-Cul2 ubiquitin ligase complex (VBC-Cul2 ユビキチンリガーゼ複合体における Rbx1 の多様な役割)	
論文調査委員	(主 査) 教授 戸口田 淳也	教授 瀬原 淳子 教授 藤井 信吾

論 文 内 容 の 要 旨

ユビキチン・プロテアソーム系は E1, E2, E3 の 3 種の酵素群の働きにより, 標的蛋白質を特異的に認識してユビキチン (Ub) を付加し, この後ユビキチン化された蛋白質を 26S プロテアソームによる分解へと至らしめるシステムであり, 生物のさまざまな高次機能の制御に重要な役割を担っている翻訳後修飾系である。ユビキチン修飾系の重要性は選択的に標的蛋白質を識別してユビキチンを付加し, 分解へと導くことに依存することから, 標的蛋白質を特異的に認識しユビキチンを付加する酵素である E3: ユビキチンリガーゼがシステムの key molecule であると考えられている。

Von Hippel-Lindau (VHL) 病は種々の良性, 悪性腫瘍が特徴である常染色体優性遺伝性疾患であり, その原因遺伝子である VHL 遺伝子は, 約 80% の腎淡明細胞癌においても欠損している癌抑制性遺伝子である。VHL 遺伝子産物, pVHL は elonginB/C, Cullin2, Rbx1 と VBC-Cul2 ユビキチンリガーゼ複合体を形成しており, pVHL はその標的識別サブユニットとして機能している。VBC-Cul2 は低酸素応答性転写因子 (hypoxia inducible factor: HIF) の α サブユニット (HIF- α) を酸素依存性にユビキチン化する E3 であることから, VHL 欠損により, 細胞が酸素存在下においてもあたかも低酸素状態にあると感知してしまうことが発癌のトリガーとなると考えられている。

VBC-Cul2 リガーゼのサブユニットの 1 つである RING-finger 蛋白質: Rbx1 は E2 をユビキチンリガーゼに recruit する, いわば, VBC-Cul2 リガーゼの活性中心として機能する分子である。また, Rbx1 は VBC-Cul2 リガーゼの機能を正に制御するユビキチン様蛋白質: Nedd8 の Cul2 への結合の活性中心としても機能することが知られている。Cul2 は Cullin ファミリーに属する蛋白質であるが, Cullin ファミリー蛋白質は Rbx1 を含むユビキチンリガーゼのサブユニットであり, Nedd8 修飾を受けることを共通の特徴としている。RING-finger ドメインはシステイン (Cys) とヒスチジン (His) (計 8 個) をコンセンサスとして持ち, その 8 番目のコンセンサスは Cys であるが, Rbx1 ではアスパラギン酸 (Asp) に置き換わっている。そこで, この 8 番目の Asp を他のすべてのアミノ酸に置き換えた変異体を作成し, Rbx1 の機能を検討した。

その結果, 野生型 Rbx1 は 8 番目のコンセンサスを Cys に置換した Rbx1 変異体よりも Cullin ファミリー蛋白質を効率的に Nedd8 修飾できることがわかった。さらに, これらの変異体を用いて, VBC-Cul2 リガーゼにおける Rbx1 の役割を検索したところ, Rbx1 は Cul2 の Nedd8 修飾, HIF- α の Ub 修飾の活性中心として機能するが, Rbx1 と Nedd8 の E2 (Ubc12), Ub の E2 (UbcH5c) との結合様式がおのおの異なることが明らかになった。加えて, Rbx1 は VBC 複合体と Cul2 の結合を安定させることにより VBC-Cul2 リガーゼを安定化させ, 標的蛋白質のユビキチン修飾を正に制御することが明らかになった。

以上より Rbx1 は Ub 修飾の活性中心であり, Cul2 の Nedd8 修飾を促進するのみならず, VBC-Cul2 複合体の維持を促進することを介して VBC-Cul2 複合体の活性を正に制御すること, すなわち, Rbx1 は VBC-Cul2 の E3 活性を 3 つのポイントから調節していることが示された。

論文審査の結果の要旨

Von Hippel-Lindau (VHL) 病の原因遺伝子である癌抑制性遺伝子: VHL は、約80%の腎臓明細胞癌においても欠損しており、その遺伝子産物、pVHL は VBC-Cul2 ユビキチンリガーゼ複合体の基質識別サブユニットとして機能している。VBC-Cul2 はユビキチン様蛋白質: Nedd8の Cul2 への修飾によって正の制御を受け、VBC-Cul2 のサブユニットの一つである Rbx1 が基質のユビキチン化、Cul2 の Nedd8 化の活性中心としても機能する。この Rbx1 の変異体を作成し、Cul2 の Nedd8 化や VBC-Cul2 の発現量に及ぼす影響を検討するとともに、基質である低酸素応答性転写因子 (HIF- α) の *in vitro* ユビキチン化アッセイの系を用いてユビキチン化に与える影響についても検討した。

その結果、Rbx1 は Cul2 の Nedd8 修飾、HIF- α の Ub 修飾の活性中心として機能するが、Rbx1 の機能様式は Nedd8 化と Ub 化とは異なることを示した。加えて、Rbx1 は VBC-Cul2 複合体の維持を促進することを介して VBC-Cul2 複合体の活性を正に制御すること、すなわち、Rbx1 による VBC-Cul2 の新たな制御機構を明らかにした。

以上の研究は pVHL による細胞の酸素感知機構の解明の一助となり、ひいては細胞のストレス応答機構やがん、遺伝病などの病因の解明につながる可能性がある。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年12月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。