

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03986

研究課題名（和文）分岐型ユビキチン鎖が司る新たなシグナル伝達機構

研究課題名（英文）Elucidating the role of branched ubiquitin code

研究代表者

大竹 史明（Ohtake, Fumiaki）

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任准教授

研究者番号：60447373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチンによるタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質分解だけでなく、炎症シグナル応答やDNA修復、細胞内輸送など広範な生命機能を制御することが近年明らかになってきた。ユビキチン化修飾の多様性は基質に付加されるユビキチンの構造的多様性に起因する。しかし、多様なユビキチン鎖の発するシグナルがどのように相互連関して複雑な細胞応答を制御しているかは十分に解明されていなかった。本研究では枝分かれした（分岐型）ユビキチン鎖を形成する酵素としてUBR5およびTRIP12を明らかにした。UBR5はTXNIPを基質として分岐鎖依存的なタンパク質分解を誘導した。またTRIP12はK29/K48分岐鎖を形成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、分岐型ユビキチン鎖がタンパク質分解を促進することが明らかとなり、その責任酵素の一端を解明した。ユビキチン修飾系の異常は様々な疾患の原因となっており、ユビキチン化の詳細なメカニズムの解明は、将来的に、疾患発症機構の解明につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Post-translational modification of proteins with ubiquitin regulates numerous biological pathways such as proteasomal protein degradation, inflammation, and DNA repair. However, how different ubiquitin signals are integrated to govern complex biological outputs remains largely unknown. In this study, we identified UBR5 and TRIP12 as ubiquitin chain branching factors. UBR5 modifies TXNIP with K48/K63 branched ubiquitin chains to promote its proteasomal degradation.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：ユビキチン 標的タンパク質分解 プロテアソーム アポトーシス PROTAC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、タンパク質分解だけでなく、炎症シグナル応答や DNA 修復、細胞内輸送など広範な生命機能を制御することが近年明らかになってきた。ユビキチン化修飾の機能的多様性は、基質に付加されるユビキチンの構造的多様性に起因する。ユビキチンは、ユビキチン分子内の 7ヶ所のリジン残基または N 末端メチオニン残基を介して連結し、8 種類のポリユビキチン鎖を形成する。48 番目のリジン残基で連結したユビキチン鎖 (K48 鎖) はプロテアソーム依存的蛋白質分解を促進し、K63 鎖は炎症シグナル伝達や DNA 損傷応答を制御する。特定のユビキチン鎖を認識してシグナルを下流に伝達する解読分子 (リーダー) が存在し、ユビキチンシグナル・ネットワークを形成している (Husnjak and Dikic, *Annu Rev Biochem* 2012)。

従来のユビキチンコード研究では一般的に、単一の連結型から成るユビキチン鎖 (例えば、K48 鎖や K63 鎖など) がそれぞれ異なる機能を持つとされ積極的に研究されてきた。しかし、多様なユビキチン鎖の発するシグナルがどのように相互関連して複雑な細胞応答を制御しているかは十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

これまで、細胞内で分岐型ユビキチン鎖がどの程度の量存在しているのか、また機能的な意義の有無についてはよくわかっていなかった。分岐鎖の研究が進んでこなかった要因として、分岐鎖を測定する技術的な困難さが挙げられる。申請者らはこれまでに定量プロテオミクス法によってユビキチンコードの解析を進めてきた。その結果、細胞内で最も主要な 2 種類のユビキチン鎖である K48 鎖と K63 鎖から成る K48/K63 分岐ユビキチン鎖を発見した。しかし、分岐鎖の生成に関わる酵素、脱ユビキチン化酵素、分岐鎖シグナルを読み解くリーダーについては、申請者が同定した HUWE1 を除きほとんどわかっていない。加えて、分岐鎖は細胞内に豊富に存在しており、様々な生命現象に寄与する可能性が考えられるが、これに関してもほとんどが未知である。

以上の経緯から、本研究は分岐型ユビキチン鎖を生成する酵素群の同定と機能解析により、分岐鎖が担う新たなシグナル伝達機構の解明を目的とする。高感度質量分析技術を駆使した定性・定量プロテオミクスを用い、申請者が発見した分岐鎖のさらなる機能解析を行うことで、これまで見過ごされてきた分岐鎖が担う新たなシグナル伝達機構を包括的に解明する。分岐鎖の形成機構および生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

これまでに、細胞内に分岐鎖が予想外に豊富に存在することを見出した。これは先に解析したユビキチンリガーゼ HUWE1 のみでは説明ができず、細胞内には複数の分岐鎖形成酵素が存在する可能性が高い。また、HUWE1 は K63 鎖を認識し、K48 分岐を付加する活性を有していることから、分岐鎖形成酵素群はそれぞれがユビキチン鎖相互作用能を有している可能性が考えられる。そこで、ユビキチン鎖に相互作用能を有するユビキチンリガーゼ群について解析する。次に申請者が開発した分岐鎖の定量技術により、分岐鎖形成能を評価する。具体的には、分岐の検出に特化したユビキチン分子を用いて *in vitro* 及び *in vivo* でユビキチン鎖を形成させ、高感度の定量質量分析法である Parallel Reaction Monitoring (Ub-PRM) を用いて分岐鎖形成を定量解析する。

同定した分岐鎖形成酵素に関しては、分岐鎖形成能の生化学的な解析を進める。分岐鎖形成酵素は特定のユビキチン鎖を「基質」として認識し、分岐を挿入する活性を有すると考えられるため、ユビキチン鎖に対する認識機構を定量的な手法によって解析する。

また分岐鎖形成酵素の基質と、その下流の細胞応答については、分岐鎖酵素のノックアウト細胞を作製し、基質の分解速度、ユビキチン化、細胞増殖やアポトーシスなどの応答について検討を行う。

4. 研究成果

1) 分岐鎖形成酵素 UBR5 の同定と機能解析

細胞内には複数の分岐型ユビキチン鎖形成酵素が存在する可能性が高いと考えられる。そこで、生化学的な手法により、分岐型ユビキチン鎖を形成する酵素および標的タンパク質を探索した。その結果、NEDD4 型ユビキチンリガーゼ ITCH を見出した。ユビキチン鎖を質量分析技術により定量的に解析を行った結果、ITCH は細胞内で標的タンパク質 TXNIP を分岐型ユビキチン鎖で修飾することが明らかとなった。ITCH 自身は *in vitro* で K63 ユビキチン鎖を形成することから、分岐を形成するのに必要な相互作用因子を探索した。その結果、3 種のユビキチンリガーゼ (UBR5、HUWE1、UBR4) を同定した。ノックダウンによる検討の結果、これらユビキチンリガー

ぜが K63 鎖に対して K48 分岐を挿入することで、分岐型ユビキチン鎖を形成していることが示唆された。UBR5 はユビキチン認識ドメイン (UBA ドメイン) を有しており、ユビキチン鎖を認識して K48 分岐を挿入することが試験管内反応にて確認できた。

さらに、TXNIP はアポトーシス促進因子であることから、細胞応答への分岐鎖の関与を検討した。その結果、ITCH のノックダウンによる TXNIP の蓄積はカンプトテシン依存的なアポトーシス誘導を顕著に促進し、TXNIP との二重ノックダウンによって回復することが判明した。

従来、K63 型ユビキチン鎖はプロテアソーム非依存的な細胞内経路を制御することが報告されていた。本研究から、K63 鎖が分岐鎖形成の種として機能することで、結果的にプロテアソーム依存的なタンパク質分解を制御することが明らかとなった。

2) 分岐鎖形成酵素 TRIP12 の同定と機能解析

さらなる新規の分岐鎖形成酵素について検討を行った。プロテオミクス解析を用いた解析から、新規の分岐鎖形成酵素として TRIP12 を見出した。TRIP12 は HECT 型ユビキチンリガーゼであり、UFD 経路への関連などが報告されているが、ユビキチン鎖特異性の厳密な解析はなされていなかった。そこで、試験管内でユビキチン鎖特異性を検討したところ、TRIP12 は K29 連結型ユビキチン鎖を特異的に形成することが判明した。培養細胞系において標的タンパク質分解誘導剤 (PROTAC) を用いた検討を行った。その結果、PROTAC による BRD4 のユビキチン化において、TRIP12 は PROTAC 依存的に BRD4 にリクルートされ、VHL が形成した K48 鎖に分岐を挿入し、K29/K48 分岐型ユビキチン鎖を形成した。さらに TRIP12 は PROTAC による BRD4 の分解と細胞のアポトーシス誘導を促進することが判明した。以上の結果から、TRIP12 が形成する K29/K48 分岐型ユビキチン鎖はより強力な分解シグナルとして機能することが示唆され、ユビキチンコードのさらなる多様性の一端が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaiho-Soma Ai, Akizuki Yoshino, Igarashi Katsuhide, Endo Akinori, Shoda Takuji, Kawase Yasuko, Demizu Yosuke, Naito Mikihiro, Saeki Yasushi, Tanaka Keiji, Ohtake Fumiaki	4. 巻 81
2. 論文標題 TRIP12 promotes small-molecule-induced degradation through K29/K48-branched ubiquitin chains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1411 ~ 1424.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.01.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakabayashi Osamu, Takahashi Hirota, Moriwaki Kenta, Komazawa-Sakon Sachiko, Ohtake Fumiaki, Murai Shin, Tsuchiya Yuichi, Koyahara Yuki, Saeki Yasushi, Yoshida Yukiko, Yamazaki Soh, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya, Nakano Hiroyasu	4. 巻 4
2. 論文標題 MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitylation of cFLIPL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01603-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Masashi, Saeki Yasushi, Takahashi Hidehisa, Ohtake Fumiaki, Yoshida Yukiko, Kasuga Yusuke, Kondo Takeshi, Yaguchi Hiroaki, Suzuki Masanobu, Ishida Hiroki, Tanaka Keiji, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 3
2. 論文標題 A substrate-trapping strategy to find E3 ubiquitin ligase substrates identifies Parkin and TRIM28 targets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01328-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fuseya Yasuhiro, Fujita Hiroaki, Kim Minsoo, Ohtake Fumiaki, Nishide Akira, Sasaki Katsuhiro, Saeki Yasushi, Tanaka Keiji, Takahashi Ryosuke, Iwai Kazuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 The HOIL-1L ligase modulates immune signalling and cell death via monoubiquitination of LUBAC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 663 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-020-0517-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2. Yasuda S, Tsuchiya H, Kaiho A, Guo Q, Ikeuchi K, Endo A, Arai N, Ohtake F, Murata S, Inada T, Baumeister W, Fernandez-Busnadiego R, Tanaka K*, and Saeki Y*	4. 巻 578
2. 論文標題 Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 296-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1982-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 大竹史明	4. 巻 91
2. 論文標題 分岐型ユビキチン鎖とアセチル化ユビキチン	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohtake, F., Tsuchiya, H., Tanaka, K., and Saeki, Y.	4. 巻 618
2. 論文標題 Methods to measure ubiquitin chain length and linkage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 105-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2018.12.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohtake, F.*, Tsuchiya, H., Saeki, Y., and Tanaka, K*.	4. 巻 115
2. 論文標題 K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 E1401-E1408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1716673115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya, H., Burana, D., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Komada, M., Tanaka, K. *, and Saeki, Y.*	4. 巻 9
2. 論文標題 Ub-ProT reveals global length and composition of protein ubiquitylation in cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Commun	6. 最初と最後の頁 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-02869-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大竹史明
2. 発表標題 質量分析技術とケミカルツールでユビキチン鎖の複雑性に挑む
3. 学会等名 第4回先端ケミカルバイオロジー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtake F, Naito M, Saeki Y, Tanaka K.
2. 発表標題 Proteomic analysis of K48/K63 branched ubiquitin chains.
3. 学会等名 EMBO Conference 「The ubiquitin system: Biology, mechanism, and roles in disease」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯 泰、遠藤彬則、土屋 光、大竹史明
2. 発表標題 ケモテクノロジーと質量分析計を活用したユビキチンコードの解読
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大竹史明
2. 発表標題 分岐型ユビキチン鎖によるタンパク質分解制御機構
3. 学会等名 第8回TOBIRA研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtake F, Saeki Y, Tanaka K.
2. 発表標題 The ubiquitin ligases ITCH and UBR5 regulate proteasomal degradation through K48/K63 branched ubiquitin chains
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohtake F, Saeki Y, Tanaka K.
2. 発表標題 Post-translational modification code of ubiquitin in signal transduction and protein degradation
3. 学会等名 第91回日本生化学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohtake F, Saeki Y, Tanaka K.
2. 発表標題 The NEDD4 family ubiquitin ligase ITCH regulates proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains.
3. 学会等名 FASEB Conference「Ubiquitin and cellular regulation」（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大竹史明、田中啓二
2. 発表標題 炎症応答を制御する新たなユビキチン・シグナル
3. 学会等名 第44回日本毒性学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohtake F., Tanaka K.
2. 発表標題 Role of the K48/K63 branched ubiquitin chains in signal transduction and proteasomal degradation.
3. 学会等名 EMBO conference「Ubiquitin and SUMO」（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野有紗、大竹史明、佐伯泰、田中啓二
2. 発表標題 出芽酵母におけるK48/K63分岐型ポリユビキチン鎖の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

星薬科大学先端生命科学研究所ホームページ
<https://www.hoshi.ac.jp/site/information/kenkyusosiki/36kyoushitsu-sentanseimeikagaku/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	土屋 光 (Tsuchiya Hikaru) (90760132)	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・主任研究員 (82609)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------