

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14446

研究課題名(和文) リボソームにおけるK63ユビキチン化と新規ユビキチン鎖形成促進機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of the K63-linked polyubiquitination in the ribosome and a new mechanism in stimulation of polyubiquitination

研究代表者

黒川 裕美子 (Kurokawa, Yumiko)

東京工業大学・情報生命博士教育院・特任助教

研究者番号：10381633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母を材料にリボソームにおけるK63ユビキチン鎖と機能制御、ならびにRNAによる新規K63ポリユビキチン鎖形成促進メカニズムについて解析した。in vitro においてUbc13/Mms2依存的K63ユビキチン鎖形成反応は、あるbuffer条件下で核酸によって強く促進されることを発見した。核酸の配列依存性や鎖長等を検討した結果、核酸の長さが促進に重要であること、配列依存性はみられないことが明らかになった。さらに、Ubc13/Mms2ヘテロダイマーが直接核酸に結合することが反応促進に必須であることが明らかになった。分裂酵母リボソームも含め、核酸によるユビキチン鎖形成促進メカニズムに着目した。

研究成果の概要(英文)：In fission yeast, we analyzed the K63-linked polyubiquitination in the ribosome and the newly discovered mechanism for stimulating the K63-specific polyubiquitin chains by RNA. We found that Ubc13/Mms2 dependent polyubiquitination was strongly stimulated by nucleic acids purified from the ribosome in the specific buffer condition in vitro. To understand the molecular mechanism in this stimulation, we prepared the several nucleic acids and analyzed the reaction conditions in vitro. For the stimulatory effect, there were no sequence specificity in RNA or DNA but the length of nucleic acids was important (necessary over 200 bases). DNA binding analysis revealed that hetero dimer of Ubc13/Mms2 can bind to DNA directory. From these results, we conclude that RNA or DNA performs as a platform of polyubiquitination in vitro.

研究分野：DNA組換え・修復

キーワード：ユビキチン K63 リボソーム DNA RNA Mms2 Ubc13

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム安定性の維持に働くユビキチン化制御機構に着目し、K63 ユビキチン鎖の形成に働く E2 酵素 Ubc13/Mms2 複合体が関わる新たな機構について探索していた。分裂酵母や出芽酵母の Ubc13/Mms2 は、それぞれの遺伝子破壊株の表現型が DNA ダメージ感受性を示すことが知られている。そこで 2-hybrid 法を用いて分裂酵母 Mms2 と相互作用する蛋白質を探索した結果、リボソーム結合タンパク質 Cpc2 が同定されていた。リボソームと K63 ユビキチン鎖の関係性はそれまで知られておらず、リボソームと K63 ユビキチン化についてさらに解析を進めたところ、*in vitro*において精製リボソーム存在下で Ubc13/Mms2 依存的に K63 ユビキチン鎖の形成が促進されることを見出した。リボソーム中に K63 ユビキチン化のターゲットや E3 酵素が存在するものと期待された。その後の解析から、リボソーム中に存在する RNA が K63 ユビキチン鎖の形成を促進する E3 様の働きをしていることを発見していた。

## 2. 研究の目的

研究目的は以下の 2 点に大きく分けられる。

### (1) RNA による K63 ユビキチン鎖形成促進反応のメカニズムの解明 (*in vitro*):

*in vitro*においてリボソーム中に存在する RNA が Ubc13/Mms2 依存的な K63 ユビキチン鎖形成を促進することが明らかになった。この反応促進メカニズムを明らかにする。

### (2) リボソームにおける K63 ユビキチン化の意義の解明 (*in vivo*):

Cpc2 はリボソームの小 (40S) サブユニットに結合し蛋白質合成を負に制御すること、さらにリボソームにおける Non-stop mRNA の品質管理に必須と報告されている。このようなリボソーム固有のメカニズムにおける K63 ユビキチン鎖の果たす役割について検討する。

## 3. 研究の方法

リボソームと K63 ユビキチン鎖の関係性について以下を具体的な研究課題とし、分裂酵母を材料に生化学的・遺伝学的手法を用い研究を進めた。

### (1) リボソーム中の RNA によって促進される K63 ユビキチン鎖伸長反応の *in vitro* 解析:

HA-Cpc2 免疫沈降複合体中にはリボソーム小 (40S) サブユニットと同時に各種の RNA も含まれていた。この複合体を *in vitro* で

Ub、E1、Ubc13/Mms2 と反応させたところ、ある Buffer 条件下で K63 Ub 鎖の形成が強く促進されること、RNase 処理によりこの活性が失われることをこれまでに見出している。さらに分裂酵母から精製した total RNA でもこの活性が検出された。RNA が E3 リガーゼ様活性の重要な部分 (活性中心) を担っていることを考え、細胞から抽出した全 RNA 標品を分画し、mRNA、tRNA、rRNA のどの画分に活性があるのかを検証する。rRNA に関してはどの rRNA 分子種 (28S、18S、5S) に活性があるのかも明らかにする。さらに *in vitro* 転写系を用いて各 RNA を合成し、欠失体を作成することで活性中心をマッピングする。最終的には、RNA と E1、Ubc13/Mms2、Ub の相互作用を解析し、反応の促進メカニズムを明らかにしたい。

### (2) リボソームに存在する K63 ユビキチン鎖の検出と K63 ユビキチン化タンパク質の同定についての *in vivo* 解析:

分裂酵母ゲノム中の Cpc2 遺伝子に HA タグを付加した株を作成した。細胞内 HA-Cpc2 複合体を HA アガロースビーズを用いて精製し、リボソーム小 (40S) サブユニットを含む複合体を得ている。ユビキチン抗体を用いたウェスタンブロットにより、このサンプル中には何らかのユビキチン修飾物の存在が確認されていた。そこで、以下の実験からそれらの同定を目指す。複合体中のユビキチン修飾が K63 鎖によるものかどうかを、K63 ユビキチン特異的抗体を用いて解析する。さらに質量分析を用いて K63 鎖の確認やユビキチン化修飾タンパク質の同定を行う。K63 ユビキチン化の標的蛋白質が同定できた場合には、ユビキチン化 Lys 残基を明らかにし、変異株・変異体を作成することで表現型解析や生化学的解析につなげていく。

## 4. 研究成果

(1) *in vitro* の Ubc13/Mms2 依存的 K63 ユビキチン鎖形成反応系を用いて、精製した total RNA 中のどの分子種がユビキチン鎖伸長促進活性を有しているのかについて検討した。最初に *in vitro* 転写系で 18S rRNA と 28S rRNA を合成し、検討した結果、どちらも促進活性を有していることがわかった。一方で tRNA では活性が検出されなかった。次に 18S rRNA について *in vitro* 転写系で欠失体を作成し活性中心を探索したところ、配列特異性は確認できず、むしろ 200base 以上の長さが促進活性に重要であることが明らかになった。配列非特異的という点に着目し、大腸菌由来の total RNA やファージ ssDNA でも検討したところ、いずれも促進活性を有することが明らかになった。一方で dsDNA では反応促進効果が弱いこともわかった。以上のように、RNA で最初に見出された K63 ユビキチ

ン鎖伸長促進効果は、RNA に特異的な現象ではなく ssDNA でも同様にみられ、核酸の長さが活性に重要であることが明らかになった。

反応促進には核酸とユビキチン化に関わるタンパク質の直接結合が重要と考え、次に、Uba1、Mms2、Ubc13、Ub それぞれの ssDNA 結合能についてゲルシフト法を用いて解析した。その結果、Mms2/Ubc13 ヘテロダイマーにした場合にバンドがシフトしたことから、Mms2/Ubc13 がヘテロダイマーとして直接核酸に結合することが反応促進に重要であると考えられた。

そこで Ubc13/Mms2 と核酸の結合に着目し、核酸との結合に重要な Ubc13/Mms2 内の部位の探索について構造データを参考に進めた。ドッキング予測プログラムである ZDOCK を用いて Ubc13/Mms2 複合体と各種核酸 (dsRNA, dsDNA, ssDNA) の結合を予測した結果、いずれの核酸も Ubc13 と Mms2 のヘテロダイマーを形成するジョイント部分近傍へのドッキングが予測された。ZDOCK プログラムはタンパク質表面形状の相補性や静電ポテンシャルなどを考慮した予測結果を示すとされている。Ubc13/Mms2 内に存在するアミノ酸残基のうち、核酸との結合に重要と思われる数か所を予測し変異体スクリーニングを進めることで、今後 *in vivo* における核酸依存的な K63 ユビキチン鎖形成の意義についての理解につながると期待している。

*in vitro* の Ub 化アッセイに関して予定していた実験はほぼ完了した。今後は核酸と Ubc13/Mms2 の結合状態のさらなる解析により、反応促進の分子メカニズムに迫れるのではないかと期待される。核酸の長さが重要であることを考慮すると、核酸をプラットフォームとして Ubc13/Mms2 が数カ所に結合し、連続的かつ効果的にユビキチン鎖促進反応が進行しているのではないかと予想される。AFM 等の解析によって、この現象を観察することが技術的には可能であり、検討していきたい。

(2) 分裂酵母を用いた解析から、リボソーム結合タンパク質 Cpc2 の免疫沈降複合体中にはリボソーム小サブユニットとともに未知のユビキチン化タンパク質が存在していた。リボソームによる翻訳機構の制御に K63 ユビキチン化に関わる可能性を考え、K63 ユビキチン鎖特異的抗体を用いて、この複合体中に K63 ユビキチン鎖が含まれているかどうかを確かめようとした。しかしユビキチン化タンパク質量が微量なこともあり、現在までに明確な結果は得られていない。複合体精製をよりスケールアップしてユビキチン化タンパク質の収量を増やす必要もある。また、検出方法の改良として、これまで使用していた K63 ユビキチン鎖抗体の感度の問題があったが、K63 ユビキチン鎖特異的 TUBE1 の使用を検討中である。質量分析で解析できる量の K63 ユビキチン修飾物を回収するには、さら

なる条件検討が必要であろう。まずは K63 ユビキチンに限らず、ユビキチン修飾物を一括で解析し、Ubc13 や Mms2 破壊株由来のサンプルと比較することで、K63 ユビキチン化のターゲットを探索する方法が望まれる。

*in vivo* において K63 ユビキチン鎖はある種のシグナルとして働くと考えられる。リボソームにおいて K63 ユビキチン鎖がどのようなシグナルとして働くのかはまだわかっていない。一方で、細胞内において K63 ユビキチン鎖を特異的に認識して結合する蛋白質も未知の部分が多い。そこで K63 ユビキチン鎖結合カラムを作成し、細胞抽出液から K63 ユビキチン鎖結合蛋白質の単離を検討した。その結果、130kDa、120kDa、90kDa、80kDa、70kDa 付近に特異的なバンドが確認できた。今後、質量分析で同定することで、K63 ユビキチン鎖がどのような生命現象のシグナルとして機能しているか、理解につながる事が期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 裕美子 (KUROKAWA, Yumiko)

東京工業大学・情報生命博士教育院・  
特任助教  
研究者番号：10381633

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )