

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22408

研究課題名（和文）「ユビキチンコード」解明へ向けたポリユビキチン化基質の網羅的同定

研究課題名（英文）Comprehensive identification of polyubiquitinated substrates for elucidation of the "ubiquitin code"

研究代表者

渡部 昌 (watanabe, masashi)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：10632424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチンによるタンパク質の可逆的修飾は、様々な生命現象を支える重要な翻訳後修飾の一つであり、特に近年、自身の分子内に7個存在するリジン残基とアミノ末端のメチオニンを介した多彩なポリユビキチン鎖と、その機能との関係性の解明に焦点があたっている。本研究では、ポリユビキチン鎖を効率よく抽出するプローブを複数開発し、そのポリユビキチン鎖特異性の検証を行った。その結果、バリエーションに富んだ特異性を保持する複数のプローブを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ポリユビキチン鎖を効率よく抽出するプローブの開発を行った。この技術をさらに発展させることで、個々のポリユビキチン鎖の効率的な抽出が可能となり、さらに個々のユビキチン付加酵素（ユビキチンリガーゼ）がどの基質に対してどのポリユビキチン鎖を付加しているのかという情報を先入観なく網羅的に同定することが可能となるものと思われる。多彩なポリユビキチン鎖を介した未解明の制御機構の発見に結びつくことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Reversible modification of proteins by ubiquitin is one of the important post-translational modifications that support various life phenomena. In recent years, it has been focused on elucidating the relationship between the diverse polyubiquitin chain and its function via the seven lysine residues and amino-terminal methionine in ubiquitin itself. In this study, we developed several probes that efficiently capture polyubiquitin chains and verified their chain specificity. As a result, we obtained several probes that retain various specificities.

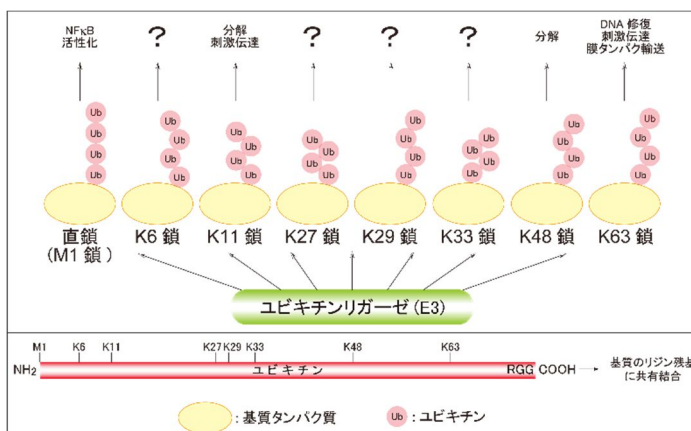
研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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、様々な生命現象を支える重要な翻訳後修飾の一つである。ユビキチンは、自身の分子内に7個存在するリジン残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63)およびアミノ末端のメチオニン(M1)を介して多彩なポリユビキチン鎖を形成することができ、鎖の種類によって標的タンパク質に異なる結果をもたらす(右図参照)。多彩なユビキチン修飾と機能との関係性を、ヒストンの修飾と機能の関係を表現した「ヒストンコード仮説」になぞらえて「ユビキチンコード」とも呼称されている。ユビキチン修飾系はE1(活性化酵素)/E2(結合酵素)/E3(ユビキチンリガーゼ)の3種の酵素群から構成され、E3が基質の認識を司ると同時に、ポリユビキチン鎖の種類の決定に重要な役割を果たす。したがって鎖の機能を解明するためには、「どのE3が」、「どの基質に」、「どのポリユビキチン鎖を付加」するのかを明らかにする必要がある。このうちE3の基質同定に関して我々は新規手法の検討を先行研究で行っており、効率よく同定することに成功しているものの、様々な問題によりこれまで体系的・網羅的な研究は未だ行われていない。その問題点の大きな一つが、ポリユビキチン鎖を効率よく抽出する技術、特に各ポリユビキチン鎖を特異的に抽出する技術であった。



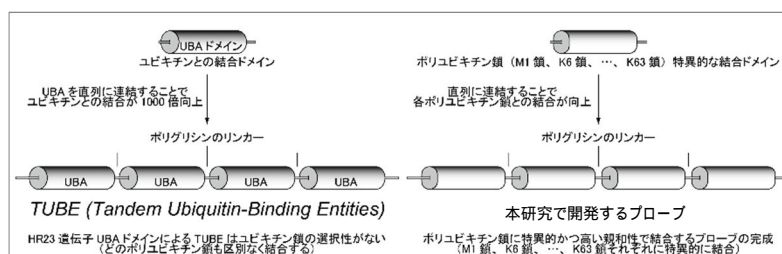
ユビキチン修飾系はE1(活性化酵素)/E2(結合酵素)/E3(ユビキチンリガーゼ)の3種の酵素群から構成され、E3が基質の認識を司ると同時に、ポリユビキチン鎖の種類の決定に重要な役割を果たす。したがって鎖の機能を解明するためには、「どのE3が」、「どの基質に」、「どのポリユビキチン鎖を付加」するのかを明らかにする必要がある。このうちE3の基質同定に関して我々は新規手法の検討を先行研究で行っており、効率よく同定することに成功しているものの、様々な問題によりこれまで体系的・網羅的な研究は未だ行われていない。その問題点の大きな一つが、ポリユビキチン鎖を効率よく抽出する技術、特に各ポリユビキチン鎖を特異的に抽出する技術であった。

2. 研究の目的

本研究では、ポリユビキチン鎖を効率よく抽出する技術の開発を前進させることで、E3・基質・ポリユビキチン鎖の種類という3者の関係解明への道を開くことを目指した。具体的には、それぞれのポリユビキチン鎖を効率よく捕獲するプローブを作製し、そのバリエーションを増やすことである。

3. 研究の方法

2009年に、どのポリユビキチン鎖に対しても非特異的かつ高い親和性で結合することができる人工タンパク質TUBE(Tandem Ubiquitin-Binding Entities)の開発が報告された[EMBO Rep 10:1250(2009)]。その実態は



RAD23遺伝子のユビキチン結合UBAドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結したものであり、単量体に比べておよそ1000倍結合力が上昇している。本研究ではこの手法に倣い、各ポリユビキチン鎖に特異的に結合することのできるドメインを直列に連結することでプローブを作製した(上図参照)。大腸菌やバキュロウイルス・昆虫細胞(Sf-9)系を利用してこのプローブタンパク質を作製し、各鎖との結合特異性をプルダウン法により検証を行った。

4. 研究成果

(1)M1ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲するドメインを用いた新規プローブの作製：M1鎖を特異的に認識するヒトNEMO遺伝子のUBANドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質を作製することができたため、各鎖との結合特異性をテトラユビキチン鎖(M1、K6、K11、K29、K33、K48、K63鎖)を用いたプルダウン法によって検証を行ったところ、M1鎖特異的な結合を認めた。

(2)M1ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲するドメインを用いた新規プローブの作製：M1鎖を特異的に認識するヒトH01L1L遺伝子のNZFドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質を作製することができたため、各鎖との結合特異性をテトラユビキチン鎖(M1、K6、K11、K29、K33、K48、K63鎖)を用いたプルダウン法によって検証を行ったが、M1鎖特異的な結合が消失し、K63鎖と弱く結合するという結果となった。

(3)K11 ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲するドメインを用いた新規プローブの作製： K11 鎖を特異的に認識するヒト OTUD7 遺伝子の OTU ドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質の作製を試みたものの、大腸菌内における発現が微量であったため、バキュロウイルス・昆虫細胞(Sf-9)系を利用してこのプローブタンパク質の作製を試みたが、結果として十分な量を発現させることができなかった。

(4)K6 ポリユビキチン鎖および K11 ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲するドメインを用いた新規プローブの作製： K6 鎖および K11 鎖を特異的に認識するヒト OTUD3 遺伝子の OTU ドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質を作製することができたため、各鎖との結合特異性をテトラユビキチン鎖(M1, K6, K11, K29, K33, K48, K63 鎖)を用いたプルダウン法によって検証を行ったところ、予想に反し、単量体のドメインが認識する、K6 鎖および K11 鎖との結合を認めず、K63 鎖との強く特異的な結合を認めた。

(5)K29/K33 ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲するドメインを用いた新規プローブの作製： K29/K33 鎖を特異的に認識するヒト TRABID 遺伝子の NZF1 ドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質を作製することができたため、各鎖との結合特異性をテトラユビキチン鎖(M1, K6, K11, K29, K33, K48, K63 鎖)を用いたプルダウン法によって検証を行った。このプローブは、期待していた K29/K33 鎖への特異性を消失していたが、どの鎖に対しても非常に強力なポリユビキチン鎖結合活性を持っていた。

(6)K63 ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲する新規プローブの作製： 前項とは別種の K63 鎖を特異的に認識するヒト AMSH 遺伝子の JAMM ドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質を作製することができたため、各鎖との結合特異性をテトラユビキチン鎖(M1, K6, K11, K29, K33, K48, K63 鎖)を用いたプルダウン法によって検証を行ったところ、弱いながらも K63 鎖特異的な結合を認めた。

(7)K63 ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲するドメインを用いた新規プローブの作製： K63 鎖を特異的に認識するヒト TAB2 遺伝子の NZF ドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質を作製することができたため、各鎖との結合特異性をテトラユビキチン鎖(M1, K6, K11, K29, K33, K48, K63 鎖)を用いたプルダウン法によって検証を行ったところ、K63 鎖との強い結合を認めたものの、予想に反し K48 鎖との結合、および K6 鎖との弱い結合を認めた。

(8)K63 ポリユビキチン鎖を特異的に捕獲するドメインを用いた新規プローブの作製： K63 鎖を特異的に認識するヒト RAP80 遺伝子の UIM ドメインを直列に4つ、柔軟性の高いポリグリシンのリンカーで連結した。大腸菌を利用してこのプローブタンパク質を作製することができたため、各鎖との結合特異性をテトラユビキチン鎖(M1, K6, K11, K29, K33, K48, K63 鎖)を用いたプルダウン法によって検証を行った。単量体のドメインが認識する、K63 鎖との強い結合を認めたものの、予想に反し K48 鎖との結合、および K6 鎖との弱い結合を認めた。

以上の結果を総括すると、個々のユビキチン鎖特異的な結合能を持つドメインは、TUBE 化を行うと、いくつかのドメインに関しては鎖特異性を維持するが、多くは元の鎖特異性とは異なる鎖特異性へと変化することが明らかになり、特に K63 鎖への結合能を獲得するものが多かった。また、TAB2 遺伝子の NZF ドメイン、RAP80 遺伝子の UIM ドメインを用いると、双方は元々 K63 鎖への結合特異性を持つドメインであるが、予想に反し K48 鎖との結合、および K6 鎖との弱い結合をも獲得していた。双方のドメインは別種のファミリーに属するドメインであるが、ポリユビキチン鎖認識の規則性をうかがわせる結果となった。

また一方で、TRABID 遺伝子の NZF1 ドメインを用いたプローブでは、期待していた K29/K33 鎖への特異性を消失していたものの、どの鎖に対しても非常に強力なポリユビキチン鎖結合活性を獲得していた。現在では鎖選択性を持たない TUBE として RAD23 遺伝子の UBA ドメインを用いたものが主流であるが、TRABIDNZF1 ドメイン(33 アミノ酸)は RAD23UBA ドメイン(56 アミノ酸)よりもサイズが小さいため、有用な代替物となるものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Masashi, Saeki Yasushi, Takahashi Hidehisa, Ohtake Fumiaki, Yoshida Yukiko, Kasuga Yusuke, Kondo Takeshi, Yaguchi Hiroaki, Suzuki Masanobu, Ishida Hiroki, Tanaka Keiji, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 3
2. 論文標題 A substrate-trapping strategy to find E3 ubiquitin ligase substrates identifies Parkin and TRIM28 targets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01328-y	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 Suzuki Masanobu, Suzuki Takayoshi, Watanabe Masashi, Hatakeyama Shigetsugu, Kimura Shogo, Nakazono Akira, Honma Aya, Nakamaru Yuji, Vreugde Sarah, Homma Akihiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Role of intracellular zinc in molecular and cellular function in allergic inflammatory diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 190 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.09.007	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 該当する

1. 著者名 Takahashi H, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Chen K, He Y, Zhang Y, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Washburn MP, Saraf A, Florens L, Sato S, TomomoriSato C, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S	4. 巻 11
2. 論文標題 The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14849-1	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部 昌
2. 発表標題 ユビキチン様修飾分子UFM1によるロイコトリエン生合成の制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部 昌
2. 発表標題 自然免疫シグナルに関わるユピキチンリガーゼ群の網羅的な基質同定と解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019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

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