

Elongin BC型 E3 ユビキチンリガーゼと細胞機能制御

奥村文彦, 奥村晶子, 中務邦雄, 嘉村 巧

Elongin BおよびElongin C (Elongin BC) は, Elongin Aの転写伸長活性を増強する因子として報告されたが, 近年の研究により, Cullin-RING型 E3 ユビキチンリガーゼの構成因子であることが明らかにされている. Elongin BCは, 足場タンパク質 Cul2 または Cul5, RING フィンガータンパク質 Rbx1 あるいは Rbx2, さらには基質認識サブユニット BC ボックスタンパク質と結合し, Cullin-RING型ユビキチンリガーゼ CRL2や CRL5を形成する. Elongin BCは, BC ボックスタンパク質と Cullinをつなぐアダプターとして機能するが, われわれは BC ボックスタンパク質がさらに二つのグループ, すなわち VHL ボックスタンパク質 (CRL2の基質認識サブユニット) と SOCS ボックスタンパク質 (CRL5の基質認識サブユニット) に分類されることを見いだしている. ヒトには, 約10種類の VHL ボックスタンパク質と約40種類の SOCS ボックスタンパク質が存在しており, 家族性腫瘍症候群 von Hippel-Lindau (VHL) 病の原因因子 pVHL やサイトカインシグナルを負に制御する因子 SOCS1 や SOCS3 がよく知られている. 本稿では, CRL2 および CRL5 発見の経緯やこれら E3 により制御される様々な生命現象 (がん化, シグナル伝達, 細胞運動, 分化など) について, 最新の知見も含めて紹介する.

1. はじめに

ポリユビキチン修飾依存性のタンパク質分解は短命なタンパク質の除去に重要である. 特に細胞周期, 細胞外のストレスやリガンドによるシグナル伝達, 形態形成, 分泌, DNA 修復, オルガネラ構築などに関連するタンパク質の適切な除去は生命を維持するために必須である^{1,2)}. 分解すべき標的タンパク質にユビキチンを付加する反応は数種類の酵素群により行われる^{3,4)}. ユビキチンはユビキチン活性化酵素 (E1) により ATP 依存的に活性化され, ユビキチン結合酵素 (E2) に受け渡される. E2-ユビキチンが基質分子を認識しているユビキチンリガーゼ (E3) に結合す

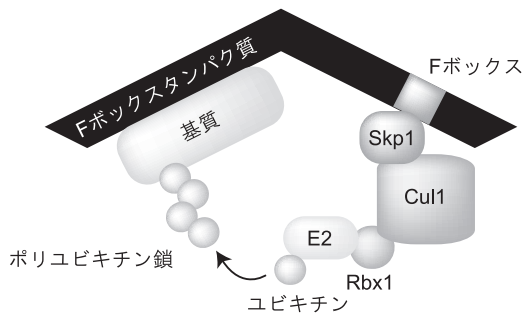
ることで基質分子がユビキチン修飾を受ける. E3はこの一連の反応において基質を認識する重要なタンパク質である⁴⁾. 構造的な違いから E3 は大きく三つのグループに分類される. HECT (homologous to E6-AP COOH terminus) 型^{2,5)}, RING フィンガー型⁶⁻⁸⁾, U ボックス型⁹⁻¹¹⁾である. S phase kinase-associated protein 1 (Skp1)- Cul1-F ボックスタンパク質ファミリーは Cullin-RING フィンガー型ユビキチンリガーゼ (CRL) であり SCF 複合体 (別名 CRL1) と呼ばれている (図1)¹²⁾. Cul1は足場タンパク質として機能し, RING フィンガータンパク質 Rbx1, アダプタータンパク質 Skp1, 基質認識サブユニット F ボックスタンパク質を会合させ, SCF 複合体を構築する. Elongin BC-Cul2 あるいは Cul5-BC ボックスタンパク質ファミリーもまた CRL ファミリー (CRL2 および CRL5 と呼ばれている) に属している (図1)¹³⁾. CRL2 および CRL5 ユビキチンリガーゼは, SCF 型ユビキチンリガーゼと構造が類似しており, RING フィンガータンパク質として Rbx1 あるいは Rbx2 を, 足場タンパク質として Cul2 あるいは Cul5 を, そして基質認識サブユニットとして VHL ボックスタンパク質あるいは SOCS ボックスタンパク質を含んでいる^{13,14)}.

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 (〒464-8602 名古屋市千種区不老町)

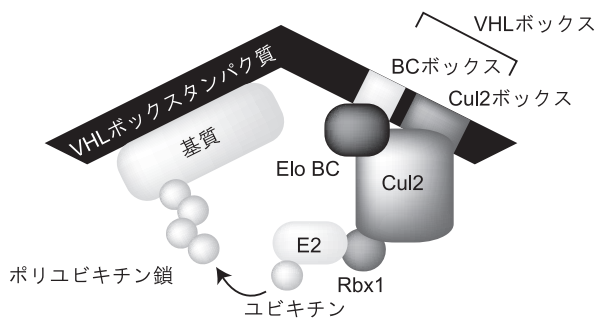
Regulation of cellular functions by Elongin BC based E3 ubiquitin ligase

Fumihiko Okumura, Akiko Okumura, Kunio Nakatsukasa and Takumi Kamura (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan)

A



B



C

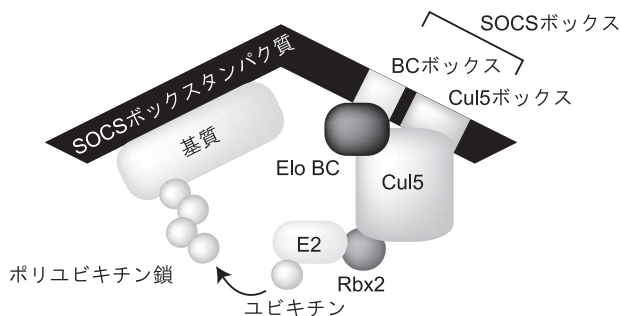


図1 SCF型、CRL2型およびCRL5型ユビキチンリガーゼの比較

(A) SCF型ユビキチンリガーゼ。Cul1は足場タンパク質であり、Skp1はFボックスタンパク質とCul1をつなぐアダプターである。(B) CRL2型ユビキチンリガーゼ。Cul2は足場タンパク質であり、Elongin BC (Elo BC) VHLボックスタンパク質とCul2をつなぐアダプターである。Cul2ボックスはCul2を認識する。(C) CRL5型ユビキチンリガーゼ。Cul5が足場タンパク質として機能する。Rbx2がE2酵素をリクルートする。

SCF型ユビキチンリガーゼでは基質認識サブユニットとCullinをつなぐアダプターとしてSkp1が用いられているが、CRL2およびCRL5ではElongin BCが用いられている(図1)。これらCRLファミリー(CRL1からCRL5までの5ファミリーからなる)はヒトで約400種類存在し、様々な生命現象を制御していることが知られている。本稿ではCRLファミリー、なかでもCRL2およびCRL5ユビキチンリガーゼファミリーに焦点を絞り、これまでの知見を紹介する。

2. Elongin ABC 複合体

Elongin ABC 複合体は転写時におけるRNAポリメラーゼ II (pol II) の一過性の読み取り停止を抑制することで転写を促進する^{15,16}。Elongin ABC 複合体は転写活性のあるElongin Aと二つの制御サブユニットElongin BおよびElongin Cからなる^{17~19}。Elongin BとElongin Cは複合体を形成し、Elongin Aの転写活性を増強する。Elongin Bはユビキチンに、そしてElongin CはSkp1に一部構造が類似しているが、発見当時はこれが何を意味しているのかは不明であった²⁰。引き続き行われた研究により、Elongin BCは転写制御因子として機能するだけでなく、後述するがん抑制因子 von Hippel-Lindau (VHL) など多くのタンパク質と相互作用することが明らかになった^{21~23}。

3. CRL2 および CRL5 ユビキチンリガーゼファミリー発見の経緯

家族性腫瘍症候群である von Hippel-Lindau (VHL) 病の原因因子として同定されたVHLがん抑制タンパク質(pVHL)の研究の過程でCRL2が発見された。pVHL異常による発がんメカニズムの解明を目的としてpVHLと結合するタンパク質の同定が生化学的手法を用いて精力的に行われてきた。その結果としてpVHLは、C末端側に存在するBCボックスを介してElongin BおよびElongin CとそしてさらにはCul2やRbx1/ROC1と結合することが明らかにされた。Elongin BおよびElongin Cは前述した転写伸長因子Elongin ABC複合体の構成因子として同定されていた。またCul2はCullinファミリーの一種であり、Rbx1/ROC1はRINGフィンガータンパク質であることより、この複合体もSCF複合体のようにE3として機能することが予想されたが、実際に後述するように低酸素誘導性転写因子HIF- α をユビキチン化することが明らかにされた。またpVHL自身の機能は、Fボックスタンパク質のように基質認識サブユニットとして基質をE3本体にリクルートすることであると判明した。

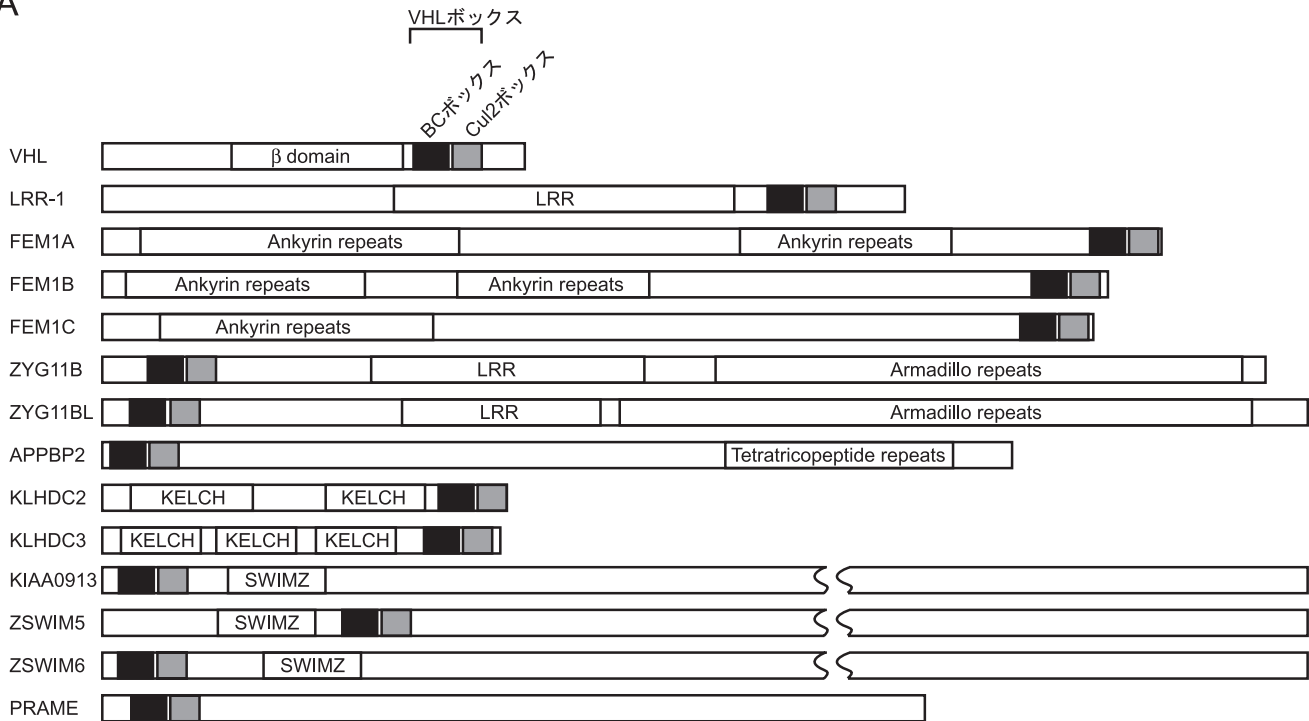
SCF複合体の基質認識サブユニットであるFボックスタンパク質が多数存在することより、CRL2の基質認識サブユニットもpVHL以外にもあることが予想された。Hiltonらは、C末端側に約50残基の保存されたアミノ酸配列[SOCS (suppressor of cytokine signaling) ボックスと呼ばれる]をもつ一群をSOCSボックスタンパク質として報告したが、このSOCSボックスのN末端の配列がpVHLに存在するBCボックスと高い相同性を持っていた²⁴。そこでわれわれは、バキュロウイルスによる昆虫細胞発現系を用いた結合実験を行い、SOCSボックスタンパク質が、Elongin B, Elongin C, Cul2, さらにはRbx1/ROC1と複合体を形成することを確認した。このことよりpVHLに加

え SOCS ボックスタンパク質も CRL2 の基質認識サブユニットであると考えられたが, さらに Cul2 と同様に Cul5 も, pVHL や SOCS ボックスタンパク質, Elongin B, Elongin C, さらに Rbx1/ROC1 と結合し E3 として機能することが明らかとなった。

これらの報告により多くの総説で, pVHL および SOCS ボックスタンパク質は, CRL2 および CRL5 両方の基質認

識サブユニットとしての役割を担っていると紹介されてきた。しかしながらわれわれは, pVHL や SOCS ボックスタンパク質がどのようにして共通のアダプター因子 Elongin BC を介して異なった Cullin (Cul2 と Cul5) と複合体を形成するのかということに興味を持ち研究を進めた。その結果として pVHL は Cul2 と, SOCS ボックスタンパク質は Cul5 と, それぞれ特異的に結合することを明らかにする

A



B

VHL	NP_000542	175	YRRLLD	I	V	R	S	L	Y	E	D	L	E	189
LRR-1	NP_689542	338	YGSHII	P	F	H	L	C	Q	D	L	D	352	
LRR14	NP_055480	21	QALPLP	P	R	E	L	F	F	P	L	L	F	35
LRR28	NP_653199	295	LSPISL	P	R	S	L	L	E	L	L	H	309	
LRR42	NP_443172	105	DSLIGF	P	E	Q	I	A	E	K	L	F	119	
LRR58	NP_001093148	277	YTPYDL	P	G	N	L	R	L	R	L	G	291	
FEM1A	NP_061178	653	PYKGF	P	E	D	L	E	A	F	I	E	667	
FEM1B	NP_056137	611	NYQDQ	I	P	R	T	L	E	E	F	V	G	625
FEM1C	NP_064562	600	YYKGI	P	E	K	L	E	T	F	V	S	614	
ZYG11B	NP_078922	45	QEPGV	F	P	Q	E	V	A	D	R	L	L	59
ZYG11BL	NP_006327	37	HPDIF	L	P	S	E	I	C	D	R	L	V	51
APPBP2	NP_006371	30	RDIRS	L	P	E	N	I	Q	F	D	V	Y	44
KLHDC2	NP_055130	381	NSWNC	L	P	K	H	L	L	H	S	V	N	395
KLHDC3	NP_476502	351	LDQSC	L	P	H	D	I	R	W	E	L	N	365
KIAA0913	NP_055852	95	KVYPP	V	P	E	Q	L	R	I	A	109		
ZSWIM5	NP_065934	84	ERFER	I	P	E	P	V	Q	R	R	I	V	98
ZSWIM6	NP_065979	96	ERFER	I	P	E	P	V	Q	R	R	I	V	110
PRAME	NP_996839	43	AALEL	L	P	R	E	L	F	F	P	L	F	57
MED8	NP_963836	169	NKQTF	N	P	T	D	N	A	L	V	A	183	
HPV E7	NP_041326	64	TLRLC	V	Q	S	T	H	V	D	I	R	T	78

Consensus -----ΦP--Φ---Φ--

図2 VHL ボックスタンパク質のドメイン構造

(A) VHL ボックスは BC ボックスと Cul2 ボックスからなる。LRR (leucine-rich repeats), SWIMZ (SWI2/SNF2 MuDR zinc fingers). (B) Cul2 ボックスのアライメント。保存されたアミノ酸を強調している。GenBank™ accession numbers をそれぞれ記している。保存されたアミノ酸配列を最下部に記している。Φ: 疎水性アミノ酸。

とともに、新たに VHL ボックスタンパク質群を Cul2 結合タンパク質として同定した¹⁴⁾。これらの結合の特異性はそれぞれ VHL ボックスと SOCS ボックスにより担われていた。VHL ボックスは約 40 アミノ酸からなり、BC ボックスと Cul2 ボックスに分けられる (図 1)。BC ボックスは (S,T,P)LXXX(C,S,A)XXXΦ というコンセンサス配列からなり^{25,26)}、この領域を介して Elongin C と結合する。Cul2 ボックスは BC ボックスより 8~23 アミノ酸残基 C 末端側に位置し、ΦPXXΦXXXΦ というコンセンサス配列を持ち、Cul2 との結合に必要である (図 2)。一方 SOCS ボックスは、BC ボックスと Cul5 ボックスよりなり、Cul5 ボックスを介して Cul5 と選択的に結合する。また、ヒトには Rbx1 および Rbx2 と 2 種類の似通った RING フィンガータンパク質が存在しているが、Rbx1 は Cul2 と、そして Rbx2 は Cul5 と特異的に結合することも明らかにした¹⁴⁾。これらの発見は、混同されていた CRL2 と CRL5 の構造的特徴を明確に分離するものであった。

4. CRL2 ユビキチンリガーゼと細胞機能制御 (表 1)

4-1. CRL2^{pVHL} 複合体

CRL2^{pVHL} 複合体は転写因子 hypoxia-inducible factor-α (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α) をポリユビキチン化しプロテアソームによる分解を促進する (図 3)²⁷⁾。通常酸素濃度においては HIF-α の oxygen-dependent degradation domain (ODDD) 内にあるコンセンサス配列 (LXXLAP) のプロリン残基が水酸化を受け pVHL によって認識される^{28~31)}。その結果、HIF-α はポリユビキチン修飾を受け分解される。哺乳類においては HIF-α に対するプロリン水酸化酵素として 3 種類 (PHD1, PHD2, PHD3) が同定されている³²⁾。そのうち PHD2 が HIF-1α に対する主な酵素であることが報告されている³³⁾。低酸素状況下では PHD は HIF-α を水酸化できないために HIF-α は pVHL によって認識されず、恒常的に発現している HIF-1β (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: ARNT) と結合し、核内に移行する。そして、vascular endothelial growth factor A

(VEGFA), solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1, GLUT1), platelet-derived growth factor-β (PDGFB) といった遺伝子群の発現を誘導する^{27,34~37)}。一方、pVHL の変異・欠失により酸素濃度依存的な HIF-α の制御ができなくなると、下流遺伝子群の発現が恒常的に亢進し、VHL 病の発症へとつながる。

現在までに HIF-α 以外にも多くのタンパク質が CRL2^{pVHL} 複合体によってユビキチン修飾を受けることが報告されている。がんの増殖に関与する Sprouty2 (Spry2) は CRL2^{pVHL} によりポリユビキチン修飾を受け分解される³⁸⁾。HIF-α と同様に Spry2 のプロリン残基は、通常の酸素濃度下において PHD により水酸化され、pVHL に認識される。CRL2^{pVHL} はさらに上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) のポリユビキチン修飾・分解も引き起こす³⁹⁾。CRL2^{pVHL} は恒常的な EGFR 依存性のシグナル伝達を抑制することで、がん細胞の増殖を制御していると考えられている。CRL2^{pVHL} による PKCλ と PKCζII のポリユビキチン修飾も報告されている^{40,41)}。PKCζII は密着結合や頂低極性において重要な Par6 と結合し、密着結合の形成を抑制する^{42,43)}。PKCλ に関してはあまり解析が進んでいないが同様の機能を有しているかもしれない。CRL2^{pVHL} はさらに RNA ポリメラーゼ II のサブユニット RPB7 をポリユビキチン化し RPB7 依存的な VEGF の転写を抑制する⁴⁴⁾。別のサブユニット Rpb1 には HIF-1 がもつ pVHL 結合ドメインと類似のアミノ酸配列があり、pVHL によりポリユビキチン修飾を受ける (図 4)⁴⁵⁾。pVHL と Rpb1 の結合は紫外線 (UV) 照射による Rpb1 のリン酸化により増強されることから、Rpb1 のユビキチン修飾は DNA 修復に寄与している可能性がある^{45,46)}。Rpb1 の LXXLAP モチーフ内のプロリン残基は酸化ストレス下において主に PHD1 により水酸化を受ける⁴⁷⁾。pVHL はこの 1465 番目のプロリン残基の水酸化、さらには 5 番目のセリン残基のリン酸化、Rpb1 のポリユビキチン化と DNA への結合に必須である。興味深いことに腎明細胞がんにおいて CRL2^{pVHL} は Rpb1 をポリユビキチン化するが分解せず、逆に安定化する。その結果、下流の遺伝子発現を亢進し、がん細胞の増殖を促進する。一方、PC12 細胞内においては CRL2^{pVHL} は Rpb1 をポリユビキチン化し分解へと導く⁴⁵⁾。二つの異なった細胞株でなぜこのような違いが起こるのかはまだ明らかにされていない。

4-2. CRL2^{LRR-1} 複合体

leucine-rich repeat protein (LRR)-1 は VHL ボックスを持ち Cul2-Rbx1 複合体と結合する (図 3)^{14,48)}。線虫の LRR-1 は Cip/Kip CDK-inhibitor (CKI-1) を分解し生殖細胞の細胞周期を亢進する⁴⁹⁾。ヒトの LRR-1 も CDK-inhibitor p21^{Cip1} をポリユビキチン化するが、細胞周期には影響を与えない

表 1 CRL2 型ユビキチンリガーゼと認識される基質

ユビキチンリガーゼ	基 質	文 献
pVHL	HIF-α	28~31)
	Spry2	38)
	EGFR	39)
	PKCλ と PKCζII	40, 41)
	RPB7	44)
	Rpb1	45, 47)
LRR-1	CKI-1 (<i>C. elegans</i> のタンパク質)	49)
	p21 ^{Cip}	49)
FEM1B	TRA-1	52)
	Ankrd37	53)

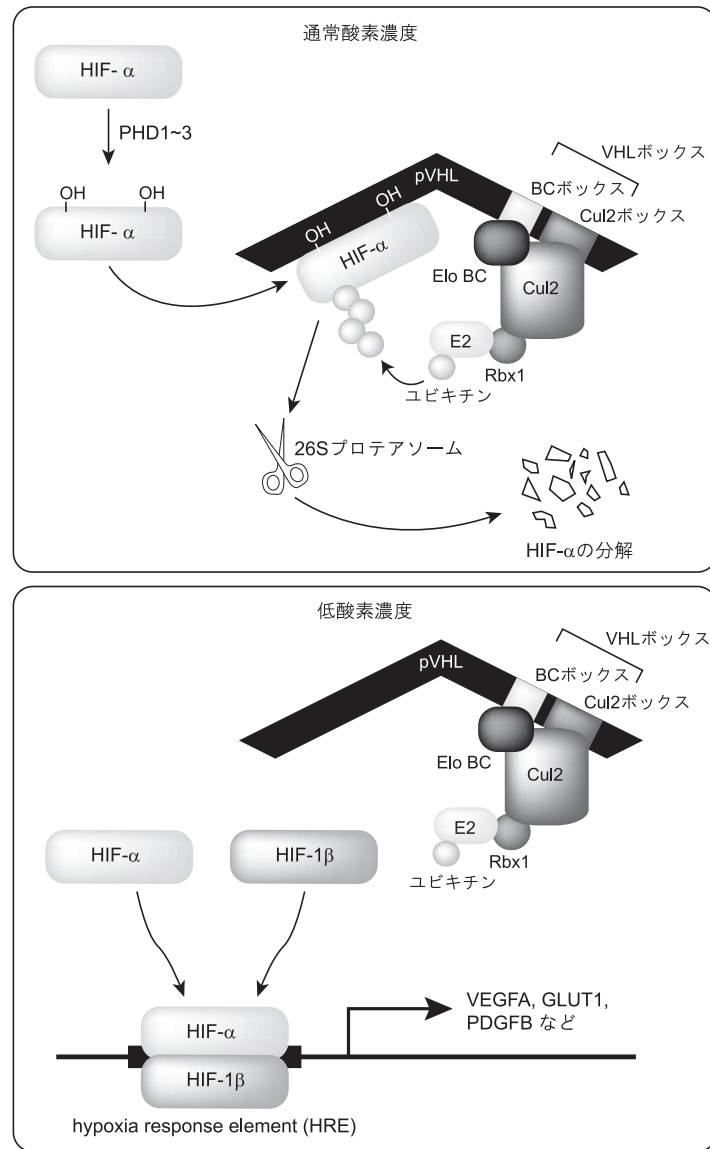


図3 pVHLによるHIF- α の制御

通常酸素濃度下においてはHIF- α の二つのプロリン残基はPHDにより水酸化を受けpVHLに認識される。その結果プロテアソーム依存的に分解される。一方、低酸素状況下ではHIF- α は水酸化を受けないため分解されない。HIF- α はHIF-1 β と二量体化しアクティブな転写因子となる。持続的なHIF- α / β 転写因子の存在はVHL病の主な発症原因となる。

い。ヒトのLRR-1は細胞質のp21を分解することでRho/ROCK/LIMK経路の抑制を解除するので、細胞運動を抑制するアクチン脱重合タンパク質Cofilinの抑制因子であると考えられている。

4-3. CRL2^{FEM1B}複合体

Feminization-1 (FEM-1)はVHLボックスを持ちCul2-Rbx1複合体と結合する(図3)。線虫のFEM-1は性決定過程においてアポトーシスを制御する⁵⁰⁾。すなわち、FEM-1はApaf-1のホモログであるCED-4と結合すること

でアポトーシスを誘導する。このことは進化的に保存されたFEM-1の役割を示唆している⁵¹⁾。線虫のFEM-1は性決定過程に関与し、Gliファミリーに属する転写因子TRA-1をポリユビキチン化する⁵²⁾。マウスFEM1ホモログB(FEM1B)はAnkyrin repeat domain 37(Ankrd37)と結合しポリユビキチン化する⁵³⁾。Ankrd37はゼブラフィッシュからヒトまで保存され、精巣に高発現している。これらの知見は性決定過程がユビキチン依存性のタンパク質分解により制御されていることを示唆している。一方、FEM-1はFボックスとWD40リピートをもつユビキチンリガー

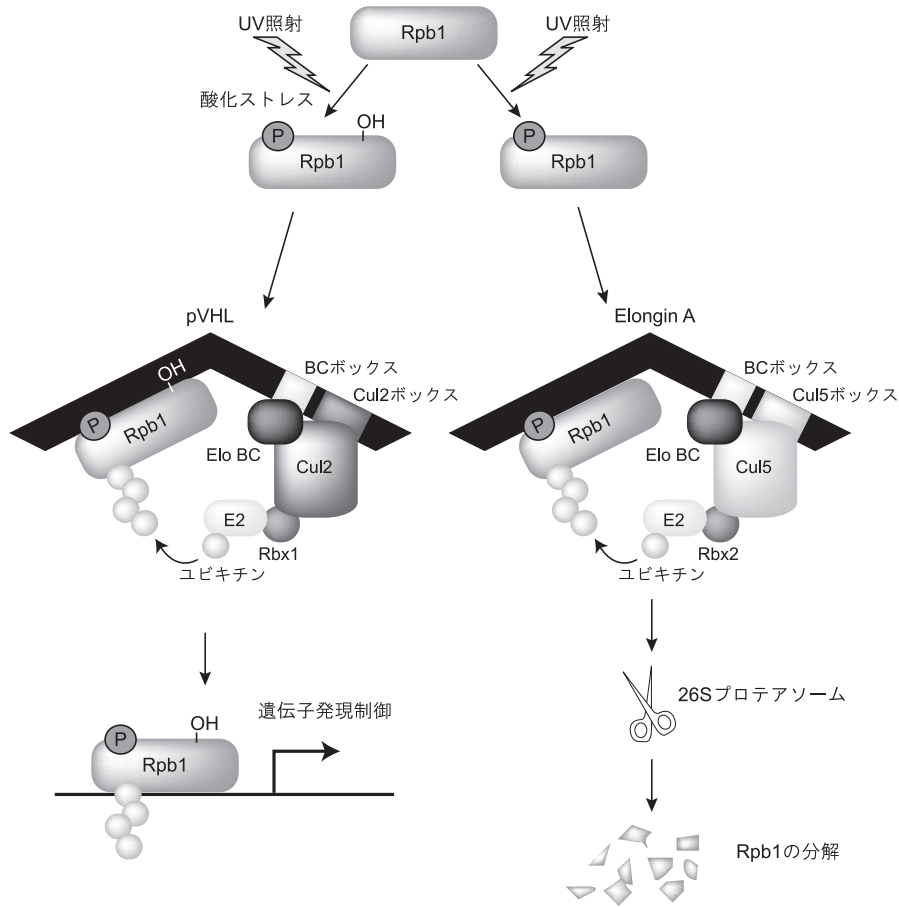


図4 pVHLとElongin Aによるlarge subunit of RNA polymerase II (Rpb1)の制御
 酸化ストレスによりRpb1の5番目のセリン残基のリン酸化、1465番目のプロリン残基の水酸化が起こりpVHLに認識される。ポリユビキチン化されたRpb1は分解へと導かれず、遺伝子発現を制御することで腎臓細胞のがん化に寄与する。5番目のセリン残基はUV照射によってもリン酸化され、Elongin Aに認識されて分解へと導かれる。

ゼSEL-10によりポリユビキチン化を受けプロテアソーム依存的に分解される⁵⁴。哺乳類細胞においてはWD40リピートをもつタンパク質receptor for activated C kinase (RACK) 1もFEM1Bと結合し、ポリユビキチン化することで分解を促進する⁵⁵。RACK1はElongin BC複合体と結合することでCRL2^{pVHL}非依存的にHIF-1 α もポリユビキチン化する⁵⁶。RACK1のElongin BC結合領域はpVHLの配列と似ているので、RACK1はCRL2複合体を形成すると考えられる。

4-4. CRL2^{PRAME}複合体

preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME)はVHLボックスを持ちCul2-Rbx1複合体と結合する(図3)^{14, 48}。網羅的Ch-IP解析によりPRAMEはエンハンサーや初期発生に不可欠な転写因子nuclear transcription factor Y (NFY)が結合しているアクティブなプロモーターに蓄積していることが明らかとなっている^{48, 57}。しかしながらポリユビキチン修飾を受ける基質分子は現在まで同定され

ていない。

5. CRL5ユビキチンリガーゼと細胞機能制御 (表2)

5-1. CRL5^{CIS/SOCS}複合体

このファミリーはSOCSタンパク質とcytokine-inducible SH2 domain-containing protein (CISあるいはCISH)により構成される。これらはSOCSボックスを介してCRL5複合体を形成する⁵⁸。現在8種類のタンパク質がCIS/SOCSファミリーとして同定されている(CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7)。これらは中央にSrc homology 2 (SH2)ドメイン、C末端側に約50アミノ酸からなるSOCSボックスをもつ(図5)⁵⁹⁻⁶¹。CIS/SOCSファミリータンパク質はJanus kinases (JAKs)、サイトカイン受容体、シグナル伝達因子に結合し、過剰なシグナル伝達を抑制する⁵⁸。SOCS1とSOCS3のkinase inhibitory region (KIR)は偽基質ドメインとして働きJAKsを阻害し、過剰なシグナル伝達を抑制する。また、CIS/SOCSファミリータンパク質は競合的にシグナル伝達因子の受容

表2 CRL5型ユビキチンリガーゼと認識される基質

ユビキチンリガーゼ	基質	文献
SOCS1	JAK2	64)
	Vav	63)
	IRS1 と IRS2	65)
Elongin A	Rpb1	70)
SSB1, SSB2 と SSB4	iNOS	74, 75)
WSB1	HIPK2	76, 77)
	D2	91)
ASB2	Filamin A と Filamin B	95)
	Jak3	96, 97)
ASB3	TNF-R2	98)
ASB4	IRS4	100)
ASB6	APS	101)
ASB9	CKB	102)
ASB11	DeltaA (<i>Danio rerio</i> のタンパク質)	106, 107)

体への結合を阻害したり、ポリユビキチン化によってシグナル伝達因子を分解したりすることでシグナル伝達を制御する^{58, 62)}。例えば SOCS1 は JAK2, Vav, IRS1, IRS2 をポリユビキチン化することが示されている^{63~65)}。最近では、SOCS1 と SOCS3 は獲得免疫にも重要であることが明らかにされている^{13, 66)}。データベース解析により現在までに約 40 種類の SOCS ボックスタンパク質が存在していることが知られている (図 5)^{14, 24, 67~69)}。前述しているように SOCS ボックスは BC ボックスと Cul5 ボックスより構成されており、Cul5 ボックス内の保存されたアミノ酸配列 LPΦP (特に 4 番目のプロリンが重要) は Cul5 との選択的結合に寄与している¹⁴⁾。SOCS1 は不完全な Cul5 ボックスを有しているため Cul5 との結合はウェスタンブロッティングにより確認できていない。しかしながら、SOCS1 は JAK2, Vav, IRS1, IRS2 などポリユビキチン化する^{63~65)}。このことは、SOCS1 と基質に結合する SOCS1 以外のユビキチンリガーゼの存在を示唆している。もしくは SOCS1 は Cul5-Rbx2 複合体に検出不可能なくらい非常に弱く結合することで基質のポリユビキチン修飾を担っているのかもしれない。実際、他の SOCS ボックスタンパク質に比べて SOCS1 は 100 倍、SOCS3 は 10 倍弱く Cul5 と結合することが報告されている⁶⁷⁾。一般的に μM (マイクロモル濃度) レベルの親和力が生理的な相互作用に必要とされており、SOCS1 と SOCS3 は Cul5 に対してそれぞれ $1 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$ の親和力を示している。したがって、すべての CIS/SOCS ファミリーはユビキチンリガーゼとして機能することができると考えられる。これらのことはなぜ SOCS1 と SOCS3 だけが SOCS ボックス依存性あるいは非依存的にシグナル

伝達を抑制できるのかを示唆しているのかもしれない。

5-2. CRL5^{Elongin A} 複合体

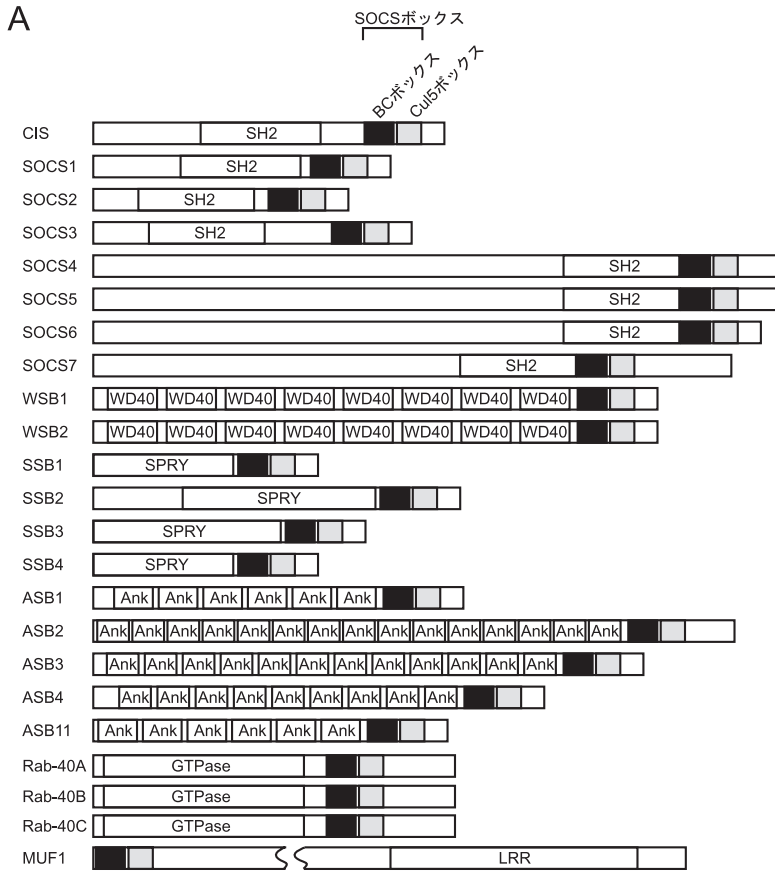
既に述べたように pVHL は RNA ポリメラーゼ II (Rpb1) に対するユビキチンリガーゼである。興味深いことに UV 照射による Rpb1 のポリユビキチン化とプロテアソーム依存性の分解は Elongin A 欠損細胞において抑制されていることから Elongin A は Rpb1 に対するユビキチンリガーゼであることが報告されている (図 4)⁷⁰⁾。実際、Elongin A の再導入により Rpb1 のポリユビキチン化と分解が回復する。さらに Elongin A と Elongin BC 複合体は Cul5-Rbx2 複合体と相互作用し、*in vitro* において Rpb1 をポリユビキチン化する。また、UV 照射による Rpb1 の 5 番目のセリン残基のリン酸化により Elongin A との結合が増強する。これらの事実は Elongin A が DNA 損傷後の Rpb1 のポリユビキチン化とその分解に寄与していることを示唆している。

