

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32676

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22726

研究課題名(和文) ユビキチン鎖高次構造を形成する細胞内メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of intracellular ubiquitin chains formation mechanism

研究代表者

相馬 愛(海保愛)(Soma, Ai)

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任助教

研究者番号：60420684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン・プロテアソーム系は選択的なタンパク質分解により多彩な生命現象を制御し、細胞内タンパク質ホメオスタシスに必須の役割を果たしている。細胞内でいかにして効率的にポリユビキチン鎖高次構造を形成するのかについて不明な点が多く残る。本研究はユビキチン鎖伸長因子の細胞内動態およびユビキチン鎖形成、基質分解への寄与の解明により、細胞内でのポリユビキチン鎖高次構造を形成するメカニズムを検討した。ユビキチン鎖伸長因子のロックアウト細胞を用い、細胞内のポリユビキチン鎖形成および基質の分解への寄与を検討した。その結果、ユビキチン鎖伸長因子によって分解を制御される標的タンパク質を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン・プロテアソーム系による選択的なタンパク質分解は様々な生命機能を制御しており、その破綻はがんや神経変性疾患、免疫疾患など、多様な病態に関わることが知られている。本研究で解明したタンパク質分解の分子機構は将来的にこれら疾患の理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitin proteasome system regulates numerous biological pathways through target specific protein degradation and is indispensable for maintaining cellular proteostasis. Ubiquitin monomers assemble into poly-ubiquitin chains with different linkage topologies by conjugating with each other through one of seven lysine residues or the first methionine of the ubiquitin molecule. Such diversity in the form of ubiquitin chains is the basis for the functional diversity of protein ubiquitylation: the concept known as the ubiquitin code. However, it is largely unknown how complex poly-ubiquitin architectures are efficiently generated in cells. In this study, we analyzed ubiquitin chain elongation factors and identified proteins co-localized with proteasomes and ubiquitin chaperons. In addition, we used a proteomics approach to find target proteins regulated by ubiquitin chain elongation factors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ユビキチン プロテアソーム タンパク質分解 ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン・プロテアソーム系は選択的なタンパク質分解により多彩な生命現象を制御し、細胞内タンパク質ホメオスタシスに必須の役割を果たしている。ユビキチンは異なる連結様式や分岐により様々な高次構造のポリユビキチン鎖を形成することで多様な経路を制御する。すなわち基質の分解は、ユビキチンリガーゼによる特異的な基質認識のみならず、分解誘導に適した高次構造のポリユビキチン鎖 = ユビキチンコードを形成する過程によって厳密に制御される。ポリユビキチン鎖の形成はこれまで生化学的な解析が進んできたが、細胞内でいかにして効率的にポリユビキチン鎖高次構造を形成するのかについてはいまだ解明されていない。本研究では細胞内でのユビキチン鎖伸長因子群の機能を解析することにより、ユビキチン鎖高次構造を形成する細胞内メカニズムの解析を行う。

2. 研究の目的

本研究はユビキチン鎖伸長因子の細胞内動態およびユビキチン鎖形成、基質分解への寄与の解明により、細胞内でのポリユビキチン鎖高次構造を形成するメカニズムを明らかにすることを目的とする。応募者が培ってきた生細胞イメージング技術とプロテオミクス解析を駆使し、ユビキチン鎖伸長因子の細胞内挙動、ユビキチン鎖伸長因子の欠失によるプロテアソームおよびユビキチン鎖への影響、ユビキチン鎖伸長因子によって制御される基質群の解明を行う。

3. 研究の方法

- (1) ユビキチン鎖伸長因子の細胞内挙動 候補となるユビキチン鎖伸長因子の免疫染色により細胞内動態を解析する。細胞刺激を与え、ユビキチン鎖伸長因子、プロテアソームやユビキチン鎖との共局在、プロテアソーム分解阻害の効果について検討する。
- (2) ユビキチン鎖伸長因子の欠失によるプロテアソームおよびユビキチン鎖への影響 候補となるユビキチン鎖伸長因子をノックアウトし、細胞内のポリユビキチン鎖形成、プロテアソームの局在、基質タンパク質の分解への寄与を検討する。
- (3) ユビキチン鎖伸長因子によって制御される基質群の解明 ユビキチン鎖伸長因子のノックアウトあるいはノックダウン細胞を用い、TMT法と質量分析計を用いた網羅的プロテオミクス解析により、ユビキチン鎖伸長因子の基質を同定する。

4. 研究成果

(1) ユビキチン鎖伸長因子の細胞内挙動

候補となるユビキチン鎖伸長因子群に関して、免疫染色により細胞内動態を解析した。種々の細胞刺激を与え、ユビキチン鎖伸長因子の局在の変動および、プロテアソームやユビキチン鎖との共局在、プロテアソーム分解阻害の効果について検討した。その結果、プロテアソームおよびユビキチンシャペロン分子(ユビキチン化基質のプロテアソーム依存性分解を仲介する因子群)と共局在するユビキチン鎖伸長因子を見出した。本結果から、ユビキチン鎖伸長因子群は個別の基質を制御するのみならず、プロテアソームおよびユビキチンシャペロン分子と相

相互作用し、ユビキチン鎖の伸長とプロテアソームへの運搬・分解を共役し、細胞内タンパク質分解をグローバルに制御する可能性が示唆された。

(2) ユビキチン鎖伸長因子の欠失によるプロテアソームおよびユビキチン鎖への影響

候補となるユビキチン鎖伸長因子をノックアウトし、細胞内のポリユビキチン鎖形成、プロテアソームの局在、基質タンパク質の分解への寄与を検討した。その結果、ユビキチン鎖伸長因子のノックアウトによって、細胞内のポリユビキチン鎖量がグローバルに制御されることが明らかとなった。ポリユビキチン鎖の蓄積はプロテアソーム阻害剤依存的だったことから、ユビキチン鎖伸長因子がプロテアソーム分解を促進していることが示唆された。

(3) ユビキチン鎖伸長因子によって制御される基質群の解明

ユビキチン鎖伸長因子のノックアウトあるいはノックダウン細胞を用い、TMT法と質量分析計を用いた網羅的プロテオミクス解析により、ユビキチン鎖伸長因子によって量的制御を受ける標的を探索した。その結果、ユビキチン鎖伸長因子の基質候補を見出し、ウェスタンブロットティングおよびシクロヘキシミドチェイス法によってタンパク質分解への寄与を確認することができた。

以上の結果から、ユビキチン鎖伸長因子がプロテアソーム依存的タンパク質分解を制御する機構の一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------