

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年～2011 年

課題番号：22700346

研究課題名（和文）ユビキチン様新規翻訳後修飾因子 UBL3 の機能解析

研究課題名（英文）The functional analysis of a novel ubiquitin like posttranslational modifier UBL3

研究代表者

上田 洋司 (AGETA HIROSHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：40416649

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、バイオインフォマティクスの手法により、進化的に高度に保存された翻訳後修飾因子として UBL3 を同定した。そして、UBL3 が膜分画に局在し、ユビキチンのように他分子に対して翻訳後修飾する事を示した。しかし、UBL3 の機能的実態は依然として不明であったため、会合分子の同定を含めた機能解析を推進させた。その結果、いくつかの UBL3 結合分子の同定に成功した。更に、UBL3 による翻訳後修飾である UBL3 化を促す分子群を同定し、それらが UBL3 と結合する事を発見した。以上の発見は、UBL3 化を介した新たな膜移行システムの存在を示唆している。

研究成果の概要（英文）：By using a bioinformatical method, we identified UBL3 as a highly conserved posttranslational modifier. We found that UBL3 were localized at the plasma membrane and attached to other proteins like an ubiquitin protein. However, the functional role of UBL3 is still unknown. To elucidate roles of UBL3, we searched for interaction protein with UBL3. As a result, we identified several UBL3-binding proteins. One UBL3-binding protein enhanced UBL3ylation which is a posttranslational modification via UBL3. These findings suggest that UBL3 may play a pivotal role as an essential component of a novel membrane localization system.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費        | 間接経費      | 合計          |
|---------|-------------|-----------|-------------|
| 2010 年度 | 1,600,000 円 | 480,000 円 | 2,080,000 円 |
| 2011 年度 | 1,400,000 円 | 420,000 円 | 1,820,000 円 |
| 年度      |             |           |             |
| 年度      |             |           |             |
| 年度      |             |           |             |
| 総計      | 3,000,000 円 | 900,000 円 | 3,900,000 円 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学、新規翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 翻訳後修飾の1つに、ユビキチン-プロテアソーム機構(UPS)がある。ユビキチンリガーが標的タンパク質へユビキチンを付着させる事(ユビキチン化)により、プロテアソームがユビキチンを目印にして、標的タンパク質を分解する機構である。同様に、ユビキチンと相同な配列(Ubiquitin like domain, UBL)を持つタンパク質(SUMO や Nedd8 や Atg)も翻訳後修飾因子として作用し、標的分子の輸送、機能活性調節、分解などを行っている。

(2)ユビキチンと相同な配列を持つ UBL タンパクは、ヒトゲノム中に 57 個と数多く存在する。ハエ-線虫-哺乳動物と高度に保存されている UBL タンパクは 5 種類である。進化的に保存が高いタンパクは機能的にも重要である事が知られている。その証拠に高度に保存された UBL タンパク 5 種の中には、ユビキチン、SUMO、Nedd などの重要タンパク群が含まれている。バイオインフォマティクス解析により、UBL3 が機能未知の進化的保存度の高いタンパクとして、研究代表者はスクリーニングした。

(3)研究代表者は UBL3 のユビキタスな発現パターンを示し、特に脳・神経細胞に多く発現する事を見出している。更に、膜分画に特異的に局在する事も見出している。UBL3 の相互作用分子として、シャペロン分子である CCT の同定に成功した。

## 2. 研究の目的

「UBL3 が進化的高度に保存され、なぜ UBL3 が機能的に重要なのか？」という中心課題に対する答えは見いだせていなかった。本研究課題では、UBL3 の会合分子の同定を行いつつ、UBL3 の機能的役割に対して解析を推進させた。

## 3. 研究の方法

(1)機能的類推及びタンパク構造により、UBL3 結合分子を推定し、結合するか否かを調べた。

(2)機能的類推及びタンパク構造により、UBL3 化反応促進分子を推定し、UBL3 との結合及び UBL3 化への影響を調べた。

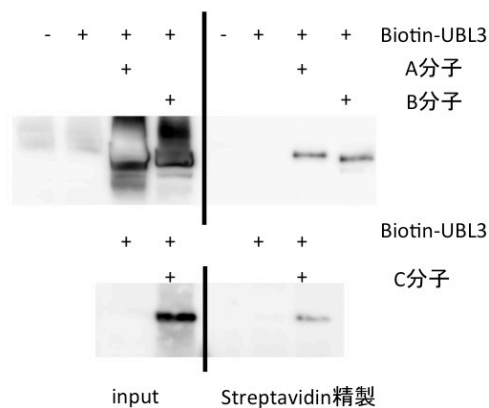
(3)UBL3 との結合分子の探索及び生体中での UBL3 の挙動を観察する目的で、神経特異的

UBL3 過剰発現マウスの作製を行った。

## 4. 研究成果

(1)機能的類推及びタンパク構造により、UBL3 結合分子を推定し、実験を行った。UBL3 には Biotin タグを付加し、HEK293T 細胞へ導入後 Streptavidin ビーズで BiotinUBL3 を精製した。

UBL3 結合分子を推定後、タグ配列を付加し、BiotinUBL3 と同時に遺伝子導入を行った。その結果、候補分子に付加したタグ配列に対する抗体でのウエスタンブロットにより、A, B, C と 3 種の UBL3 結合分子を新たに見出す事に成功した。

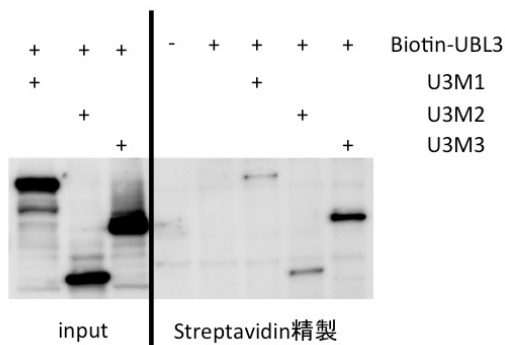


(2) 機能的類推及びタンパク構造により、UBL3 化反応に影響に及ぼす分子をバイオインフォマティクス解析により同定し、候補分子を U3M1, U3M2, U3M3 と名付けた。

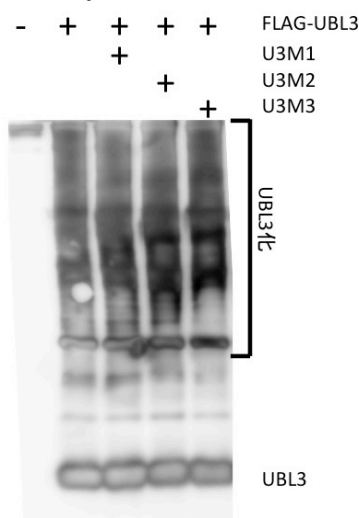
U3M1, U3M2, U3M3 をクローニングし、タグ配列を付加させたものを作製した。

UBL3 には Biotin タグを付加し、HEK293T 細胞へ導入後 Streptavidin ビーズで BiotinUBL3 を精製した。同時に U3M1, U3M2, U3M3 も遺伝子導入を行った。

その結果、タグ配列に対する抗体でのウエスタンブロットにより、U3M1, U3M2, U3M3 のすべてが Biotin-UBL3 と共沈してくる事がわかった。その中でも U3M3 が特に強く結合する事が分かった。



(3) BiotinUBL3 と特異的に共沈した U3M1、U3M2、U3M3 を FLAG-UBL3 と共に HEK293T に導入し、UBL3 化への影響を調べた。その結果、BiotinUBL3 と一番強く結合した U3M3 分子が特に UBL3 化への影響が強い事が分かった。



(4) UBL3 の生体中での挙動及び、更なる結合分子の同定を目的として、過剰発現マウスの作製を行った。Biotin タグ配列は Streptavidin ビーズに特異性を持つため、この実験の目的に適していると考え、UBL3 へ Biotin タグ配列を付加したものを過剰発現させる事にした。UBL3 が脳・神経系に特に強い発現を示すため、前脳神経特異的プロモーターである  $\alpha$  CaMKII プロモーターを BiotinUBL3 の発現制御配列として使用した。250 個の卵へ transgene を導入した結果、42 匹の仔を産出し、その内、8 匹が遺伝子導入動物であった。

今後は、一番発現量の多いラインの確定を行い、その過剰発現動物を用いて次の実験を行う。

① BiotinUBL3 過剰発現マウスから脳を摘出

し、BiotinUBL3 を Streptavidin ビーズで精製を行う。その後、精製産物を電気泳動法によりタンパクを分離する。ネガティブコントロールとしては、野生型マウスを使用する。ネガティブコントロールと差があるバンドを切り出し、質量分析計でタンパク同定する事により、脳・神経系での UBL3 結合分子を同定する。

② 上記解析で得られた UBL3 結合分子及び U3M1、U3M2、U3M3 が脳・神経系でも結合するかどうかを、BiotinUBL3 過剰発現マウスを用いて確認する。

以上のように、本研究により UBL3 へ結合する分子及び UBL3 化へ影響を及ぼす分子の同定に成功した。現在、「UBL3 による新たな翻訳後修飾」として論文投稿準備中である。

今後は、UBL3 化による結合分子の膜局在化に焦点をあて、新たな膜局在化システムとして研究を促進させ、今回の研究で見つけた U3M3 による UBL3 化促進に対する阻害剤探索などを行うことで、医学的応用へも繋がることを考えている。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- 変形性関節症の軟骨細胞に対する網羅的プロテオミクス解析  
池田 大樹、上田 洋司、土田 邦博、山田 治基  
日本軟骨代謝学会  
2012年3月10日  
愛知県
- Proteomics analysis of new animal models of bipolar disorder,  
Hiroshi Ageta, Akihiko Takasaki, Kaoru Inokuchi, Kunihiro Tsuchida  
北米神経科学大会  
2011年11月14日  
ワシントン DC

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/ICMS/res04.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 洋司 (AGETA HIROSHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教  
研究者番号：40416649

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし