

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05691

研究課題名(和文) タンパク質翻訳後修飾体のライブイメージングと選択的単離を実現する新規解析法の開発

研究課題名(英文) Live imaging and selective isolation of protein post-translational modification with bimolecular fluorescence complementation

研究代表者

松浦 顕教 (Matsuura, Kenkyo)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：50836096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の翻訳後修飾はアミノ酸配列の一次情報に複雑性を加え、機能調節において不可欠な役割を担っている。近年の質量分析技術の発達により、細胞内全タンパク質の翻訳後修飾の網羅的解析が可能となっているが、その後の個々のタンパク質修飾の高精度かつ簡便な検証に十分な手法ははまだ開発されていない。

本研究では、新規翻訳後修飾解析技術を開発することを目的とした。本技術により、生きたままの細胞における翻訳後修飾のイメージングに加え、タンパク質修飾体のみを特異的に単離することが可能になり、質量分析技術との組み合わせで翻訳後修飾の検証や相互作用因子の同定が容易になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命現象を司るタンパク質の機能は、ゲノムにコードされているアミノ酸配列によって完全に規定されるわけではなく、細胞内外の刺激に応じて多様な翻訳後修飾により巧妙に制御されている。これら翻訳後修飾の制御機構は、p53に代表されるがん抑制因子やMycなどの発がん因子の活性調節に密接に関わっている。細胞内全タンパク質の翻訳後修飾の網羅的解析が可能となっている一方で、その情報を基に個々のタンパク質修飾の機能解析のための簡便かつ高精度な検証が必要である。本研究における手法はそのような解析を可能にし、幅広い翻訳後修飾に応用可能であり、高い発展性を有する。

研究成果の概要(英文)：Protein modification confers additional regulatory layer of function for the target protein, and it plays essential role. Recently, because of technical advance in mass-spectrometric analysis, whole cellular protein analysis become feasible for researchers. However, individual analysis of the modified proteins and validation of the modification is still technical barrier for researchers.

In this study, we aimed to develop novel technology to analyze protein modification. This is for both of live cell imaging and selective isolation of proteins with specific modification. With mass-spectrometry analysis, it enables validation of the protein modification and identification of protein interaction networks.

研究分野：生化学 細胞生物学 腫瘍生物学

キーワード：BiFC GFP nanobody 複合体精製 タンパク質翻訳後修飾 ユビキチン

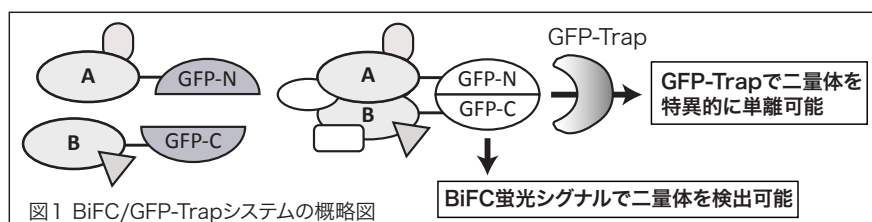
1. 研究開始当初の背景

生命現象を司るタンパク質の機能は、ゲノムにコードされているアミノ酸配列によって完全に規定されるわけではなく、細胞内外の刺激に応じてユビキチン化、SUMO化、リン酸化、アセチル化、メチル化などの多様な翻訳後修飾により巧妙に制御されている。これら翻訳後修飾の制御機構は、p53に代表されるがん抑制因子やMycなどの発がん因子の活性調節に密接に関わっている。近年の質量分析技術の発達により、細胞内全タンパク質の翻訳後修飾の網羅的解析が可能となり、膨大な翻訳後修飾の情報が得られ始めている。その一方で、その情報を基に個々のタンパク質修飾の検証作業が必要になるが、膨大な情報量に対応した簡便な解析系が乏しいのが現状である。

従来のタンパク質修飾解析方法として信頼性が高く、頻用されているのはタンパク質修飾特異的抗体であるが、その作製には数ヶ月の時間がかかり、コスト面でも問題があるうえに、十分な力価を有する抗体が得られる保証は必ずしもない。また、抗体によるタンパク質修飾の検出には、細胞溶解液の調製や細胞の固定化のステップが必要で、生細胞内のタンパク質修飾を捉えることができず、ブレイクスルーとなる解析系の開発が待ち望まれている。

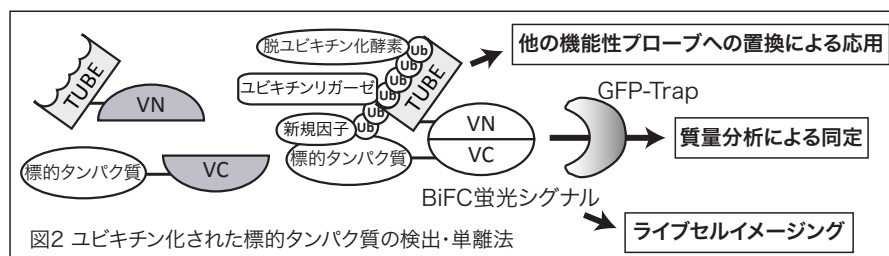
2. 研究の目的

以上の背景の中、本研究では、網羅的解析から得られるタンパク質翻訳後修飾の情報を簡便・高精度に生細胞で検出・検証でき、その修飾体を単離・解析できる方法の開発に取り組むことを目的とする。ここでは主に、細胞内タンパク質の量的・質的制御に重要な役割を担っている「ユビキチン修飾」に焦点をあてる。



私たちはこれまでの研究で、タンパク質二量体蛍光検出法のBiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)とGFP高親和性nanobodyのGFP-Trapを組み合わせることによって、会合したタンパク質二量体のみをワンステップで選択的に精製する方法、BiFC/GFP-Trapシステムを開発した(図1) (Robeson et al., EMBO J., 37: e97072, 2018)。BiFCは、GFPやVenusなどの蛍光タンパク質を分割し、両分割体が近接した場合のみ蛍光タンパク質構造が再構築されることを利用して、タンパク質間相互作用を検出する方法である。BiFC/GFP-Trapシステムは、生細胞においてタンパク質二量体のみをBiFCの蛍光シグナルでイメージングするだけでなく、GFP-Trapにより目的タンパク質二量体とその相互作用因子を選択的に単離できる画期的な方法である。この方法では、BiFCに用いる各蛍光タンパク質分割体に解析目的のタンパク質をそれぞれ結合させた発現プラスミドを構築するだけでよく、時間もコストもかからない。

本研究では、BiFCにおいて相互作用を検出する2つのタンパク質を、ユビキチン鎖結合プローブと標的タンパク質に置き換えることで、特定のタンパク質のユビキチン化反応をリアルタイムでイメージングでき、さらに修飾部位や相互作用因子を容易に同定できる手法を開発する(図2)。これにより、目的タンパク質のユビキチン化が、いつ・どこで・どのようなタイミングで生じるのか、簡便に解析可能になる。さらに、本研究で用いるユビキチン鎖結合プローブのTUBEを他の機能性プローブに置き換えることによって、SUMO化、リン酸化、アセチル化、メチル化等の他の修飾にも応用可能であり、発展性は高く、波及効果は大きい。

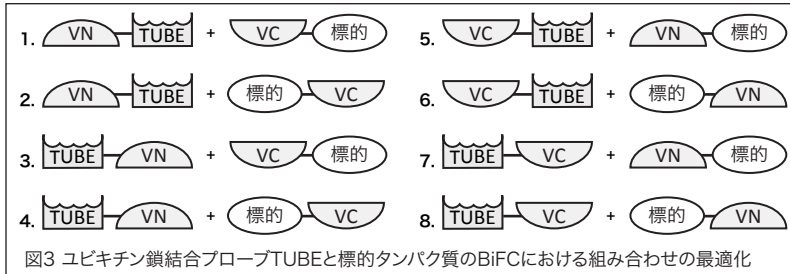


*1 GFPよりも輝度が高く、BiFCに頻用されるVenusを用い、N末端側(VN)とC末端側(VC)に分ける

*2 TUBEはユビキチン結合ドメインを4つ連結したユビキチン鎖結合プローブである

3. 研究の方法

ライブイメージング系をベースにして、BiFCにおけるユビキチン鎖結合プローブ TUBE とモデル標的タンパク質の各蛍光タンパク質分割体との組み合わせを検討し、最適な条件を決定する。BiFCにおいては、蛍光タンパク質 Venus の分割体 (VN または VC) を付加した 2 種類のタンパク質が近接時に蛍光タンパク質構造を効率よく再構築する必要があるため、VN および VC を TUBE と標的タンパク質のどちらに付加させるか、また各タンパク質の N 末端側と C 末端側のどちらが適当か検討する (図 3)。



標的	細胞への刺激・処理など	ユビキチン化
p53	脱ユビキチン化酵素(USP10など)阻害剤	増加
	ユビキチンリガーゼ(MDM2)阻害剤 DNA損傷剤	減少
IκBα	TNFαまたはLPS処理	増加
	上流のIKKキナーゼ阻害剤	減少

表1 モデル標的タンパク質のユビキチン化を増減させる刺激・処理

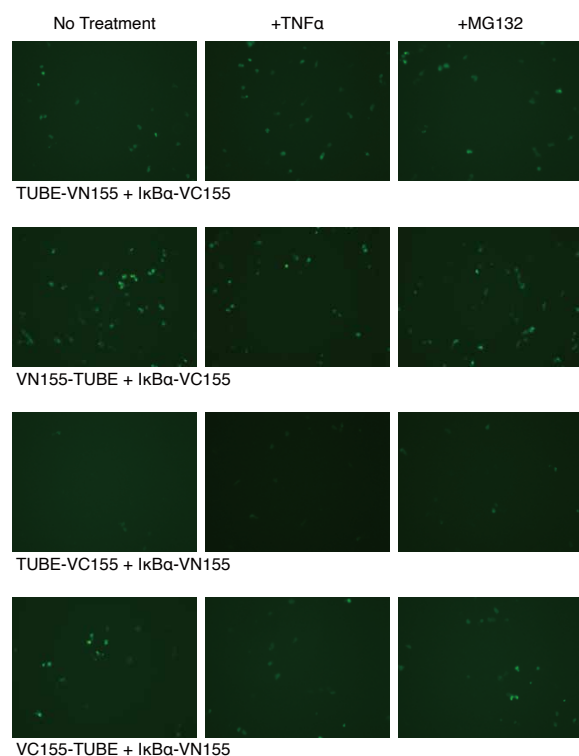
モデル標的タンパク質として、ユビキチン化調節機構がよく知られている p53 と IκBα を用い、表 1 に示した刺激・処理後に BiFC による蛍光量や細胞内局在の変化をライブセルイメージングで観察し、既知の報告と一致するか確認するとともに、図 3 に示した 8 パターンの組み合わせから最も感度良く検出できるものを選び出す。

4. 研究成果

本研究では、BiFC に頻用されている Venus を用い、N 末端側 (VN) と C 末端側 (VC) に分割し、ユビキチン結合プローブの TUBE と標的タンパク質との相互作用を BiFC シグナルとしてユビキチン化を検出し、そしてユビキチン化修飾体を GFP-Trap によって単離・精製することを試みた。ユビキチン化のモデル標的タンパク質として、IκBα と p53 を用いた。BiFC を効率よく生じる組み合わせを検討するため、VN、VC を TUBE またはモデル標的タンパク質 (IκBα または p53) の N 末端側または C 末端側それぞれに付加した場合の組み合わせを試した。

IκBα の場合、タグの C 末端側への付加は IκBα の機能に影響しないことがわかっていたため、N 末端側にタグをつけたコンストラクトは用いず、計 4 パターンの組み合わせを検討した。大腸がん由来細胞の HCT116 にトランスフェクションして蛍光シグナルを蛍光顕微鏡下で観察した。一方、IκBα のユビキチン化増加刺激として TNFα もしくはプロテアソーム阻害剤の MG132 で刺激したところ、蛍光シグナルを示す細胞の割合が増加する組み合わせを見出した (図 4)。

p53 の場合、VN または VC のタグとの計 8 パターンの全てを検討した。そのうち、p53 の C 末端側にタグを付加した場合には BiFC の蛍光シグナルはほとんど観察されず、p53 の C 末端側へのタグ付けは BiFC には不向きであることが分かった。一方で、p53 の N 末端側へタグを付加した場合には BiFC の蛍光シグナルは観察され、これらの組み合わせの中で、p53 のユビキチン化を行うユビキチンリガーゼの阻害剤により、BiFC の蛍光シグナルを示す細胞の割合が減少する組み合わせを見出した (データ掲載は省略)。



上記の条件において細胞溶解液を調製し、GFP-Trap によって再構成された BiFC ペア、すなわちユビキチン化が生じたモデル標的タンパク質の精製を試みた。ウエスタンブロットによる解析の結果、IkBa のユビキチン化体を示すラダー状のシグナルを検出することに成功した(図 5)。一方で、ユビキチン化を受けていない非修飾体を示すバンドも同時に検出された。

本技術によってユビキチン化体のみを精製を可能にすることが目的であるため、非修飾体が検出されることは克服すべき課題である。また、これらの実験で用いた一時的トランスフェクション法では、細胞間の発現量のばらつきは避けられず、蛍光シグナルの強弱がモデル標的タンパク質のユビキチン化を評価できているか、今後検証する必要があると考えている。

本研究成果では、開発した解析システムが概ね想定通りに機能することが分かった。今後は、他の標的タンパク質での検討、さらにはユビキチン化以外の翻訳後修飾への適用を通し、本システムを用いて生物学的課題の解決に繋がる研究に展開することを考えている。

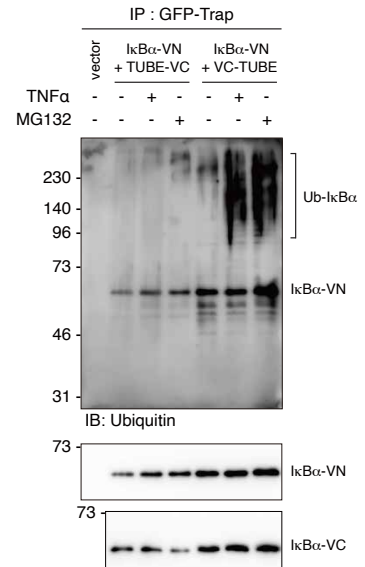


図5 BiFC・GFP-Trapシステムを用いた、IkBaユビキチン化体のウエスタンブロット検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松浦 顕教	4. 巻 273
2. 論文標題 タンパク質翻訳後修飾とがん幹細胞制御 ヒストンアシル化による遺伝子発現制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 430-435
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 Kei Kozawa, Miho Sekai, Kenji Ohba, Shoko Ito, Hiroaki Sako, Takeshi Maruyama, Mai Kakeno, Takanobu Shirai, Keisuke Kuromiya, Tomoko Kamasaki, Koki Kohashi, Shinya Tanaka, Susumu Ishikawa, Nanami Sato, Shota Asano, Hironori Suzuki, Nobuyuki Tanimura, ... Takahiro Ito, Kenkyo Matsuura, ... Yasuyuki Fujita	4. 巻 31
2. 論文標題 The CD44/COL17A1 pathway promotes the formation of multilayered, transformed epithelia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3086 ~ 3097.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.04.078	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 顕教
2. 発表標題 Regulation of Programmed Cell Death by Protein Ubiquitylation
3. 学会等名 RSセミナー 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 医生物学研究所 がん・幹細胞シグナル分野
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/laboratory/lab41/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------