

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19506

研究課題名(和文)信頼性の高いユビキチン化基質タンパク質の新規同定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of method for identification of ubiquitinated protein

研究代表者

畠山 鎮次 (Hatakeyama, Shigetsugu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70294973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：「ユビキチン化」はタンパク質分解を制御する多くの生命現象を支える極めて重要な翻訳後修飾の一つであり、ユビキチンリガーゼ(E3)が選択的に基質タンパク質を認識する。したがって個々のE3に特異的な基質を同定し、基質タンパク質のユビキチン化部位を決定することは、それらが関連する生命現象を理解する上で重要である。しかし、さまざまな問題により、ユビキチン化を受けた基質同定法の標準化には未だほど遠い。本研究では、TUBEとユビキチンレムナント抗体を用いた新規のテクノロジーにより、さまざまなタイプのユビキチンリガーゼ(E3)へ網羅的に適用し、E3-基質関係を俯瞰的に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請で開発した基質同定法は、これまでの問題点を原理的に解消した全く新しい手法であり、すべてのE3に対して適用可能であるため、E3の機能解析が加速することが期待できると思われる。本手法の応用により、正常及び異常(疾患)に関与しているユビキチン化修飾の全貌解明が期待できる。したがって、将来的には疾患特異的ユビキチン化部位を標的とした創薬のシーズを発掘できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitination is a chemical modification that controls protein degradation and is one of the most important post-translational modifications that support many biological phenomena. The reaction system is mediated by ubiquitin ligases (E3) selectively recognizing substrate proteins. Therefore, it is important to identify specific substrates of each E3 and to determine the ubiquitination site of substrate proteins in understanding the biological phenomenon that they are associated with. However, due to various problems, it is still far from standardizing ubiquitinated substrate identification methods. In this study, we challenged to establish a novel technology using TUBE (artificial protein exhibiting high affinity binding to polyubiquitin chain) and ubiquitin remnant antibody allows comprehensive application to various types of ubiquitin ligase (E3) and the E3-substrates relationship was analyzed.

研究分野：医化学

キーワード：ユビキチン TRIM型E3 TUBE Parkin

## 1. 研究開始当初の背景

「タンパク質」は、「からだ」を構成する主要な要素であるので、その量と機能の調節は非常に重要である。タンパク質は合成された後に、さまざまな化学修飾を受けて機能を発揮することが多い。さらにタンパク質は時期及び場所特異的に存在することが必要であり、タンパク質の機能という観点からは、「タンパク質分解」も重要な制御である。「ユビキチン化」はタンパク質分解を制御する翻訳後修飾であり、多くの生命現象（タンパク質分解のみならず酵素の活性なども制御）を支える極めて重要な翻訳後修飾の一つである（図2参照）。その反応系は、ユビキチンリガーゼ（E3）が選択的に基質タンパク質を認識することによって進む反応である。ヒト遺伝子には600種以上のユビキチンリガーゼ（E3）が存在する。したがって個々のE3に特異的な基質を同定し、基質タンパク質のユビキチン化部位を決定することは、それらが関連する生命現象を理解する上で重要である。これまで定性的・個別的な解析はなされているが、技術的困難さのため、未だ標準化した手法は確立していないのが現状である。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、E3と基質の結合力を利用した方法やレポーターアッセイを指標としたスクリーニング法により基質の同定を試み機能解析を行ってきた。しかし、これらの方法において、E3と結合力の強い分子はユビキチン化を受けないことが多いことや、偽陽性が多いことなどの特異度の低さなどの大きな問題が存在した。また近年では基質の半減期を指標とする方法などが報告されているが、プロテアソームでの分解には関与しないユビキチン化を受けた基質は同定できず、基質同定法の標準化には未だほど遠いのが現状である。本申請では、最近実用化したさまざまな新しい手法を効果的に組み合わせることにより、これまでの問題点を原理的に解消した、これまでとは全く異なった新しい基質同定法を開発する。

本申請研究では、TUBE（ポリユビキチンを認識して結合できるタンパク質断片）とユビキチンレムナント抗体/K-εGG抗体（基質タンパク質とユビキチンのイソペプチド結合部分のトリプシン消化断片のペプチドであるK-εGG配列を認識する）を用いた新規のテクノロジーにより、さまざまなタイプのユビキチンリガーゼ（E3）へ網羅的に適用し、E3-基質関係を俯瞰的に解明することを目指す。さらに、本手法はユビキチン化修飾の代表的な機能である「プロテアソームを介した分解」に依存しない手法であるため、分解シグナル以外のユビキチン化修飾（リン酸化酵素の活性化やエンドサイトーシスのシグナル等）の機能解明にも有効であると考えられる。

## 3. 研究の方法

TUBE（Tandem Ubiquitin Binding Entity）はユビキチン化タンパク質を精製することに優れたポリユビキチン鎖に高親和性結合を示す人工タンパク質である。本研究で用いる新規同定法は、

FLAGタグ、ユビキチン高親和性人工タンパク質（TUBE）、解析したい任意のE3酵素の3つのドメイン、の3種のタンパク質（ペプチド）を融合した精製用プローブを用いることに特徴がある。「細胞内で」E3がユビキチン化した直後の基質を「その場で」捕獲し、かつ「ユビキチン化

ペプチドのみ」を精製し網羅的に検出する点に斬新性がある。E3 のすぐそばでユビキチン化を受けた基質タンパク質のペプチド断片のみを「ユビキチンレムナント抗体」で再精製するため、ユビキチン化部位の同定も可能となる。E3 により細胞内で実際に起きる酵素反応を検出するため、偽陽性が少なく特異性が高い生理的な基質を定量的に同定できることが推測された。

本同定法の実験手順：

- 1) E3-TUBE 融合タンパク質を細胞に導入し、捕獲したユビキチン化基質タンパク質複合体を抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行う。
- 2) 免疫沈降物をトリプシンで消化する。
- 3) ユビキチンレムナント抗体 (K-εGG 抗体) によりユビキチン化を受けたペプチド断片を再精製する。
- 4) ユビキチンレムナント抗体で精製されたペプチドを IonTrap-Orbitrap LC-MS 型質量分析器で検出する。

#### 4. 研究成果

遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである Parkin 及び TRIM ファミリーユビキチンリガーゼの一つである TRIM28 に関して、この新規方法を適用するために人工 cDNA の作製を行なった。この発現ベクターを HEK293T 細胞に安定発現させ、免疫沈降及び質量分析計により解析を進めた。まずはこれまでに多くの解析がなされている Parkin に関して解析を進めたところ、これまで報告されている基質候補タンパク質のほとんどをこの方法で同定することができた。また、同定された多くの基質タンパク質は、ミトコンドリア外膜に発現していることが知られているものであり、パーキンソン病がミトコンドリア異常に関連する可能性を考慮すると、本方法は真の基質を同定している可能性が高い。

TRIM28 に関しては、これまで報告されてきた関連タンパク質として、KRAB 型 Zn フィンガータンパク質以外に、TFIIB、CCNA2、ATP6V1C1 などが検出された。TFIIB、CCNA2 及び ATP6V1C1 に関して、免疫沈降法により特異的な結合及びユビキチン化への影響を検討し、TRIM28 ノックダウンにより、これらのタンパク質のユビキチン化量が変動することが確かめられた。すなわち、TFIIB、CCNA2 及び ATP6V1C1 は TRIM28 の特異的なユビキチン化基質と考えられた。以上より、今回開発した E3-TUBE 法は、実際にユビキチン化基質の同定に用いることができることが示された。

本申請で開発した基質同定法は、これまでの問題点を原理的に解消した全く新しい手法であり、すべての E3 に対して適用可能であるため、E3 の機能解析が加速することが期待できると思われる。また、本手法の応用により、正常及び異常（疾患）に関与しているユビキチン化修飾の全貌解明が期待できる。したがって、この技術により、将来的には疾患特異的ユビキチン化部位を標的とした創薬のシーズを発掘できる可能性がある。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Yanagi, T., Watanabe, M., Hata, M., Kitamura, S., Imafuku, K., Yanagi, H., Homma, MD, A., Wang, L., Takahashi, H., Shimizu, H. and Hatakeyama, S.: Loss of TRIM29 alters keratin distribution to promote cell invasion in squamous cell carcinoma, *Cancer Res.*, 査読有, 78, 6795-6806, 2018.

DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-1495

Matsumoto, J., Takada, S., Kinugawa, S., Furihata, T., Nambu, H., Kakutani, N., Tsuda, M., Fukushima, A., Yokota, T., Tanaka, S., Takahashi, H., Watanabe, M., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Otsuka, Y., Sabe, H., Tsutsui, H. and Anzai, T.: Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure, *Circulation*, 査読有, 138, 2064-2066, 2018.

DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035212

Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Watanabe, M., Nomura, T., Kano, T., Watanabe, M. and Hatakeyama, S.: Anti-Sez6l2 antibody, detected in a patient with immune-mediated cerebellar ataxia, inhibits complex formation of GluR1 and Sez6l2, *J. Neurol.*, 査読有, 265, 962-965, 2018.

DOI: 10.1007/s00415-018-8785-z

Yabe, I., Yaguchi, H., Kato, Y., Miki, Y., Takahashi, H., Tanikawa, S., Shirai, S., Takahashi, I., Kimura, M., Hama, Y., Matsushima, M., Fujioka, S., Kano, T., Watanabe, M., Nakagawa, S., Kunieda, Y., Ikeda, Y., Hasegawa, M., Nishihara, H., Ohtsuka, T., Tanaka, S., Tsuboi, Y., Hatakeyama, S., Wakabayashi, K. and Sasaki, H.: Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome, *Sci. Rep.*, 査読有, 8, 819, 2018.

DOI: 10.1038/s41598-018-19198-0

Sang, Y., Li, Y., Song, L., Alvarez, A.A., Zhang, W., Lv, D., Tang, J., Liu, F., Chang, Z., Hatakeyama, S., Hu, B., Cheng, S. and Feng, H, TRIM59 promotes gliomagenesis by inhibiting TC45 dephosphorylation of STAT3, *Cancer Res.*, 査読有, 78, 1792-1804, 2018.

DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-2774

Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Watanabe, M., Nomura, T., Kano, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Watanabe, M. and Hatakeyama, S.: Sez6l2 regulates phosphorylation of ADD and neuritogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 494, 234-241, 2017.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.10.047

Watanabe, M. and Hatakeyama, S.: Fine-tuning of thymocyte development by

ubiquitination-mediated stability control of the ESCRT protein CHMP5. Cell. Mol. Immunol. (Research Highlight), 査読有, 14, 957-959, 2017.

DOI: 10.1038/cmi.2017.91

〔学会発表〕(計 4件)

畠山鎮次、TRIM ファミリーの機能解析、第2回ユビキチン研究会、2019年1月14~16日、東京大学(東京)

Masashi Watanabe, Shigetsugu Hatakeyama, Comprehensive identification of E3 ubiquitin ligase substrates by fusion of TUBE and ligase trapping methods, The 2<sup>nd</sup> GI-CoRE GSQ, GSB & IGM Joint Symposium, Hokkaido University, Sapporo (Japan), 2018年9月7~8日

畠山鎮次、TRIM タンパク質の機能と病理学的解析、第1回ユビキチン研究会、2018年1月18~20日、東京大学(東京)

畠山鎮次、TRIMファミリータンパク質による細胞機能制御、GU Cancer Forum 2017、2018年7月21日、ホテルニューオータニ(東京)

〔図書〕(計 1件)

畠山鎮次：系統看護学講座 専門基礎分野人体の構造と機能[2]「生化学」 第14版、304ページ、医学書院、東京、2019 (ISBN978-4-260-03556-9)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://hokudai-ikagaku.jp>

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：高橋 秀尚

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Hidehisa

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：20399819

研究協力者氏名：渡部 昌

ローマ字氏名：WATANABE, Masashi

所属研究機関名：北海道大学  
部局名：医学研究院  
職名：講師  
研究者番号(8桁): 10632424

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。