

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05942

研究課題名(和文)人工ユビキチンリガーゼを活用した迅速・高精度なユビキチン化の検出法の開発

研究課題名(英文)Rapid and accurate detection of ubiquitination using artificial ligase

研究代表者

宮本 和英 (Miyamoto, Kazuhide)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：10415317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内のユビキチン化反応を構成しているE2(ユビキチン結合酵素)は、白血病、乳がん、大腸がん等、様々ながん疾患と深く関与していることが知られている。しかしながら、これまでE2の活性は、その反応の複雑さ故に、がんの病態を捉えるために利用されてこなかった。私は最近、人工的に設計したARF分子によって、簡便にE2活性を検出できるシステムの開発を行った。ARFは38残基のアミノ酸配列を有するペプチドにE3リガーゼの活性部分のみを移植することで作製された。ARFのイムノクロマトグラフィーを活用して、抗がん剤ボルテゾミブを添加した白血病細胞NB4のE2活性の検出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のユビキチン化反応のE2(ユビキチン結合酵素)活性を簡便に捉えることができる新しい検出システムの開発を進めている。血液・組織中のE2活性を測定すれば新たながん診断の指標となりうることは広く認識されながらも、ユビキチン化が複雑なカスケード反応であるという理由から、これまでE2活性を定量的に計測するのは困難とされてきた。世界で初めて、人工的にユビキチンリガーゼを分子設計し、これを活用した簡便なE2活性の定量的な検出システムの開発に成功した。今後の更なる研究の発展により、ユビキチン化活性に基づいた新たながん診断、例えば、医薬品の効果を治療前に予測できるがん診断が可能になると期待されている。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin-conjugating (E2) enzymes of the ubiquitination pathway are associated with various cancers, such as leukemia, lung cancer, and gastric cancer. However, to date, detection of E2 activities is not practicable for capturing the pathological conditions of cancers due to complications related to the enzymatic cascade reaction. To overcome this hurdle, I have recently investigated a novel strategy for measuring E2 activities. Artificial RING fingers (ARFs) were developed to conveniently detect E2 activities during the ubiquitination reaction. ARFs were created by grafting the active sites of ubiquitin-ligating (E3) enzymes onto amino acid sequences with 38 residues. The use of the immunochromatography of the ARF and allowed us to monitor E2 activities using acute promyelocytic leukemia (APL)-derived cells following treatment with the anticancer drug bortezomib.

研究分野：物理系薬学

キーワード：ユビキチン化 バイオマーカ がん診断

1. 研究開始当初の背景

生体内では、構造異常などが原因で不要となったタンパク質(標的タンパク質)を分解する機能、即ち、品質管理機能が存在する。これは標的タンパク質にユビキチンが付加することで生じるユビキチン化反応により行われる。ユビキチン化は、基本的にユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)の 3 つの酵素が関与しており、ユビキチンが E1 から E2 に転移し、そして E3 を介して標的タンパク質に付加される。この反応が繰り返されることで複数のユビキチンが標的タンパク質に付加される。付加された複数のユビキチンを目印に、標的タンパク質の分解が行われる。このユビキチン化は、様々な疾患との関係も深く、最近、E2 酵素が、白血病、乳がん、大腸がんなどの多くのがんに関与していることが報告されている。しかし、血液・組織中の E2 活性を測定すれば疾患の診断・病態把握に役立つことは広く認識されながらも、ユビキチン化が複雑なカスケード反応であるという理由から、これまで E2 活性を定量的に計測するのは困難でした。そこで私は、これまでに、人工的に分子設計・作製した人工ユビキチンリガーゼ(ARF)を活用した E2 活性の定量的な検出法を研究してきた。

本研究では、ARF を駆使して、素早く E2 活性を簡易検出できる新たな検出システムの構築を検討したので報告する。

2. 研究の目的

- (1) ヒト乳がんに関与する E3 (SIAH1) に基づき、ARF および、それに細胞膜透過配列 (TAT) を組み込んだ TAT-ARF を分子設計する。
- (2) 単離精製されたユビキチン、E1、E2、TAT-ARF(or ARF)を混合しユビキチン化を生じさせて、in vitro レベルで、E2 活性を検出する。
- (3) ARF とイムノクロマトグラフィーを駆使して E2 活性の簡易検出を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳がん由来の SIAH1 に基づき ARF を分子設計し合成する。図 1 に示したように、SIAH1 の活性部位 (アミノ酸 5 残基 PKLTC) を土台配列に移植して ARF を分子設計した。この移植法は、これまでに私が開発してきたヘリックス領域置換法を活用して行われた。さらに、ARF の N 末端に細胞膜透過配列(TAT)を付加した TAT-ARF、また、ARF 中のリジン残基を全てアルギニンに置換した TAT-K/R を分子設計した。

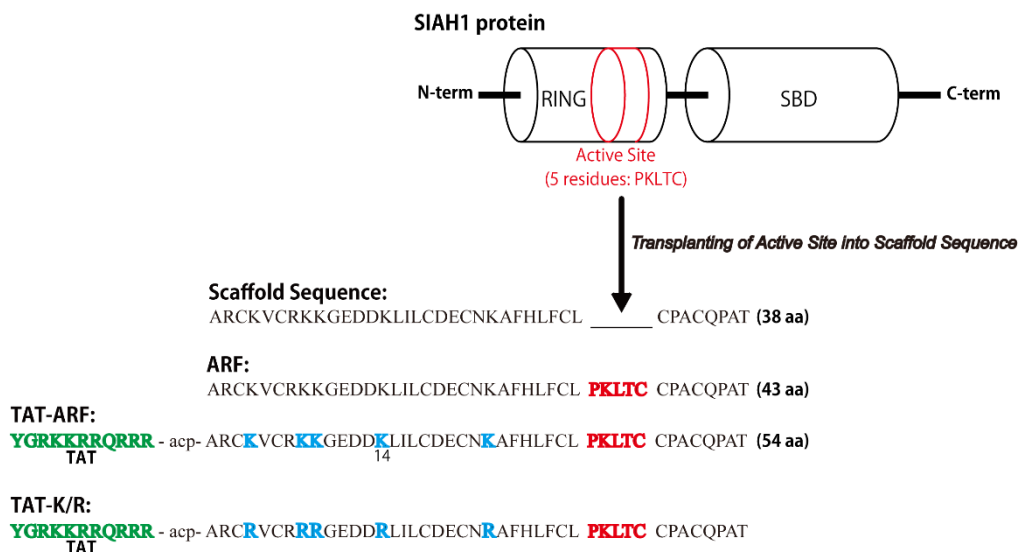


図 1 : 新規開発した人工分子(ARF)の分子設計法

(2) ARF によるユビキチン化実験を行った。まず、ユビキチン化反応に必要な各種試薬 (ARF, E1, E2, ユビキチン) を混合させ、37°C で 1 時間インキュベートした。この反応溶液を SDS 電気泳動した後、ユビキチン化抗体でウエスタンブロット検出した。

(3) ARF を用いたイムノクロマトグラフィーで E2 活性の簡易検出を検討した。ARF の分子量や金コロイド表面への吸着力等を考慮し、BSA 等のキャリアタンパク質に ARF を結合し、ARF を結合させたキャリアタンパク質を金コロイドへ標識する方法を検討した。

4. 研究成果

(1) 設計したアミノ酸配列に基づき、ARF、TAT-ARF、TAT-K/R をペプチド合成し、トリフルオロ酢酸等で脱保護を行った後、グラジエント HPLC で精製した。合成確認は、質量分析 (AXIMA-TOF2, 島津製) によって行った。次に、透析操作を経て、各ペプチドのリフォールディングを行った後、円偏光二色性スペクトルの測定結果から、立体構造形成の確認を行った。

(2) ARF、TAT-ARF、TAT-K/R の全てで、ユビキチン化反応を検出できた (図 2)。TAT-ARF は、ARF と比べて、強いユビキチン化転移の活性を有することが分かった。TAT-K/R は、TAT-ARF よりもさらに、強いユビキチン化活性を示した。TAT-ARF には、TAT 配列中のリジン残基と、ARF 配列中のリジン残基が存在するが、以上の実験結果から、TAT 配列中のリジン残基がよりユビキチン付加の感受性が高いことが明らかになった。これらのユビキチン化活性は、E2 からユビキチンを受けとることで生じる活性であるから、ARF の反応性が E2 活性に等しいことになる。この理論に基づけば、ARF のユビキチン化の反応性から E2 活性を測定することができる。TAT-K/R は、特に強い活性を有していたので、もっとも E2 活性の測定に用いるのにふさわしいと分かった。

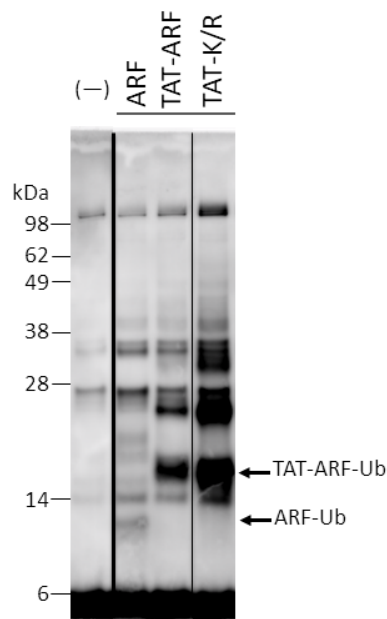


図 2 : ARF のユビキチン化反応

次に、ARF を用いることでヒト乳がん細胞 MCF7 中のユビキチン化に関与する E2 活性

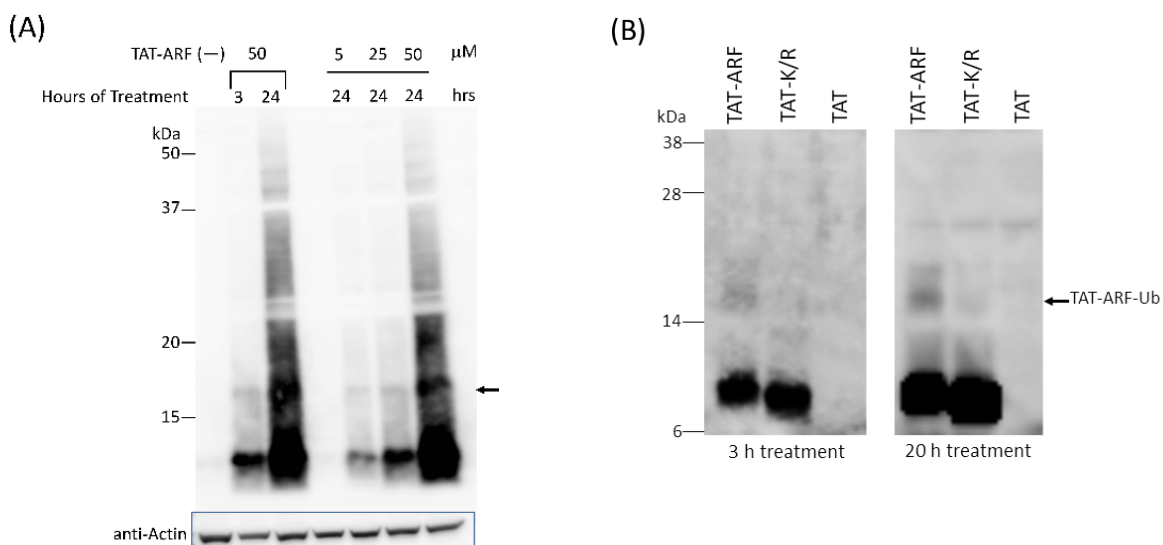
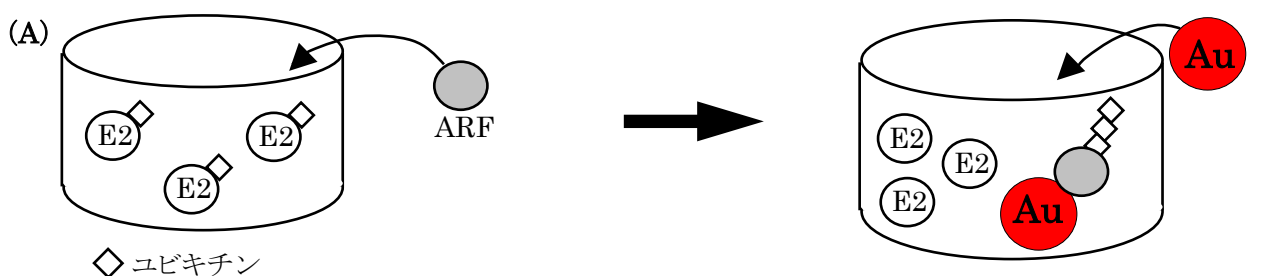


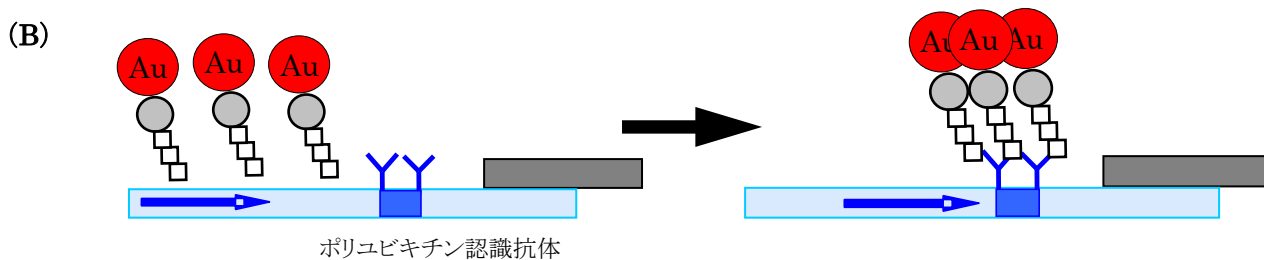
図 3 : 乳がん細胞中の ARF の反応性の検出

を測定できるかどうかを検討した(図3AとB)。ビオチン標識した50 μ M TAT-ARFをMCF7に添加し3 or 24時間インキュベートした後、SDS Lysate中のTAT-ARFをストレプトアビジン系で検出した(図3A)。3よりも24時間の方が、TAT-ARFのユビキチン化反応が促進していたので、TAT-ARFは経時的なユビキチン化活性を示した。また、5, 25, 50 μ M TAT-ARFをMCF7に添加した結果、濃度に応じてTAT-ARFの反応性は増加した。以上の結果を踏まえると、TAT-ARFは細胞中に取り込まれ、そして、ユビキチン化反応を生じたと理解できる。しかし、TAT-K/RについてもMCF7細胞で同様の検討を行ったところ、TAT-K/Rではユビキチン化反応を確認できなかった(図3B)。

(3) ペプチド結合キットでプレ活性化されたキャリアタンパク質(BSA等)をARFに結合させ、キャリアタンパク質を金コロイドへ吸着させた(図4A)。しかしながら、市販キットでのペプチド結合には高濃度のARFが必要となることから(ARF濃度2~5mg/ml)、実用化を考えると現実的でない判断した。次にN末端をビオチン標識したARFにストレプトアビジン化金コロイドを添加し、ストレプトアビジン・ビオチンの反応を利用した金コロイド標識を検討した。その結果、金コロイドの凝集がなく、うまくARFに金コロイド標識できた。メンブレン上での金コロイド粒子の補足では、ポリおよびモノユビキチン鎖を認識する特異抗体を用いて、イムノクロマト用ハーフストリップを作製した(図4B)。



試験サンプルに金コロイド標識したARFを導入し、ARF上に複数のユビキチンを付加させる。



ARFを反応させた試験サンプル中に、ポリユビキチン認識特異抗体を固相化したイムノクロマトハーフストリップ試験片を挿入し、毛細管現象により浸透した金コロイド粒子を捕捉することによって、ドット発色反応させ、即時検出する。

図4：ARFの金コロイド標識と反応性の検出

次に、ユビキチン化反応に必要な各種試薬(TAT-ARF, E1, E2, ユビキチン)を混合させ、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。E2の濃度は、0, 0.496, 2.48, 12.4 および62 μ Mと変化させた。これら反応液中のE2活性をイムノクロマト用ハーフストリップでの検出で検討した(図5)。

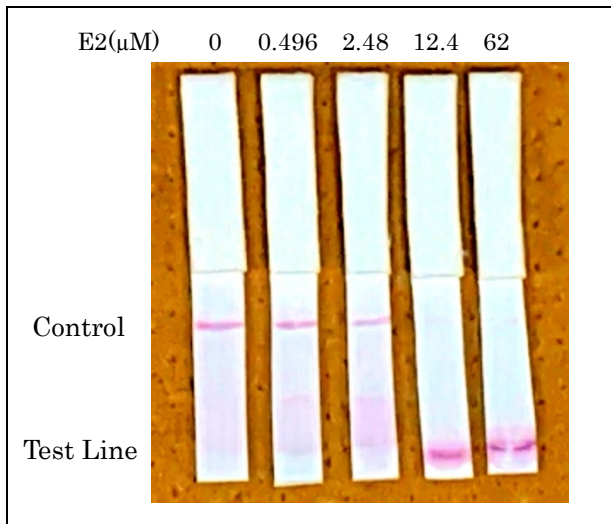


図5：イムノクロマトグラフィーでの検出

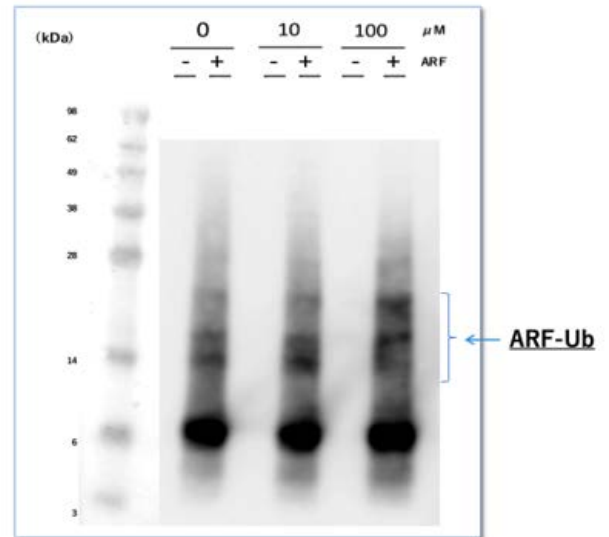


図6：NB4細胞上清のARFの反応



図7：NB4細胞上清のARFの反応のイムノクロマトグラフィー

E2の活性に応じて、Test Lineのバンドが強く観察されている。しかしながら、E2の濃度が0~2.48 μ Mの範囲では、明瞭なTest Lineバンドではないので今後改善の必要がある。次に、実際に急性骨髄性白血病細胞株(NB4)を用いて、細胞中のE2活性を計測した。NB4培養上清に抗がん剤ボルテゾミブを添加し細胞外にE2を漏出させた培養上清と、ネガティブコントロールとしてボルテゾミブ未添加の培養上清を用意した(図6)。これら細胞上清のイムノクロマトグラフィー検出を検討した(図7)。ボルテゾミブの添加濃度に応じて、Test Lineバンドの強度が高まっていることが分かる。より明瞭なバンドが検出できるように、金コロイド標識法を変えるなど、メンブレン上での金コロイド粒子の補足法をさらに検討していく必要がある。

本研究では、人工的に設計したARFを活用する研究によって、世界で初めてイムノクロマトグラフィーを活用して、ユビキチン化のE2活性を計測することに成功した。イムノクロマトグラフィーは特別な機器を必要としない簡便で便利な手法である。E2活性は、白血病や乳がんなどの様々ながん疾患に関与することから、本手法は新たながんスクリーニング法となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 21件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuhide Miyamoto*, Kaori Migita, and Kazuki Saito	4. 巻 29
2. 論文標題 Solution structure of the zinc finger domain of human RNF144A ubiquitin ligase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1836-1842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3903	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 Kazuhide Miyamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of Ubiquitination Activities using ARF on Micro Bioactive Analyzer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pept. Sci.	6. 最初と最後の頁 in-press
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 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 Miyamoto Kazuhide, Fujiwara Yuma, Saito Kazuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Zinc finger domain of the human DTX protein adopts a unique RING fold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1151 ~ 1156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3610	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 Ayumi Yamashita, Kazuki Saito, Kazuhide Miyamoto*	4. 巻
2. 論文標題 Exploring amino acid residues for regulating E2 specificities of artificial RING fingers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pept. Sci.	6. 最初と最後の頁 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 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 Kazuhide Miyamoto*, Arisa Nakatani, Mayumi Sunagawa, Kazuki Saito	4. 巻
2. 論文標題 Detection of ubiquitination activities of artificial RING fingers in human breast cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pept. Sci.	6. 最初と最後の頁 62
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 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 Airi Uechi, Shoko Nakamichi, Yuma Yamabana, Mayumi Sunagawa, Yuri Ishigaki, Kazuhide Miyamoto, Kazuki Saito	4. 巻
2. 論文標題 Preparation of the silkworm prothoracicotropic hormone receptor, Torso, a receptor tyrosine kinase with a novel dimer structure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pept. Sci.	6. 最初と最後の頁 32
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 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 Miyamoto Kazuhide, Taguchi Yukari, Saito Kazuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Unique RING finger structure from the human HRD1 protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 448 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3532	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 Kazuhide Miyamoto*, Yuma Fujiwara, and Kazuki Saito	4. 巻 28
2. 論文標題 Zinc finger domain of the human DTX protein adopts a unique RING fold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1151-1156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3610	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 Kazuhide Miyamoto*, Yukari Taguchi, and Kazuki Saito	4. 巻 28(2)
2. 論文標題 Unique RING finger structure from the human HRD1 protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 448-453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3532	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 4.Kazuhide Miyamoto*, Arisa Nakatani, Mayumi Sunagawa, and Kazuki Saito	4. 巻 27(9)
2. 論文標題 Unique auto-ubiquitination activities of artificial RING fingers in cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1704-1709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3452.	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 Kazuhide Miyamoto*, Kazuki Saito	4. 巻 1867
2. 論文標題 Design of a system for monitoring ubiquitination activities of E2 enzymes using engineered RING finger proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 75-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8799-3_6	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 Kazuhide Miyamoto*, Arisa Nakatani, Mayumi Sunagawa, Kazuki Saito	4. 巻
2. 論文標題 Detection of ubiquitination activities of artificial RING fingers in human breast cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 62
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 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 Ayumi Yamashita, Kazuki Saito, and Kazuhide Miyamoto*	4. 巻
2. 論文標題 Exploring amino acid residues for regulating E2 specificity of artificial RING fingers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 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 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 Airi Uechi, Shoko Nakamichi, Yuma Yamabana, Mayumi Sunagawa, Yuri Ishigaki, Kazuhide Miyamoto, Kazuki Saito*	4. 巻
2. 論文標題 Preparation of the silkworm prothoracicotropic hormone receptor, Torso, which is a receptor tyrosine kinase with novel dimer structure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 32
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 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 Miyamoto Kazuhide, Saito Kazuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Concise machinery for monitoring ubiquitination activities using novel artificial RING fingers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Science (Invited Review)	6. 最初と最後の頁 1354-1363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3427	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 Ayumi Yamashita, Kazuki Saito, Kazuhide Miyamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of E2 activities in cancer cells using an artificial E3 ligase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pept. Sci.	6. 最初と最後の頁 152-153
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 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 Mayumi Sunagawa, Ayumi Yamashita, Kazuki Saito, Kazuhide Miyamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Cellular effects of artificial ubiquitin ligases on cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pept. Sci.	6. 最初と最後の頁 124-125
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 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 Kazuhide Miyamoto, Ayumi Yamashita, Kazuki Saito	4. 巻 27
2. 論文標題 Solution structure of the PHD finger from the human KIAA1045 protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 903-1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3389	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 Kazuhide Miyamoto, Arisa Nakatani, Kazuki Saito	4. 巻 26
2. 論文標題 The unique N terminal zinc finger of synaptotagmin like protein 4 reveals FYVE structure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 2451-2457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3301	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 Kazuhide Miyamoto, Airi Uechi, Kazuki Saito	4. 巻 26
2. 論文標題 The zinc finger domain of RING finger protein 141 reveals a unique RING fold	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1681-1686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3201	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 宮本 和英, 砂川 真弓, 齋藤 一樹	4. 巻 66
2. 論文標題 人工ユビキチンリガーゼの分子設計法の開発 ユビキチン化活性に基づくがん診断に向けて	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 分析化学 (総合論文)	6. 最初と最後の頁 393-402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.66.393	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37件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 宮本和英
2. 発表標題 Detection of ubiquitination activities using ARF on micro Bioactive analyzer
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhide Miyamoto
2. 発表標題 Detection of ubiquitination activities in cancer cells using artificial RING fingers
3. 学会等名 65TH Annual Meeting of Biophysical Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本和英, 中谷有沙, 黒涼菜, 齋藤一樹
2. 発表標題 人工分子ARFを活用するユビキチン化活性の検出法
3. 学会等名 分析イノベーション交流会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本和英, 中谷有沙, 田口由加里, 齋藤一樹
2. 発表標題 Auto-ubiquitination of artificial ring fingers in human breast cancer cells.
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本和英
2. 発表標題 乳がん細胞膜中のユビキチン結合酵素活性の検出
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田佳苗, 石垣悠里, 此上祥史, 宮本和英, 片岡宏誌, 齋藤一樹
2. 発表標題 プレビパチルス菌を用いたカイコガ前胸腺刺激ホルモンの分泌発現とその構造確認
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本和英, 中谷有沙, 齋藤一樹
2. 発表標題 自己ユビキチン化能を有する人工RING fingerの作製法
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本和英, 黒涼菜, 田口由加里, 中谷有沙, 齋藤一樹
2. 発表標題 人工分子ARFを活用した乳がん細胞のコピキチン化活性検出
3. 学会等名 第32回バイオメディカル分析シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒涼菜, 田口由加里, 齋藤一樹, 宮本和英
2. 発表標題 人工分子ARFを活用したコピキチン結合酵素活性の特異的検出
3. 学会等名 第32回バイオメディカル分析シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田佳苗, 石垣悠里, 此上祥史, 片岡宏誌, 宮本和英, 齋藤一樹
2. 発表標題 複雑なジスルフィド構造を有するカイコガ前胸腺刺激ホルモンの大量調製法の確立 ~ 分泌型発現系を備えたプレビパチルス菌の利用 ~
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本和英, 中谷有沙, 齋藤一樹
2. 発表標題 人工コピキチンリガーゼを活用した乳がん細胞のE2活性検出
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhide Miyamoto, Arisa Nakatani, Mayumi Sunagawa, Kazuki Saito
2. 発表標題 Detection of ubiquitination activities of artificial RING fingers in human breast cancer cells.
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayumi Yamashita, Kazuki Saito, and Kazuhide Miyamoto
2. 発表標題 Exploring amino acid residues for regulating E2 specificity of artificial RING fingers
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Airi Uechi, Shoko Nakamichi, Yuma Yamabana, Mayumi Sunagawa, Yuri Ishigaki, Kazuhide Miyamoto, Kazuki Saito
2. 発表標題 Preparation of the silkworm prothoracicotropic hormone receptor, Torso, which is a receptor tyrosine kinase with novel dimer structure.
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口由加里、齋藤一樹、宮本和英
2. 発表標題 人工分子ARFが有するユビキチン結合酵素の特異的認識能の改変
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本和英, 中谷有沙、山下歩美、齋藤一樹
2. 発表標題 人工分子ARFを用いるユビキチン結合酵素活性の検出
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中道祥子, 上地愛理, 山端裕真, 石垣悠里, 宮本和英, 齋藤一樹
2. 発表標題 あらかじめジスルフィド架橋で二量化したチロシンキナーゼ型レセプター・Torsoの大量調製
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本和英, 中谷有沙、齋藤一樹
2. 発表標題 乳がん細胞のユビキチン化に関するE2活性の検出
3. 学会等名 第8回新アミノ酸分析研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上地愛理, 中道祥子, 山端裕真, 砂川真弓, 石垣悠里, 宮本和英, 齋藤一樹
2. 発表標題 細胞膜貫通領域のジスルフィド架橋を介して二量化しているチロシンキナーゼ型レセプター・Torsoの大量調製
3. 学会等名 第35回関西ペプチドセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下歩美, 田口由加里, 齋藤一樹, 宮本和英
2. 発表標題 人工RINGフィンガーが有するE2特異的認識能の検討
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上地愛理, 中道祥子, 砂川真弓, 宮本和英, 齋藤一樹
2. 発表標題 これまでにはなかった二量化様式のチロシンキナーゼ型レセプター・Torsoの大量調製法の確立
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石垣悠里, 下田佳苗, 此上祥史, 片岡宏誌, 宮本和英, 齋藤一樹
2. 発表標題 プレビパチルス菌を用いたカイコガ前胸腺刺激ホルモンの大量調製法の確立 ~複雑なジスルフィド構造を有するリコンビナントタンパク質の発現・調製~
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本和英, 山下美歩, 齋藤一樹
2. 発表標題 Unique ubiquitination reaction of artificial E3 ligases in cancer cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石垣悠里、下田佳苗、此上祥史、片岡宏誌、宮本和英、齋藤一樹
2. 発表標題 複雑なジスルフィド構造を有するカイコガ前胸腺刺激ホルモンPTTHの、プレビパチルス菌を用いた大量調製
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下歩美、齋藤一樹、宮本和英
2. 発表標題 人工ユビキチンリガーゼのE2特異性を担うアミノ酸残基の探索
3. 学会等名 第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上地愛理、砂川真弓、宮本和英、齋藤一樹
2. 発表標題 膜貫通領域のジスルフィド架橋で二量化しているチロシンキナーゼ型レセプターTorso の大量調製
3. 学会等名 日本生化学会大会近畿支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本和英、山下歩美、齋藤一樹
2. 発表標題 人工ユビキチンリガーゼを用いる特異的なE2活性検出の検討
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本和英
2. 発表標題 人工ユビキチンリガーゼを活用するがん診断への挑戦
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会 一般シンポジウム 「がん診断・治療に貢献する次世代分析法開発への挑戦」【シンポジウム主催】
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhide Miyamoto, Ayumi Yamashita, Kazuki Saito
2. 発表標題 Molecular design of artificial RING fingers for detecting ubiquitination activities.
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下歩美, 齋藤一樹, 宮本和英
2. 発表標題 人工RINGフィンガーを用いた簡便なE2活性の検出法
3. 学会等名 第34回関西地区ペプチドセミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mayumi Sunagawa, Arisa Nakatani, Kazuki Saito, Kazuhide Miyamoto
2. 発表標題 Measuring E2 activities by artificial RING fingers in cancer cells.
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017 (ConBio2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下歩美, 齋藤一樹, 宮本和英
2. 発表標題 人工ユビキチンリガーゼを活用したユビキチン化活性の検出
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会 第7回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 砂川真弓, 山下歩美, 齋藤一樹, 宮本和英
2. 発表標題 人工ユビキチンリガーゼのがん細胞における効果
3. 学会等名 第54回ペプチド討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下歩美, 齋藤一樹, 宮本和英
2. 発表標題 人工E3リガーゼを用いるがん細胞のE2活性の検出
3. 学会等名 第54回ペプチド討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 砂川真弓, 中谷有沙, 齋藤一樹, 宮本和英
2. 発表標題 人工ユビキチンリガーゼを用いたがん細胞のユビキチン化活性の測定
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮本和英
2. 発表標題 人工E3リガーゼのユビキチン化反応に基づくがんのスクリーニング
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮本和英, 砂川真弓, 齋藤一樹
2. 発表標題 ユビキチン化活性の検出に用いる人工ユビキチンリガーゼの設計法
3. 学会等名 第77回分析化学討論会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuhide Miyamoto* et al. (Editor Jia Liu)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 276
3. 書名 Zinc Finger Proteins (Methods and Protocols)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

山口東京理科大学薬学部HP http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/kazuhide-miyamoto.html
--

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	砂川 真弓 (湯浅真弓) (Sunagawa Mayumi) (40444509)	姫路獨協大学・薬学部・助手 (34521)	

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