

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32676

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21408

研究課題名（和文）翻訳後修飾によらないユビキチンの新機能

研究課題名（英文）Identification of a new ubiquitin proteoform

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチンは76アミノ酸からなる小型タンパク質であり、カルボキシ（C）末端グリシンを介して基質タンパク質のリジン残基に翻訳後修飾として付加され、基質タンパク質の運命や機能を変換する。しかし、ユビキチンの機能的多様性はいまだ十分には解明されていない。本研究はユビキチンのトップダウンおよびミドルダウン質量分析法を導入して詳細な解析を行った。その結果C末端が切断されたユビキチンがプロテアソーム阻害依存的に増加することを見出し、相互作用因子群を同定した。本研究は翻訳後修飾を介さないユビキチンの性状の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン・プロテアソーム系は細胞内の主要なタンパク質分解システムの一つであり、その破綻はがんや神経変性疾患、炎症性疾患など、様々な疾病につながる事が知られている。そのため、本研究で見出したユビキチンの質量分析手法や新たなユビキチンのプロテオフォームは、将来的にユビキチン系のさらなる理解に貢献し、ユビキチン系に基づいた疾患に対する治療法開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitin is a small protein consisting of 76 amino acids and serve as a source of a post-translational modification called ubiquitylation. Ubiquitylation regulates function or destiny of substrate proteins, yet, the diversity of the role of ubiquitin is not fully understood. In this study, we established the top-down and middle-down mass spectrometry for ubiquitin. Subsequently, we found that the cleaved ubiquitin, lacking the C-terminal double glycines, is accumulated after proteasomal inhibition. Moreover, the C-terminally cleaved ubiquitin interacts with specific binding proteins in vitro.

研究分野：分子生物学

キーワード：ユビキチン プロテアソーム プロテオミクス 翻訳後修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾は生体に必須の翻訳後修飾であり、タンパク質恒常性(プロテオスタシス)維持やシグナル伝達、DNA 修復など、多種多様な生命現象を制御している。ユビキチンは 76 アミノ酸からなる小型タンパク質であり、カルボキシ(C)末端グリシンを介して基質タンパク質のリジン残基に翻訳後修飾として付加され、基質タンパク質の運命や機能を変換する。

ユビキチン修飾は、連結型の違いや翻訳後修飾など、構造的な違いによって多様な機能を発揮する。このようなユビキチン修飾の機能的多様性はユビキチンコードと称される。基質に付加されたユビキチンはさらに連結し、異なる連結型のポリユビキチン鎖を形成する。連結部位は主に 7つのリジン残基または開始メチオニンであり、8種類の連結型を形成するが、近年セリン・トレオニン残基で連結したユビキチン鎖も報告されている。また、異なる連結型のユビキチン鎖が枝分かれした分岐型ユビキチン鎖(分岐鎖)、混合して連結した混合鎖も細胞内に存在する。

また、ユビキチン自身が低分子の翻訳後修飾を受けて機能変換する事例も知られている。リン酸化ユビキチン、アセチル化ユビキチンはユビキチンリガーゼの活性制御やポリユビキチン化伸長阻害、脱ユビキチン化の制御などの機能を有する。しかしながら、ユビキチンの構造的な差異に基づく機能的多様性についてはいまだ十分には解明されていない。

2. 研究の目的

ユビキチン修飾の多様性は主にボトムダウン型の質量分析技術によって解明されてきた。すなわち、ユビキチン修飾やユビキチン鎖をトリプシンで消化するとユビキチン連結部分の残基に特徴的な Gly-Gly(ダブルグリシン)が残存することからユビキチン鎖の連結タイプを決定および定量することができる。また翻訳後修飾についても同様であった。一方で、このような画一的なボトムアップ・プロテオミクスでは判別できないユビキチン修飾も存在すると考えられる。消化酵素を用いずにインタクトなタンパク質の全長を測定するトップダウン質量分析や、限定的な消化によって長鎖のペプチドを測定するミドルダウン質量分析はこのような技術的境界の一部を解決すると考えられる。本研究ではユビキチンのトップダウンおよびミドルダウン質量分析を確立し、ユビキチンの新たな翻訳後修飾である「切断型ユビキチン」の性情解析を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではユビキチンのトップダウンおよびミドルダウン質量分析を構築する。高精度質量分析計 Orbitrap Fusion Lumos と nanoLC を使い、MS および MS2 を測定する。ミドルダウン質量分析については、ユビキチン鎖を非変性条件下で少量のトリプシンで限定的に消化することで、Arg74 のみで切断されてモノユビキチン部分が保持される。また、トリプシン消化より長いペプチド断片を生成するため Lys-C による消化を用いたボトムアップ質量分析も行った。測定手法としては、データ依存的な MS2 取得に加え、高感度のデータ非依存質量分析法である Parallel Reaction Monitoring (PRM) を行った。

4. 研究成果

1) ユビキチンのトップダウンおよびミドルダウン質量分析の構築

ユビキチンの定量解析を行うために、トップダウンプロテオミクス解析法を構築した。遊離型のモノマー・ユビキチンを 293T 細胞および HCT116 細胞から精製し、Higher energy Collision Dissociation (HCD) による開裂によって特徴的な b, y イオンを検出した。これによりトップダウン解析を確立した。

次に、ユビキチンのミドルダウン質量分析を構築した。まず標品である K48 連結ジユビキチンや K63 連結ジユビキチンを非変性条件下で切断し、精製後、測定に供した。その結果、Ub (1-74 a.a.) および Ub (1-74 a.a.)-GlyGly に相当する質量を検出することができた。GlyGly の修飾位置によって変化する特徴的な y イオンを見出し、K63 鎖の判別に成功した。

以上の結果から、ユビキチンのトップダウンおよびミドルダウン質量分析を構築した。本研究では MS2 を取得し、y イオンによって連結部位の検出に成功したため、本手法はユビキチン鎖のより詳細な定性および定量分析に応用可能であると考えられる。

2) 切断型ユビキチンの機能解析

培養細胞から精製した遊離型のモノマー・ユビキチンのトップダウン解析を行う中で、C 末端

の Gly-Gly を欠失したユビキチンの存在を見出した。この切断型ユビキチン (Ub- Δ GG) は新たなユビキチン翻訳後修飾と考えられた。さらに、トップダウン解析の結果を裏付けるため、ボトムアップのプロテオミクス解析を行った。モノユビキチンを in-gel での LysC 消化を行った。LysC 消化によって切断型ユビキチンに特徴的な配列が生成されるため、これを LC-MS にて検出することで、切断型ユビキチンを測定した。これらユビキチン断片に対応するペプチド配列をもとに安定同位体標識した標準ペプチドを合成した。その結果、細胞内の切断型ユビキチンの絶対定量に成功した。

さらに、細胞内の切断型ユビキチンの量的変動を検討するため、確立したトップダウンプロテオミクス解析および、安定同位体標識した標準ペプチドを用いた parallel reaction monitoring (PRM) 法を行った。様々なプロテオスタシス・ストレスを与えた培養細胞からユビキチンを精製し、定量測定を行った。その結果、細胞内の切断型ユビキチンは、プロテアソーム阻害剤などのストレス存在下で増加することを明らかにした。すなわち、細胞内で生じた切断型ユビキチンはプロテアソーム経路依存的に分解制御を受けていることが示唆された。

切断型ユビキチンはC末端を欠失しているため、基質のユビキチン化には用いられない。そこで Ub- Δ GG の機能を明らかにするため、リコンビナントの Ub および Ub- Δ GG を作製し、培養細胞抽出液から相互作用因子を精製し、ショットガンプロテオミクスによって同定を試みた。その結果、Ub- Δ GG において特異的に相互作用するタンパク質あるいは相互作用が増強するタンパク質を複数同定した。これらの相互作用因子は、Ub- Δ GG の細胞内機能あるいは細胞内での代謝に関与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Huang Yifan, Yokoe Hiromasa, Kaiho-Soma Ai, Takahashi Kazunori, Hirasawa Yusuke, Morita Hiroshi, Ohtake Fumiaki, Kanoh Naoki	4. 巻 33
2. 論文標題 Design, Synthesis, and Evaluation of Trivalent PROTACs Having a Functionalization Site with Controlled Orientation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 142 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00490	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 Fumiaki	4. 巻 171
2. 論文標題 Branched ubiquitin code: from basic biology to targeted protein degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 361 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac002	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 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 Akizuki Yoshino, Morita Mai, Mori Yuki, Kaiho-Soma Ai, Dixit Shivani, Endo Akinori, Shimogawa Marie, Hayashi Gosuke, Naito Mikihiro, Okamoto Akimitsu, Tanaka Keiji, Saeki Yasushi, Ohtake Fumiaki	4. 巻 19
2. 論文標題 cIAP1-based degraders induce degradation via branched ubiquitin architectures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 311 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-022-01178-1	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大竹史明、相馬愛、秋月慶乃
2. 発表標題 Branched ubiquitin chains promote chemically-induced targeted protein degradation
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大竹史明
2. 発表標題 化合物による標的タンパク質分解を誘導するユビキチンコード
3. 学会等名 第94回日本生化学大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohtake Fumiaki
2. 発表標題 Role of ubiquitin chain architecture revealed by chemo-technology
3. 学会等名 第93回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大竹史明
2. 発表標題 プロテオミクス解析から明らかになるユビキチン修飾のバイオロジー
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------