

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07261

研究課題名(和文) コムギ無細胞系によるヒト脱ユビキチン化酵素プロテインアレイの構築と基質特異性解析

研究課題名(英文) Establishment of an wheat cell-free based protein array of deubiquitinating enzyme and determination of specificity of polyubiquitin

研究代表者

高橋 宏隆 (Takahashi, Hirotaka)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：70432804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脱ユビキチン化酵素(DUB)はユビキチン鎖を切断することで、ユビキチン化によって起こる様々な生命現象を負に制御する重要な因子である。本研究では、ヒトの約100種類のDUBのほぼ全てを、コムギ無細胞系を用いて組換えタンパク質として合成し、活性の有無やユビキチン鎖の特異性の決定を目指した。タンパク質合成に成功した89種類のDUBについて、8種類の二量体ユビキチンを基質としたin vitro切断アッセイを行い、80種類のDUBの基質特異性を決定した。今回用いたDUBには、活性の有無や基質特異性が未報告のものも多数含まれており、ヒトの8割のDUBの基質特異性を明らかにした世界で初めての報告となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、siRNAやCRISPR/Cas9を用いたゲノムレベルでのスクリーニングから、DUBが様々な生命現象において重要な役割を担っていることが報告されている。しかし、ヒトゲノムには約100種類のDUBが存在するが、その半数以上は細胞内での機能が不明であり、DUBとしての機能を有するかも不明なものも少なくない。そのため、上記の逆遺伝学的手法で同定されたDUBの多くは、細胞内での機能が不明のままである。本研究で得られた80種類のDUBの活性およびユビキチン鎖特異性の解析結果は、機能不明なDUBについて、細胞内での機能や役割、またDUB活性の関与の予測における、重要な基盤情報として期待される。

研究成果の概要(英文)：Deubiquitinating enzymes (DUBs) remove ubiquitin molecules from ubiquitinated proteins and cleave the polyubiquitin chain, therefore negatively regulating numerous ubiquitin-dependent processes. In this study, we synthesized recombinant proteins of about 100 human DUBs using a wheat cell-free system, and aimed to clarify their ubiquitin chain specificity. As a result, we successfully synthesized 89 DUBs, and an in vitro cleavage assay using eight kinds of dimer ubiquitins as substrates revealed the chain specificity of 80 DUBs. Interestingly, the activity and the chain specificity of many of these DUBs have not been reported so far. Therefore, we reported the activities and linkage specificities of 80 human DUBs for the first time.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：脱ユビキチン化酵素 ポリユビキチン鎖 コムギ無細胞タンパク質合成系 タンパク質アレイ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾の一つであるユビキチン化は、修飾タンパク質であるユビキチンが標的タンパク質に結合し、そのユビキチン分子の7つのリジン残基 (K) のいずれか、もしくは開始メチオニン (M1) に他のユビキチン分子が重合することで、ポリユビキチン鎖を形成する。重合様式が異なったポリユビキチン鎖は、標的タンパク質の分解・シグナル伝達・DNA 修復など、個々に異なった機能を持つ。

脱ユビキチン化酵素 (DUB) はポリユビキチン鎖を分解する酵素で、細胞内におけるタンパク質分解の抑制やシグナル伝達の負の制御を担う重要な因子である。DUB はヒトでは 98 種類存在し、8 種類のポリユビキチン鎖を非特異的に切断する DUB も少なくないが、近年ではある特定のポリユビキチン鎖を特異的に分解する DUB が注目されている。例えば直鎖型や K63 型ポリユビキチン鎖は、炎症や免疫応答における NF- κ B の活性化シグナル伝達に必須であるが、CYLD や OTULIN などの DUB はこれらのポリユビキチン鎖を特異的に分解することで、NF- κ B の働きを負に制御するブレーキとしての役割を担っている。そのため、細胞内でのこれらの DUB の変異や欠損が様々な細胞傷害を引き起こすことが知られている。しかし、このようにポリユビキチン鎖特異性や細胞内での機能が明らかとなっている DUB は限られており、多くの DUB は未解析のままである。これらの主な原因として、生細胞を用いた解析では、細胞内で不安定なポリユビキチン鎖をどの DUB が切断しているかをモニタリングする実験系がなく、また多くの DUB は分子量が 100 kDa を超えるため、既存のタンパク質発現系によって全ての DUB を活性型の組換えタンパク質として合成し、生化学的解析を行うことが容易ではないことがある。

2. 研究の目的

本申請研究では、真核生物の多種多様なタンパク質の合成に実績のあるコムギ無細胞系を用いて、ヒトのほぼ全ての DUB を組換えタンパク質として合成し、活性やユビキチン鎖特異性を明らかにする。また特定のユビキチン鎖のみを切断する DUB が見出された場合には、細胞内における機能や役割を調べる。

3. 研究の方法

ヒトの DUB を、コムギ無細胞系を用いて組換えタンパク質として合成した。これらの DUB タンパク質全てについて、K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63、M1 の 8 種類の結合型の 2 量体ユビキチンをモデル基質として、*in vitro* 切断アッセイを行い、ユビキチン鎖特異性を決定した。

得られた結果について、各 DUB のユビキチン鎖の特異性とアミノ酸配列との比較を行い、ユビキチン鎖特異性を決定する領域の決定を試みた。

4. 研究成果

ヒトの DUB は酵素活性中心の構造から USP、OTU、UCH、Josephin、MINDY、ZUFSP、JAMM の 7 グループに分かれる。本研究では MINDY および ZUFSP を除く 5 グループの DUB 合計 89 種類についてコムギ発現コンストラクトを作製し、コムギ無細胞タンパク質合成を行った結果、88 種について組換えタンパク質の合成に成功した。

これらの DUB タンパク質を用いて、8 種類の二量体ユビキチンを用いた切断アッセイから、80 種類について活性を検出することができ、それらのユビキチン鎖特異性を明らかにした (図および表)。

USP ファミリーの DUB の多くはユビキチン鎖特異性が低く、ほぼ全てのユビキチン鎖を切断することが報告されている。本研究で活性が検出された 52 種類の USP は、K63 および M1 鎖に高い特異性を示す CYLD を除き、多くが広範な二量体ユビキチンを切断した。OTU ファミリーの DUB は USP とは異なり、特定のユビキチン鎖に高い特異性を示す DUB が多く含まれることが知られているが、本研究で活性が得られた 16 種類の DUB は、過去の報告とほぼ同様の特異性を示した。一方、

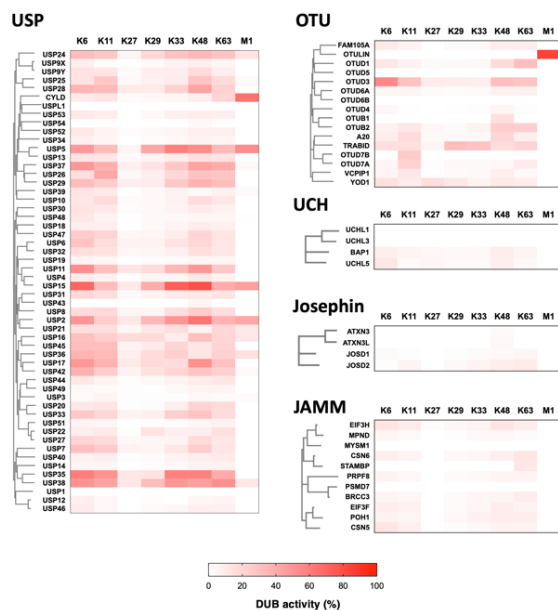


図 二量体ユビキチンを用いた DUB のユビキチン鎖特異性解析結果。Takahashi et al. 2020, Biomedicines 掲載図を一部改変。

UCH ファミリー4種類のうち、UCHL1 および UCHL3 は活性が認められなかった。また Josephin ファミリーや JAMM ファミリーについても、その多くで活性が検出された。Josephin ファミリーの ATXN3 および ATXN3L は K48 鎖のみを切断したものの、切断活性は弱かった。

また、今回の DUB の中に、特定のユビキチン鎖にのみ特異性を示す新規な DUB を見出すことはできなかった。一方で、多くの DUB が広範なユビキチン鎖特異性を示したが、ペプチド結合で形成される M1 鎖を切断した DUB は USP ファミリーの9種類と、M1 鎖特異的 DUB として報告されている OTU ファミリーの OTULIN のみで、その他の DUB は M1 鎖を切断できなかった。特に USP ファミリーにおいて、USP11 や USP37 のようにイソペプチド結合から成る7種類の二量体ユビキチンに高い切断活性を示すものの、M1 鎖に対する切断活性が認められない DUB が多く存在した。現在、USP ファミリーにおける M1 鎖切断に関わる特異的なアミノ酸配列や立体構造の解明を目指し、更なる研究を進めている。

これまでの DUB の生化学的解析では 40 種類程度の DUB の解析例が最多であり、本研究で解析した 80 種類は、世界で最も多くの DUB の解析例である。また、これらの中には、これまで活性やユビキチン鎖特異性が報告されていない DUB が数多く含まれており、DUB 研究に関わる多くの研究者に有益な情報を提供することが多いに期待される。

表 本研究で解析対象とした DUB の種類

ファミリー (ヒトゲノム中の数)	発現 コンストラクト	合成に成功 したDUB	活性型 DUB	不活性型 DUB
USP (56)	54	54	52	2
OTU (17)	16	16	14	2
UCH (4)	4	4	2	2
Josephin (4)	4	4	4	0
JAMM/MPN (12)	11	10	8	2
Total (93)	89	88	80	8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takahashi Hirotaka, Yamanaka Satoshi, Kuwada Shohei, Higaki Kana, Kido Kohki, Sato Yusuke, Fukai Shuya, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 8
2. 論文標題 A Human DUB Protein Array for Clarification of Linkage Specificity of Polyubiquitin Chain and Application to Evaluation of Its Inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 152 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8060152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 高橋 宏隆、山中 聡士、徳永 文稔、澤崎 達也	4. 巻 92
2. 論文標題 ヒト脱ユビキチン化酵素タンパク質アレイの開発とその応用例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 64 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920064	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 高橋 宏隆、山中 聡士	4. 巻 56
2. 論文標題 コムギ無細胞合成系による脱ユビキチン化酵素アレイの作製とDUB阻害剤開発への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 51 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamanaka Satoshi, Sato Yusuke, Oikawa Daisuke, Goto Eiji, Fukai Shuya, Tokunaga Fuminori, Takahashi Hirotaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 524
2. 論文標題 Subquinocin, a small molecule inhibitor of CYLD and USP-family deubiquitinating enzymes, promotes NF- B signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uematsu Atsushi, Kido Kohki, Takahashi Hirotaka, Takahashi Chikako, Yanagihara Yuta, Saeki Noritaka, Yoshida Shuhei, Maekawa Masashi, Honda Mamoru, Kai Tsutomu, Shimizu Kouhei, Higashiyama Shigeki, Imai Yuuki, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 294
2. 論文標題 The E3 ubiquitin ligase MIB2 enhances inflammation by degrading the deubiquitinating enzyme CYLD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14135 ~ 14148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yonezawa Taishi, Takahashi Hirotaka, Shikata Shiori, Sawasaki Tatsuya, Kitamura Toshio, Goyama Susumu	4. 巻 505
2. 論文標題 The ubiquitin ligase RNF38 promotes RUNX1 ubiquitination and enhances RUNX1-mediated suppression of erythroid transcription program	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 905 ~ 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uematsu Atsushi, Kido Kohki, Manabe Erika, Takeda Hiroyuki, Takahashi Hirotaka, Hayashi Minoru, Imai Yuuki, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 495
2. 論文標題 DANFIN functions as an inhibitor of transcription factor NF- B and potentiates the antitumor effect of bortezomib in multiple myeloma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2289 ~ 2295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yonezawa Taishi, Takahashi Hirotaka, Shikata Shiori, Liu Xiaoxiao, Tamura Moe, Asada Shuhei, Fukushima Tsuyoshi, Fukuyama Tomofusa, Tanaka Yosuke, Sawasaki Tatsuya, Kitamura Toshio, Goyama Susumu	4. 巻 292
2. 論文標題 The ubiquitin ligase STUB1 regulates stability and activity of RUNX1 and RUNX1?RUNX1T1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12528 ~ 12541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.785675	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高橋 宏隆, 及川 大輔, 長尾 和哉, 岩崎 誠, 今井 祐記, 徳永 文稔, 澤崎 達也
2. 発表標題 直鎖状ポリユビキチン鎖結合タンパク質ZnUBPファミリーのNF- κ B抑制機構の解明
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 林 徳田, 竹田 浩之, 入江 崇, 澤崎 達也
2. 発表標題 ウイルスRNA受容体MDA5に結合し、IFN産生シグナルを抑制する脱ユビキチン化酵素の同定と機能解析。
3. 学会等名 第14回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi H, Kuwada S, Yamanaka S, Goto E, Tokunaga F, Sawasaki T
2. 発表標題 Establishment of a protein array system consisted of 90 human recombinant deubiquitinating enzymes (DUBs) proteins for assessment of linkage specificity of each DUB and evaluation of the selectivity of DUB inhibitors.
3. 学会等名 The ubiquitin system: Biology, mechanisms and roles in disease. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 山中 聡士, 後藤 栄治, 及川 大輔, 佐藤 裕介, 深井 周也, 徳永 文稔, 澤崎 達也
2. 発表標題 コムギ無細胞タンパク質合成系を基盤としたヒト脱ユビキチン化酵素タンパク質アレイの作製と応用。
3. 学会等名 第24回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 山中 聡士, 栗田 翔平, 後藤 栄治, 今井 賢一郎, 富井 健太郎, 佐藤 裕介, 深井 周也, 徳永 文稔, 澤崎 達也
2. 発表標題 コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた脱ユビキチン化酵素タンパク質アレイの作製と応用
3. 学会等名 第二回ユビキチン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 山中 聡士, 栗田 翔平, 後藤 栄治, 今井 賢一郎, 富井 健太郎, 佐藤 裕介, 深井 周也, 徳永 文稔, 澤崎 達也
2. 発表標題 コムギ無細胞系を用いて作製したヒト脱ユビキチン化酵素(DUB)プロテインアレイによるポリユビキチン鎖基質特異性解析とDUB阻害剤の選択性評価
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi H, Kuwada S, Yamanaka S, Goto E, Tokunaga F, Sawasaki T
2. 発表標題 Establishment of a protein array system consisted of 85 human recombinant deubiquitinating enzymes (DUBs) proteins for assessment of linkage specificity and evaluation of the selectivity of DUB inhibitors.
3. 学会等名 Keystone Symposia, Ubiquitin Signaling (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanaka S, Tokunaga F, Sato Y, Fukai S, Takahashi H, Sawasaki T
2. 発表標題 Development of CYLD inhibitor using wheat cell-free based drug screening system.
3. 学会等名 Keystone Symposia, Ubiquitin Signaling (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 宏隆
2. 発表標題 ヒト脱ユビキチン化酵素タンパク質アレイの作製と生化学的解析
3. 学会等名 第一回 ユビキチン研究会・一般シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑田 翔平、山中 聡士、岡田 健吾、後藤 英治、徳永 文稔、高橋 宏隆、澤崎 達也
2. 発表標題 85種類のヒト脱ユビキチン化酵素 (DUB) の完全長組換えタンパク質を用いたポリユビキチン鎖特異性決定とDUB阻害剤評価系の構築
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	富井 健太郎 (Tomii Kentaro) (40357570)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・人工知能研究センター・研究チーム長 (82626)	
連携研究者	今井 賢一郎 (Imai Kenichiro) (80442573)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (82626)	