

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82609

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06882

研究課題名(和文) EGF受容体および不良ミトコンドリアにおけるユビキチン修飾の実体解明

研究課題名(英文) A method for determining ubiquitin chain length in cells

研究代表者

土屋 光 (TSUCHIYA, Hikaru)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：90760132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：代表者らはユビキチン鎖結合プローブによるユビキチン鎖の保護とトリプシンによる限定分解を組み合わせることによりユビキチン鎖長を決定する手法を開発してきた。本研究では、代表者らが開発したユビキチン鎖長決定法および質量分析計によるユビキチン鎖の高感度絶対定量法を用いて、主要なユビキチン依存的経路である増殖因子受容体のダウンレギュレーションに焦点を当て解析した。FLAGタグ融合EGFR安定発現細胞をEGF刺激後、抗FLAG抗体により免疫沈降し、Ub-ProT法によりEGFRに付加されたユビキチン鎖の長さを検討した。この結果、EGF刺激により4-6個のK63鎖がEGFRに付加されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We describe a novel versatile method for assessing chain length of substrate-attached polyubiquitin chains. We named this method, which combines a high-affinity probe for ubiquitin and partial trypsin digestion of ubiquitin chains, 'ubiquitin chain protection from trypsinization (Ub-ProT)'. Using this method, we analyzed the ubiquitin chain architecture of ligand-activated epidermal growth factor receptor (EGFR) in human cells. By combining mass spectrometry-based ubiquitin chain quantification, deubiquitinase-based analysis, and Ub-ProT, we revealed that EGFR is rapidly modified by K63-linked tetra- to hexa-ubiquitin chains following EGF treatment.

研究分野：タンパク質分解

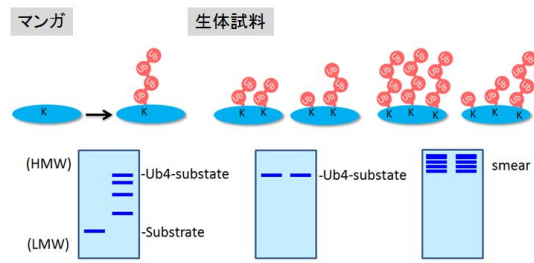
キーワード：ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチンによるタンパク質の翻訳後修飾はプロテアソーム依存的なタンパク質分解系として研究が発展してきたが、近年ユビキチン修飾がタンパク質分解のみならず、DNA 修復、タンパク質の輸送やシグナル伝達など広汎は生命機能を制御することが明らかとなってきた。ユビキチン化修飾の標的となる基質タンパク質はユビキチン化酵素群(E1, E2 および E3)により時期特異的にユビキチン化される。ユビキチン化はモノユビキチン化と8種類の異なるポリユビキチン鎖(ユビキチン分子の異なるリジン残基を介して連結した K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K29 鎖、K33 鎖、K48 鎖、K63 鎖及び、N 末端のメチオニンを介して連結した M1 鎖)が存在する。異なる構造のユビキチン鎖はそれぞれ異なる機能を持つと考えられている。例えば、K48 鎖はプロテアソームによるタンパク質分解シグナルとして機能し、K63 鎖は DNA 修復やシグナル伝達として機能する。さらに、異なる種類のユビキチン鎖が連結した混合鎖や一つのユビキチンに複数のユビキチンが付加した分岐鎖などの複雑な構造を持つユビキチン修飾が細胞内に存在すること、最近では翻訳後修飾分子であるユビキチン自身がリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けることも分かってきた。一方でユビキチン鎖の長さもユビキチン修飾の機能に重要であり、4 つ以上の長さの K48 鎖がプロテアソームによる分解に重要であることが試験管実験により証明されている。よって、ユビキチン修飾の構造は「ユビキチン鎖の種類」、「複雑さ」、「翻訳後修飾」、「長さ」の4つの要素から構成されている。細胞内では多種多様な構造のユビキチン修飾が使い分けられることで標的タンパク質の運命や機能が決定されることが想定されており、現在、ユビキチン修飾の構造多様性は“ユビキチンコード”と称されるに至っている。しかしながら、ユビキチン修飾の解析技術は未だ完全には確立されておらず、細胞内におけるユビキチンシグナル発動の機構は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

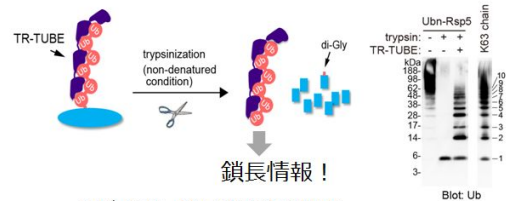
代表者らはこれまで高分解能質量分析計を用いて、複雑試料中から全ての種類のユビキチン鎖を 100 アトモルから絶対定量する方法 ( Ub-PRM : Ubiquitin-Parallel Reaction Monitoring ) を確立した ( Tsuchiya et al, BBRC, 2013 )。また、同様の手法でユビキチンの「翻訳後修飾」および「複雑さ」についても定量的に解析できることを明らかにしてきた ( Koyano et al, Nature, 2014; Ohtake et al, EMBO Rep, 2015 )。一方、「長さ」については重要な要素であるにも関わらず、SDS 電気泳動の移動度で見積もる以外に解析法が存在しなかったため、ほとんど議論されてこなか



ユビキチン鎖解析の問題点

った。そこで、代表者は、ユビキチン鎖結合プローブによるユビキチン鎖の保護とトリプシンによる限定分解を組み合わせることによりユビキチン鎖長を決定する新手法 Ub-ProT 法 ( Ubiquitin chain-Protection from Trypsinization ) を開発してきた ( 米国特許出願 )。

### Ub-ProT: Ubiquitin chain-Protection from Trypsinization



ユビキチン鎖長決定法の開発

これまで、Ub-ProT 法により、細胞内のユビキチン化基質の平均鎖長は 2~6 個であること、ユビキチン鎖のタイプにより平均鎖長が異なることを見出している ( 投稿準備中 )。さらにプロテアソーム阻害剤や様々な変異体を用いた解析よりユビキチン化基質の平均鎖長とタイプが変動したことから、細胞内では各タイプのユビキチン鎖の長さが厳密に制御されていることが示唆された。一方、ユビキチン修飾のデコーダー分子であるユビキチン結合タンパク質を網羅的に解析することで、細胞内におけるユビキチン鎖の使い分けについても全体像を明らかにしてきた ( Tsuchiya et al, Mol Cell, 2017 )。このように、我々はユビキチンコードの解析法を確立し、ユビキチンシグナルの全体像を俯瞰する研究を実施し、様々な知見を得てきた。そこで、次の段階として、ユビキチン修飾により制御される2つの重要な経路、増殖因子受容体および損傷ミトコンドリアの分解に焦点を当てた研究を実施する本課題の着想に至った。ユビキチン修飾系の破綻はがんや神経変性疾患と密接に関わっている。上皮成長因子受容体 EGFR ( Epidermal Growth Factor Receptor ) は細胞の分化、増殖、生存など様々な細胞内機能を制御するチロシンキナーゼであり、細胞膜上で EGF 刺激により活性化される。過剰なシグナルの増強を防ぐために、活性化された EGFR はユビキチン化されエンドソームを経てリソソームにより分解を受けることが知られている。一方、損傷を受けたミトコンドリアは、ユビキチンリガーゼ Parkin によりユビキチン化され、オートファジーにより選択的に除去される。EGFR の安定化は異常

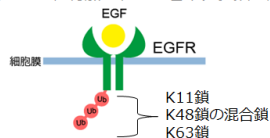
な細胞増殖（がん化）、不良ミトコンドリアの蓄積はパーキンソン病を引き起こすと考えられているが、EGFR およびミトコンドリアに付加されるユビキチン修飾（特にユビキチン鎖の長さやタイプの関連性）およびデコーディング機構については不明な点が多く残されている。

そこで（ ）EGFR および（ ）損傷ミトコンドリアに付加されるユビキチン修飾を詳細に解析する。次いで、EGFR およびミトコンドリアの細胞内動態を関連因子（脱ユビキチン化酵素やユビキチン結合タンパク質）とともに解析し、生化学的な解析と細胞生物学的な解析を統合することで、EGFR 分解および損傷ミトコンドリア分解を引き起こすユビキチンシグナルとそのデコーディング機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

EGFR は EGF 刺激により数分間にポリユビキチン化され、エンドサイトーシスにより取り込まれた後、リソソームまで運ばれ分解される。先行研究により EGFR は K11、K48、K63 鎖型のユビキチン修飾を受けることが報告されている（Huang, F *et al.*, Mol Cell, 2006）が、鎖の種類と長さの関係については依然不明である。そこで EGFR に付加されるユビキチン鎖の種類と長さを明らかにする。まず、FLAG タグおよび EGFP 融合 EGFR 安定発現細胞を樹立する。次いで EGF 刺激依存的な EGFR のユビキチン化を解析するために EGFR を精製する。EGF 刺激後、抗 FLAG 抗体により免疫沈降し、Ub-ProT 法により EGFR に付加されたユビキチン鎖の鎖長情報を得る。次いで、Ub-PRM 法により各長さのユビキチン鎖にどのようなタイプのユビキチン鎖が含まれるか解析する。次いで、経時的に解析することで、EGFR に付加されるユビキチン修飾の変動を生化学的にモニターする。一方、リソソーム阻害時において同様に解析する。

