

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15058

研究課題名(和文) 特異性の高い新規ユビキチンリガーゼ基質同定法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method to identify E3 ligase substrates

研究代表者

渡部 昌 (WATANABE, MASASHI)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：10632424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン化修飾の基質特異性はユビキチンリガーゼ(E3)が決定しているため、個々のE3に特異的な基質を同定しそのユビキチン化部位を決定することは様々な生命現象を理解する上で重要となる。近年、ユビキチン結合ドメイン(UBA)とE3の融合プローブによるLigase trap法、ユビキチン高親和性ドメイン(TUBE)とユビキチン化を受けたペプチドを認識するK-GG抗体を組み合わせるTR-TUBE法が提唱された。私たちはこの手法にいくつかの改良を加えてさらに進展させた基質同定法の開発を試み、感度の向上に成功している。この手法を用いることで、E3の機能解析が加速することが期待できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Since ubiquitin ligase (E3) has the substrate specificity of ubiquitination, identifications of specific substrates of each E3 enzymes and of their ubiquitination sites are important for understanding various biological phenomena. In recent years, Toczyski and colleagues have proposed a ligase trap method using a fusion probe of an ubiquitin-binding domain (UBA) and an E3, and Yoshida and colleagues have proposed a TR-TUBE method combining Tandem Ubiquitin Binding Entity (TUBE) and K-GG-specific antibody. We attempted to develop a more advanced substrate identification method by adding some improvements in their methods and succeeded in improving the sensitivity. By using this method, it is expected that the functional analysis of E3 would be accelerated.

研究分野：医化学一般

キーワード：ユビキチン ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンによるタンパク質の可逆的修飾は、リン酸化、アセチル化、メチル化などと同様に、様々な生命現象を支える極めて重要な翻訳後修飾の一つである。ユビキチン化は、ユビキチンリガーゼ (E3) が選択的に基質を認識することによって起こる。したがって個々の E3 に特異的な基質を同定しそのユビキチン化部位を決定することは様々な生命現象を理解する上で重要である。

研究者は、これまでに E3 と基質の結合力を利用した方法やレポーターアッセイを指標としたスクリーニング法により基質の同定を試み機能解析を行ってきた。しかし E3 と結合力の強い分子はユビキチン化を受けないことが多いことや、偽陽性が多いことなどの特異度の低さが大きな問題であった。また近年では基質の半減期を指標とする方法などが報告されているが、プロテアソーム輸送シグナル以外のユビキチン化を受ける基質は同定することができない。基質同定手法のさらなる進展が望まれる状況であった。

ユビキチンはカルボキシル末端 (RGG) を介し基質のリジン側鎖の ϵ -アミノ基にイソペプチド結合する。ユビキチン化修飾を受けた基質をトリプシンにより消化すると、塩基性アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合が切断されるため、ユビキチン化部位にユビキチンレムナント (K- ϵ -GG) が残ることとなる。近年になり、この K- ϵ -GG を認識する抗体が Jaffrey SR らによって開発された。また、真核生物の遺伝子中に見られるユビキチン結合ドメインの 1000 倍という高い親和性を持つユビキチン高親和性人工タンパク質 (TUBE) が Rodriguez MS らによって開発された。

質量分析器を用いて標的を同定する際に重要なことは、如何に同定したい標的基質のみを濃縮して精製することができるかという点にある。ユビキチン化を受けた基質を特異的に精製するために、K- ϵ -GG 認識抗体と TUBE を用いる方法に着目し、本研究構想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、近年進展した様々な手法を効果的に組み合わせることにより、これまでの問題点を原理的に解消した新しい基質同定法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で開発する同定法は、FLAG タグ、ユビキチン高親和性人工タンパク質 (TUBE) 解析したい任意の E3 酵素の 3 つのドメインを融合したプローブを用いることに特徴がある。「細胞内で」E3 がユビキチン化した直後の基質を「その場で」捕獲し、かつ「ユビキチン化ペプチドのみ」を精製し網羅的に検出する点に斬新性がある (図 1 参照)。ユビキチン化を受けたペプチドのみを再精製す

ることで、同時にユビキチン化部位の同定も可能となる。E3 が細胞内で実際に担う酵素反応を検出するため、偽陽性が少なく特異性が高い生理的な基質を定量的に同定できる。

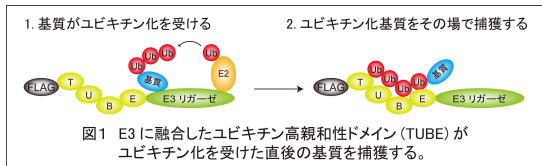


図1 E3に融合したユビキチン高親和性ドメイン (TUBE) がユビキチン化を受けた直後の基質を捕獲する。

本方法では、1. プローブを安定に発現する細胞を樹立し、2. プローブを細胞に導入しプローブが捕獲するユビキチンリガーゼの基質を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、3. トリプシンによって消化した後、4. ユビキチンレムナント抗体 (K- ϵ -GG 抗体) を用いて、ユビキチン化を受けたペプチドのみ再精製し、5. Ion Trap-Orbitrap 型質量分析器にて検出する (図 2 参照)。

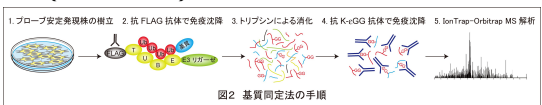


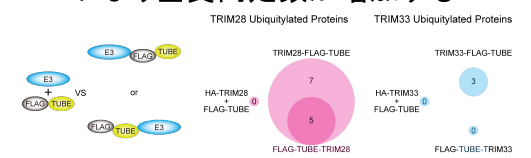
図2 基質同定法の手順

以上を踏まえ、下記の研究計画を立て、実行した。すなわち、基質を最も効率よく捕獲できる E3 プローブを開発し、安定に発現する細胞株を作製する。ユビキチン化タンパク質を精製し高感度質量分析器にて網羅的に同定し妥当性を評価する。方法の確立後、システム生物学的アプローチへの応用を試みる。

4. 研究成果

(1) TUBE とユビキチンリガーゼの融合により基質同定数が増加することを見出した (図 3 参照)。まず初めに、TUBE とユビキチンリガーゼを融合させたプローブが融合せずに用いた場合と比較して有効であるかどうかを検証した。ユビキチンリガーゼとして TRIM28、TRIM33 を用いて比較したところ、非融合プローブではともに基質候補の同定に至らなかった一方で、融合プローブでは一定の基質候補の同定に至った。

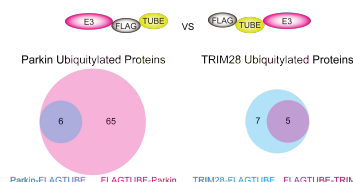
図3 TUBE とユビキチンリガーゼの融合により基質同定数が増加する



(2) TUBE 配列の融合部位の違いにより基質同定数が変動することを見出した (図 4 参照)。次に、TUBE 配列の融合部位をユビキチンリガーゼのアミノ末端側とカルボキシル末端側とで比較を行った。Parkin をユビキチンリガーゼとして用いた場合はアミノ末端に TUBE を融合させたプローブが効率よく基質候補を同定することができた。一方、TRIM28 をユビキチンリガーゼとして用いた場合は、カルボキシル末端に TUBE を融合させたプローブが比較的効率よく基質候補

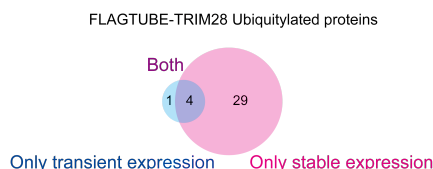
を同定することができた。このため、最適な融合部位はユビキチンリガー毎に異なることが示唆された。

図4 TUBE 配列の融合部位の違いにより基質同定数が変動する



(3)プローブの安定発現細胞株を作製し利用することにより同定数が増加することを見出した(図5参照)。HEK293T細胞を用いて、プローブを一過性に過剰発現させた系と安定に発現させた系の比較を行ったところ、安定発現細胞株を作製して行った系で基質同定数が増加した。

図5 プローブ安定発現株を作製することにより同定数が増加する



以上より、プローブはTUBEとユビキチンリガーを融合させることが望ましく、その融合部位はユビキチンリガー毎に検討が必要であり、さらにプローブは安定発現細胞株を作製することが望ましいことが明らかとなった。

(4)理論上プローブ1分子につき基質候補1分子を捕獲する実験系であるため、プローブの発現量が高いほど感度も高いと期待される。プローブ自身の細胞毒性によって発現量を高く保てない場合は、用いる細胞の量を増加させることで対応した。

(5)以上を踏まえて21のユビキチンリガー遺伝子についてプローブを作製し、プローブを安定に発現する細胞株の作製を試みた。このうち、10のユビキチンリガー遺伝子プローブの安定発現株取得に成功し、残りの11のプローブでは作製が困難であった。作製した細胞株を用いて基質の同定を試みたところ、6のユビキチンリガー遺伝子プローブで特異的と思われる基質候補分子とそのユビキチン化部位の同定に成功している。

(6)ユビキチンリガーParkinとTUBEの融合プローブを用いてミトコンドリア膜電位低下誘発剤 CCCP 投与により mitophagy を活性化し本方法を適用したところ、過去に報告されている基質を中心に、ミトコンドリア外膜に局在する分子を多数同定した(図6参照)。過去の報告では、Parkinのユビキチンリガー活性は通常不活性化状態にあり、mitophagy 経路が駆動するとミトコンドリア

