

氏名(生年月日)	カナ 金 谷 幸 一
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第2250号
学位授与の日付	平成16年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Cobalt- and nickel-binding property of cullin-2 (Co^{2+} , Ni^{2+} 結合蛋白としてのカリン-2)
主論文公表誌	Biochemical and Biophysical Research Communications 第290巻 第1号 294-299 頁 2002年
論文審査委員	(主査)教授 伊藤 達雄 (副査)教授 小田 秀明, 山口 直人

論文内容の要旨

〔目的〕

低酸素状態は生体に様々な反応を引き起こす。転写因子である hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) に誘導される反応もその1つである。酸素正常状態では HIF1 α はユビキチンリガーゼ(E3)によりポリユビキチン化され、プロテアソームによりすばやく分解され不安定である。HIF1 α の E3 は von-Hippel Lindau gene product (pVHL), cullin-2 (Cul-2) などにより構成され、SCF 様複合体といわれる。

最近、酸素正常状態では HIF1 α のプロリン(564)が水酸化酵素により水酸化され、これを pVHL が認識し HIF1 α のポリユビキチン化が引き起こされることが報告された。一方 Co^{2+} , Ni^{2+} は HIF1 α を安定化させ低酸素状態と類似した状況を引き起こすが、メカニズムは不明である。

本研究の目的は、 Co^{2+} , Ni^{2+} による HIF1 α の安定化のメカニズムを解明することである。

〔方法および結果〕

Cul-2 を COS-M6 に発現させ溶解した後、 Co^{2+} コートされたビーズ(Co^{2+} ビーズ)で沈降させ、ウエスタンブロット(WB)法で Cul-2 を同定し、Cul-2 と Co^{2+} ビーズが結合することを証明した。

次に Cul-2 の Co^{2+} 結合部位を調べるため、Cul-2 とその変異体をバクテリアで発現させ、その溶解液を Co^{2+} ビーズで沈降させ、WB法で Cul-2 を同定した。Cul-2 は Co^{2+} と少なくとも3カ所で結合していた。さらに Cul-2 が Co^{2+} , Ni^{2+} と直接結合することを蛍光スペクトロスコピーを用いて証明した。

最後に Co^{2+} の SCF 様複合体への影響を調べるため、pVHL をアデノウイルスに組み込み HUVEC (human vein endothelial cells) に感染させ、その溶解液を免疫沈降させ、pVHL と結合した内因性 Cul-2 を WB 法で同定した。その結果 Co^{2+} は SCF 様複合体の集合体に影響を及ぼさなかった。

〔考察〕

本研究において Co^{2+} , Ni^{2+} が直接 Cul-2 と結合することが明らかになり、さらにデータには示さなかったが、SCF 様複合体の中で Cul-2 のみと結合したことから、Cul-2 が Co^{2+} , Ni^{2+} による HIF1 α 安定化の鍵になると考えられた。そこで Co^{2+} , Ni^{2+} が SCF 様複合体の構造に変化を与え E3 として機能せず、HIF1 α が安定化するのではないかと仮説をたて検討したが、 Co^{2+} は SCF 様複合体の集合体には変化を与えなかった。*in vivo* では Co^{2+} , Ni^{2+} は HIF1 α を安定化することから考えると、 Co^{2+} が Cul-2 に結合することによって、SCF 様複合体の機能を変化させることが示唆された。

〔結語〕

1. Co^{2+} , Ni^{2+} は Cul-2 に直接結合する。

2. Co^{2+} が Cul-2 に結合することにより SCF 様複合体の機能に影響を与えていることが示唆された.

論 文 審 査 の 要 旨

酸素正常状態では hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) はユビキチンリガーゼ (E3) によりポリユビキチン化され、プロテアソームによりすばやく分解され不安定である。HIF1 α の E3 は von-Hippel Lindau gene product (pVHL), cullin-2 (Cul-2) などにより構成され、SCF 様複合体といわれる。最近、酸素正常状態では HIF1 α のプロリン (564) が水酸化酵素により水酸化され、これを pVHL が認識し HIF1 α がポリユビキチン化されると報告された。一方 Co^{2+} , Ni^{2+} は HIF1 α を安定化させ低酸素状態と類似した状況を引き起こすが、そのメカニズムは依然不明である。

我々は偶然にも Cul-2 と Co^{2+} , Ni^{2+} が結合することを発見し、これを証明した。「 Co^{2+} , Ni^{2+} が Cul-2 を介して SCF 様複合体の構造に変化を与え、E3 の機能を奪い、HIF1 α が安定化する」と仮説をたて検討した。しかし、SCF 様複合体の集合体には変化を与えなかった。in vivo では Co^{2+} , Ni^{2+} は HIF1 α を安定化することから、これらが Cul-2 と結合し、SCF 様複合体の機能を変化させることが示唆された。