#### ① EGFR に付加されたユビキチン鎖の解析



#### ② ユビキチン鎖長による制御機構の解明 GFPタグノックイン細胞の作製

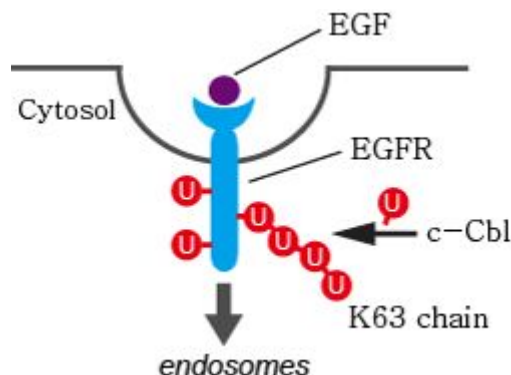


ユビキチン鎖長によるユビキチンシグナル制御機構の解明

### 4. 研究成果

EGF 刺激により EGFR は素早くユビキチン化され刺激 60 分後には分解されることが明らかとなった。蛍光顕微鏡による観察により、

EGFR は細胞膜から EGF 刺激 15 分から 30 分後にエンドソームに到達し、1 時間でリソソームに局在することが確認された。さらに Ub-PRM 法により EGFR に付加されたユビキチン鎖の絶対定量をおこなったところ、K63 鎖、K48 鎖及び K11 鎖がそれぞれ約 50%、4%、2%の割合で含まれていることが明らかとなった。次に、EGFR に付加されたユビキチン鎖の長さを検討した。ユビキチン化された EGFR を精製し Ub-ProT 法により調製した試料をウェスタンブロット法に供したところ EGF 刺激により EGFR には 4~6 個の K63 鎖に相当するバンドが得られた。このバンドが真の K63 鎖であることを確認するため、ユビキチン鎖リンケージ特異的脱ユビキチン化酵素を用いたユビキチン鎖構造決定法『Ubiquitin Chain restriction (UbiCrest)法をおこなった。その結果 Ub-ProT 法により得られた EGFR のユビキチン鎖は K63 鎖特異的な脱ユビキチン化酵素 AMSH および非選択的脱ユビキチン化酵素 USP2 では切断されたのに対し、K48 鎖特異的脱ユビキチン化酵素 OTUB1 では切断されなかった。従って EGF 刺激により EGFR には 4~6 個の K63 鎖が付加されることが明らかとなった。



EGFR のユビキチン化について既に数多くの報告があるが、研究者ごとに異なる結果であり、些か混沌としているのが現状であった。その要因としてユビキチン鎖の種類のみ注目されてきた経緯が挙げられる。本研究は、代表者自身が開発したユビキチン修飾解析法により、EGFR および損傷ミトコンドリアに提示されるユビキチンシグナル（ユビキチン鎖の長さなどを含めたユビキチン修飾の全ての情報）を時空間的に解析した点が大きな特色である。EGFR の安定化はがんや神経変性疾患の要因であるため、これらのユビキチンシグナルの実体の理解およびデコーディング機構の解明は、将来の治療薬開発の分子基盤となることが期待される。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S, Tanaka, K., and Saeki, Y. In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-linked Chain Specificity of the Proteasome Mol Cell. (4): 448-502 (2017) doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.024. 査読有

2. Ohtake, F., and Tsuchiya, H. The complexity of ubiquitin architecture. J Biochem 66 (2) : 125-133 (2016) doi: 10.1093/jb/mvw088. 査読有

3. Yoshida, Y., Saeki, Y., Murakami, A., Kawawaki, J., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Shindo, M., and Tanaka, K. A comprehensive method for detecting ubiquitinated substrates using TR-TUBE. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112, 4630-4635 (2015). doi: 10.1073/pnas.1422313112. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Hikaru Tsuchiya, Keiji Tanaka, and Yasushi Saeki: Ubiquitin chain selectivity of ubiquitin-binding proteins in yeast, 7<sup>th</sup> PROTEASOME and AUTOPHAGY WORKSHOP, 2016.4.6-8 Clermont-Ferrand, France

2. 土屋光、吉原英人、新井直子、海保愛、田中啓二、佐伯泰: プロテアソーム依存的タンパク質分解経路におけるユビキチン鎖選択抑制の解析新規第 38 回 日本分子生物学会 第 88 回 日本生化学会合同大会, 2015.12.1-4, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) (ポスター発表・口頭発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
東京都医学総合研究所・蛋白質代謝研究室ホームページ  
<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
土屋 光 (TSUCHIYA, Hikaru)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号 : 90760132

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし