

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21570213

研究課題名（和文）

メンブレントラフィックのユビキチンによる調節

研究課題名（英文）

Regulation of membrane traffic by ubiquitination

研究代表者

市村 徹 (ICHIMURA TOHRU)

防衛大学校・応用科学群・教授

研究者番号：50213012

研究成果の概要（和文）：

タンパク質のユビキチン化 (Ub 化) は、生命科学のさまざまな領域で研究されている。我々は、LC を微流速化させることで、試料中に極微量しか含まれないタンパク質を正確に同定することができる LC-MS/MS システムを開発した。また、細胞刺激に応じて形成されるシグナル伝達複合体などのタンパク質複合体を、本来の機能を損なうことなく細胞や組織から分離するための多段階精製用アフィニティータグを開発し、ウイルスからヒトに至るさまざまな複合体の機能解析に適用してきた。本研究では、Ub 分子内に His タグを組み込んだ改変 Ub 分子を作成し、上記 LC-MS/MS システムと組み合わせることで、基質タンパク質の Ub 修飾部位を効率よく同定するための手法の開発を試みた。PCR 法を用いて His タグを Ub の C 末端近傍に導入した様々な改変分子を作成した。これらを用いて、200 を超すタンパク質の Ub 化部位の同定に成功した。本法は、Ub 化反応の解析に有効な手法になるものと推察される。また、ユビキチン E3 リガーゼの一つである TRIM32 の細胞内トラフィックを制御する機構として、cAMP 依存性タンパク質キナーゼ A (PKA) によるリン酸化と、これに依存する 14-3-3 タンパク質の相互作用を見出した。この成果は、TRIM ファミリーの機能調節に関して重要な知見を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：

The relevance of the ubiquitin (Ub)-proteasome system is widely accepted in a variety of cell system. We previously reported a MS-based proteomic technology involving multi-step immunoaffinity purification to characterize signaling complexes in a large scale. In this study we described a novel procedure that combined the technology with newly developed Ub derivatives that inserted a His tag within its C-terminal region. Using this procedure, we successfully identified *in vivo* ubiquitination sites of over 200 proteins with high confidence. In another experiment, we investigated the crosstalk between phosphorylation and ubiquitination. We found that the ubiquitin E3 ligase TRIM32 binds 14-3-3 proteins in a PKA-catalyzed phosphorylation-dependent manner. Subsequent studies demonstrated that this interaction negatively regulates the catalytic activity and intracellular transport of TRIM32. The findings described herein constitute the first evidence for the regulatory mechanism of the TRIM member.

交付決定額

(金額単位：円)

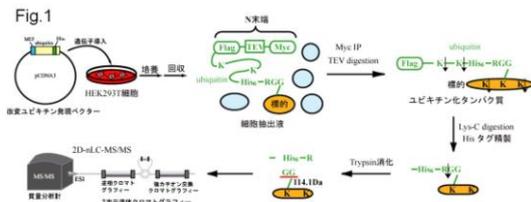
	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	0	1,700,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000



を回収し、SDS-ゲル電気泳動で分離した。抗 Myc 抗体を用いてウエスタンブロット分析したところ、改変 Ub は、そのモノマーの分子量に相当する位置にバンドが観察されると同時に、高分子領域に強いスミアなバンドが観察された。このことは培養細胞内で改変 Ub が確かに発現され、標的タンパク質に結合していることを示唆している。

#### 4-2 多段階アフィニティータグ法による Ub 化ペプチドの精製と LC-MS/MS 法による分析

改変 Ub 分子を発現する 15cm ディッシュ 50 枚の培養細胞から抽出した 580 mg のタンパク質を、抗 Myc 抗体を固定したカラムに添加し、Ub 化タンパク質を捕集した後、TEV プロテアーゼを用いてゲルから溶出させ、回収した。回収したユビキチン化タンパク質は、TCA 沈殿、還元アルキル化、透析後、リジレンドペプチダーゼで消化した。この消化物を、Ni-NTA カラムに添加し、イミダゾールで溶出した。この溶出画分を、脱塩・濃縮後、遠心濃縮機で溶媒を除去した後、トリプシンで消化し、LC-MS ショットガン分析の試料とした (Fig. 1)。



2 回の調製によって得られた試料について、各 2 回、計 4 回の LC-MS/MS 分析を行った。1 回目の分析では、ユビキチン化部位を同定したタンパク質は 107 種で、修飾部位数は 110 箇所であった。2 回目の分析では、ユビキチン化部位を同定したタンパク質は 121 種で、修飾部位数は 122 箇所であった。この 121 種のユビキチン化タンパク質のうち、約 50% は 1 回目で同定したユビキチン化タンパク質と重複しており、新たに同定したユビキチン化タンパク質は約 50% であった。3、4 回目の分析では、新たにユビキチン化部位を同定したタンパク質の割合は 25% に減り、ほぼ網羅的にユビキチン化タンパク質が同定できていると考えられた。結果を総合すると、本研究で同定されたユビキチン化標的タンパク質は 203 種類で、修飾部位数は 234 箇所であった。同定した 234 箇所のユビキチン化部位の中で、101 種 (約 43%) が複数のペプチドもしくは複数の解析で同定された。さらに、ユビキチン化部位を同定した 203 種のタンパク質には、ユビキチン化部位を複数含んでいるタンパク質が、25 種 (11%) 存在した。

#### 4-3 同定したタンパク質の特徴

(1) 局在：同定した 203 種のタンパク質の局在を調べるために、human protein reference database を用いて、分類した (Fig. 2)。その結果、同定した Ub 化タンパク質のほとんどが、核または細胞質に存在していることがわかった。Ub 自体が細胞質に存在するタンパク質であるため、その標的タンパク質も細胞質に存在するタンパク質であることは容易に想像できるが、本研究の結果はそれと矛盾していなかった。一方、膜タンパク質に対する Ub 化の役割については、余りよくわかっていないが、幾つかの例は知られている。例えば、ナトリウムチャンネルの一つである ENaC は Ub 化によって分解誘導され、その速度はユビキチンリガーゼである NEDD4 のリン酸化状態によって規定されていることが、我々の研究によって明らかになっている。そこで、本研究で同定されたタンパク質を、膜貫通領域 (TM) 予測ソフト SOSUI を用いて、TM の有無を予測分析した。その結果、8 種類が TM を有すると予測された。現在までに、哺乳動物の細胞を用いた大規模解析においては膜タンパク質はほとんど同定されていない。酵母細胞を用いた大規模解析では、膜タンパク質が多数検出されており、また、膜タンパク質の Ub 化はメンブレントラフィックのシグナルとして重要な役割を果たしていることが報告されていることから、同定した Ub 化の役割を解明することは、今後の重要な課題になる。

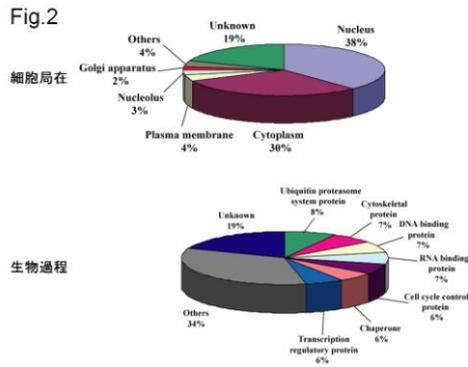
#### (2) 生物機能と分子機能

次に、Ub 化タンパク質の生物機能を分類した。数の多いものから順に転写や翻訳などの核酸代謝、タンパク質代謝、シグナル伝達、細胞の成長、輸送、栄養代謝 (Fig. 2) であった。しかしながら、他にも様々なプロセスに分類されることから、Ub 化が幅広いプロセスに関与していることが明らかになった。

さらに、分子クラスで分類したところ、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質が最も多く同定された。ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質の中には、ユビキチン、ユビキチン結合酵素 E2、ユビキチン連結酵素 E3、脱ユビキチン化酵素、ユビキチン様タンパク質 Nedd8、Nedd8 の E1、E2、プロテアソームサブユニットが含まれていた。

今回同定した 234 種の Ub 化部位は、変異体を用いる表現系の網羅的観察実験や、個別の分子を対象とした基礎研究に対して、重要な知見を与えるものと考えられる。一方、本研究では、MEF タグを除去した改変 Ub 分子や、His タグの挿入場所を変えた改変分子、His タグの残基数を 6 個から 4, 3, 2 個と減らした分子も同時に作成し、実験に組み込んだ。しかしながら、標的タンパク質への取り込み率が増加した分子は、Ni-NTA カラムでの回収が

困難であり、またその逆の場合も存在するなど、Ub 分子自体のさらなる改良は今後の課題として残った。



#### 4-4 TRIM32 と 14-3-3 の相互作用

ユビキチンリガーゼ TRIM32 と 14-3-3 タンパク質の相互作用を、精製した標品を用いてプルダウン解析した。その結果、TRIM32 はタンパク質キナーゼ A (PKA) によるリン酸化反応に依存して、14-3-3 ( $\eta$  アイソフォーム) と直接結合することが明らかとなった。哺乳動物細胞に発現するすべての 14-3-3 アイソフォームを用いて相互作用解析したところ、すべてのアイソフォームが PKA のリン酸化に依存して TRIM32 と複合体を形成することが明らかとなった。また PC12 細胞に発現する内在性 14-3-3 と TRIM32 も確かに結合することが免疫沈降実験で確かめられた。

次に、TRIM32 のリン酸化部位を、部位欠質体または部位特異的変異体を作成し解析した。その結果、TRIM32 は NHL ドメイン内に存在する C 末端近傍のセリン残基のリン酸化を契機として 14-3-3 と結合すること、またこの部位をアラニンに代えた変異体は 14-3-3 結合能が確かに消失することが明らかとなった。

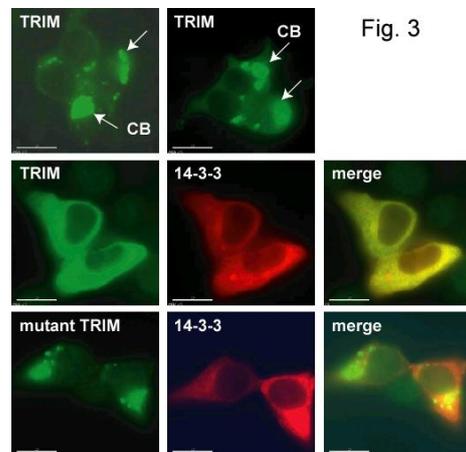
#### 4-5 14-3-3/TRIM32 複合体の生理的役割

TRIM32 の発現異常は遺伝病をはじめとする様々な疾患に直結している。TRIM32 の細胞内濃度は、二つの自己調節機構 (自己ユビキチン化、cytoplasmic body (CB) 形成) により調節されていることが知られている。そこで、これらの調節機構に与える相互作用の影響を検討した。In vivo Ub 化実験の結果、14-3-3 との結合は TRIM32 の自己 Ub 化を抑制することが分かった。興味深いことにこの効果は、TRIM32 による基質の Ub 化反応も抑制することが明らかとなった。

次に、CB 形成に及ぼす効果を免疫蛍光抗体法、ライブセルイメージング法を用いて解析した。その結果、14-3-3 との相互作用は TRIM32 の CB 形成を抑制することが分かった (Fig. 3)。

CB 形成には微小管を介した細胞内物質輸送が重要な役割を担っていることが報告されている。14-3-3 と結合した TRIM32 は微小管と結合しないことが判明した。一方、リン酸化部位をアラニンに換えた変異体では、E3 リガーゼ活性の抑制とともに CB 形成の阻害効果も認められなかった。従って、観察された 14-3-3 の効果は、PKA を介したリン酸化とこれを契機とする 14-3-3 の結合により引き起こされるものと考えられる。

結果として、14-3-3 の結合は、可溶性 TRIM32 の細胞内濃度を上昇させる。この相互作用が TRIM32 の機能に重要なことは、TRIM32 のリン酸化部位変異体はもはや細胞増殖能を示さなくなることから確認された。以上の結果は、TRIM タンパク質の調節機構に関して重要な知見を与えるものと考えられる。



#### 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)

- (1) Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2009) Two beclin-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. Nat Cell Biol., 11, 385-396. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270696> (査読有)
- (2) Asaoka, Y., Kanai, F., Ichimura, T., Tateishi, K., Tanaka, Y., Ohta, M., Seto, M., Tada, M., Ijichi, H., Ikenoue, T., Kawabe, T., Isobe, T., Yaffe, M.B., & Omata, M. (2010) Identification of a suppressive mechanism for Hedgehog

signaling through a novel interaction of Gli with 14-3-3.

J. Biol. Chem. 285, 4185-4194.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996099> (査読有)

- (3) Nasu, J., Murakami, K., Miyagawa, S., Yamashita, R., Ichimura, T., Wakita, T., Hotta, H., Miyamura, T., Suzuki, T., Satoh, T. & Shoji, I. (2010) E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent 1 degradation of peroxiredoxin 1.

J. Cell. Biochem., 111, 676-685.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589759> (査読有)

- (4) Okada M., Hozumi Y., Ichimura T., Tanaka T., Hasegawa H., Yamamoto M., Takahashi N., Iseki K., Yagisawa H., Shinkawa T., Isobe T., & Goto K. (2011) Interaction of nucleosome assembly proteins abolishes nuclear localization of DGK $\zeta$  by attenuating its association with importins.

Exp. Cell Res., 317, 2853-2863.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21996351> (査読有)

[学会発表] (計6件)

- (1) 吉田順、市村徹 (2009年10月23日) リン酸化とユビキチン化のクロストーク  
第82回日本生化学会大会 (神戸ポートアイランド：兵庫県)
- (2) 松永耕一，齋藤達哉，田端桂介，大森弘子，佐藤荘，黒鳥直樹，前島郁子，野田桂苗，市村徹，磯辺俊明，審良静男，野田健司，吉森保 (2009年10月24日) 二つの新規 Beclin1 結合タンパク質である Atg14L と Rubicon は、それぞれオートファジーを正負に制御する  
第82回日本生化学会大会 (神戸ポートアイランド：兵庫県)
- (3) 吉田順，市村徹，垣内一恵 (2009年12月11日) TRIM-NHL タンパク質のリン酸化による調節  
第32回日本分子生物学会 (パシフィコ横浜：神奈川県)
- (4) S. Ikuo, J. Nasu, K. Murakami, S. Miyagawa, R. Yamashita, T. Ichimura, T. Wakita, Y. Ide, H. Hotta, T. Miyamura, T. Suzuki, and T. Satoh (2010年12月9日) E6AP ubiquitin ligase mediates

ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1.

第33回日本分子生物学会 (神戸ポートアイランド：兵庫県)

- (5) 市村徹，八谷如美，小俣結子，畠山鎮次勝二郁夫 (2011年9月24日) PKA/14-3-3によるユビキチンリガーゼ TRIM32の制御  
第84回日本生化学会大会 (京都国際会館：京都府)

- (6) T. Ichimura, I. Shoji, and N. Hachiya (2011年12月15日) A Regulatory Mechanism for Tripartite-motif Protein 32 Revealed by Quantitative 14-3-3 Interactome Analysis in PKA signaling Pathways.

第34回日本分子生物学会 (パシフィコ横浜：神奈川県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

市村 徹 (ICHIMURA TOHRU)

防衛大学校・応用科学群・教授

研究者番号：50213012