

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710200

研究課題名 (和文) 定量プロテオミクスによる脱ユビキチン化酵素の網羅的基質探索

研究課題名 (英文) A systematic search for potential substrates of deubiquitinase with quantitative proteomics

研究代表者

太田 一寿 (OTA KAZUHISA)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：00322727

研究成果の概要 (和文)：我々は独自に開発したポリユビキチン化タンパク質濃縮法と高感度質量分析技術を組み合わせることにより、出芽酵母ゲノムにコードされる USP 型脱ユビキチン化酵素全 16 種類の網羅的基質同定を試みた。最終的に、94 の潜在的な酵素-基質関係を同定し、その一部については分子生物学的な手法による確認作業を追加した。

研究成果の概要 (英文)：Combining our originally poly-ubiquitinated protein enrichment method and high throughput LC-MS/MS analysis, we tried to identify specific substrates for all USP type deubiquitinases coded in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. Finally, we identified 94 potential substrate-enzyme relationships and, for some of these, made validation with molecular biological methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：翻訳後修飾、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

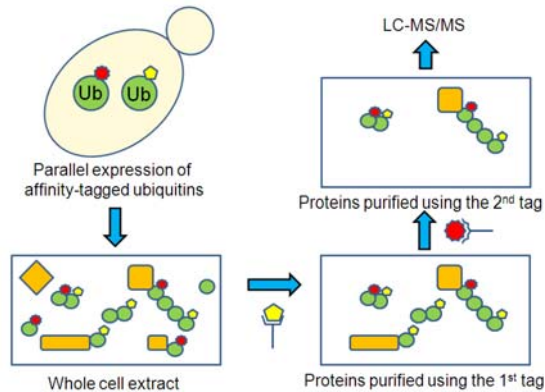
脱ユビキチン化酵素はユビキチン C 末が形成するペプチド結合やイソペプチド結合を加水分解することによりユビキチン化蛋白質の運命決定や細胞内遊離ユビキチン総量の維持に関与しているとされている。その種類は単純な真核生物とされる出芽酵母においても 17 を超え、哺乳類に至っては 100 前後と生命現象の様々なステップに関与する重要な分子であることが予想されており、ヒトにおいてはある種の癌や神経変性疾患の原因遺伝子であることが明らかになっている。一方、細胞内での特異的基質に関する報

告は比較的少なく、いまだに基質側からの地道な個別研究に依存している状況にあり、汎用性・網羅性が高い基質探索アプローチの開発が望まれている。

我々はこのようなユビキチン関連の課題に切り込むために、出芽酵母をモデル系として、ポリユビキチン化蛋白質を優先的に濃縮できる「パラレルアフィニティタグ精製 (PAP) 法」の開発・改良を行ってきた。「PAP 法」とは我々が独自に考案した方法で、異なるタグで標識された 2 種類のユビキチンを同時に細胞内で発現させてポリユビキチン鎖に双方のタグを取り込ませ、次にそれぞれの

タグに対するアフィニティ精製を連続して行うものである。これにより、ポリユビキチン化蛋白質を選択的に（つまり大量に存在するフリーのユビキチンやモノユビキチン化蛋白質を含まずに）しかも高純度に精製する事が可能となる（図1参照）。現時点までの成果として、His タグと Flag タグを用いた PAP 法で得られたサンプルを LC-MS/MS 解析（PAP-MS）したところ、既知のものを含め 130 種以上の基質蛋白質候補を 80%以上の精度で同定する事が可能となっている。

図1.



また、定量的 PAP-MS を行う為に安定同位体標識のアミノ酸を用いた SILAC 法(Stable Isotopic Labeling using Amino Acids in Cell Culture)を採用して、サンプル間でのユビキチン化状況の僅かな違いまで相対比として把握できる SILAC-PAP-MS 解析システムを構築した。これにより SCF 型 E3 の構成因子である F-box 蛋白質の一種でその変異がミトコンドリアの形態異常を引き起こす Mdm30p の特異的な基質としてミトコンドリア外膜蛋白質 Mdm34p の同定に成功している。

今回、SILAC-PAP-MS の F-box 蛋白質に関する成果を目の当たりにして、この方法を脱ユビキチン化酵素の基質探索に応用することに思い当たった。

2. 研究の目的

出芽酵母の全 16 種類の USP 変異株を野生株を対照とする SILAC-PAP-MS 解析に供して、USP-基質ネットワークを解明する。実験系として出芽酵母を、脱ユビキチン化酵素として出芽酵母ゲノム上 16 遺伝子と最も種類が多い USP(Ubiquitin Specific Protease)型を主な対象とする。

(1)SILAC-PAP-MS にアレンジを加えることで脱ユビキチン化酵素の基質探索に適したシステムを構築する。

(2)前段階で構築されたシステムを用いて、出芽酵母のゲノムにコードされるすべての USP 型脱ユビキチン化酵素に関して特異的基質の同定を試みる。得られた情報を総合し、酵素別基質リストや冗長性を加味した

酵素 - 基質ネットワーク図を描出する。

(3)作成したリスト・ネットワークを元に作業仮説を生成し、これを他の角度から証明することでデータの有用性を示す。

3. 研究の方法

(1)脱ユビキチン化酵素の基質探索に適した SILAC-PAP-MS システムの構築

出芽酵母において比較的個別解析が進んでおり基質も明らかになっている脱ユビキチン化酵素 (UBP2 など) を選抜し、酵素欠損株と野生株の間、もしくは活性部位を変異させた酵素を過剰発現する株と発現しない株の間で SILAC-PAP-MS を行い、既知基質のユビキチン化亢進を捉えることを指標にシステムの評価を行った。

(2)出芽酵母ゲノムにコードされるすべての USP 型脱ユビキチン化酵素を対象とした基質同定

前段階で構築されたシステムを用いて、出芽酵母のゲノム上にコードされるすべての USP 型脱ユビキチン化酵素 (全 16 種) に関して特異的基質の同定を試みる。同定された基質候補の内、代表的な蛋白質に関しては western blot によるユビキチン化亢進の追認実験を行った。

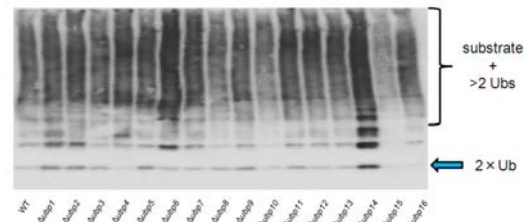
(3)酵素別基質リスト・酵素 - 基質ネットワーク図の描出とその有用性の証明

以上の実験で得られた情報を総合し、酵素別基質リストや冗長性を加味した酵素 - 基質ネットワーク図を描出する。作成したリスト・ネットワーク図を元に作業仮説を生成し、これを他の角度から証明することでデータの有用性を示す。

4. 研究成果

(1) PAP システムの USP 型脱ユビキチン化酵素欠損変異体全 16 株への導入

プラスミド上で構築した PAP システムを標準的な形質転換法により酵母株に導入した。各々の一段階精製後サンプルを二段階目に用いる anti-FLAG 抗体で western blot することによりポリユビキチン鎖の含有量を評価した。



PAP システムの動作確認と共にバンドパターンの比較により各変異体に特有のユビキチン化動態の存在が示唆された。

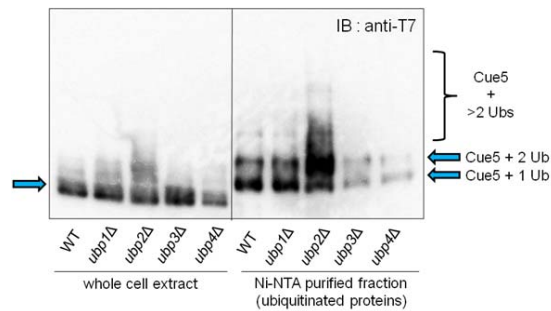
(2) SILAC-PAP-MS 解析

構築した変異株と野生株に対して SILAC-PAP-MS 解析を行った結果、771種類、のべ3426タンパク質が同定された。このうち、比較定量が可能だったものは126種類、のべ536タンパク質だった。これらの定量結果を元に27の酵素-基質候補関係と67の酵素-準基質候補関係を同定した。

	基質候補	準基質候補	定量タンパク質数	同定タンパク質数
Ubp1	0	2	13	211
Ubp2	1	2	28	184
Ubp3	5	7	27	212
Ubp4	6	7	44	238
Ubp5	0	0	28	232
Ubp6	2	6	32	217
Ubp7	3	3	25	250
Ubp8	0	3	41	199
Ubp9	0	4	9	153
Ubp10	4	8	47	230
Ubp11	0	1	14	206
Ubp12	3	4	60	266
Ubp13	0	9	64	240
Ubp14	0	5	30	131
Ubp15	0	3	43	263
Ubp16	3	3	31	194
合計	27	67	536(126種類)	3426(771種類)

(3) 個別検証

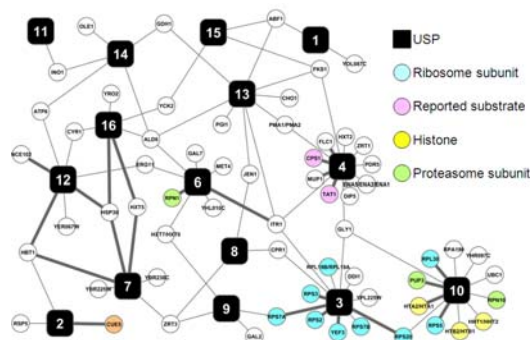
個々の酵素-基質候補関係を基質タンパク質認識抗体による western blot で確認した。



一例として上図に ubp2 欠損株における Cue5 のユビキチン化状況を示す。各細胞内で His-Ub と T7-Cue5 を共発現させ、細胞抽出液と Ni-NTA で精製したユビキチン化タンパク質画分を、T7 抗体を用いて western blot を行っている。Cue5 の Ubp2 依存的なユビキチン化パターンの変化が確認されている。

(4) 脱ユビキチン化酵素-基質ネットワークの描出

上記過程で得られた酵素-基質関係を元にネットワーク図を作成し、基質タンパク質の生物学的な特性を色で表現した。



基質重複を広範囲に認める複雑なネットワークが描出され、脱ユビキチン化酵素の細胞機能への関与が単純ではないことが示唆された。

また、一部の酵素に関しては基質タンパク質に特徴があり細胞内機能の推定が容易であったが、ほとんどの場合は基質情報が不十分であり更なる解析の必要性が痛感させられた。

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3件)

① Feng SY., Ota K., *Ito T.

A yeast one-hybrid system to screen for methylated DNA-binding proteins.

Nucleic Acids Res. 2010 Aug 26. 査読有

② Kato M., Kito K., Ota K., *Ito T.

Remodeling of the SCF Complex-mediated Ubiquitination System by Compositional Alteration of Incorporated F-box Proteins

Proteomics 2009 Oct 8. 査読有

③ Okada S., Ota K., *Ito T.

Circular permutation of ligand-binding module improves dynamic range of genetically encoded FRET-based nanosensor.

Protein Sci. 2009 Oct 13. 査読有

[学会発表] (計3件)

① 太田一寿、紀藤圭治、伊藤隆司

RSP5 機能のユビキチン化による制御機構

BMB 2010 2010年12月9日

神戸ポートアイランド

② 太田一寿・岡田悟・伊藤隆司

ミトコンドリア外膜蛋白質 MDM34 のユビキチン化機構

日本分子生物学会 2009年12月10日

パシフィコ横浜

③ 廣田剛志・太田一寿・紀藤圭治・伊藤隆司

USP 型脱ユビキチン化酵素の網羅的基質探索

日本分子生物学会 2009年12月10日

パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ

<http://itolab.k.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 一寿 (OTA KAZUHISA)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：00322727