5-3. CRL5^{SSB} 複合体

誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS あるいは NOS2) は NOS1 や NOS3 に比べて活性が約 10 倍強い⁷¹⁾。iNOS は通常は発現していないが、サイトカイン、病原菌あるいはその産物などによって誘導され一酸化窒素 (NO) を合成する。その結果、NO、亜硝酸塩、硝酸塩などの反応性関連物質や、ペルオキシ亜硝酸などの活性酸素種が蓄積しウイルスや細菌の除去に用いられる^{71~73)}。SSB1, SSB2, SSB4 は iNOS をポリユビキチン化する^{74, 75)}。SSB2 欠損マクロファージは持続した iNOS の発現と NO 合成を示し、大形リーシュマニア (トリパノソーマ科に属する原生生物で細胞内に寄生する) の除去効率が高い。その後の解析により、主に SSB1 と SSB4 が iNOS に対するユビキチンリガーゼであることが示され、NO の過剰産生や細胞障害を抑制することが報告されている。

5-4. CRL5^{WSB1} 複合体

WSB1 は homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) をポリユビキチン化する。HIPK2 はショウジョウバエからヒトまで保存されている核内タンパク質である^{76, 77)}。HIPK2 は p300/CBP コアクチベーター^{78, 79)}、Groucho/TLE コリプレッサー⁷⁶⁾ など様々な転写因子と結合する^{80~83)}。HIPK2 の欠損はアポトーシスを抑制し三叉神経節の数を増加させる。一方、HIPK2 の知覚神経や交感神経での過剰発現はカスパーゼ依存性のアポトーシスを誘導する^{84, 85)}。HIPK2 は p53, CtBP, Axin, Brn3, Sp100, TP53INP1, PMLなどを介したアポトーシスに重要である^{85~89)}。UV 照射は WSB1 非依存的に HIPK2 の自己リン酸化を引き起こし、HIPK2 は安定化されると同時に活性化され、p53 の



B

CIS	NP_037456	255	VDCPLPRRMADYLR	269
SOCS1	NP_003736	191	LARIPLNFVERDYLS	205
SOCS2	NP_003868	178	IWGLPLPTRLKDYLE	192
SOCS3	NP_003946	207	VTQLRGPPIREFLDQY	221
SOCS4	NP_955453	406	IDALPIPSSMKLYLK	420
SOCS5	NP_659198	501	IDGLPLPSSMDDFLK	505
SOCS6	NP_004223	517	IQKLPLPNKMKDYLQ	531
SOCS7	NP_055413	535	IPDLPLPKPLTSYIR	549
WSB1	NP_056441	404	VQELPIPSKLLDFLS	418
WSB2	NP_061109	386	VLALPIPKMKBFLLT	400
SSB1	NP_079382	257	IHTLPLPASLQVYLL	271
SSB2	NP_001139788	247	VSALPLPPAMKRYLL	261
SSB3	NP_543137	296	LEGDLPLPGLKQVYH	310
SSB4	NP_543138	257	ISSLPLPQSLKNYLO	271
ASB1	NP_057198	319	IPSLPLPDPFKKFL	333
ASB2	NP_001189358	616	IDTLPLPGRLLRYLK	630
ASB3	NP_057199	485	ISQLPLPRLHNYLL	499
ASB4	NP_057200	406	LLSLPLSLKKYLLLE	420
ASB5	NP_543150	313	IPQLPLPFLKRNFLQ	327
ASB6	NP_060343	396	VKALPLPDRKQWYLL	410
ASB7	NP_937886	298	LDELPLIAKVMKDYLK	312
ASB8	NP_077000	271	VKGLPLPASKKEYLL	285
ASB9	NP_001026909	278	ITRLVLPEDLKKFLL	292
ASB10	NP_001135931	445	LPRPLPPLRLRYLQ	459
ASB11	NP_543149	307	IHKPLPPEPLERFL	321
ASB12	NP_569059	301	INQLDIPPMILSYLK	315
ASB13	NP_078977	262	IAKNIPLPRLDYLS	276
ASB14	NP_001136205	557	MSFLPLPNRLKRVL	571
ASB15	NP_563616	560	VEKPLPLPALQRNLL	574
ASB16	NP_543139	431	ATRPLPLPLRDYLL	445
ASB17	NP_543144	278	IFSLPLPAREQNYLN	292
ASB18	NP_997721	444	IPLLPLPKPLQNYLL	458
Rab-40A	NP_543155	209	VDKLPLPSTLRSHLK	223
Rab-40B	NP_006813	209	VDKLPLPVALRSHLK	223
Rab-40C	NP_066991	209	IDKLPLPVTIKSHLK	223
MUF1	NP_006360	65	VVALPGLPILQSILPL	79
EloA	NP_003189	593	FEVGVVPSVLEPVL	607

Consensus Φ --LP Φ P-- Φ --YL--
F

図5 SOCSボックスタンパク質のドメイン構造

(A) SOCSボックスはBCボックスとCul5ボックスからなる。SH2 (Src homology 2 phosphotyrosine binding domain), WD40 (WD40 repeats), SPRY (sp1A/ryanodine receptor domain), Ank (ankyrin repeats), LRR (leucine-rich repeats), GTPase (GTPase domain). (B) Cul5ボックスのアライメント。保存されたアミノ酸を強調している。GenBank™ accession numbersをそれぞれ記している。保存されたアミノ酸配列を最下部に記している。Φ:疎水性アミノ酸。

46番目のセリン残基をリン酸化する。その結果、p53の下流の遺伝子群が発現誘導されアポトーシスを引き起こす^{82,83}。一方、アドリアマイシンやシスプラチンによるDNA損傷はWSB1によるHIPK2のポリユビキチン化を抑制する⁷⁷。p53欠損細胞株においてHIPK2はCtBPの422番目のセリン残基をリン酸化し、CtBPの26Sプロテアソームによる分解を誘導することでアポトーシスを誘導する⁹⁰。WSB1はさらにthyroid hormone-activating enzyme type 2 iodothyronine deiodinase (D2)のポリユビキチン化も引き起こす⁹¹。WSB1は胚芽や胚構造に関わる部位においてSonic hedgehog (Shh)により誘導される⁹²。D2もShhにより誘導されるが、WSB1によりポリユビキチンを受け、その結果、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (parathyroid hormone-related peptide: PTHrP)を誘導し、軟骨細胞の分化が制御される⁹¹。また、WSB1はインターロイキン-21受容体 (IL-21R)に結合する⁹³が、分解を引き起こすのではなく成熟型IL-21Rの分解を抑制する。WSB1はIL-21Rの細胞内領域に結合し、N型糖鎖修飾体から完全に糖鎖修飾を受けた成熟型への移行を促進する。したがってWSB1はIL-21Rの成熟と分解において重要である。

5-5. CRL5^{ASB} 複合体

ASB2, ASB3, ASB4, ASB6, ASB9, ASB11はすべてCul5-Rbx2複合体と結合する。急性前骨髄球性白血病細胞においてASB2はレチノイン酸で誘導され⁹⁴、アクチン結合タンパク質Filamin A, Filamin Bをプロテアソームによる分解へと導く⁹⁵。白血病細胞のASB2をノックダウンすると、レチノイン酸による分化とFilaminの分解が抑制されるのでASB2はFilaminの分解を促進することで、造血細胞の分化とアクチンの再構築を制御している可能性がある。ASB2はSkp2と結合し、Cullin1とCullin5を含むヘテロ二量体型ユビキチンリガーゼを形成し、Jak3のポリユビキチン化と分解を促進する^{96,97}。ASB3は腫瘍壊死因子受容体2型 (tumor necrosis factor receptor type 2: TNF-R2)をポリユビキチン化しその分解を促進する⁹⁸。ASB3はTNF-R2の分解を促進することでT細胞のTNF- α 依存性シグナル伝達を抑制する。インスリン受容体基質4 (insulin receptor substrate 4: IRS4)はインスリンやレプチンによるシグナル伝達を担うアダプタータンパク質である。視床下部全体に発現しているが内側視索前核、視床下部腹内側部、弓状核に強く発現している⁹⁹。視床下部神経細胞においてASB4はIRS4と共局在し、お互いに結合している¹⁰⁰。ASB4はIRS4をポリユビキチン化し、分解を促進することでインスリンによるシグナル伝達を抑制する。ASB6は3T3-L1脂肪細胞に発現しているが繊維芽細胞には発現していない¹⁰¹。ASB6は脂肪細胞内において、インスリン依存性シグナル伝達に関与するアダプタータンパク

質の分解を促進している可能性がある。ASB9はクレアチンキナーゼB (creatine kinase B: CKB)をポリユビキチン化し分解を促進する¹⁰²。Notchシグナル伝達は時空間的細胞運命決定に必要不可欠である¹⁰³⁻¹⁰⁵。一回膜貫通タンパク質DeltaはNotch受容体のリガンドである。ゼブラフィッシュのAsb11 (d-Asb11)はDeltaAの分解を促進することでNotchシグナル伝達経路を活性化し、内胚葉系や神経細胞系のサイズを制御する^{106,107}。d-Asb11はDeltaDの分解を促進しないのでこの制御はDeltaAに選択的である。ゼブラフィッシュの胎仔においてd-Asb11をノックダウンすると特定のDelta-Notchシグナル伝達経路や標的遺伝子の発現が抑制されるが、d-Asb11の再導入によりこれらは回復する。このことはd-Asb11がDeltaAの分解を介してDelta-Notchシグナル伝達経路を適切に制御していることを示唆している。

