

- H., & Kanazawa, H. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)*, **132**, 483–491.
- 6) Matsushita, M., Tanaka, S., Nakamura, N., Inoue, H., & Kanazawa, H. (2004) *Traffic*, **5**, 140–151.
- 7) Cheng, L.J., Zhou, Z.M., Li, J.M., Zhu, H., Zhou, Y. D., Wang, L.R., Lin, M., & Sha, J.H. (2002) *Life Sci.*, **71**, 2741–2757.
- 8) Santama, N., Krijnse-Locker, J., Griffiths, G., Noda, Y., Hirokawa, N., & Dotti, C.G. (1998) *Embo J.*, **17**, 5855–5867.
- 9) Mok, H., Shin, H., Kim, S., Lee, J.R., Yoon, J., & Kim, E. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 5253–5258.
- 10) Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y., & Hirokawa, N. (2001) *Cell*, **105**, 587–597.
- 11) Aulchenko, Y.S., Hoppenbrouwers, I.A., Ramagopalan, S.V., Broer, L., Jafari, N., Hillert, J., Link, J., Lundstrom, W., Greiner, E., Dessa Sadovnick, A., Goossens, D., Van Broeckhoven, C., Del-Favero, J., Ebers, G.C., Oostra, B.A., van Duijn, C.M., & Hintzen, R.Q. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 1402–1403.
- 12) Hollenbeck, P.J. & Swanson, J.A. (1990) *Nature*, **346**, 864–866.
- 13) Al-Bassam, J., Cui, Y., Klopfenstein, D., Carragher, B.O., Vale, R.D., & Milligan, R.A. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 743–753.
- 14) Tomishige, M., Klopfenstein, D.R., & Vale, R.D. (2002) *Science*, **297**, 2263–2267.
- 15) Matsushita, M., Yamamoto, R., Mitsui, K., & Kanazawa, H. (2009) *Traffic*, **10**, 1647–1654.

松下 昌史, 金澤 浩

(大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻)

Variation and function of splicing isoforms of kinesin motor KIF1B

Masafumi Matsushita and Hiroshi Kanazawa (Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, Machikaneyama-cho 1-1, Toyonaka City, Osaka 560-0043, Japan)

## G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のユビキチン化を介したエンドサイトーシス機構

### 1. はじめに

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は7回膜貫通型の細胞膜タンパク質であり, ヒトゲノムにおいて約900種類からなるファミリーを形成している。これら GPCR は細胞の増殖, 形態変化をはじめ, 血圧の調節, 味覚, 嗅覚,

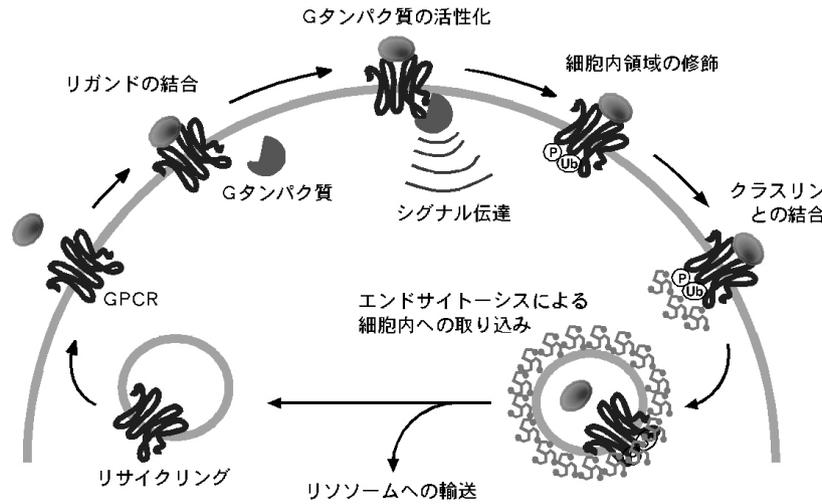
光感覚など様々な生体現象において必要とされている。最近の研究において, 幾つかの GPCR ががん細胞に過剰発現し, 異常なシグナルを伝えることにより, 細胞のがん化に関わっていることが報告されている<sup>1)</sup>。また, GPCR の多くは生理活性物質をリガンドとし, このため GPCR は創薬の重要な標的タンパク質となっている。現在まで開発された医薬品の中で50%程度は GPCR に作用する薬剤であり, これらのことから GPCR シグナルの調節機構を明らかにすることは, がんやその他の病気の効果的な治療薬の開発にとって非常に重要である。

出芽酵母の接合フェロモン受容体である Ste2p は GPCR の一種であり, GPCR のシグナル伝達, 修飾, ダウンレギュレーションの分子機構を調べるモデル受容体として研究されてきた。特に, GPCR シグナルとエンドサイトーシスの関係や GPCR のユビキチン化についての先駆的な研究は Ste2p を用いて行われている<sup>2,3)</sup>。また, 出芽酵母はエンドサイトーシス研究の非常に優れたモデル生物でもある<sup>4,5)</sup>。本稿では GPCR のユビキチン化を介したエンドサイトーシス機構について, 最近の出芽酵母を用いた研究によって明らかにされた知見を概説する。

### 2. リガンド結合による GPCR の修飾

GPCR の脱感作とそれに引き続くエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みは, GPCR シグナルのダウンレギュレーションにおいて中心的な役割を果たしている。図1に示すように, 多くの GPCR はリガンドと結合することにより三量体 G タンパク質を活性化し, 細胞内へとシグナルを伝達する。その後, GPCR は細胞内領域がリン酸化, ユビキチン化され, クラスリン小胞によりエンドサイトーシスされる。細胞内に取り込まれた GPCR はエンドソームにおいてリガンドと分離し, リソソームに輸送されて分解されるか, もしくは細胞膜へトリサイクリングされる。

GPCR のリン酸化は主に細胞内ドメインの Ser もしくは Thr 残基に起こる。GPCR のリン酸化を行う酵素としては GPCR キナーゼ (GRK) やカゼインキナーゼなどが報告されており, 多くの GPCR はリン酸化されることによりアレクチン (arrestin) タンパク質に結合し, エンドサイトーシスされる。また, これまでの研究から, GPCR の多くがリン酸化に加えて, ユビキチン化されていることが報告されている。しかしながら, GPCR のユビキチン化がエンドサイトーシスにおいて果たす役割についてはまだよく分かっていない。例えば, トロンビンにより活性化される



ユビキチン化されるGPCRの例

GPCR	リガンド	ユビキチン化の役割
出芽酵母		
Ste2	$\alpha$ -ファクター	エンドサイトーシス
Ste3	a-ファクター	エンドサイトーシス
哺乳類		
PAR1	トロンピン	エンドサイトーシス
CXCR4	SDF-1	エンドソーム選別
$\beta_2$ AR	アドレナリン	エンドサイトーシス
V <sub>2</sub> R	バソプレッシン	分解、エンドサイトーシス(?)
PAR2	トリプシンなど	エンドソーム選別
NK <sub>1</sub> R	ニューロキニン1	分解、エンドソーム選別(?)
S1PR	スフィンゴシン1リン酸	分解、エンドサイトーシス
Sst3	ソマトスタチン	分解、エンドソーム選別(?)

図1 GPCRのエンドサイトーシス機構とユビキチン化されるGPCRの例

GPCRである protease-activated receptor-1 (PAR1) はリガンド非存在下でユビキチン化されており、リガンドの結合により脱ユビキチン化される。このユビキチン化は PAR1 の恒常的なエンドサイトーシスを阻害することが報告されている<sup>6)</sup>。stromal cell-derived factor 1 (SDF1) 受容体である CXCR4 や、 $\beta_2$  アドレナリン作動性受容体 ( $\beta_2$ AR) は細胞膜でユビキチン化されるが、これらのユビキチン化はエンドソーム膜におけるユビキチン結合タンパク質による認識と選別に必要である<sup>7)</sup>。さらに、バソプレッシン受容体 (V<sub>2</sub>R)、ソマトスタチン受容体 (sst3)、PAR2、ニューロキニン1受容体 (NK1R) などの GPCR も、リガンドの結合によってユビキチン化されることが報告されているが、それらの役割についてはまだ十分には解明されていない

(図1)。

### 3. Ste2p 受容体のエンドサイトーシス機構

出芽酵母の Ste2p は全長 430 アミノ酸からなる 7 回膜貫通型の GPCR である (図 2A)。Ste2p は酵母の接合フェロモンである  $\alpha$ -factor と結合することにより、G タンパク質を介して MAP キナーゼ経路を活性化し、増殖の停止と接合形態への分化を行う。また、 $\alpha$ -factor の結合は Ste2p の C 末端細胞内領域のリン酸化とユビキチン化を引き起こし、これらの修飾は Ste2p のエンドサイトーシスのトリガーとなる<sup>8,9)</sup>。興味深いことに、Ste2p の活性化には Ste2p の C 末端領域 (図 2, 326-430 アミノ酸) は必要ではないが、この領域を欠く Ste2p はエンドサイトーシスさ

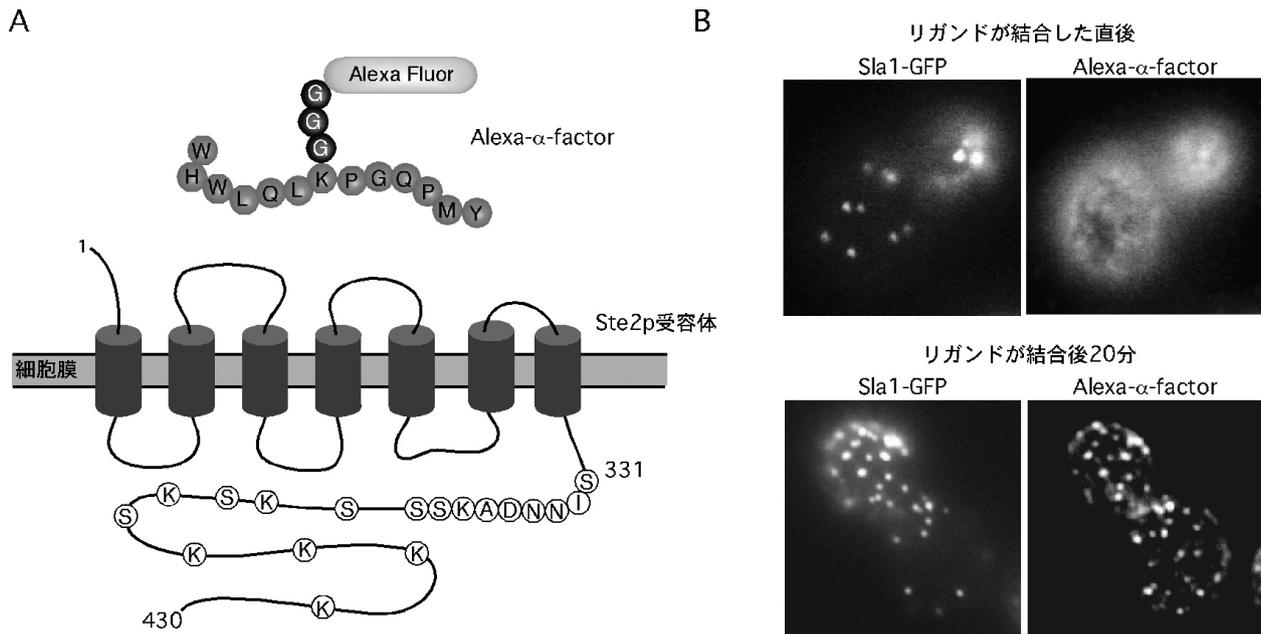


図2 Alexa- $\alpha$ -factor, Ste2pの構造と局在

(A)  $\alpha$ -factorは13アミノ酸からなるペプチドフェロモンであり、7番目のリジン残基に蛍光物質であるAlexa Fluorを付加することにより、Alexa- $\alpha$ -factorを作製した。Ste2pは全長430アミノ酸からなる7回膜貫通型のGPCRである。図中のC末端細胞内領域に示されたSはリン酸化の修飾を受けるセリン残基をKはユビキチン化される可能性のあるリジン残基を示している。(B) クラスリン小胞をSla1-GFPで、リガンドに結合したSte2pをAlexa- $\alpha$ -factorで標識している。Alexa- $\alpha$ -factorを細胞に結合させた直後(上図)とその20分後(下図)のそれぞれの局在を示している。

れない<sup>10)</sup>。また、このC末端領域を欠くSte2pを発現する細胞は $\alpha$ -factorへの感受性が高まることが報告されており、このことはSte2pのエンドサイトーシスがシグナルのダウンレギュレーションに必要であることを示唆している<sup>10)</sup>。さらに、Ste2pの活性化とエンドサイトーシスによる取り込みは完全に独立した現象であることも報告されている<sup>3)</sup>。HickeとRiezmanはSte2pのC末端領域に存在するSINNDKSS配列(図2)に含まれるSer残基のリン酸化とLys残基のユビキチン化が、Ste2pのエンドサイトーシスに必要であることを明らかにした<sup>2)</sup>。私達は活性化したSte2pがリガンドと結合した後、どのようにしてエンドサイトーシスされるかを調べるために、リガンドである $\alpha$ -factorに蛍光物質(Alexa Fluor)を付加した新規のマーカー(Alexa- $\alpha$ -factor)を作製した(図2A)<sup>11)</sup>。Alexa- $\alpha$ -factorを用いて、細胞膜上のSte2pの動態を調べたところ、Ste2pはリガンドと結合した直後は細胞膜上全体に局在し、非常に速い速度で細胞膜上を動いていることが分かった(図2B)<sup>11)</sup>。その後、Alexa- $\alpha$ -factor/Ste2pは次第にクラスリン小胞の部位へと移動し、20分後にはほぼ完全にクラスリン小胞の部位に集積した(図2B)。このことから、

Ste2pはリガンド非存在下においては細胞膜上に均一に局在するが、リガンドとの結合によりクラスリン小胞へと移動することが分かった。興味深いことに、Ste2pのC末端領域に存在する6箇所のカゼインキナーゼのリン酸化コンセンサス配列(D/E-X-X-S/TもしくはS/T(P)-X-X-S/T)を壊した変異体では、Ste2pのクラスリン小胞への移動は認められなかった。また、ユビキチン化される可能性のある7箇所のLysをArgに置換した変異体でもSte2pのクラスリン小胞への移動は見られなかった<sup>9)</sup>。これらの結果は細胞内領域のリン酸化およびユビキチン化がSte2pのクラスリン小胞への移動と、それに続く細胞内への取り込みに必要であることを示唆している。さらに、リン酸化とユビキチン化のどちらが重要であることを調べるために、Ste2pの脱リン酸化型の変異体にユビキチンを融合した変異体を作製した。興味深いことに、このユビキチンを融合したSte2p脱リン酸化型変異体は、リガンド非存在下においてもクラスリン小胞へと移動した。この結果から、リガンドの結合によるSte2pのクラスリン小胞への移動には、細胞内領域のユビキチン化が最も重要であることが分かった<sup>9)</sup>。

4. ユビキチン結合タンパク質

ユビキチン化は一般的にタンパク質の分解シグナルとし

て機能する。ユビキチン化には大きくポリユビキチン化とモノユビキチン化の2種類があり、一般的に前者はプロテアソームでの分解に、後者はエンドサイトーシス経路を介

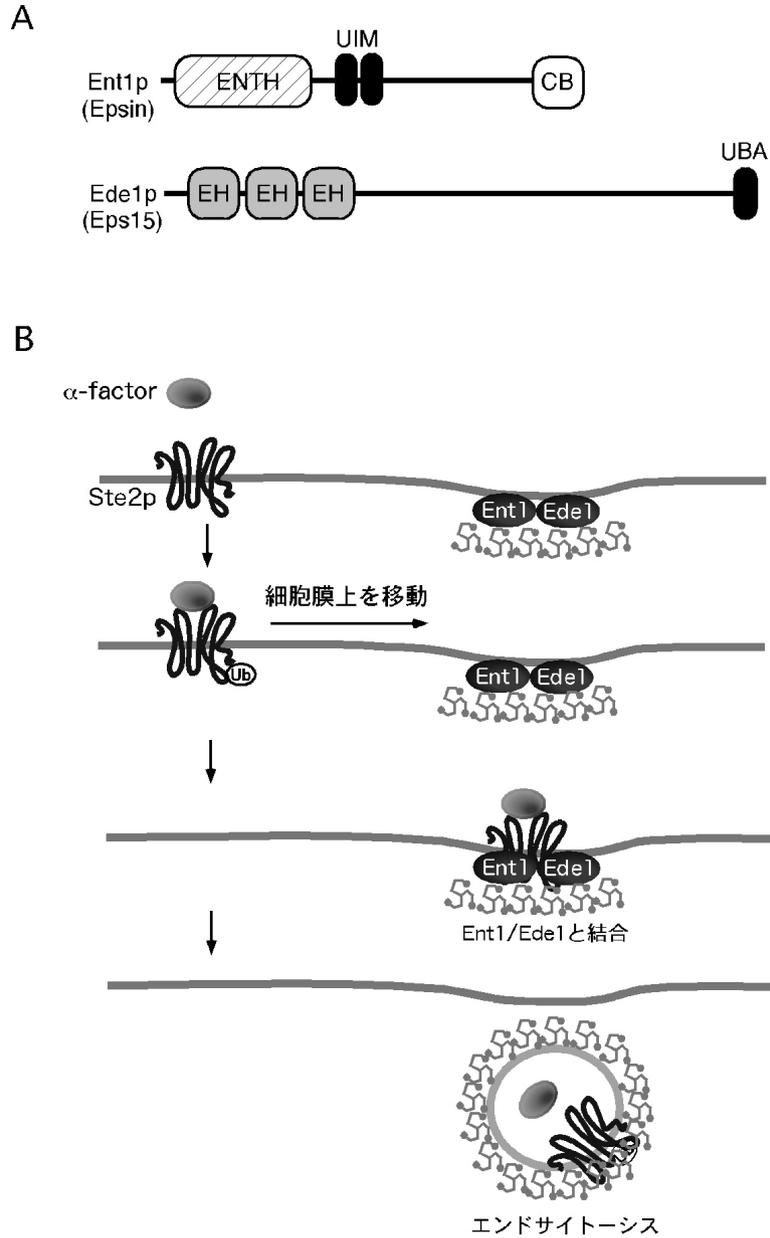


図3 Ent1p および Ede1p の構造と Ste2p のクラスリン小胞への輸送モデル (A) ENTH, Epsin N末端ホモロジドメイン; UIM, ユビキチン結合モチーフ; CB, クラスリン結合ドメイン; EH, Eps15ホモロジドメイン; UBA, ユビキチン会合ドメイン (B) リガンドの結合により誘導される Ste2p のエンドサイトーシスのモデル. Ste2p は  $\alpha$ -factor に結合することによりユビキチン化される. 次に, Ste2p は細胞膜上を移動し, クラスリン小胞に局在する Ent1p および Ede1p を介して小胞内へ取り込まれ, エンドサイトーシスされる.

したリソソームへの輸送と分解に必要であることが明らかにされている。ユビキチンに結合するタンパク質モジュールとしては、これまでに UIM, CUE, UBA, VHS, GAT, NZF, PAZ, UEV, GLUE ドメインなどが同定されている<sup>12)</sup>。ユビキチン結合ドメインは数百種のタンパク質に見られ、これらの多くは分子内に複数のユビキチン結合ドメインを有している。エンドサイトーシスに関わるタンパク質の中にも、Epsin, Eps15, HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), TSG101 (tumor susceptibility gene 101) などがユビキチン結合ドメインを持ち、これらはそれぞれ自身もユビキチン化されている。この中で、Epsin は細胞膜内の PIP<sub>2</sub> に結合する ENTH (Epsin N-terminal homology) ドメインとクラスリン結合 (CB) ドメインを有するクラスリン小胞の構成分子である (図 3)。また、Eps15 もクラスリン小胞の構成分子であり、NPF (Asn-Pro-Phe) モチーフに結合する EH (Eps15 homology) ドメインを介して多くのエンドサイトーシス関連タンパク質と結合する (図 3)。一方、HRS, TSG101 は多胞体における輸送タンパク質 (積み荷) の選別に関わることが報告されている<sup>12)</sup>。私達は、Epsin, Eps15 の酵母ホモログである Ent1p および Ede1p がユビキチン化された Ste2p のクラスリン小胞へのリクルートに必要ではないかと考え、Ent1p と Ede1p のユビキチン結合ドメインを壊した変異体を用いて、Ste2p のクラスリン小胞への移動を調べた。この結果、Ste2p のリガンドの結合により起こるクラスリン小胞への移動は完全に抑制された。これらの結果から推測されるモデルを図 3B に示す。Ste2p はリガンド ( $\alpha$ -factor) の非存在下では細胞膜全体に局在するが、リガンドが結合することによりユビキチン化され、その後、細胞膜上を移動し、クラスリン小胞に含まれる Ent1p, Ede1p のユビキチン結合ドメインを介して小胞内へと取り込まれると考えられる (図 3B)<sup>9)</sup>。

### 5. Ste2p のユビキチン化におけるリン酸化の役割

Ste2p のリン酸化部位を壊した変異体では Ste2p のクラスリン小胞への移動が阻害される。しかしながら、この変異体にユビキチンを付加すると Ste2p はリガンドの非存在下でもクラスリン小胞の部位へと移動する。では、Ste2p のリン酸化はなぜ必要なのだろうか。哺乳類を含む多くの高等生物においては GPCR のダウンレギュレーションにはアレステンが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。アレステンの詳細については他の優れた総説を参照して頂くとして、アレステンの一般的に知られてい

る役割はリン酸化された受容体に結合し、GPCR シグナルの脱感作を行うことである。また、アレステンはクラスリンもしくは AP2 複合体に結合し、GPCR をクラスリン小胞へと運ぶと考えられている。

出芽酵母には、これまでアレステンタンパク質は存在しないと考えられていた。しかしながら、2008 年 Emr らのグループは出芽酵母にも 9 種類のアレステン様タンパク質 (ART タンパク質) が存在することを明らかにした<sup>13)</sup>。これらの ART タンパク質は酵母の E3 ユビキチンリガーゼである Rsp5 に結合することが明らかにされ、このことから、Ste2p はリン酸化されることにより、ART タンパク質を介して Rsp5 と結合し、ユビキチン化されるのではないかと予想される。このモデルに関しては今後の検証が必要である。

### 6. おわりに

GPCR は様々な生命現象に関わり、細胞外シグナルを細胞内に伝えている。近年、GPCR のユビキチン化に関する研究が多く報告されてきているが、まだその役割については不明な点が多い。しかしながら、GPCR のユビキチン化はほとんどの場合において、GPCR の分解に関わっているようである。このため、もし人為的に特定の GPCR をユビキチン化することができれば、目的の GPCR を介するシグナルを特異的に阻害することが可能になるかもしれない。GPCR のユビキチン化の研究はまだ始まったばかりであり、今後のさらなる研究が期待される。

- 1) Dorsam, R.T. & Gutkind, J.S. (2007) *Nat. Rev. Cancer*, 7, 79–94.
- 2) Hicke, L. & Riezman, H. (1996) *Cell*, 84, 277–287.
- 3) Zanolari, B., Raths, S., Singer-Kruger, B., & Riezman, H. (1992) *Cell*, 71, 755–763.
- 4) Kaksonen, M., Toret, C.P., & Drubin, D.G. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 404–414.
- 5) Toshima, J., Toshima, J.Y., Martin, A.C., & Drubin, D.G. (2005) *Nat. Cell Biol.*, 7, 246–254.
- 6) Wolfe, B.L., Marchese, A., & Trejo, J. (2007) *J. Cell Biol.*, 177, 905–916.
- 7) Marchese, A. & Benovic, J.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 45509–45512.
- 8) Hicke, L., Zanolari, B., & Riezman, H. (1998) *J. Cell Biol.*, 141, 349–358.
- 9) Toshima, J.Y., Nakanishi, J., Mizuno, K., Toshima, J., & Drubin, D.G. (2009) *Mol. Biol. Cell*, 20, 5039–5050.
- 10) Konopka, J.B., Jenness, D.D., & Hartwell, L.H. (1988) *Cell*, 54, 609–620.
- 11) Toshima, J.Y., Toshima, J., Kaksonen, M., Martin, A.C., King, D.S., & Drubin, D.G. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103,

5793-5798.

- 12) Hicke, L., Schubert, H.L., & Hill, C.P. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 610-621.
- 13) Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., & Emr, S.D. (2008) *Cell*, 135, 714-725.

十島 純子, 十島 二郎

(東京理科大学基礎工学部生物工学科)

Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis via ubiquitination

Junko Y. Toshima and Jiro Toshima (Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, Yamazaki 2641, Noda, Chiba 278-8510, Japan)

投稿受付:平成21年10月14日

## タンパク質モチーフ活性の予測とシグナル伝達解析

### はじめに

タンパク質の機能は、タンパク質の修飾、分解、細胞内局在などの翻訳後制御によって調節されている。これらを制御するタンパク質は、標的タンパク質内の短いモチーフ配列を目印として認識、相互作用することでその機能を発揮する。したがって、タンパク質が特異的モチーフを持つかどうか、翻訳後制御を受けるかどうかの決定因子となる。一般的に、単離されたモチーフはペプチドとして独立して機能することができ、モチーフを認識するタンパク質はモチーフの配列のみを認識して結合する。モチーフ配列は、3~10 アミノ酸からなる短い配列で、通常その中の2~3 アミノ酸のみがモチーフ機能に大きな働きをしている。モチーフは明確な高次構造をとらず（このため linear motif と呼ばれる）、モチーフの多くは、タンパク質の非構造領域 (intrinsically disordered region) に存在することが観察されている<sup>1)</sup>。

モチーフとは対照的に、タンパク質ドメインは、30 アミノ酸以上からなる進化的によく保存された高次構造をとる配列単位である。一般的に、ドメイン-ドメイン間の相互作用は強いが、ドメイン-モチーフ間の相互作用は弱いものが多い。このことは、一過的なタンパク質-タンパク質相互作用が中心となるシグナル伝達ネットワークにおいて、ドメイン-モチーフ相互作用が有利に働くことを示している。タンパク質相互作用ネットワークにおいて、多く

のタンパク質との相互作用を持つネットワークハブとして働くタンパク質は、多くの相互作用モチーフを持つことが知られている。

進化的に保存されたドメインは、アミノ酸配列の相同性から容易に類似ドメインを同定できるが、モチーフをその配列から正確に予測することは困難である。その理由は、モチーフの短さが高い配列多様性を生ずることにある<sup>2)</sup>。このような多様な配列候補の中から、タンパク質が特異的モチーフを選択し、特異的機能を発揮する機構はどのようなものであろうか？ 現在考えられるタンパク質モチーフ認識機構は主に二つある。一つは、その認識に複数のモチーフが関わることで、結合親和性、特異性を高めていること。もう一つは、現在知られているモチーフ配列よりもより広い領域において、モチーフ内の各アミノ酸が様々なレベルでタンパク質相互作用に貢献していることによる。これらの理由から、モチーフ認識の特異性は現在の単純なコンセンサス配列では表すことはできない。まずこれら二つのモチーフ認識機構について簡単に解説し、モチーフ予測法の現状と、最近筆者らによって開発された定量的モチーフ予測法について概説する。

### 1. 複数のモチーフを介した相互作用

タンパク質リン酸化酵素は、リン酸化部位であるセリン、スレオニン、またはチロシン残基とその周辺配列を認識することで基質タンパク質を特異的にリン酸化する。したがって殆どのタンパク質リン酸化酵素は、特異的リン酸化配列を含むペプチドを基質にすることができる。一方、mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーやサイクリン依存性キナーゼ (CDK) ファミリーなどは、共に最小配列として (S/T)P を含む配列をリン酸化するが、これら酵素はリン酸化部位とは異なる基質上の配列ドッキングモチーフを認識することにより基質特異性を高めていることが知られている<sup>3)</sup>。例えば、MAPK が認識するドッキングモチーフの一つである D-site は、コンセンサス配列 (K/R)<sub>2-3</sub>-X<sub>1-6</sub>-φ-X-f (φ:疎水性アミノ酸) を持ち、ERK, JNK を含む多くの MAPK 基質がこのモチーフを含んでいる。一方、CDK は二量体として結合するサイクリンの種類によってリン酸化配列の特異性を変えることが観察されている。これは、サイクリンが基質に存在するドッキングモチーフ (RXL モチーフ) を認識することによる<sup>4)</sup>。

タンパク質の主要な核輸送体である importin α は、分子内に二つの核移行シグナル (NLS) 結合部位を持ち、それぞれ異なるクラスの monopartite NLS (クラス 1/2 および