

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657112

研究課題名(和文) ユビキチン・コードの解明

研究課題名(英文) Characterization of the ubiquitin code

研究代表者

大竹 史明(Ohtake, Fumiaki)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究者番号：60447373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の翻訳後修飾は様々な生命現象において非常に重要である。ユビキチン化は生体機能に不可欠な翻訳後修飾の一つであるが、ユビキチン修飾の多様性には不明な点が多く残っている。本研究では、翻訳後修飾のソースとして解析されてきたユビキチン分子自身が翻訳後修飾の基質になる新規分子機構の提案を目的として、解析を行った。その結果、ユビキチン分子自身がリン酸化修飾を受けることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modifications (PTMs) govern many aspects of biological systems. Ubiquitylation is a versatile PTM whose functional diversity has not been fully understood. In this study, we investigated a possibility that ubiquitin, itself a source of PTM, is functionally regulated by another PTM. Our research identified ubiquitin phosphorylation sites from cellular ubiquitin conjugated to substrates.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ユビキチン 翻訳後修飾 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の翻訳後修飾は様々な生命現象において非常に重要であり、翻訳後修飾の組み合わせが複雑な機能情報を形成する。翻訳後修飾の相互制御を含めた多様性については、未だ不明な点が多く残っている。

ユビキチン化は生体機能に不可欠な翻訳後修飾の一つであり、蛋白質分解に加え、シグナル伝達、DNA 修復、転写制御など多彩な役割を担うことが明らかになりつつある。このようなユビキチン化の多様な役割の分子基盤として、ユビキチン化修飾の多様性が挙げられる。ユビキチン化はモノ・ユビキチン化と、ユビキチンがポリマー状に連なったポリ・ユビキチン化とが存在し、異なる機能を有する。加えて、ユビキチン分子内のリジン(K)48 残基、K63 残基など異なる連結構造を有するポリユビキチン鎖の形態によって、基質は異なる運命へと振り分けられる。このような特異的なポリユビキチン鎖形成機構については特定の E2 酵素の解析など様々な研究が行われているものの、その全貌はほとんど不明な状況であった。

ユビキチン修飾の特殊性は、アセチル化やリン酸化等他の修飾とは異なり、修飾分子自身が蛋白質である点にある。従って、修飾分子ユビキチン自身が翻訳後修飾を受ける可能性が考えられる。ユビキチンは細胞内に大量に存在する蛋白質であり、真核生物で高度に保存されている。にも関わらず、ユビキチン蛋白質自身に対する翻訳後修飾とその機能的意義に関しては先行研究は行われておらず、未解明であった。

2. 研究の目的

ユビキチン修飾は重要な翻訳後修飾であるが、異なる形態のポリユビキチン鎖をはじめ、ユビキチン修飾の多様性に関しては不明な点が多く残っている。中でも、ユビキチン蛋白質自身に対する翻訳後修飾とその機能的意義に関してはわかっていない。

本研究では、翻訳後修飾のソースとして解析されてきたユビキチン分子自身が翻訳後修飾の基質になる新規分子機構の提案を目的とする。これまで異なる形態のポリユビキチン鎖の生物学的重要性が明らかにされてきたが、ユビキチンの多彩な役割が発揮される仕組みは大きな謎だった。本研究によりポリユビキチン修飾系における新たな分子機構の一端の解明が期待される。

ユビキチンに対する翻訳後修飾とその機能的意義を解明するため、以下の研究を計画する。第一に、質量分析計(LC-MS/MS)を用

い、ユビキチン翻訳後修飾の同定を進める。翻訳後修飾の種類としては様々なものが考えられるため、リン酸化をはじめとした修飾の可能性を検討する。第二に、翻訳後修飾箇所の変異体等により、ユビキチン翻訳後修飾の細胞レベルでの機能を検討する。以上より、ユビキチン自身が翻訳後修飾群により制御される「ユビキチン・コード」の提唱を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 質量分析による、ユビキチン分子内の翻訳後修飾の同定

質量分析計を用いて、ユビキチン翻訳後修飾を同定する。ユビキチンの精製としては、抗体による濃縮の他、外来発現ユビキチンのタグを用いた精製、ユビキチン認識ドメインを用いた精製や、主要なモノユビキチン化蛋白として知られるヒストン画分の使用等を検討する。また、分析に際しては高精度の質量分析計を用いることや、ラベルされた標準ペプチドを対照に用いることで偽陽性を排除し、確証を得る。