5-6. CRL5^{Rab-40C} 複合体と CRL^{MUF1} 複合体

Rab-40CとMUF1がそれぞれ認識する基質は明らかとなっていない。しかしながら、Rab-40Cはrecycling compartment (早期エンドソーム)に局在するので受容体のエンドサイトーシスに関与している可能性がある¹⁰⁸。Rab-40CのmRNA量とタンパク質量はオリゴデンドロサイトが分化するにしたがって増加するので、ミエリン形成に関与している可能性がある。

6. ウイルス CRL ユビキチンリガーゼと細胞機能制御 (表3)

6-1. CRL2^{HPV16E7} 複合体

16型ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV)は扁平上皮がんを引き起こす¹⁰⁹。ウイルスDNAの宿主ゲノムへの挿入により、がん化とその維持に必須なタンパク質E6, E7が持続的かつ無秩序に発現する。E6はE6-associated protein (E6AP)と共にp53のポリユビキチン化を促進する。E7タンパク質は不完全なCul2ボックスを有し、内在性のCul2と結合する¹¹⁰。E7は網膜芽細胞腫抑制因子 (retinoblastoma tumor suppressor: pRB)をポリユビキチン化しその分解を促進する¹¹⁰⁻¹¹³。

6-2. CRL5^{Vif} 複合体

ヒト免疫不全ウイルス1 (human immunodeficiency virus-1: HIV-1)のViral infectivity factor (Vif)はCul5型ユビキチンリガーゼである^{114,115}。Vifの亜鉛結合モチーフはCul5との結合に重要であることが報告されている¹¹⁶⁻¹¹⁸。Vifは宿主細胞内のAPOBEC3FとAPOBEC3Gをポリユビキチン化する^{114,119,120}。APOBEC3FとAPOBEC3Gはシチジン脱アミノ酵素であり、HIV-1ウイルス粒子に取り込まれるとウイルスDNAのシトシン (C)をウラシル (U)に置換

表3 ウイルス CRL 型ユビキチンリガーゼと認識される基質

ユビキチンリガーゼ	基 質	文 献
HPV16E7 (CRL2 型)	pRB	110~113)
Vif (CRL5 型)	APOBEC3F と APOBEC3G	114, 119, 120)
Ad5 の E4orf6 (CRL5 型)	p53 Mre11 DNA リガーゼ IV インテグリン α 3 AAV5 Rep52 とカプシドタンパク質	131~136) 126, 137) 138) 139) 140)
Ad16 の E4orf6 (CRL2 かつ CRL5 型)	DNA リガーゼ IV	128)
BZLF1 (CRL2 かつ CRL5 型)	p53	149, 150)

する^{121~125)}。この C から U への置換はアミノ酸変異を引き起こし、HIV-1 の酵素活性に影響を与える¹²⁵⁾。また、ウイルス DNA のデオキシウリジンはウラシル DNA グリコシラーゼに認識され除去される可能性もある。これらの脱塩基部位はエンドヌクレアーゼに認識され切断されることで HIV-1 の複製が抑制される。CRL5^{Vif} 複合体は APOBEC3F と APOBEC3G をプロテアソームによる分解へと導くので、Vif と Cul5 の結合を抑制するような抗ウイルス薬の探索は有益であると考えられる。

6-3. CRL5^{E4orf6} 複合体

ヒトアデノウイルス 5 型 (adenovirus type 5: Ad5) early region 4 34-kDa product from open reading frame 6 (E4orf6) は三つの BC ボックスを有している^{126~128)}。Ad5 E4orf6 は Cul5, Elongin BC 複合体, Rbx1 と複合体を形成するが Cul5 ボックスを有していない^{126, 128, 129)}。別のアデノウイルスタンパク質 E1B55K は E4orf6 と結合し、基質分子をユビキチン-プロテアソーム経路を介して分解する^{126, 127, 130)}。この複合体は効率的なウイルス複製に不可欠であり、その基質として p53^{131~136)}、Meiotic recombination 11 (Mre11)^{126, 137)}、DNA リガーゼ IV¹³⁸⁾、インテグリン α 3¹³⁹⁾、アデノ随伴ウイルス 5 型 (adeno-associated virus type 5: AAV5) Rep52, カプシドタンパク質¹⁴⁰⁾が同定されている。Mre11 複合体は Mre11, RAD50, Nijmegen 染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome 1: NBS1, Nibrin) からなる DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand breaks: DSBs) のセンサーとして機能し、p53 依存的なアポトーシスを誘導する¹⁴¹⁾。DNA リガーゼ IV は DSBs の修復に重要であり、その変異により顕著な放射線感受性の亢進、DNA 修復異常、悪性腫瘍、免疫不全、骨髄低形成などが主症状のリガーゼ IV (LIG4) 症候群を引き起こす¹⁴²⁾。インテグリン α とインテグリン β のヘテロ二量体は細胞外からのシグナルを細胞内に伝達する受容体として機能する。 α 3 と β 1 からなるインテグリン α 3 β 1 はフィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ラミニンなどを含む様々な細胞外のマト

リックスと結合する¹⁴³⁾。E4orf6/E1B55K ユビキチンリガーゼ複合体は細胞外マトリックスからの細胞の遊離に関与することでウイルスの拡散に寄与している可能性がある¹³⁹⁾。Ad5 の E4orf6 複合体には Cul5 が含まれるが、Ad12 と Ad40 の E4orf6 複合体には Cul2 が含まれる¹²⁸⁾。興味深いことに Ad16 の E4orf6 複合体は Cul2 にも Cul5 にも結合し、p53 やインテグリン α 3 の分解を促進しない。どのようにして E4orf6 複合体が Cul2 と Cul5 を識別しているのかはいまだ明らかとなっていない。

6-4. CRL5^{BZLF1} 複合体

Epstein-Barr ウイルス (EBV) やヒト γ -ヘルペスウイルスは B 細胞や上皮細胞のがん化に関与し、その感染は潜伏期と複製期に分けられる¹⁴⁴⁾。BZLF1 (Zta, EB1, あるいは ZEBRA) は転写因子であり EBV の初期遺伝子を発現誘導することでウイルス複製期を開始する^{145~148)}。BZLF1 は Cul2 ボックスも Cul5 ボックスも有し、Cul2 にも Cul5 にも結合することができる¹⁴⁹⁾。BZLF1 は p53 をポリユビキチン化しその分解を促進する^{149, 150)}。p53 の分解はアポトーシスを抑制し、ウイルスの増殖と複製は効率的に行われる。

7. おわりに

従来の BC ボックスタンパク質群はさらに二つのファミリー、VHL ボックスタンパク質群と SOCS ボックスタンパク質群に分類される。これらのタンパク質群は、それぞれ CRL2 と CRL5 の基質認識サブユニットとして、特異的基質を E3 にリクルートする役割を担っている。現在までにこれらのユビキチンリガーゼが発がんやシグナル伝達などに関与していることが明らかになってきている。しかしながら、CRL2 と CRL5 ユビキチンリガーゼはヒトでは 50 種類以上存在しており、まだこれら E3 の大多数の機能は明らかにされていない。今後の研究により新たな基質の同定、そしてそれら酵素・基質関係に制御される生命現象が解明されていくことが期待される。

文 献

- 1) Peters, J.M. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 759–768.
- 2) Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425–479.
- 3) Hershko, A. & Ciechanover, A. (1992) *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761–807.
- 4) Scheffner, M., Nuber, U., & Huibregtse, J.M. (1995) *Nature*, **373**, 81–83.
- 5) Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2563–2567.
- 6) Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., & Weissman, A.M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11364–11369.
- 7) Freemont, P.S. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, R84–R87.
- 8) Joazeiro, C.A. & Weissman, A.M. (2000) *Cell*, **102**, 549–552.
- 9) Aravind, L. & Koonin, E.V. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, R132–R134.
- 10) Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., & Nakayama, K.I. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 33111–33120.
- 11) Cyr, D.M., Hohfeld, J., & Patterson, C. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 368–375.
- 12) Lipkowitz, S. & Weissman, A.M. (2011) *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 629–643.
- 13) Kile, B.T., Schulman, B.A., Alexander, W.S., Nicola, N.A., Martin, H.M., & Hilton, D.J. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 235–241.
- 14) Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., & Nakayama, K.I. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 3055–3065.
- 15) Bradsher, J.N., Jackson, K.W., Conaway, R.C., & Conaway, J.W. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 25587–25593.
- 16) Bradsher, J.N., Tan, S., McLaury, H.J., Conaway, J.W., & Conaway, R.C. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 25594–25603.
- 17) Aso, T., Lane, W.S., Conaway, J.W., & Conaway, R.C. (1995) *Science*, **269**, 1439–1443.
- 18) Garrett, K.P., Tan, S., Bradsher, J.N., Lane, W.S., Conaway, J.W., & Conaway, R.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5237–5241.
- 19) Garrett, K.P., Aso, T., Bradsher, J.N., Foundling, S.I., Lane, W.S., Conaway, R.C., & Conaway, J.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7172–7176.
- 20) Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., & Elledge, S.J. (1996) *Cell*, **86**, 263–274.
- 21) Duan, D.R., Pause, A., Burgess, W.H., Aso, T., Chen, D.Y., Garrett, K.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Linehan, W. M., & Klausner, R.D. (1995) *Science*, **269**, 1402–1406.
- 22) Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A., & Kaelin, W.G., Jr. (1995) *Science*, **269**, 1444–1446.
- 23) Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K., & Kamura, T. (2012) *Front. Oncol.*, **2**, 10.
- 24) Hilton, D.J., Richardson, R.T., Alexander, W.S., Viney, E.M., Willson, T.A., Sprigg, N.S., Starr, R., Nicholson, S.E., Metcalf, D., & Nicola, N.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 114–119.
- 25) Conaway, J.W., Kamura, T., & Conaway, R.C. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1377**, M49–M54.
- 26) Mahrouf, N., Redwine, W.B., Florens, L., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Bradford, W.D., Staehling-Hampton, K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., & Conaway, J.W. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 8005–8013.
- 27) Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., & Ratcliffe, P.J. (1999) *Nature*, **399**, 271–275.
- 28) Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., & Ratcliffe, P.J. (2001) *EMBO J.*, **20**, 5197–5206.
- 29) Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., & Ratcliffe, P.J. (2001) *Science*, **292**, 468–472.
- 30) Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I., & Jones, E.Y. (2002) *Nature*, **417**, 975–978.
- 31) Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., & Kaelin, W.G., Jr. (2001) *Science*, **292**, 464–468.
- 32) Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., & Ratcliffe, P.J. (2001) *Cell*, **107**, 43–54.
- 33) Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., & Pouyssegur, J. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4082–4090.
- 34) Wizigmann-Voos, S., Breier, G., Risau, W., & Plate, K.H. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 1358–1364.
- 35) Gnarr, J.R., Zhou, S., Merrill, M.J., Wagner, J.R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E.H., Klausner, R.D., & Linehan, W.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10589–10594.
- 36) Iliopoulos, O., Levy, A.P., Jiang, C., Kaelin, W.G., Jr., & Goldberg, M.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10595–10599.
- 37) Kourembanas, S., Hannan, R.L., & Faller, D.V. (1990) *J. Clin. Invest.*, **86**, 670–674.
- 38) Anderson, K., Nordquist, K.A., Gao, X., Hicks, K.C., Zhai, B., Gygi, S.P., & Patel, T.B. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 42027–42036.
- 39) Zhou, L. & Yang, H. (2011) *PLoS One*, **6**, e23936.
- 40) Okuda, H., Saitoh, K., Hirai, S., Iwai, K., Takaki, Y., Baba, M., Minato, N., Ohno, S., & Shuin, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 43611–43617.
- 41) Iturrioz, X. & Parker, P.J. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 1397–1402.
- 42) Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T., & Ohno, S. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 1183–1196.
- 43) Parkinson, S.J., Le Good, J.A., Whelan, R.D., Whitehead, P., & Parker, P.J. (2004) *EMBO J.*, **23**, 77–88.
- 44) Na, X., Duan, H.O., Messing, E.M., Schoen, S.R., Ryan, C. K., di Sant'Agnes, P.A., Golemis, E.A., & Wu, G. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4249–4259.
- 45) Kuznetsova, A.V., Meller, J., Schnell, P.O., Nash, J.A., Ignacak, M.L., Sanchez, Y., Conaway, J.W., Conaway, R.C., & Czyzyk-Krzeska, M.F. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2706–2711.
- 46) Svejstrup, J.Q. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 21–29.
- 47) Mikhaylova, O., Ignacak, M.L., Barankiewicz, T.J., Harbaugh, S.V., Yi, Y., Maxwell, P.H., Schneider, M., Van Geyte, K., Carmeliet, P., Revelo, M.P., Wyder, M., Greis, K.D., Meller, J., & Czyzyk-Krzeska, M.F. (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2701–2717.
- 48) Costessi, A., Mahrouf, N., Tijchon, E., Stunnenberg, R., Stoel, J.

- M.A., Jansen, P.W., Sela, D., Martin-Brown, S., Washburn, M.P., Florens, L., Conaway, J.W., Conaway, R.C., & Stunnenberg, H.G. (2011) *EMBO J.*, **30**, 3786–3798.
- 49) Starostina, N.G., Simpliciano, J.M., McGuirk, M.A., & Kipreos, E.T. (2010) *Dev. Cell*, **19**, 753–764.
- 50) Hodgkin, J., Doniach, T., & Shen, M. (1985) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **50**, 585–593.
- 51) Chan, S.L., Yee, K.S., Tan, K.M., & Yu, V.C. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 17925–17928.
- 52) Starostina, N.G., Lim, J.M., Schvarzstein, M., Wells, L., Spence, A.M., & Kipreos, E.T. (2007) *Dev. Cell*, **13**, 127–139.
- 53) Shi, Y.Q., Liao, S.Y., Zhuang, X.J., & Han, C.S. (2011) *Gene*, **485**, 153–159.
- 54) Jager, S., Schwartz, H.T., Horvitz, H.R., & Conradt, B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12549–12554.
- 55) Subauste, M.C., Ventura-Holman, T., Du, L., Subauste, J.S., Chan, S.L., Yu, V.C., & Maher, J.F. (2009) *Cancer Biol. Ther.*, **8**, 2297–2305.
- 56) Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., & Semenza, G.L. (2007) *Mol. Cell*, **25**, 207–217.
- 57) Bhattacharya, A., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R., de Crombrughe, B., & Maity, S.N. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 8167–8172.
- 58) Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F., & Tavernier, J. (2008) *Cytokine Growth Factor Rev.*, **19**, 371–381.
- 59) Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., & Yoshimura, A. (1997) *Nature*, **387**, 921–924.
- 60) Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., & Kishimoto, T. (1997) *Nature*, **387**, 924–929.
- 61) Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J. R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., & Hilton, D.J. (1997) *Nature*, **387**, 917–921.
- 62) Ram, P.A. & Waxman, D.J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35553–35561.
- 63) De Sepulveda, P., Ilangumaran, S., & Rottapel, R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 14005–14008.
- 64) Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., Kitamura, T., Kato, H., Nakayama, K., & Yoshimura, A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 12530–12538.
- 65) Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., & White, M.F. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 42394–42398.
- 66) Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H., & Yoshimura, A. (2011) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 980–985.
- 67) Babon, J.J., Sabo, J.K., Zhang, J.G., Nicola, N.A., & Norton, R.S. (2009) *J. Mol. Biol.*, **387**, 162–174.
- 68) Kamura, T., Burian, D., Yan, Q., Schmidt, S.L., Lane, W.S., Querido, E., Branton, P.E., Shilatifard, A., Conaway, R.C., & Conaway, J.W. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 29748–29753.
- 69) Sartori da Silva, M.A., Tee, J.M., Paridaen, J., Brouwers, A., Runtuwene, V., Zivkovic, D., Diks, S.H., Guardavaccaro, D., & Peppelenbosch, M.P. (2010) *PLoS One*, **5**, e14023.
- 70) Yasukawa, T., Kamura, T., Kitajima, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., & Aso, T. (2008) *EMBO J.*, **27**, 3256–3266.
- 71) Lowenstein, C.J. & Padalko, E. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 2865–2867.
- 72) Fang, F.C. (1997) *J. Clin. Invest.*, **99**, 2818–2825.
- 73) Nathan, C. & Shiloh, M.U. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8841–8848.
- 74) Kuang, Z., Lewis, R.S., Curtis, J.M., Zhan, Y., Saunders, B. M., Babon, J.J., Kolesnik, T.B., Low, A., Masters, S.L., Willson, T.A., Kedzierski, L., Yao, S., Handman, E., Norton, R.S., & Nicholson, S.E. (2010) *J. Cell Biol.*, **190**, 129–141.
- 75) Nishiya, T., Matsumoto, K., Maekawa, S., Kajita, E., Horinouchi, T., Fujimuro, M., Ogasawara, K., Uehara, T., & Miwa, S. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 9009–9019.
- 76) Choi, C.Y., Kim, Y.H., Kim, Y.O., Park, S.J., Kim, E.A., Riemenschneider, W., Gajewski, K., Schulz, R.A., & Kim, Y. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 21427–21436.
- 77) Choi, D.W., Seo, Y.M., Kim, E.A., Sung, K.S., Ahn, J.W., Park, S.J., Lee, S.R., & Choi, C.Y. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 4682–4689.
- 78) Aikawa, Y., Nguyen, L.A., Isono, K., Takakura, N., Tagata, Y., Schmitz, M.L., Koseki, H., & Kitabayashi, I. (2006) *EMBO J.*, **25**, 3955–3965.
- 79) Kim, E.J., Park, J.S., & Um, S.J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 32020–32028.
- 80) Kim, E.A., Noh, Y.T., Ryu, M.J., Kim, H.T., Lee, S.E., Kim, C.H., Lee, C., Kim, Y.H., & Choi, C.Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 7489–7497.
- 81) Zhang, Q., Nottke, A., & Goodman, R.H. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2802–2807.
- 82) D’Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., & Soddu, S. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 11–19.
- 83) Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., & Schmitz, M.L. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 1–10.
- 84) Wiggins, A.K., Wei, G., Doxakis, E., Wong, C., Tang, A.A., Zang, K., Luo, E.J., Neve, R.L., Reichardt, L.F., & Huang, E. J. (2004) *J. Cell Biol.*, **167**, 257–267.
- 85) Doxakis, E., Huang, E.J., & Davies, A.M. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 1761–1765.
- 86) Kanei-Ishii, C., Ninomiya-Tsuji, J., Tanikawa, J., Nomura, T., Ishitani, T., Kishida, S., Kokura, K., Kurahashi, T., Ichikawa-Iwata, E., Kim, Y., Matsumoto, K., & Ishii, S. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 816–829.
- 87) Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T.G., Rueffer, S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., & Schmitz, M.L. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 4310–4314.
- 88) Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T.G., Staeger, H., Gresko, E., Ludi, K.S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., & Schmitz, M. L. (2003) *Oncogene*, **22**, 8731–8737.
- 89) Tomasini, R., Samir, A.A., Carrier, A., Isnardon, D., Cecchinelli, B., Soddu, S., Malissen, B., Dagorn, J.C., Iovanna, J. L., & Dusetti, N.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 37722–37729.
- 90) Zhang, Q., Yoshimatsu, Y., Hildebrand, J., Frisch, S.M., & Goodman, R.H. (2003) *Cell*, **115**, 177–186.
- 91) Dentice, M., Bandyopadhyay, A., Gereben, B., Callebaut, I., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Nissim, S., Mornon, J.P., Zavacki, A.M., Zeold, A., Capelo, L.P., Curcio-Morelli, C., Ribeiro, R., Hamey, J.W., Tabin, C.J., & Bianco, A.C. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 698–705.
- 92) Vasiliasukas, D., Hancock, S., & Stern, C.D. (1999) *Mech. Dev.*, **82**, 79–94.
- 93) Nara, H., Onoda, T., Rahman, M., Araki, A., Juliana, F.M., Tanaka, N., & Asao, H. (2011) *Cell Immunol.*, **269**, 54–59.
- 94) Guibal, F.C., Moog-Lutz, C., Smolewski, P., Di Gioia, Y.,

- Darzynkiewicz, Z., Lutz, P.G., & Cayre, Y.E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 218–224.
- 95) Heuze, M.L., Lamsoul, I., Baldassarre, M., Lad, Y., Leveque, S., Razinia, Z., Moog-Lutz, C., Calderwood, D.A., & Lutz, P. G. (2008) *Blood*, **112**, 5130–5140.
- 96) Nie, L., Zhao, Y., Wu, W., Yang, Y.Z., Wang, H.C., & Sun, X.H. (2011) *Cell Res.*, **21**, 754–769.
- 97) Wu, W. & Sun, X.H. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 41153–41162.
- 98) Chung, A.S., Guan, Y.J., Yuan, Z.L., Albina, J.E., & Chin, Y. E. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 4716–4726.
- 99) Numan, S. & Russell, D.S. (1999) *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **72**, 97–102.
- 100) Li, J.Y., Chai, B., Zhang, W., Wu, X., Zhang, C., Fritze, D., Xia, Z., Patterson, C., & Mulholland, M.W. (2011) *BMC Neurosci.*, **12**, 95.
- 101) Wilcox, A., Katsanakis, K.D., Bheda, F., & Pillay, T.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 38881–38888.
- 102) Debrincat, M.A., Zhang, J.G., Willson, T.A., Silke, J., Connolly, L.M., Simpson, R.J., Alexander, W.S., Nicola, N.A., Kile, B.T., & Hilton, D.J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 4728–4737.
- 103) Louvi, A. & Artavanis-Tsakonas, S. (2006) *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 93–102.
- 104) Lai, E.C. (2004) *Development*, **131**, 965–973.
- 105) Mumm, J.S. & Kopan, R. (2000) *Dev. Biol.*, **228**, 151–165.
- 106) Diks, S.H., Sartori da Silva, M.A., Hillebrands, J.L., Bink, R. J., Versteeg, H.H., van Rooijen, C., Brouwers, A., Chitnis, A. B., Peppelenbosch, M.P., & Zivkovic, D. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1190–1198.
- 107) Diks, S.H., Bink, R.J., van de Water, S., Joore, J., van Rooijen, C., Verbeek, F. J., den Hertog, J., Peppelenbosch, M.P., & Zivkovic, D. (2006) *J. Cell Biol.*, **174**, 581–592.
- 108) Rodriguez-Gabin, A.G., Almazan, G., & Larocca, J.N. (2004) *J. Neurosci. Res.*, **76**, 758–770.
- 109) Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., & Huh, K. (2004) *J. Virol.*, **78**, 11451–11460.
- 110) Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.Y., Libermann, T. A., Jin, J., Harper, J.W., & Munger, K. (2007) *J. Virol.*, **81**, 9737–9747.
- 111) Boyer, S.N., Wazer, D.E., & Band, V. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 4620–4624.
- 112) Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P., & Bagchi, S. (1997) *Cell Growth Differ.*, **8**, 1277–1286.
- 113) Jones, D.L. & Munger, K. (1997) *J. Virol.*, **71**, 2905–2912.
- 114) Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., & Yu, X.F. (2003) *Science*, **302**, 1056–1060.
- 115) Bergeron, J.R., Huthoff, H., Veselkov, D.A., Beavil, R.L., Simpson, P.J., Matthews, S.J., Malim, M.H., & Sanderson, M. R. (2010) *PLoS Pathog.*, **6**, e1000925.
- 116) Mehle, A., Thomas, E.R., Rajendran, K.S., & Gabuzda, D. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 17259–17265.
- 117) Xiao, Z., Ehrlich, E., Yu, Y., Luo, K., Wang, T., Tian, C., & Yu, X.F. (2006) *Virology*, **349**, 290–299.
- 118) Yu, Y., Xiao, Z., Ehrlich, E.S., Yu, X., & Yu, X.F. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 2867–2872.
- 119) Liu, B., Sarkis, P.T., Luo, K., Yu, Y., & Yu, X.F. (2005) *J. Virol.*, **79**, 9579–9587.
- 120) Mehle, A., Goncalves, J., Santa-Marta, M., McPike, M., & Gabuzda, D. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 2861–2866.
- 121) Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., & Malim, M.H. (2002) *Nature*, **418**, 646–650.
- 122) Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., & Landau, N.R. (2003) *Cell*, **114**, 21–31.
- 123) Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., & Trono, D. (2003) *Nature*, **424**, 99–103.
- 124) Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., & Hance, A.J. (2003) *Science*, **300**, 1112.
- 125) Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., & Malim, M.H. (2003) *Cell*, **113**, 803–809.
- 126) Blanchette, P., Cheng, C.Y., Yan, Q., Ketner, G., Ornelles, D. A., Dobner, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W., & Branton, P.E. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9619–9629.
- 127) Cheng, C.Y., Blanchette, P., & Branton, P.E. (2007) *Virology*, **364**, 36–44.
- 128) Cheng, C.Y., Gilson, T., Dallaire, F., Ketner, G., Branton, P. E., & Blanchette, P. (2011) *J. Virol.*, **85**, 765–775.
- 129) Harada, J.N., Shevchenko, A., Pallas, D.C., & Berk, A.J. (2002) *J. Virol.*, **76**, 9194–9206.
- 130) Luo, K., Ehrlich, E., Xiao, Z., Zhang, W., Ketner, G., & Yu, X.F. (2007) *FASEB J.*, **21**, 1742–1750.
- 131) Cathomen, T. & Weitzman, M.D. (2000) *J. Virol.*, **74**, 11407–11412.
- 132) Moore, M., Horikoshi, N., & Shenk, T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11295–11301.
- 133) Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H., & Dobner, T. (2000) *J. Virol.*, **74**, 5168–5181.
- 134) Querido, E., Marcellus, R.C., Lai, A., Charbonneau, R., Teodoro, J.G., Ketner, G., & Branton, P.E. (1997) *J. Virol.*, **71**, 3788–3798.
- 135) Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J.A., Fattaey, A., & Hermiston, T. (2001) *J. Virol.*, **75**, 4297–4307.
- 136) Steegenga, W.T., Riteco, N., Jochemsen, A.G., Fallaux, F.J., & Bos, J.L. (1998) *Oncogene*, **16**, 349–357.
- 137) Stracker, T.H., Carson, C.T., & Weitzman, M.D. (2002) *Nature*, **418**, 348–352.
- 138) Baker, A., Rohleder, K.J., Hanakahi, L.A., & Ketner, G. (2007) *J. Virol.*, **81**, 7034–7040.
- 139) Dallaire, F., Blanchette, P., Groitl, P., Dobner, T., & Branton, P.E. (2009) *J. Virol.*, **83**, 5329–5338.
- 140) Nayak, R., Farris, K.D., & Pintel, D.J. (2008) *J. Virol.*, **82**, 3803–3808.
- 141) Stracker, T.H. & Petrini, J.H. (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 90–103.
- 142) Chistiakov, D.A., Voronova, N.V., & Chistiakov, A.P. (2009) *Eur. J. Med. Genet.*, **52**, 373–378.
- 143) DiPersio, C.M., Shah, S., & Hynes, R.O. (1995) *J. Cell Sci.*, **108** (Pt 6), 2321–2336.
- 144) Tsurumi, T. (2001) *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **258**, 65–87.
- 145) Sinclair, A.J., Brimmell, M., Shanahan, F., & Farrell, P.J. (1991) *J. Virol.*, **65**, 2237–2244.
- 146) Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daille, J., & Sergeant, A. (1986) *EMBO J.*, **5**, 3243–3249.
- 147) Countryman, J., Jenson, H., Seibl, R., Wolf, H., & Miller, G. (1987) *J. Virol.*, **61**, 3672–3679.
- 148) Hammerschmidt, W. & Sugden, B. (1988) *Cell*, **55**, 427–433.
- 149) Sato, Y., Kamura, T., Shirata, N., Murata, T., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Isomura, H., Nishiyama, Y., & Tsurumi, T. (2009) *PLoS Pathog.*, **5**, e1000530.
- 150) Sato, Y., Shirata, N., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Murata, T., Isomura, H., Nishiyama, Y., & Tsurumi, T. (2009) *Virology*, **388**, 204–211.