にリクルートされて活性化し、近傍の基質をユビキチン化するとされているため、本研究の結果はこれに一致した妥当なものであると考えられた。

ユビキチン化タンパク質	同定ペプチド数			ユビキチン化タンパク質	同定ペプチド数		
	実験1	実験2	実験3		実験1	実験2	実験3
総ペプチド数	696	951	999				
総タンパク質数	49	47	42				
Ubiquitin	74	79	98	MCL1	12	9	4
TOMM70A	101	169	185	CYBSR3	10	7	5
MFN2	63	97	90	SLMAP	9	5	4
MFN1	45	107	101	ACSL1	4	10	2
FAF2	33	66	85	MAOB	4	5	7
HK1	48	65	64	DCAKD	6	4	5
CPT1A	33	50	59	NT5C3A	12	1	1
VDAC3	22	43	59	HSDL1	5	4	5
MARC2	30	26	32	TRIM4	4	6	4
ACSL4	25	23	24	POLR2A	13		
VDAC1	16	27	28	SLC25A5	5	3	2
VDAC2	13	29	25	ELMOD2	4	4	3
MARC1	19	22	21	ODR4	3	4	4
CISD1	14	18	27	ATAD1	4	6	
FKBP8	20	14	15	CYBSR1	8	2	
TRABD	13	13	21	TRIP12	3	4	3
GDAP1	15	17	16	HK2	5	2	2
HSD17B10	7	5	7	ATP5B	3	2	3
PTRH2	4	19	18	PSMC3	2	2	3
AGPAT5	6	14	17	FAM213A	4	2	
TOMM20	9	10	13	CISD2	4	1	
SSBP1	7	4	4	HSD17B7	2	3	
RHOT2	4	11	12	SLC25A6	3		1
FIS1	5	10	11	GPAM	2	2	
CPS1	11	3	6	TRIM5	2	1	1

図6 CCCP 刺激時の Parkin 基質の同定
太字はミトコンドリア外膜タンパク質

本研究では、基質同定手法の有効性を確認し、いくつかの改良を施すことができた。定常条件のみならず、CCCP 刺激などの刺激依存的な基質候補の同定も可能であった。一方で、安定発現株作製効率が 50%未満という問題点も浮上している。これは、TUBEのみを安定発現させることができないことから、TUBE自身に何らかの細胞毒性を持つためと思われる。本手法の適用範囲をさらに拡大する上で、誘導型のプロモーターを用いるなどの何らかの改良が必要であると思われる。

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)

[雑誌論文](計4件)

Watanabe M and Hatakeyama S: TRIM proteins and diseases. J. Biochem., 161, 135-144, 査読有, 2017

DOI:10.1093/jb/mvw087

Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama K, Tsutsui H, Hatakeyama S: The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. J. Mol. Cell. Cardiol., 100, 43-53, 査読有, 2016

DOI:10.1016/j.yjmcc.2016.09.013

Anwar D, Takahashi H, Watanabe M, Suzuki M, Fukuda S and Hatakeyama S: p53 represses the transcription of snRNA genes by preventing the formation of little elongation complex. Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech., 1859, 975-982, 査読有, 2016

DOI:10.1016/j.bbagr.2016.06.001

Suzuki M, Watanabe M, Nakamaru Y, Takagi D, Takahashi H, Fukuda S and Hatakeyama S: TRIM39 negatively regulates the NF B-mediated signaling pathway through stabilization of cactin. Cell. Mol. Life Sci., 73, 1085-1101, 査読有, 2016 DOI:10.1007/s00018-015-2040-x

〔学会発表〕(計7件)

Watanabe M: Identification of E3 ligase substrates by fusion of TR-TUBE and ligase trap methods. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on the Ubiquitin Family, April 18-22, 2017, Cold Spring Harbor, New York, USA

渡部 昌, 高橋秀尚, 畠山鎮次, The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR ,第39回日本分子生物学会年会,2016年12月1日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

渡部 昌, 高橋秀尚, 畠山鎮次, ユビキチンリガーゼ TRIM23 は非定型ポリユビキチン化による PPAR の安定化を介して脂肪細胞分化を制御する,第89回日本生化学会大会,2016年9月27日,東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

渡部 昌, 高橋秀尚, 畠山鎮次, ユビキチン E3 リガーゼ TRIM23 は非定型ポリユビキチン化による PPAR の安定化を介して脂肪細胞分化を制御する,第68回日本細胞生物学会大会,2016年6月15日,国立京都国際会館(京都府京都市)

渡部 昌, 高橋秀尚, 畠山鎮次, ユビキチンリガーゼ TRIM23 は PPAR の安定化を介して脂肪細胞分化を制御する,第89回日本内分泌学会学術総会,2016年4月21日,国立京都国際会館(京都府京都市)

渡部 昌, 高橋秀尚, 畠山鎮次, ユビキチンリガーゼ TRIM23 は PPAR の安定化を介して脂肪細胞分化を制御する,第93回日本生理学会大会,2016年3月24日,札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Watanabe M: The ubiquitin E3 ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR . Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on the Ubiquitin Family, April 21-25, 2015, Cold Spring Harbor, New York, USA

〔図書〕(計1件)

Watanabe M and Hatakeyama S: Ubiquitin-Conjugating Enzymes (E2s) Advances in Medicine and Biology. Volume 120, 2017, pp. 49-71, Nova Science Publishers

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 昌 (WATANABE, Masashi)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10632424

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()