

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82609

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24112004

研究課題名(和文) 転写調節機構におけるユビキチン修飾系の役割解明

研究課題名(英文) Role of the ubiquitin system in the regulation of gene expression

研究代表者

大竹 史明(OHTAKE, Fumiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：60447373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 67,000,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン系は生体に必須の翻訳後修飾システムである。本研究は、修飾分子であるユビキチン自身がアセチル化修飾によって制御される分子機構を明らかにし、基質として転写活性化に関わるモノユビキチン化ヒストンH2Bを同定した。またユビキチン自身が2カ所でユビキチン化される「分岐型」ユビキチン鎖の定量手法を開発し、ユビキチン修飾がクロストークすることにより転写因子NF- $\kappa$ Bシグナルを制御する新たな細胞内機能を見出した。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitination is an essential post-translational modification (PTM) with diverse functions. In this study, we showed that ubiquitin, itself a PTM, is functionally regulated by acetylation. We identified histone H2B as a substrate of acetyl-ubiquitylation. Moreover, we established a strategy for quantifying K48/K63 branched ubiquitin chains, and found a cellular role of the branched ubiquitin chains.

研究分野：生物学

キーワード：ユビキチン 翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系はタンパク質分解にとどまらず多彩な生命活動を制御している。その中で、ユビキチン修飾系が転写制御因子あるいはクロマチンの修飾を介して、遺伝子発現調節機構の一端を担うことが明らかにされてきたが、その詳細については未だ不明な点が多い。基質タンパク質はユビキチンのリジン 48 を介したユビキチン鎖 (K48 鎖) の修飾によって分解される一方、K63 鎖修飾やモノユビキチン化によって分解非依存的な機能制御を受けることが知られている。従って、遺伝子発現調節においてもこれら異なるユビキチン鎖の使い分けが行われていると考えられる。このようにユビキチン修飾系の多様な生物学的役割は、ユビキチン鎖の多様性を分子基盤として生み出される。ユビキチン鎖の長さ (モノ、ポリユビキチン化) 及びユビキチン鎖の連結様式 (K48 鎖、K63 鎖等) がその多様性を構成する要素として知られている。一方で、ユビキチン分子自身に対する翻訳後修飾としては、従来、ユビキチン化 (すなわちポリユビキチン化) しか知られていなかった。

## 2. 研究の目的

ユビキチン修飾系の多様な生物学的役割は、ユビキチン鎖の多様性を分子基盤として生み出される。ユビキチン鎖の長さ及び連結様式がその多様性を構成する要素として知られている。一方で、ユビキチン分子自身に対する翻訳後修飾の存在や機能的意義については良く分かっていなかった。本研究では、ユビキチン分子自身に対する翻訳後修飾がユビキチン鎖の選択性を担う「ユビキチン・コード」の一端を担う可能性を検討し、ユビキチン制御系の新たな制御機構の解明を目指す。そのために、ユビキチンのアセチル化修飾がユビキチン系を調節する分子作用機構を検討するとともに、修飾基質や生物学的

意義の解析を行う。またユビキチン修飾同士のクロストーク機構についても解析を行う。本研究により、ユビキチン制御系の多様性を生み出す分子基盤として、従来知られているユビキチン鎖の長さ・連結様式に加え、ユビキチン自身の翻訳後修飾を提示することを目的とする。

## 3. 研究の方法

アセチルユビキチンおよび他のユビキチン修飾を厳密に定量するため、高感度質量分析計を用いた MS2 定量 (Parallel Reaction Monitoring 法: PRM) を用いた。培養細胞からユビキチン鎖あるいはヒストンなどの基質タンパク質を精製し、合成した標準ペプチド (AQUA ペプチド) を内部標準として PRM 法に供した。

*In vitro* での機能解析を行うため、大腸菌での遺伝暗号拡張により合成されたりコンビナント・アセチルユビキチンタンパク質を用いた。*In vitro* ユビキチン化反応後は PRM 法および Western blotting で測定を行った。

相互作用タンパク質の網羅的比較定量解析には、SILAC 法を用いた。

## 4. 研究成果

(1) アセチルユビキチンの発見と転写制御機構の解析

質量分析計を用いた解析により、内在性ユビキチンに付加された翻訳後修飾を探索した結果、複数部位でのアセチル化及びリン酸化修飾を同定した。さらにユビキチン絶対定量法を用いて翻訳後修飾の定量を行った。

ユビキチン K6 残基、K48 残基におけるアセチル化修飾に焦点を当てて分子機構解析を行った。アセチル化はモノユビキチン化活性には影響しないが、ユビキチンと E2 酵素との相互作用を阻害することで、ポリユビキチン鎖の伸長を特異的に抑制することが明らかとなった。

アセチルユビキチンの基質を網羅解析により探索した結果、ヒストン H2B を同定した。ユビキチンのアセチル化は転写活性化に関わる修飾である H2B-K120 モノユビキチン化を安定化することが示唆された。さらに、アセチルユビキチンは H2B-K120 モノユビキチン化の下流に位置する転写活性化修飾を促進することを見出した。

以上の結果から、翻訳後修飾分子であるユビキチン自身がアセチル化修飾によって機能制御を受け、転写調節機構を担うヒストン修飾に関与することを見出した。(Ohtake et al., EMBO Reports, 2015)

## (2) 分岐型ユビキチン鎖の発見とシグナル依存的遺伝子発現制御における機能

ユビキチンのアセチル化修飾の機能解析から、ユビキチン分子内の多重翻訳後修飾(アセチル化とポリユビキチン化)が互いを制御するクロストークが明らかになった。そこでこの知見を発展させて、ユビキチン修飾間のクロストークについて検討を行った。具体的には、細胞内に最も豊富に存在する K48 修飾と K63 修飾が共存する場合(いわゆる分岐型ユビキチン)を想定して研究を行った。

まず、PRM 法を用いた K48 鎖と K63 鎖からなる分岐型ユビキチン鎖の定量方法を開発した。測定の結果、K48/K63 分岐鎖が細胞内に豊富に存在することを見出した。K48 で分岐した K63 鎖は脱ユビキチン化酵素 CYLD による切断を受けにくくなり安定化することが判明し、ユビキチン多重修飾が機能的にクロストークする一例を明らかにした。

さらに分岐鎖形成酵素として E3 ユビキチンリガーゼ HUWE1 を同定した。HUWE1 は炎症性サイトカインである interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )依存的に分岐鎖を形成し、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子である TNF- $\alpha$ や IL8 の遺伝子発現制御を正に調節した。またレポーターアッセ

イによる NF- $\kappa$ B 転写活性測定においても、HUWE1 は TRAF6 依存的な NF- $\kappa$ B 転写活性化に必要なだった。

以上の結果から、新規の分岐型ユビキチン鎖を発見し、分岐鎖内におけるユビキチン修飾間クロストークと、シグナル依存的な遺伝子発現制御における機能の一端を明らかにした。(Ohtake et al., Molecular Cell, 2016; Ohtake and Tsuchiya, J Biochem, 2017)

## 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7件)

1. Tsuchiya H, Ohtake F, Arai N, Kaiho A, Yasuda S, \*Tanaka K, and \*Saeki Y. (2017) *In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-linked Chain Specificity of the Proteasome. Molecular Cell*, 66, 488-502 doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.024. 査読有

2. \*Ohtake F, Tsuchiya H. (2017) The emerging complexity of ubiquitin architecture. *Journal of Biochemistry*, 161, 125-133. doi: 10.1093/jb/mvw088. 査読有

3. 大竹史明、佐伯泰、田中啓二 (2017) 「リジン 48/63 分岐型ユビキチン鎖は NF- $\kappa$ B 経路の調節因子である」**実験医学** 35 (3) 452-454 査読無

4. 大竹史明、佐伯泰、田中啓二 (2016) 「分岐型ユビキチン鎖は NF- $\kappa$ B シグナルを制御する」**First Authors**, on line published. doi: 10.7875/first.author.2016.109 査読無

5. \*Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno, J, and \*Tanaka K. (2016) The K48-K63 branched ubiquitin chain regulates NF- $\kappa$ B signaling. *Molecular Cell*, 64, 251-266. doi:

10.1016/j.molcel.2016.09.014. 査読有

6. \*Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, and Kanno J. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* 16:192-201. doi: 10.15252/embr.201439152. 査読有

7. Okada M, Ohtake F, Nishikawa H, Wu W, Saeki Y, Tanaka K, \*Ohta T. (2015) Liganded ERα Stimulates the E3 Ubiquitin Ligase Activity of UBE3C to Facilitate Cell Proliferation. *Mol Endocrinol.* 29(11):1646-57. doi: 10.1210/me.2015-1125. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 大竹史明 : 「ユビキチンコードのクロストーク : 分岐型ユビキチン鎖の細胞内機能」国際高等研究所プロジェクト・生命活動を生体高分子への修飾から俯瞰する 平成 28 年度研究会 2017.1.24、国際高等研究所 (京都府木津川市)

2. Ohtake F. Cellular function of the Lys48/Lys63 branched ubiquitin chain. 国際シンポジウム「Diverse functions of Ubiquitin : Degradation, Signaling, and Beyond」2016.12.6 京都大学 (京都府京都市)

3. Ohtake F, Saeki Y, Tanaka K. Quantitative analysis of the branched ubiquitin chains 第 39 回日本分子生物学会シンポジウム「ユビキチンを中核とした翻訳後修飾による多様な生体調節メカニズム」2016.12.1 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

4. Ohtake F, Saeki Y, Tanaka K. Ubiquitin

acetylation regulates polyubiquitin chain elongation. FASEB Conference 'Ubiquitin and cellular regulation' 2016.6.13 BigSky、米国

5. 岡田麻衣子、大竹史明、西川裕之、佐伯泰、田中啓二、太田智彦 ERα は UBE3C のユビキチン E3 リガーゼ活性に対するリガンド依存的な調節因子として機能する 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会合同大会 2015.12.01-04 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

6. 岡田麻衣子、西川裕之、呉文文、大竹史明、佐伯泰、田中啓二、太田智彦 ER はリガンド依存的なユビキチン化制御因子として機能する 日本大分分泌学会 第 33 回内分代謝学サマーセミナー 2015.7.09-11 立花邸 (福岡県柳川市)

〔その他〕

ホームページ等

蛋白質代謝研究室ホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大竹史明 (OHTAKE, Fumiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号 : 60447373

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし