

令和元年6月4日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14702

研究課題名（和文）分岐型ユビキチン鎖の定量検出系の構築と応用

研究課題名（英文）Construction of quantitative reporter system for branched ubiquitin chains

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） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチンのポリマーであるユビキチン鎖は連結タイプの差異により、各々特異的なシグナル分子として働きます。しかし、異なる連結タイプのユビキチン鎖が枝分かれした形態を有する「分岐型ユビキチン鎖（分岐鎖）」については十分に解析されていませんでした。私たちは出芽酵母および動物個体において分岐鎖を定量的に検出するレポーター系を構築し、さらに出芽酵母において制御因子の同定を行いました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン鎖は分岐によって複雑な高次構造を形成しうることが近年明らかにされてきましたが、分岐型ユビキチン鎖の定量は技術的に困難でした。本研究では分岐型ユビキチン鎖を出芽酵母および動物個体において定量するためのレポーター系の構築に成功したことから、分岐型ユビキチン鎖の形成・制御機構の有用な解析系となることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitin chains of different linkage types regulate diverse biological pathways. However, functions of branched ubiquitin chains had been largely unknown. We established reporter systems to quantify K48/K63 branched ubiquitin chains in yeast and in mice. Moreover, we screened and identified regulators of branched ubiquitin chains in yeast.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ユビキチン 翻訳後修飾 タンパク質 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン化は生体に必須の翻訳後修飾である。ユビキチンのポリマーであるユビキチン鎖は連結タイプの差異により、各々特異的なシグナル分子として働く。48番目のリジンで連結したユビキチン鎖 (K48鎖) は蛋白質分解、K63鎖はDNA損傷応答や炎症シグナル伝達を制御する。このように各々のユビキチン鎖は単一の連結タイプが連なって機能すると、一般に考えられている。これに対し、異なる連結タイプのユビキチン鎖が枝分かれした形態を有する「分岐型ユビキチン鎖 (分岐鎖)」については、ほとんど未解明であった。細胞内にどの程度普遍的に分岐鎖が存在するかは不明であり、また機能的な役割の有無に関しても見解が分かっている状況であった。私たちはこれまでに質量分析技術を用いたユビキチン鎖の定量測定を行ってきたことから (Ohtake, EMBO Rep 2015)、分岐鎖に関しても定量測定が必要と考えた。そこで細胞内での存在量が最も多く、かつ異なる機能を有する2種の連結タイプであるK48鎖とK63鎖に着目し、分岐鎖の定量法を考案した。分岐鎖定量に供する変異型ユビキチンを「分岐鎖検出用レポーター」として酵母や動物個体に導入することで、個体レベルで分岐鎖の機能を解析可能な定量系を構築することを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、酵母および動物個体で分岐鎖のレポーター系を構築し、ユビキチン鎖アーキテクチャの実態解明を目指す。まず、出芽酵母において内在性ユビキチン遺伝子を分岐鎖検出用ユビキチン遺伝子に置換した株を作成し、分岐鎖の定量、さらに酵母遺伝学を用いて分岐鎖形成に関与する因子の探索を行う。さらに、動物個体において、分岐型ユビキチン鎖の定量的な検出レポーター系を構築する。具体的には、分岐鎖検出用ユビキチン遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (分岐鎖レポーターマウス) を作出する。これにより、マウス個体において分岐鎖の臓器、組織特異的な存在量や、発生期などにおける時期特異的な変動を定量解析するための解析系を創出する。また試験管内反応系においても分岐鎖のレポーター系を構築することで詳細な機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 出芽酵母における分岐鎖レポーター系の構築

出芽酵母においてK48/K63分岐鎖を検出するため、内在性のユビキチン遺伝子をノックアウトし、R54A変異型ユビキチンを発現する酵母株 (R54A株) を作成した。作製した変異株の増殖に影響がないことをSpotアッセイにより確認した。R54A株の細胞破砕液を抗ユビキチン抗体で免疫沈降し、ユビキチン化タンパク質を質量分析による絶対定量に供した。

### (2) マウスにおける分岐鎖レポーター系の構築

分岐型ユビキチン鎖定量用の変異型ユビキチン遺伝子 (R54A) をCAGプロモーター下流に接続し、Creリコンビナーゼ依存的にloxP-CATカセットを除去することで発現誘導可能なトランスジーンを構築した。得られたトランスジーンをC57BL/6NおよびB6D2F1系統マウス受精卵の前核に顕微注入により導入し、偽妊娠雌マウス卵管へ移植、出産させることでトランスジェニックマウスを得た。得られたマウスはCATカセット除去のためCAG-Creマウスと交配した。当該マウスから臓器を摘出し、質量分析を用いて定量解析を行った。遺伝子組換え実験に際しては、研究機関における遺伝子組換え実験安全委員会の審査により、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令並びに所属研究所遺伝子組換え安全管理規則に適合することの承認を得た。

### (3) 試験管内反応系を用いた分岐鎖機能解析

分岐鎖の詳細な機能解析を行うため、ドナー用ユビキチン、アクセプター用ユビキチンを準備し、分岐鎖形成を定量的に解析する系を構築した。

## 4. 研究成果

### (1) 出芽酵母における分岐鎖レポーター系の構築

出芽酵母レポーター系を用いてユビキチン鎖の絶対定量を行った結果、出芽酵母においてもK48/K63分岐型ユビキチン鎖が存在すること、プロテアソーム阻害剤MG132依存的に増加することが明らかとなった。またR54A変異株の増殖に異常が見られないことから、分岐鎖レポーター系の構築に成功したと判断した。

次に、代表的なE2、E3酵素の変異株を作成し、分岐鎖形成の変動を検討した。その結果、K63鎖特異的なE2酵素であるUbc13がK48/K63鎖形成に関与していることが明らかとなった。一方、K48鎖特異性を有する複数のE3酵素についても検討したが、分岐鎖の変動が見られなか

ったことから、これら酵素は相補的に機能する可能性が考えられた。これらの結果は、Ubc13 依存的に形成される K63 鎖が出芽酵母において K48/K63 鎖形成の主要なソースであることを示唆している。また、K48/K63 分岐型ユビキチン鎖がプロテアソーム依存性タンパク質分解に関与することを考え合わせると、Ubc13 依存的に形成される K63 鎖が分解のイニシエーターとして機能する可能性が考えられるため、今後さらに検討を進める予定である。

## (2) マウスにおける分岐鎖レポーター系の構築

当該トランスジーン導入のため顕微注入・卵管移植を行い、B6D2F1 受精卵由来の 4 匹のトランスジーン陽性個体が得られ、CAG-Cre マウスとの交配により CAT カセットを除去した 4 ラインを得た。トランスジーン挿入部位のゲノム DNA 配列を PCR 増幅しシーケンス解析し、2 ラインについて挿入部位を特定した。厳密な生物学的解析に供するべく、得られたトランスジェニックマウスの C57BL/6N 系統マウスへの戻し交配を 4 代 (C57BL/6N としての系代数は 5) まで進めた。トランスジェニックマウスから臓器を摘出し、質量分析によるユビキチン鎖絶対定量に供した。その結果、たしかに R54A 変異体が発現していること、マウス臓器においても K48/K63 分岐型ユビキチン鎖が形成されていることを確認できた。以上から、マウスにおける分岐鎖レポーター系の構築に成功したと判断した。今後は分岐鎖形成の組織特異性や発生段階等の時期特異性などの個体レベルの解析に利用が期待される。