また、リン酸化等に注目して翻訳後修飾の同定を行う。そのために、脱リン酸化阻害剤など、各種の阻害剤を培養細胞に加え、恒常的な脱修飾の阻害を検討する。

(2) ユビキチンの翻訳後修飾の細胞内機能解析

翻訳後修飾の細胞内での機能的意義を検討する。翻訳後修飾の可能性を *in vitro* アッセイや質量分析等で検討できた場合は、修飾部位の変異体の細胞内発現等により、ポリユビキチン鎖形成に及ぼす影響の検討などを行う。これにより、翻訳後修飾の細胞内での機能的意義を検討していく。この際には鎖特異的なユビキチン抗体を用いたイムノプロットティングや、質量分析による関連分子検出などを行う。

4. 研究成果

(1) 質量分析による、ユビキチン分子内の翻訳後修飾の同定

ユビキチン分子内の翻訳後修飾を、LC-MS/MS によって網羅的に同定を試みた。まず内在性ユビキチンの精製系を構築した。精製産物は高分子量画分を質量分析に供することで、既知のポリユビキチン化サイトである K11、K48、K63 を同定した。このことから、ユビキチン精製系および質量分析による修飾サイト同定の構築に成功したと判断した。次に、ポリユビキチン以外の新規修飾の探

索を遂行した。まず FLAG タグ融合ユビキチン発現細胞からの抗 FLAG アフィニティー精製により、翻訳後修飾の同定を試みた。また、内在性ユビキチンを抗ユビキチン抗体で精製し、同様の測定により検討した。観察された修飾については妥当性の検討を行った。

(2) ユビキチンのリン酸化修飾の細胞内機能解析

翻訳後修飾の中でも、特にその重要性が知られ、シグナル伝達依存的に制御される可能性の考えられるリン酸化修飾に着目し、ユビキチンがリン酸化修飾を受ける可能性について検討した。特異的残基でのリン酸化修飾を受ける可能性について、詳細に解析した。抗体や点変異体を用いた解析から、in vitro アッセイ系において、残基特異性をもってユビキチンがリン酸化されることが示唆された。

また、細胞内での機能を探るため、リン酸化ミミック変異体を細胞内に発現させて検討した。ポリユビキチン鎖特異的な抗体を用いた検討の結果、特異的なポリユビキチン鎖の存在量が顕著に影響を受ける可能性が示唆された。

一方、in vitro ユビキチン化アッセイの結果は、当該残基におけるリン酸化ミミックの細胞内挙動と一致しなかった。このことは、リン酸化修飾が及ぼす影響は、細胞内の様々なユビキチン関連因子を介している可能性を示唆している。

(3) ユビキチン翻訳後修飾の標準ペプチドによる検証

リン酸化修飾あるいはその他の新規翻訳後修飾の可能性について、細胞内性ユビキチンからの修飾同定を試みた。精製した細胞内性ユビキチンを用いた質量分析では、微量修飾の正確な同定は困難を伴うことがわかってきた。そこで、理論質量と溶出範囲を設定することによる高感度化が期待できる標的プロテオミクス法による解析を試みた。全てのセリン・トレオニン・チロシン残基に対するリン酸化修飾の理論質量、価数、及びプロダクトイオンを設定し、抗ユビキチン及び抗 FLAG 抗体免疫沈降産物中から質量分析を行った。

解析の結果、幾つかの残基に関してリン酸化の可能性が予測された。そこで内部標準ペプチドを用いて証明を試みた。標的残基にリン酸化修飾を有し、別の一つのアミノ酸において安定同位体標識された合成ペプチドは、化学的性質を同一にするため、液体クロマトグラフィーにおいて同一時間で溶出され、MS/MS でのフラグメント化パターンも同一となる。これを利用して、同定結果の確証を得ることとした。解析の結果、特異的残基におけるリン酸化修飾が同定された。以上より、

ユビキチン蛋白質自身に対する翻訳後修飾を新たに見出すことができた。

また、その他の新規翻訳後修飾に関しても、検討を進めた。

以上の解析から、本研究は、研究当初の目的であった、修飾分子ユビキチン自身に対する翻訳後修飾としてユビキチンのリン酸化修飾を同定した。また、特定の残基におけるリン酸化ミミック変異体の解析から、細胞内における役割についても示唆を得ることができた。今後は、機能的意義についてのより詳細な検討を進展させていく必要がある。

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 1 件)

1) Youn MY, 他 (Ohtake F., 著者 9 人中 4 番目). JMJD5, a JmjC-domain-containing protein, negatively regulates osteoclastogenesis through facilitating NFATc1 protein degradation. J Biol Chem. 287. 12994-13004. (査読有). 2012. DOI 10.1074

[学会発表](計 0 件)

[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

大竹史明 (OHTAKE FUMIAKI)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究者番号：60447373

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：