

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570138

研究課題名(和文) ユビキチン類似タンパク質MNSF の翻訳後修飾機構に関する酵素群の精製と応用

研究課題名(英文) Isolation and characterization of ubiquitin-like protein MNSF-conjugating enzymes

研究代表者

中村 守彦 (Nakamura, Morihiko)

島根大学・産学連携センター・教授

研究者番号：20155865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質分解で重要な役割を果すユビキチン化に準ずる、MNSF 化システムを明らかにするため、MNSF 化を触媒する酵素群を単離・精製・cDNAクローニングした。その結果、MNSF の標的タンパク質への結合を担う新しい酵素(ユビキチンE3酵素に相当)を見出した。さらに、凝集性の強いMNSF を安定化するheat shock proteinを同定した。これらにより、MNSF 化システムの一部が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified and characterized an enzyme which conjugates MNSF to target protein(s). This enzyme is a novel protein similar to ubiquitin conjugating enzyme E3. In addition, we also identified a heat shock protein which stabilizes aggregative MNSF. Thus, the mechanism of MNSF conjugation was partly shown.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：ユビキチン様タンパク質 結合酵素 翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは極めて保存性の高いタンパク質であるが、これまでにユビキチンのアミノ酸配列に相同性を示すユビキチン類似タンパク質が報告されている。研究代表者は、ユビキチン類似タンパク質として **M**onoclonal **N**onspecific **S**uppressor **F**actor  $\beta$  (MNSF $\beta$ ) を発見した。そして、ユビキチン化と同様のシステムでイソペプチド結合する2つの標的タンパク質を同定した。その1つ Bcl-G はアポトーシス促進タンパク質で、MNSF $\beta$  化により MAP キナーゼ ERK のリン酸化を抑制することを証明した。他方の Endophilin-II はこれまで機能が不明であったが、MNSF $\beta$  化によるファゴサイトーシスおよび自然免疫の制御機能を明らかにした。

## 2. 研究の目的

現在までに SUMO 化および ISG15 化の触媒酵素群が cDNA クローニングされている。本研究の目的は、ユビキチン化に準ずる MNSF $\beta$  化を触媒する酵素群を単離・精製・cDNA クローニングして MNSF $\beta$  化システムを明らかにし、他のユビキチン類似タンパク質およびユビキチン システムとの共通点と相違点を明確にすることである。

## 3. 研究の方法

**MNSF $\beta$  と標的分子との共有結合を触媒する特異的酵素の精製と cDNA クローニング**

- 1) マウス肝臓をプロテアーゼ・インヒビター・カクテル存在下で、メッシュおよび磨りガラスにより PBS 中で懸濁して、フィブリン塊を除去する。肝臓細胞を超音波処理した後、超遠心 (100,000 x g) により上清を得て、これをマウス肝臓ライセートとした (全て 4°C 下で施行)。
- 2) DEAE 陰イオンクロマトグラフィーにより、分画した (NaCl:01-05 M)。
- 3) リコンビナント MNSF $\beta$  を結合させた glutathione 4B カラムと、肝臓ライセート分画を反応させた。
- 4) 10 mM DTT, 20 mM Tris-HCL, pH 7.5 処理により、MNSF $\beta$  とチオール結合するタンパク質を溶出させた。または、トリプシン消化によって MNSF $\beta$  と非共有結合するタンパク質 (群) を得た。
- 5) MNSF $\beta$  チオール結合性タンパク質を SDS/PAGE 電気泳動法により分離して、各バンドを酵素 (トリプシン、V8 など) 処理して MALDI-TOF-MS により質量分析した。
- 6) 質量分析結果をペプチドマスフィンガープリント法によって、ユビキチン化触媒酵素の E1, E2, E3 あるいは SUMO 結合酵素のアミノ酸配列情報を基に MNSF $\beta$  化酵素 (E1-like)

を同定した。

7) 5' RACE 法等により目的の MNSF $\beta$  化酵素 cDNA を単離した。

8) 組換え型タンパク質を作製して MNSF $\beta$  化を *in vitro* で実証した。

## 4. 研究成果

(1) マウス肝臓ライセートの DEAE 陰イオンクロマトグラフィーによる分画 (0.1-0.5 M NaCl) をそれぞれ glutathione 4B カラムに結合した GST-MNSF $\beta$  と反応させ、トリプシン消化した反応物を還元条件下で SDS/PAGE 解析した結果、複数のタンパク質がクマシーブルー (CBB) 染色により検出された (図 1-A)。GST-MNSF $\beta$  にはトリプシン切断部位がデザインされており、MNSF $\beta$  と会合 (非共有結合) または共有結合したタンパク質が染色される。その中で、低分子を除くタンパク質を切り出し、酵素 (トリプシン) 処理して MALDI-TOF-MS により質量分析した。尚、この解析において陽性 (バンドが認められた) であったのは、0.2M NaCl 溶出した分画であった。その他の分画は、陰性または目的とするタンパク質を検出できなかった。さらに、二次元電気泳動も実施したが、一次元と特段の差異は認められなかった。続いて、得られた分画に対して、抗 MNSF $\beta$  抗体によるウェスタンブロット法で解析した (図 1-B)。分子量約 60,000 に強いバンドを確認した。還元条件下で SDS/PAGE 分析したことから、抗 MNSF $\beta$  抗体に反応したタンパク質は、MNSF $\beta$  と共有結合している標的タンパク質であると考えられる。一方、CBB 染色で認められた分子量約 80,000 のタンパク質は抗 MNSF $\beta$  抗体と反応しなかった。これは MNSF $\beta$  と非共有結合していることを意味する。MNSF $\beta$  化に寄与する酵素は非共有結合しているはずなので、このタンパク質を以下の如く解析した。

(2) データベース (マウス) を活用して、ペプチド・マスフィンガープリント法により、MNSF $\beta$  化酵素の候補と期待できる新しいタンパク質を複数同定した。その中で、ユビキチン結合酵素 E3、RFWD2 が同定された。ヒット率は 47% を示した。この E3 はアミノ酸 733 個で構成される分子量約 80,000 で、ユビキチンの標的タンパク質は c-Jun である。RFWD2 は RING finger および WD repeat domain を有する。RFWD2 遺伝子はマウス、ヒトともに染色体 1 番にコードされる。これは MNSF $\beta$  化にもユビキチン化システムが機能している可能性を強く示唆する。他にも興味あるタンパク質が、新規 heat shock protein を含めて検出された。この結果は、MNSF $\beta$  の強い凝集性を鑑みれば、分子シャペロンが MNSF $\beta$  と会合する意味は理にかなっている。

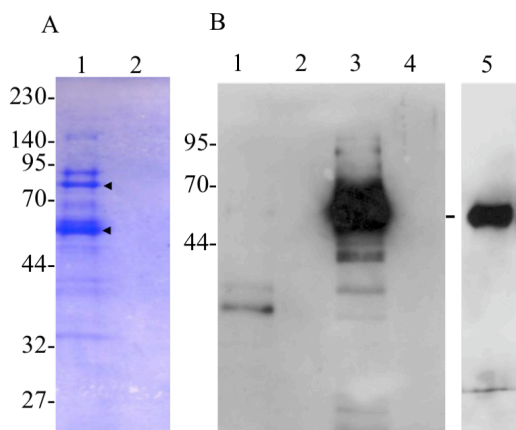


図1 MNSFβ との反応性を示す種々のタンパク質：A, クマシーブルー染色；B, 抗-MNSFβ 抗体によるウェスタンブロット

これらのMNSFβ 化に関連したタンパク質については現在詳しく解析中である。

(3) 次に、GST プルダウンアッセイを行った(図2)。GST-MNSFβ とマウス肝臓ライセートをATP存在下で反応させてウェスタンブロット解析したところ、分子量約100,000あたりにバンドを認めた(図2-B, レーン6)。これはMNSFβ とチオール結合したE1酵素(ユビキチン酵素の類似物)であると推察された。尚、ATP非存在下ではこの高分子のバンドは観察されなかった(データは示していない)。コントロールのGST単独ではこのシフトは観察されなかったことから、E1酵素は確かにMNSFβ と反応している。これら一連の実験結果は、抗GST抗体および抗MNSFβ抗体を使用したウェスタンブロット解析により、確かにGST-MNSFβ がシフトしていることを実証できた。さらにGSTを結合していないglutathione 4Bカラムではバンドが全く観察されないことから、これらの実験で非特異的な反応を観ている可能性が否定された。

(4) 他のユビキチン様タンパク質であるSUMOおよびFAT10の結合酵素とMNSFβ結合酵素との差異を観察する目的で、結合酵素Uba2(SUMO)とUba6(FAT10)に対するsiRNAによる干渉実験を遂行した。使用した細胞は、マウスマクロファージ系細胞株(Raw264.7)で、当研究室において既に複数のタンパク質にMNSFβ化が生じることを報告している。その結果、Uba2 siRNAおよびUba6 siRNAとも全くMNSFβ化に影響を与えなかった。従って、MNSFβはこれらのユビキチン様タンパク質とは結合酵素を共有しないものと考えられた。図3のレーン2はMNSFβ siRNAによるもので、MNSFβが減衰した。

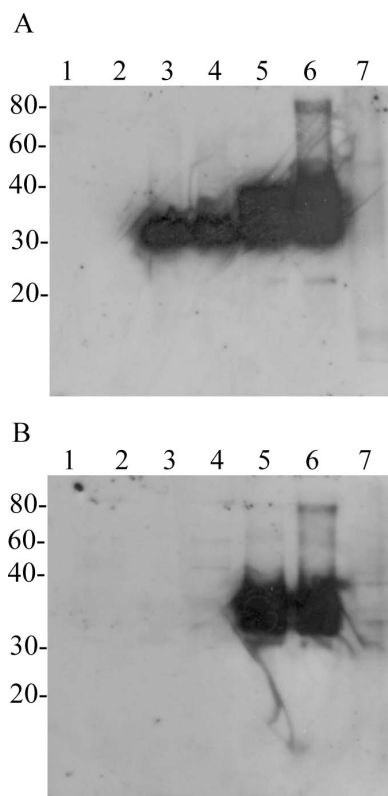


図2 GST プルダウン アッセイ：A, 抗GST抗体によるウェスタンブロット；B, 抗MNSFβ抗体

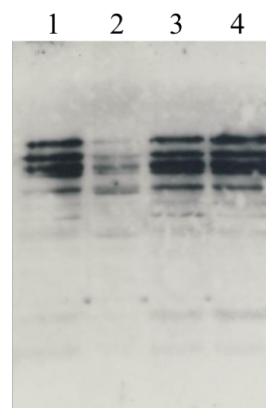


図3 siRNAによる種々の結合酵素のknock-down実験：lane 1, control siRNA; lane 2, MNSFβ siRNA; lane 3, Uba2 (SUMO); lane 4, Uba6 (FAT10)

#### 【考察】

MNSFβ結合システムには、他のユビキチン様タンパク質、SUMOおよびFAT10のそれとは異なることが明らかとなった。本研究では、ユビキチン結合システムとは一部共通する可能性が示唆された。但し、MNSFβ結合にシス

テム特有の酵素が存在するか否かは不明である。今後、この酵素を探索する。

本研究を遂行する過程で、分子シャペロンが特定されたことは興味深い。シャペロンによる安定化は、極めて凝集性の高いMNSFβの標的タンパク質への結合（イソペプチド結合）に欠かせないと考えられる。

今回は DEAE 陰イオンクロマトグラフィーによりマウス肝臓細胞を分画したが、陽イオンクロマトグラフィーによる解析も必要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Nakamura M, Nakagawa M, Watanabe J Ubiquitin-like protein MNSFβ negatively regulates T cell function and survival Immunol Invest 2014 (in press) 査読有
- ② Watanabe J, Nakagawa M, Nakamura M: Ubiquitin-like protein MNSFβ covalently binds to Bcl-G and enhances lipopolysaccharide (LPS)/interferon γ (IFNγ)-induced apoptosis in macrophages. FEBS J 280:1281-93, 2013. 査読有
- ③ Iwasaki Y, Hiroto T, Oguro H, Nakamura M: Preliminary study on using accelerometers to measure involuntary movement for the assessment of neurological motor impairments. Advanced Applied Informatics 46: 33-38, 2013 査読有
- ④ Nakamura M, Watanabe J, Watanabe N: Ubiquitin-like protein MNSFβ regulates TLR-2-mediated signal transduction. Mol Cell Biochem 364:39-43, 2012 査読有
- ⑤ Sato M, Shimatani K, Iwasaki Y, Morito S., Tanaka H, Fujita Y, Nakamura M: New surface-modified zinc oxide nanoparticles with aminotriethylene oxide chains linked by 1,2,3-triazole ring: preparation, and visible light-emitting and noncytotoxic properties. Applied Surface Science. 258:786-790, 2012 査読有
- ⑥ Tobinaga S, Hashimoto M, Utsunomiya I, Taguchi K, Nakamura M, Tsunematsu T. Chronic administration of cardanol (Ginkgol) extracted from Ginkgo biloba leaves and cashew nutshell liquid improves Working Memory-Related learning in rats. Biol Pharm Bull. 35:127-129, 2012. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

【国内】

- ① Nakagawa M, Nakamura M: Isolation and characterization of ubiquitin-like protein MNSFβ conjugating enzymes. 第 86 回 日本生化学会 横浜 2013. 9. 11
- ② Watanabe J, Nakagawa M, Nakamura M: Ubiquitin-like protein MNSFβ regulates apoptosis through ERK/ AP-1 pathway in LPS/IFNγ-stimulated macrophages. 第 85 回 日本生化学会 博多 2012. 12. 14
- ③ Watanabe J, Watanabe N, Nakamura M: Ubiquitin-like protein MNSFβ enhances LPS/IFNγ-induced apoptosis in macrophages. 第84回 日本生化学会 京都 2011. 9. 23

【国際】

- ④ Nakamura M, Nakagawa M: Ubiquitin-like protein MNSFβ covalently binds to Bcl-G and enhances lipopolysaccharide (LPS)/interferon γ (IFNγ)-induced apoptosis in macrophages. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology Milan, Italy August 2013. 8.24
- ⑤ Takeda Y, Hara S, Hasegawa S, Ono M, Nakamura M: Usefulness of aromatherapy (“Shimane rose water”) on bathing process for elderly with dementia living in a geriatric health service facility. Alzheimer’s Disease International (ADI) Taipei, Taiwan April 2013. 4. 20
- ⑥ Iwasaki Y, Hiroto T, Oguro H, Nakamura M: Preliminary study on using accelerometers to measure involuntary movements for the assessment of neurological motor impairments. Second IIAI International Conference on Advanced Applied Informatics Matsue, Japan September 2013. 9. 4

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称：情報ネットワークシステム  
発明者：橋口尚幸、中村守彦、四郎丸功、増成博志  
権利者：島根大学長  
種類：特許  
番号：2012-013088 号  
出願年月日：2012 年 1 月 25 日  
国内外の別：国内
- ② 名称：水溶性超常磁性ナノ粒子  
発明者：佐藤守之、中村守彦  
権利者：島根大学長  
種類：特許  
番号：2013-002041 号

出願年月日：2013年1月9日  
国内外の別：国内

○取得状況（計 2 件）

- ① 名称：蛍光標識材料および蛍光標識剤  
発明者：佐藤守之、中村守彦  
権利者：島根大学長  
種類：特許  
番号：5326078号  
取得年月日：2013年8月2日  
国内外の別：国内
- ② 名称：Fluorescent labeling material and  
fluorescent labeling agent  
発明者：Sato M, Nakamura M  
権利者：島根大学長  
種類：特許  
番号：09823469.3  
取得年月日：2013.9.25  
国内外の別：国外

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/CMRC/index2.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 守彦 (NAKAMURA MORIHIKO)  
島根大学・産学連携センター・教授  
研究者番号：20155865