## (3) 試験管内反応系を用いた分岐鎖機能解析

C 末端に Halo タグを付加したアクセプター用ユビキチン、K48R/K63R 変異を導入したドナー用ユビキチンを精製し、試験管内反応に供することで、K48 または K63 連結したユビキチンダイマー、あるいは K48/K63 分岐型ユビキチントリマーを定量的に検出することに成功した。さらに関連する酵素をアッセイに供し、ある種の酵素において分岐鎖形成は一方方向性に進行することを明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Ohtake, F., Tsuchiya, H., Tanaka, K., and Saeki, Y. Methods to measure ubiquitin chain length and linkage. **Methods in Enzymology**, 618:105-133, 2019, doi: 10.1016/bs.mie.2018.12.019 (査読有り)
2. Ohtake, F., Tsuchiya, H., Saeki, Y., and Tanaka, K. K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. **PNAS** 115, E1401-E1408, 2018, doi: 10.1073/pnas.1716673115 (査読有り)
3. Ohtake F., Tsuchiya H. The emerging complexity of ubiquitin architecture. **J Biochem**, 161, 125-133, 2017, doi: 10.1093/jb/mvw088, (査読有り)
4. 大竹史明 「ユビキチン鎖と NF- $\kappa$ B 活性化」 **臨床免疫・アレルギー科** 68 (5), 569-575, 2017, <http://www.kahyo.com/item/M201711-685> (査読無し)
5. 大竹史明, 佐伯 泰, 田中啓二 「Current Topics: 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, 452-454, 2017, <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101608/index.html> (査読無し)
6. Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. The K48-K63 branched ubiquitin chain regulates NF- $\kappa$ B signaling. **Mol. Cell** 64, 251-266, 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.014 (査読有り)
7. 大竹史明, 佐伯泰, 田中啓二 「K48/K63 分岐型のユビキチン鎖は NF- $\kappa$ B シグナルを制御する」 **ライフサイエンス新着論文レビュー**, doi: 10.7875/first.author.2016.109, 2016 (査読無し)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Ohtake F., Saeki Y, Tanaka K. The ubiquitin ligases ITCH and UBR5 regulate proteasomal degradation through K48/K63 branched ubiquitin chains 第 41 回日本分子生物学会シンポジウム「ユビキチン研究の新潮流：ユビキチンコードを識る・操る」2018 年 (招待講演)
2. Ohtake F., Saeki Y, Tanaka K. Post-translational modification code of ubiquitin in signal transduction and protein degradation 第 91 回日本生化学会シンポジウム「ユビキチン様タンパク質修飾系の多様な機能：分解だけじゃない、真核生物だけじゃない」2018 年 (招待講演)
3. Ohtake F., Saeki Y, Tanaka K. The NEDD4 family ubiquitin ligase ITCH regulates proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. FASEB Conference 「Ubiquitin and cellular

regulation」2018年(ポスター発表)

4. 河野有紗、大竹史明、佐伯泰、田中啓二 出芽酵母におけるK48/K63分岐型ポリユビキチン鎖の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年(ポスター発表)
5. Ohtake F, Tanaka K. Role of the K48/K63 branched ubiquitin chains in signal transduction and proteasomal degradation. EMBO conference 「Ubiquitin and SUMO」2017年(招待講演)
6. 大竹史明、田中啓二 炎症応答を制御する新たなユビキチン・シグナル 第44回日本毒性学会シンポジウム「エピジェネティクス機構を考慮したトキシコゲノミクスの展開」2017年(招待講演)
7. 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年 京都(招待講演)
8. 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年(招待講演)
9. 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年(招待講演)
10. Ohtake F, Saeki Y, Tanaka K. Ubiquitin acetylation regulates polyubiquitin chain elongation. FASEB Conference 「Ubiquitin and cellular regulation」2016年(ポスター発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

該当なし。

取得状況(計0件)

該当なし。

〔その他〕  
ホームページ等  
蛋白質代謝研究室 HP  
<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 安彦行人

ローマ字氏名: YASUHIKO yukuto

所属研究機関名: 国立医薬品食品衛生研究所

部局名: 毒性部

職名: 主任研究官

研究者番号(8桁): 40370944

### (2)研究協力者

該当なし。