

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07197

研究課題名（和文）ユビキチン化の検出システムの開発と担癌マウスモデルでの検証

研究課題名（英文）Development of a detecting system of ubiquitination and verification in mouse tumor-bearing models

研究代表者

宮本 和英（Miyamoto, Kazuhide）

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：10415317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：E2（ユビキチン結合酵素）は生体内のユビキチン化反応を構成しており、白血病、乳がん、大腸がん等、様々ながん疾患と深く関与している。E2活性は、その反応の複雑さ故に、がんの病態を捉えるために利用されてこなかった。私は最近、人工的に設計したE3によって、簡便にE2活性を検出できるシステムの開発を行った。本研究では、蛍光標識した人工E3とE2との相互作用を蛍光分光法で詳細に解析した。E2の違いにより、それらと結合したときに人工E3の蛍光強度に明らかな違いを観測できた。また、蛍光偏光度法で、人工E3とE2との結合を検出できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自開発してきた人工E3を活用し、このユビキチン化能を蛍光偏光度から、迅速かつ高精度に検出できるシステムを研究開発する。がん治療前に適切な薬剤を選択できる診断法があれば、患者への危険性や負担を軽減でき、無駄な薬剤の使用も避けることができる。国民医療費の抑制に繋がる筈である。本方針は、現代のニーズに合致しており、効率的でスマートな医療を叶える技術として有用であることは間違いない。このような革新的な疾患の判断、病態把握のできる新診断法の開発を実現していきたい。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitin-conjugating (E2) enzymes constitute the ubiquitination reaction in the body and is deeply involved in various cancer diseases such as leukemia, breast cancer, and colorectal cancer. E2 activity has not been used to detect cancer pathogenesis due to complications related to the enzymatic cascade reaction. Recently, I have developed a system that easily detect E2 activity using artificially designed E3 molecules. In this study, the interaction between fluorescently labeled artificial E3 and E2 was analyzed in detail by fluorescence spectroscopy. Due to the difference of E2, we succeeded in detecting the differences in the fluorescence intensity of artificial E3. In addition, it was found that the binding between artificial E3 and E2s was detected using the fluorescence polarization.

研究分野：生命物理化学

キーワード：ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

生体内では、ユビキチン化能により、構造異常などが原因で不要となったタンパク質(標的分子)を分解して品質管理を行っている。ユビキチン化反応では、基本的にユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)の3つの酵素が関与している。ユビキチンがE1からE2に転移し、そしてE3を介して標的タンパク質に付加される。この反応が繰り返されることで複数のユビキチンが標的タンパク質に付加され、ポリユビキチン化が進む。これを目印にして標的分子の分解が誘導される。ユビキチン化は白血病、乳がん、大腸など様々な疾患に関与することが報告されており、血液・組織中のユビキチン化能を高感度に捉えることができれば、疾患診断に役立つとされる。最近、E2活性が重要とされるが、ユビキチン化反応が複雑なカスケード反応であるため、E2活性を定量的に検出・測定することは難しい。そこで私は、人工的に分子設計・作製した人工ユビキチンリガーゼ(ARF)を活用したE2活性の定量的な検出法を研究してきた。

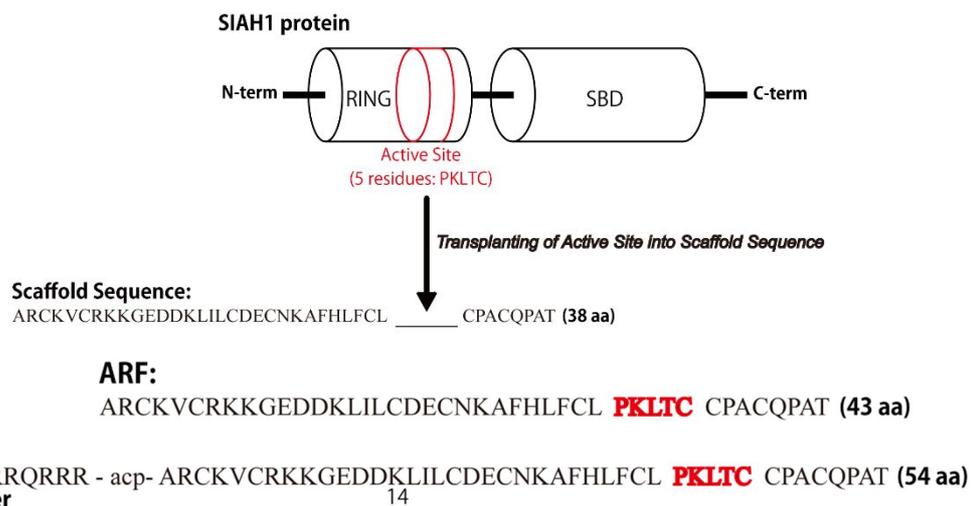
本研究では高感度なE2検出に向けて、ARFとE2との結合を蛍光検出法で詳細に研究・解析したので報告する。

2. 研究の目的

- (1) ヒト乳がんに関与するE3(SIAH1)に基づきARFを設計した。そのN末端にリンカーを付けた後にFAM(5-Carboxyfluorescein)で蛍光標識した(FAM-ARF)。
- (2) FAM-ARFとE2との相互作用を蛍光分光法で詳細に解析した。

3. 研究の方法

(1) 急性骨髄球性白血病に関与するSIAH1に基づき図1に示したARFを分子設計した。SIAH1は2量体を形成してE2と結合するが、その結合部位(アミノ酸5残基PKLTC)を土台配列 Scaffold Sequence に移植してARFを分子設計した。ARFのN末端にTAT配列を付加したアミノ酸配列に相当するペプチドをFmoc固相法で化学合成し、グラジエントHPLCで精製して得た。次に、スクシンイミドエステルのFAMを反応させて蛍光標識した(FAM-ARF)。

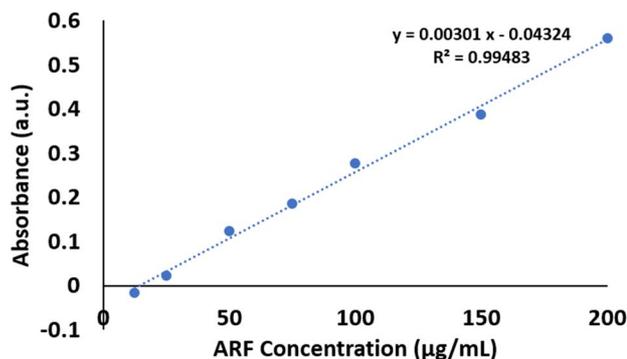


- (2) 蛍光標識したARFとE2との相互作用を蛍光分光法で検討した(分光蛍光光度計 F-7100 HITACHI)。

4. 研究成果

(1-1) 設計したアミノ酸配列に基づき、TAT-ARF をペプチド合成し、トリフルオロ酢酸等で脱保護を行った後、グラジエント HPLC で精製した。次に、透析操作を経て、各ペプチドのリフォーリングを行った。

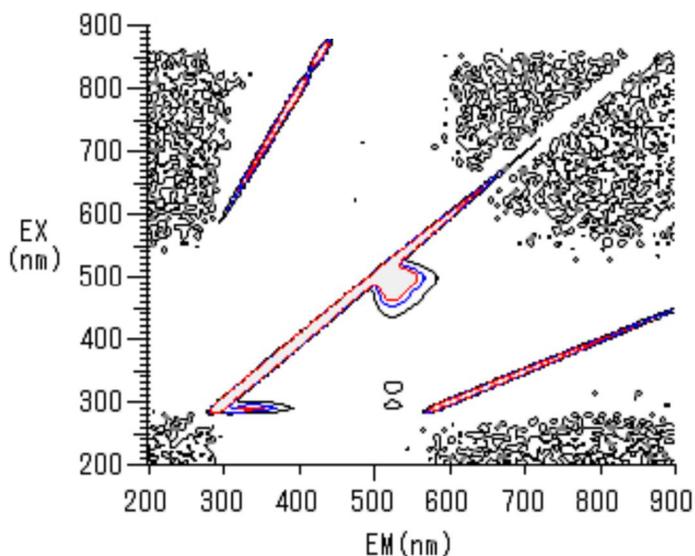
(1-2)



ARF のペプチド結合の吸収波長である 220 nm の吸光度を測定し、検量線を作成した(図)。検量線をもとに、FAM-ARF の濃度を算出した。

(2-1)

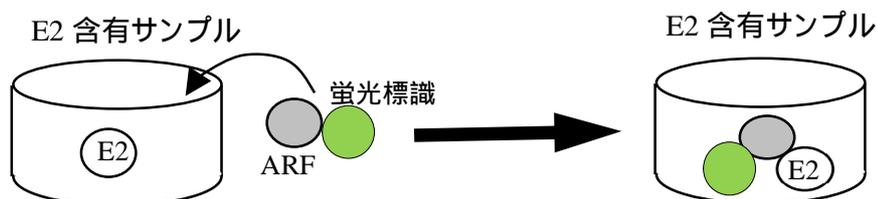
蛍光標識した FAM-ARF の三次元蛍光スペクトルを測定した。励起波長 500 nm、蛍光波長 525 nm で蛍光強度のピークを検出した。以降、FAM-ARF を含む溶液の蛍光強度測定の際は、励起波長 500 nm に設定した。



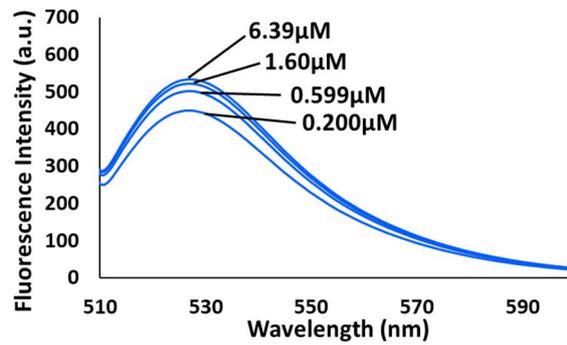
FAM-ARF_SIAH1 の三次元蛍光スペクトル
(X: 蛍光波長, Y: 励起波長, Z: 蛍光強度)

(2-2)

下図のように蛍光標識したFAM-ARFをE2含有のサンプルに添加して、蛍光強度を観測した。

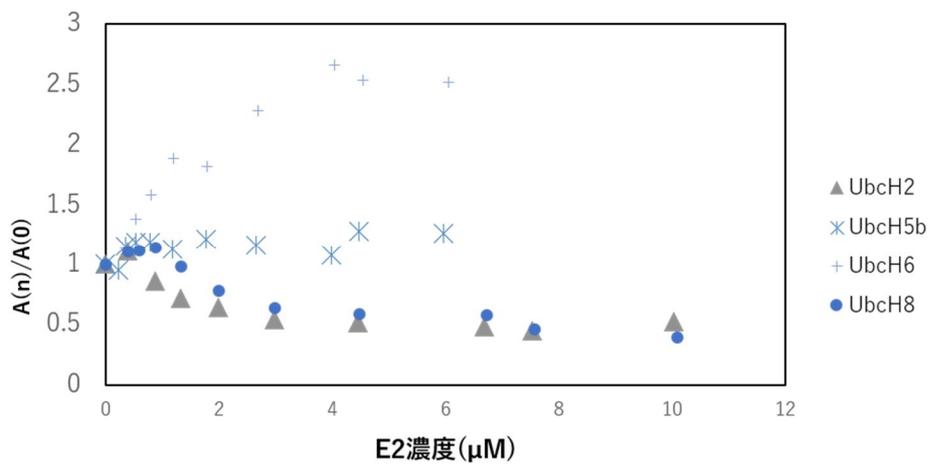


E2 の UbcH6 の濃度を変化させて、それに FAM-ARF を添加したときの蛍光スペクトルを計測した。下図に示すように、UbcH6 の濃度に依存して、FAM-ARF の蛍光強度は増大した。



FAM-ARF の蛍光スペクトル

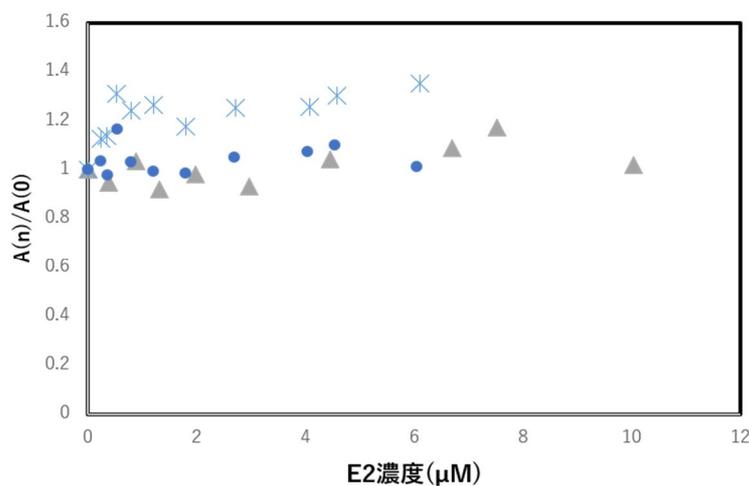
(2 - 3)



FAM-ARF の蛍光強度の変化

UbcH2, UbcH5b, UbcH6, UbcH8 の E2 が含有したそれぞれの溶液に、FAM-ARF を添加したときの蛍光強度を計測してプロットした。E2 の濃度変化に伴い FAM-ARF の蛍光強度が変化することが分かった。

(2 - 4)



FAM-ARF の蛍光偏向度の変化

UbcH2, UbcH5b, UbcH6, UbcH8 の E2 が含有したそれぞれの溶液に、FAM-ARF を添加したときの蛍光偏光度を計測してプロットした。E2 の濃度変化に伴い FAM-ARF の蛍光強度が変化することが分かった。UbcH5b では、分子量が小さいために、蛍光偏光度の違いを観測できなかった。

本研究では、人工的に設計した ARF が有する E2 結合を詳細に蛍光分光法で解析した。今後、ARF-E2 の結合強度の解析や、スペクトル変化の理由など、さらに解析を進めていく。将来的には E2 活性を蛍光偏向度から計測できるようにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuhide Miyamoto*, Hinako Ishii, and Takashi Tadokoro	4. 巻
2. 論文標題 Analysis of E2-Binding Capabilities of Artificial E3s by Fluorescence Spectroscopies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 61-62
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 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 -

1. 著者名 Ayumi Fukuda, Kazuhide Miyamoto*	4. 巻
2. 論文標題 Creation of Artificial E3s with Specific E2-binding Capabilities by Amino Acid Replacements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 85-86
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 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 -

1. 著者名 Miyamoto Kazuhide*, Tadokoro Takashi, Matsumoto Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Unique E2-binding specificity of artificial RING fingers in cancer cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-52793-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 Miyamoto Kazuhide*, Matsumoto Atsushi	4. 巻 32
2. 論文標題 Artificial <sc>RING</sc> finger reveals unique auto ubiquitination with <sc>E2</sc> specificity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.4766	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 -

1. 著者名 Ayumi Fukuda, Takashi Tadokoro, and Kazuhide Miyamoto*	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of E2 Activity on Lateral Flow Immunochromatography with Artificial E3s	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 -
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 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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本和英、石井陽菜子、田所高志
2. 発表標題 ANALYSIS OF E2-BINDING CAPABILITIES OF ARTIFICIAL E3S BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPIES
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井陽菜子、田所高志、宮本和英
2. 発表標題 蛍光標識した人工的なRING Finger のE2結合能の解析
3. 学会等名 34回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田歩未、宮本和英
2. 発表標題 CREATION OF ARTIFICIAL E3S WITH SPECIFIC E2-BINDING CAPABILITIES BY AMINO ACID REPLACEMENTS
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 歩未, 村上 侑美、田所高志、宮本和英
2. 発表標題 イムノクロマトグラフィーを用いたユビキチン結合酵素の活性の検出
3. 学会等名 第29回中国四国支部分析化学若手セミナー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 歩未, 田所高志、宮本和英
2. 発表標題 ラテラルフローイムノクロマトグラフィーを用いたユビキチン結合酵素の活性検出
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 歩未, 田所高志、宮本和英
2. 発表標題 DETECTION OF E2 ACTIVITY ON LATERAL FLOW IMMNOCHROMATOGRAPHY WITH ARTIFICIAL E3S
3. 学会等名 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山陽小野田市立 山口東京理科大学薬学部 教員紹介
<http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/kazuhide-miyamoto.html>

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