

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510233

研究課題名(和文) ユビキチン鎖連結パターンに着目した基質蛋白質の網羅的同定・分類

研究課題名(英文) Systematic identification and classification of polyubiquitinated proteins with specific chain linkage patterns.

研究代表者

太田 一寿(ota, kazuhisa)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：00322727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質のユビキチン化修飾では、修飾される事自体に加えて、その修飾様式、すなわちユビキチン鎖の特性が基質蛋白質の運命決定に重要な意味を持つとされている。そこで我々は独自開発のポリユビキチン化基質蛋白質の効果的濃縮・同定法を改変し、ユビキチン鎖の連結パターンに基づく基質蛋白質の網羅的解析を行うことで、多様なユビキチン鎖を持つ生物学的意義を明らかにする本研究に着手した。代表的な連結部位であるLys48とLys63に関する試験段階では問題なかったが、本研究の主対象であるマイナー連結部位に関しては解析に必要な量を得ることが出来なかった。目的達成の為に、今後ともシステムの改善に取り組んでいきたい。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin chains with distinct linkage pattern are said to give specific biological functions to their substrate proteins. To understand these relationships between "linkages and functions", we tried to identify ubiquitinated proteins with specific chain linkage patterns by modifying our original enrichment method for polyubiquitinated substrates. As result, we succeeded in identifying the linkage specific substrates for lys48 and lys63, which are main linkage points and already extensively characterized, but not for minor linkage points, which are major targets of this study.

研究分野：分子生物学

キーワード：ユビキチン プロテオミクス 出芽酵母 質量分析

1. 研究開始当初の背景

蛋白質のユビキチン化修飾では、修飾される事自体に加えて、その修飾様式が基質蛋白質の運命決定に重要な意味を持つ。先ず(マルチプル)モノユビキチン化なのかポリユビキチン化なのかという事が重要な点で、次にポリユビキチン化の場合にはどの Lys 残基で連結した鎖なのか(連結パターン)も考慮すべきである。しかし、修飾様式と基質蛋白質(及びその後の運命)の対応付けは、一部の基質を除きほとんどなされておらず、修飾様式側からの網羅的な視点が欠落した状況にある。そこで特定の残基以外の Lys を全て Arg に置換した変異ユビキチン(mono-K Ub)にアフィニティタグを付加して発現させ、当該 Lys で連結した Ub 鎖を持つ基質を濃縮する試みが為された。しかし、mono-K Ub の取り込みがそれ以降の鎖伸長を阻害する 경우가多く、あらゆるタイプのユビキチン鎖の末端を mono-K Ub で標識しているのとほぼ等しい状況に陥り、所期の効果的濃縮は達成されていない。

さて我々は、ポリユビキチン化基質蛋白質の効果的濃縮法としてパラレルアフィニティタグ精製法(PAP法)を開発した。PAP法とは、異なるタグで標識された2種類の Ub (His-Ub と Flag-Ub) を同時に発現させてポリユビキチン鎖に双方のタグを取り込ませ、次にそれぞれのタグに対するアフィニティ精製を連続して行うものである。これにより、ポリユビキチン化蛋白質を選択的に(つまり大量に存在するフリーの Ub やモノユビキチン化蛋白質を含まずに)しかも高純度に精製する事が可能になった。実際に酵母から PAP で得られたサンプルを LC-MS/MS 解析(PAP-MS)したところ、130 種以上の基質蛋白質候補が得られ、その 80% 以上がポリユビキチン化されることを確認できた。

今回、我々は、PAP-MS において mono-K Ub を用いれば、特定の連結パターンによるユビキチン鎖を持つ基質を効果的に濃縮することに思い至った。PAP-MS では1分子あたり最低2分子の mono-K Ub を取り込んだ基質が得られる。したがって、複数のユビキチン鎖を持ち、しかもそれぞれの末端が別のタグを持った mono-K Ub によって形成された分子を除けば、PAP-MS で得られる分子は必ずユビキチン鎖の内部に mono-K Ub を持つ、つまり当該 Lys 残基で連結したユビキチン鎖を持つので、従来法よりも各段に効果的な濃縮が期待できる(図1)。更に、2種類の mono-K Ub を用いれば、複数の連結パターンが混在する混合型ユビキチン鎖を持つ基質の探索も可能であろう。

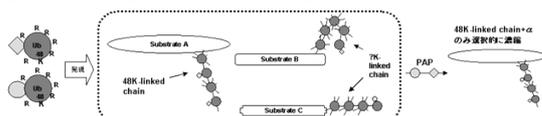


図1 mono-K Ub を用いた PAP 法によるユ

ビキチン鎖連結ポイント特異的な基質濃縮 (48K Ub の場合)

こうして得られた基質候補蛋白質の確認や機能解析には、連結パターンを定量的に計測する手法が必要になる。我々は、蛋白質の系統的絶対定量解析法として独自に開発した PCS-MS を応用すれば基質蛋白質のユビキチン鎖連結パターンを定量的に解析することに思い至った。PCS-MS 法とは、定量対象となる各蛋白質に由来するトリプシン消化ペプチドを連結した人工蛋白質(PCS)を安定同位元素存在下に作成し、質量分析による定量のための標準物質として用いるもので、PCS を一種類添加するだけで各標準ペプチドが完全に当モル量ずつサンプルに添加されて操作性と正確性が著しく向上する。安定同位元素標識したユビキチンモノマーを対象とする被修飾基質蛋白質の高度精製標品に加えて PCS-MS 解析を行うと、基質のユビキチン鎖に由来するトリプシン断片ペプチドを正確に定量できる(図2)。この時、連結に使われた Lys 残基はトリプシンで切断されないため、その両脇のペプチド(図2の黒とグレイ)は連結に関わらないペプチド(図2の白)に比較すると、その量が減少する。したがって、その減少から、連結鎖の存在量の算定と更にはユビキチン鎖長の推定も可能になる。

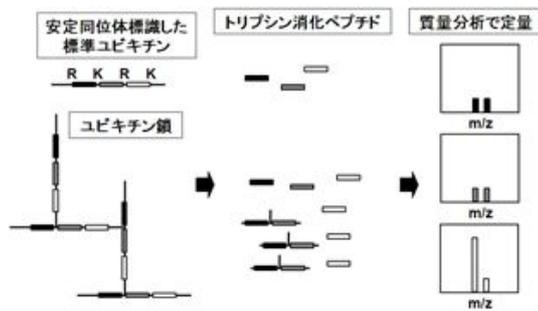


図2 安定同位体標識ユビキチンを用いた PCS-MS による連結パターンの定量解析

このように、我々が独自に開発した PAP-MS と PCS-MS を応用すれば、従来法では不可能であったユビキチン鎖の連結パターンに基づく基質蛋白質の網羅的解析と詳細な定量解析が可能になるという国内外に例のない着想を得たので、今回のプロジェクトを行うことにした。

2. 研究の目的

上述のように任意の Lys 残基で連結したユビキチン鎖を持つ基質蛋白質を網羅的に同定し、その連結鎖修飾の持つ生物学的な意義を理解するために、以下のように到達目標を設定した。

7 種類の mono-K Ub を用いて出芽酵母の

PAP-MS 解析を行い、連結パターン毎の基質候補リストを作成する。それぞれの代表的な基質に対しては PCS-MS による確認作業を行う。

外的刺激時（プロテアソーム阻害薬添加、セリンプロテアーゼ阻害剤添加、DNA 障害、熱刺激時）において、と同様の解析を行う。

上記データから各連結パターンの持つ意義を考察し、遺伝学的・生化学的手法により証明する。

### 3. 研究の方法

PAP-MS 解析によるユビキチン鎖連結パターン別基質蛋白質リストの作成

出芽酵母に mono-K Ub を一過性に発現させて、PAP-MS 解析を行うことで連結パターン特異的な基質のリストを作成する。

我々の基質解析はサンプル間での相対定量を基本とし、手技的な不安定性を回避する為に安定同位体標識のアミノ酸を用いた SILAC 法 (Stable Isotopic Labeling using Amino Acids in Cell Culture) を採用しており (SILAC-PAP-MS、参考文献 3)、本研究もこれに準じる。例えば、48K に着目した場合、野生型のユビキチン発現株と 48K 以外の Lys 残基を Arg 残基に置換したユビキチン変異体 (48K Ub) 発現株の間、および 48K Ub 発現株とすべての Lys 残基を Arg 残基に置換したユビキチン変異体 (K0 Ub) 発現株の間で、それぞれ SILAC-PAP-MS を行う。前者の比較により、48K 連結鎖基質とそれ以外の連結鎖基質が、後半ペアの比較により 48K 連結鎖基質とマルチプル (モノ) ユビキチン化基質が、それぞれ定量的に判別される。また 48K Ub とは相補的な関係にある 48K のみ Arg 残基に置換したユビキチン変異体 (K48R Ub) を用いた解析を適宜追加する予定にしている。このような解析をユビキチン中の 7 つ Lys 残基すべてについて行い、定量結果を総合することで基質リストの信頼性を向上させる。

同位体標識ユビキチンを標準として用いる連結パターン定量計測法の確立

安定同位体標識ユビキチンモノマーを標準として利用し、対象とする蛋白質試料におけるユビキチン鎖の連結パターンを定量するための技術基盤を確立する。

具体的には、大腸菌でユビキチンモノマーの発現系を構築し、安定同位体標識アミノ酸存在下で培養後、同位体標識ユビキチン標準を精製する。一方で、in vitro のユビキチン化システムを用い、特定の連結ポイントを有するポリユビキチン鎖として、例えば 48K または 63K のみで連結したユビキチン鎖を作製する。両者を様々な量比で混合したものに同位体標識ユビキチンを標準として添加し、LC-MS による定量を行い、理論値を反映した連結パターンの定量計測が可能であるか

検証する。また、K0 Ub を用いて in vitro でユビキチン化反応を行った基質を利用し、モノユビキチン化とポリユビキチン化についても区別可能であるか検証する。さらには、本方法での連結パターンの定量データと、実際の連結ペプチドの質量分析で検出頻度を照合し、方法の信頼性を確保する。

外的刺激時におけるユビキチン鎖連結パターン別基質蛋白質リストの作成

と同様の作業を外的刺激（プロテアソーム阻害薬添加、セリンプロテアーゼ阻害剤添加、DNA 障害、熱刺激）と組み合わせで行う。

1) 野生型ユビキチン発現株に各種刺激を加えた状態で定性的 PAP-MS 解析を行い、その際に存在が認められた連結ポイントペプチドが由来する Lys 残基にターゲットを絞り SILAC-PAP-MS を行う。ちなみに、現在使用している PAP-MS システムで非刺激時に認められる連結ポイントは 6K, 48K, 63K のみである。

2) PAP 後に MS ではなく免疫学的検出を組み合わせた PAP-western を刺激の種類 × Lys 残基毎に行うことによりユビキチン化基質収量を相対比較し、増加が認められた組み合わせでのみ SILAC-PAP-MS を行う。

同位体標識ユビキチンを用いた個別基質蛋白質の連結パターンの定量化

で作製されたリストから代表的な基質を選抜し、上述した同位体標識ユビキチンを用いた戦略により連結パターンの定量化を行う。その際、従来のタグ 1 - mono-K Ub + タグ 2 - mono-K Ub の組み合わせに代え、タグ 1 - 野生型 Ub + タグ 2 - 個別基質の組み合わせで PAP を行うことで、酵母細胞由来の高度に精製されたユビキチン化基質を確保する。これまでのデータと照合し、各蛋白質のユビキチン鎖連結パターンを確認するとともに、種々の刺激による連結パターンの変動を動態解析する。

各連結パターンが持つ生物学的な意義の解析

特徴的な連結パターンを持つ基質蛋白質群に着目し、文献情報や各種オーミクスデータを元に生物学的な意義の抽出を行う。

### 4. 研究成果

< 概要 >

代表的な連結部位である Lys48 と Lys63 に関しては現行法の PAP である程度のユビキチン鎖が得られ、MS 解析まで行えたが (A)、その他の連結部位に関しては解析に必要なサンプル量が得られなかった。脱ユビキチン化酵素欠損変異体の利用など様々な工夫 (B) をしたが今のところ目覚ましい収率の改善は認めなかった。

本プロジェクトを進めていく過程で、非典型

連結パターンをもつユビキチン鎖（同一ユビキチンモノマー内に二か所以上の連結部位を持つような非典型連結パターンを示すユビキチン鎖）の存在を認め（C）、解析に労力を割いてしまった。最終的な結論は得られず、現在も解析中である。

(A) 代表的な連結部位であるLys48とLys63に関して実際に PAP-MS 解析を行い、それぞれに特徴的な基質を同定した。表 1 には Lys63 に関する解析の 1 例を示した

基質蛋白質の相対定量比較(63K v.s. Wild)		膜蛋白質	
上位10遺伝子	63K/Wild ratio	下位10遺伝子	63K/Wild ratio
HSP26	1.54	HXT5	0.35
SHP1	1.41	RPS7A	0.30
COT1	1.38	RPS7B	0.28
ITR1	1.31	RPS20	0.11
ZRT3	1.16	CPR1	0.00
JEN1	1.15	DDI1	0.00
ZRT1	1.08	HXT4	0.00
TNA1	1.03	INO1	0.00
YRO2	0.94	MET4	0.00
HXT7/HXT6	0.92	RPN10	0.00

・膜蛋白質が上位に濃縮された。  
・下位には63K以外の連結鎖基質が濃縮されている事が予想される。

表 1 Lys63 に関する比較定量解析結果

(B) 脱ユビキチン化酵素欠損変異体ライブラリを用いてそれぞれの連結パターン由来ペプチドの定量解析を行った。(図 3)

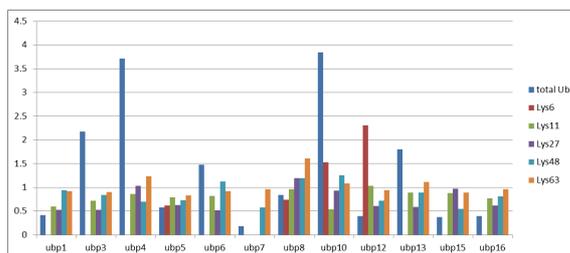


図 3 各種変異体を用いた連結パターン由来ペプチドの相対定量

(C) 同一ユビキチンモノマー内に二か所以上の連結部位を持つような非典型連結パターンを示すユビキチン鎖の解析を行った。

## 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 1 件)

- Detecting protein-DNA interactions using a modified yeast one-hybrid system.  
Ota K, Feng SY, Ito T.  
Methods Mol Biol. 2014;1164:39-50

[学会発表](計 2 件)

- 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011) (一般・ポスター)

太田一寿、紀藤圭治、伊藤隆司「Toward a unified theory for the biological mechanisms of F-box proteins」

- 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012) (一般・ポスター)  
太田一寿、紀藤圭治、伊藤隆司「UBP6 controls the ubiquitination status of RPN1」

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 一寿 (OTA, Kazuhisa)  
長崎国際大学・薬学部薬学科・准教授  
研究者番号：00322727

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

紀藤 圭治 (KITO, Keiji)  
明治大学・農学部生命科学・講師  
研究者番号：40345632