

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687016

研究課題名(和文) 脂溶性生理活性物質によるユビキチン系制御の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular pathways of fat-soluble ligands through the ubiquitin system

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) 18,700,000円、(間接経費) 5,610,000円

研究成果の概要(和文)：脂溶性生理活性物質は広範な生理作用を有するが、その分子作用経路については不明な点が多い。本研究では、脂溶性リガンド受容体型の転写因子が、ユビキチン化修飾を制御することで生理作用を発揮する、脂溶性リガンドの新規分子機構解明に取り組んだ。その結果、ユビキチン化修飾が転写活性化の終結に関与する可能性を見出した。また、非典型的ユビキチン鎖の関与を見出した。

研究成果の概要(英文)：Fat-soluble small ligands possess diverse physiological roles in part through cellular receptor proteins. However, the underlying molecular mechanisms are not fully understood. In this study, we characterized a role of the ubiquitin system in regulating a fat-soluble ligand-dependent transcription factor.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：転写因子 脂溶性リガンド

1. 研究開始当初の背景

脂溶性低分子生理活性物質は多彩な生理作用を司っている。これら脂溶性リガンドの一部は、シグナル伝達分子として、特定の受容体によって認識されることにより、細胞内にシグナルを伝達し、生理機能を発揮する。動物界において、これら脂溶性リガンドの作用点は、膜受容体によるシグナル伝達や、受容体型転写因子による転写調節などが主要なものとして知られている。しかしながら、脂溶性リガンドのシグナル伝達を担うこれら制御系以外の標的選択的システムについては十分に解明されていない。

植物界では植物ホルモン・オーキシンが F-box 型ユビキチンリガーゼ TIR1 に直接結合してその活性を調節することが知られている。動物界においては、このような「脂溶性リガンドを直接認識するユビキチンリガーゼ」の機能はよくわかっていなかった。考え合わせると、動物界における脂溶性リガンドのシグナル伝達機構は、現在考えられている以上に多彩である可能性が考えられる。このような背景から、脂溶性リガンド受容体がユビキチン系制御に関わる新規機能を有する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

脂溶性生理活性物質の作用は多彩であり、その一端はリガンド依存性転写因子群を介して発揮される。本研究では、脂溶性リガンドの新たな作用点として、ユビキチン化の制御による蛋白質の分解調節を着想し、検討を行う。bHLH/PAS ファミリー転写因子 AhR は、多環芳香族型の様々な脂溶性低分子リガンドを結合し、異なるリガンドにより複雑な作用を有する。このような作用は従来、標的遺伝子群の発現制御において解析されてきた。一方、AhR が基質のユビキチン化およびプロテアソーム依存性蛋白分解を促進することから、脂溶性リガンドの生理作用の一部は、ユビキチン翻訳後修飾を介して発揮される可能性が示唆されていた。

そこで、脂溶性リガンド受容体がユビキチン翻訳後修飾により基質の蛋白質分解を制御し、生理作用を発揮する、脂溶性リガンドの新規シグナル伝達分子機構の解明を行う。AhR のリガンド依存的なポリユビキチン鎖

形成の分子機構、および細胞応答におけるユビキチン化の意義を解析する。また、分解制御される AhR の標的基質は不明であり、基質同定によって、脂溶性リガンドの新規作用経路の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) ポリユビキチン鎖形成の制御機構の解析

AhR はリガンド結合依存的にポリユビキチン化形成を促進することがわかっているが、分子機構解明において最重要と考えられる責任 E2 酵素やユビキチン鎖の種類においてはわかっていない。そこで、様々な基質のユビキチン化の開始に関わる E2 (initiating E2) である UbcH5 や、Cul1in 型 E3 と協働して K48 連結型ユビキチン鎖を伸長する E2(elongating E2)である CDC34などに着目し、ロックダウン法により、検討を行う。

ユビキチン鎖の解析については、鎖特異的なポリユビキチン抗体あるいは、質量分析によって測定を行う。

In vitro ユビキチン化アッセイは、ユビキチン蛋白及び標的リジン残基以外をアルギニン置換されたユビキチン変異体を用い、各種ユビキチン連結酵素 (E2) を用いて検討する。

(2) AhR の分解基質を介した生理作用発現の解析

AhR のリガンド依存的なユビキチン化促進の機能的意義の一つとして、転写活性の動的制御が考えられる。そこで、リガンドを添加・除去後の時間依存的な転写活性変化を解析し、ユビキチン化経路の機能的意義について検討を行う。MCF7 細胞を用い、標的遺伝子 CYP1A1、CYP1B1 等を用いて遺伝子発現解析を行う。

AhR 相互作用因子同定のために AhR リガンドを培養細胞に添加し、共免疫沈降法により相互作用蛋白質を回収する。精製蛋白質は、質量分析により同定に供する。同定された候補因子については特異的抗体を用い、共免疫沈降あるいはユビキチン化形成について検討を行うことにより、AhR リガンドの作用経路の解明を行う。

4. 研究成果

(1) ユビキチン修飾による転写応答制御の解析

脂溶性生理活性物質に対する AhR の応答におけるユビキチン修飾の意義を解明するため、ユビキチン鎖形成の効果の検討を試みた。AhR ポリユビキチン鎖形成に関わるユビキチン連結酵素群 (E2) を探索し、次に、分解基質による AhR 転写機能への影響を検討するため、AhR ポリユビキチン鎖形成に関わる各酵素群をノックダウンして転写応答を解析した。その結果、リガンド添加・除去に応じた転写活性の迅速なシグナル応答性に、顕著な影響を生じることを見出した。AhR による標的遺伝子誘導はリガンド除去後に迅速に消失し、このような制御は細胞毒性の低減に寄与していると考えられる。この応答は AhR のユビキチン化を介した細胞応答であることが示唆された。

(2) ポリユビキチン鎖形成の制御機構の解析

ユビキチン鎖形成機構の解明のため、in vitro ユビキチン鎖形成のアッセイ系構築を行った。E2 酵素群を用いた特異性解析の結果、反応には E2 特異性が存在する可能性が示唆された。また、標的リジン以外をアルギニン置換されたリジン変異体ユビキチンの解析から、連結リジン残基特異性が観察された。また、修飾ペプチドによる定量分析を行った。

次に、細胞内ユビキチン修飾の鎖の種類について検討を行った。アゴニスト処理下、MCF7 細胞を用い、AhR におけるユビキチン修飾を測定したところ、典型的なユビキチン鎖に加え、非典型的ユビキチン鎖が同定された。さらに非典型的ユビキチン鎖は顕著な脂溶性リガンド特異性を有した。以上より、AhR におけるポリユビキチン鎖形成機構には非典型鎖形成を含むことが明らかとなった。

(3) 脂溶性リガンド特異的な AhR 基質の探索

脂溶性リガンド特異的な AhR 相互作用因子探索法を検討する中で、ユビキチン化が特異的化合物によって制御可能であることを利用して、検討を行った。ユビキチン系制御特異的リガンドと考えられた低分子化合物、あ

るいは一般的アゴニスト添加条件にて、内在性 AhR 相互作用因子群をプルダウンし、質量分析によって同定を行った。そしてリガンド特異的相互作用候補因子群を抽出した。その結果、ユビキチン制御関連因子および転写関連因子を同定した。これら候補に関しては、転写制御への関連において絞り込みを行った後、共免疫沈降法および細胞内ユビキチン化の検討を行った。その結果、2 種の転写因子に関して、AhR によってユビキチン化が制御される可能性が示唆された。従って、AhR はこれら転写因子を制御することによって機能の一端を発揮する可能性が示唆された。

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)

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：