

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：34521

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700588

研究課題名（和文） 尿におけるユビキチン化の新規高感度検出法

研究課題名（英文） High sensitive detection of ubiquitination reaction in urine

研究代表者

姫路獨協大学・薬学部・准教授

宮本 和英 (MIYAMOTO KAZUHIDE)

研究者番号：10415317

研究成果の概要（和文）：

ユビキチン化は、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おり、また、膀胱癌、前立腺癌、腎臓癌、白血病などといった様々な重篤な疾患に関与することが分っている。このユビキチン化の度合いを高感度に検出することができれば、疾患の判断、病態把握に役立つ。本研究では、(1)ユビキチン化の度合いを検出するために基質やタグを用いずにユビキチン化を生じさせることのできる人工的なE3を作製した。(2)精製したユビキチン、E1、E2を含む混合溶液に人工的なE3を添加し生じるユビキチン化を、生理活性反応測定装置AMIS-101を用いてin vitroで高感度に検出・測定することに成功した(pmol/Lオーダー)。(3)ヒト急性骨髄性白血病細胞株NB4に抗癌剤を加えた培養上清中に、人工的なE3を添加することでユビキチン化反応を生じさせ、E2酵素の活性量をAMIS-101にて高感度に観測することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Protein ubiquitination is undertaken through an enzymatic cascade comprising ubiquitin-activating (E1), ubiquitin-conjugating (E2), and ubiquitin-ligating (E3) enzymes. This ubiquitination reaction is related to several diseases such as bladder cancer, prostate cancer, kidney cancer, leukemia. The high sensitive detection of the degree of the ubiquitination leads to the diagnosis of these diseases. In this study, (1) the artificial E3 was designed for the detection of the ubiquitination without a substrate and a tag (2) the micro bioactivity analyzer (AMIS-101) had a high sensitivity for detecting the degree of the ubiquitination of the artificial E3 in the solution including the purified ubiquitin, E1, E2. (3) in human acute myelogenous leukemia cells with treatment of the cancer drugs, the detection system of the ubiquitination of the artificial E3 using AMIS-101 made it possible to the observation of the small amount of the E2 enzyme activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：検査・診断システム ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

生体内では、構造異常などが原因で不要となったタンパク質(標的タンパク質)を分解する機能、即ち、品質管理機能が存在する。これはユビキチン化により行われる。ユビキチン化は、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おり、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る。付加された複数のユビキチンを目印に、標的タンパク質の分解が行われる。このユビキチン化は、様々な疾患との関係も深く、ユビキチン化の度合いを高感度に検出できれば将来的に疾患の診断・病態把握が可能である。ここでは、ユビキチン化に関わる酵素であるE3を人工的に作製し、さらに生理活性反応測定装置AMIS-101((バイオエクス製)を活用することで、人工的なE3のユビキチン化の度合いをin vitroで高感度に検出する。さらに、培養上清や尿でAMIS-101を活用してユビキチン化の定量的・高感度な検出を行い、最適な測定条件を検討して、疾患の診断・病態把握の可能性を調査する。

2. 研究の目的

(1) ユビキチン化の度合いを検出するために利用する人工的なE3を設計し、ペプチド合成・精製して得る。

(2) 単離精製されたユビキチン、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、人工的E3などユビキチン化に必要な試薬を混合させ、in vitroレベルでAMIS-101を利用する実験を行い、ユビキチン化の度合いを検出する。

(3) 培養上清あるいは尿をサンプルとして、その中のE2の活性、即ち、ユビキチン化の度合いをAMIS-101を用いて検出・測定可能とすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 先ず、人工的なE3を設計してペプチド合成(PSSM-8, 島津製)した後、グラジエントHPLCで精製する。合成確認は、質量分析(AXIMA-TOF2, 島津製)によって行う。フォールドの確認は円偏光二色性で行う。

(2) 単離精製されたユビキチン、E1、E2、ユビキチンなど必要な試薬を混合させ、そこに人工的なE3を添加することで生じるユビキチン化をウエスタンブロットとAMIS-101

装置で確認する。ユビキチンの付加に伴う遊離プロトンの減少をAMIS-101を利用して定量的・高感度に検出・測定する。ユビキチン化の度合いは、プロトンの減少という観点から捉える事ができる。

(3) 次に、人工的なE3を、E2を含有する培養上清あるいは尿サンプルに添加して、複数のユビキチンを人工的なE3に付加させる。この時のユビキチンの付加に伴う遊離プロトンの減少をAMIS-101を利用して高感度検出測定を行う。人工的なE3の添加濃度、添加後の測定時間、測定開始時間を変化させるなどして、培養上清あるいは尿サンプルにふさわしい測定条件を検討する。

4. 研究成果

(1) 分子設計してできたアミノ酸配列に基づいて、F-moc 固相法にてペプチド合成を行った。次に、トリフルオロ酢酸等を含むクリベージ試薬で脱保護を行った後、グラジエント逆相液体クロマトグラフィーを用いて精製した。分子設計・合成・精製などの複数のプロセスを経て、ユビキチン化の度合いの検出に利用するための人工的E3を98%以上の純度で粉末状態で得ることができた。合成確認は、質量分析(MALDI-TOF)で行った(図1)。

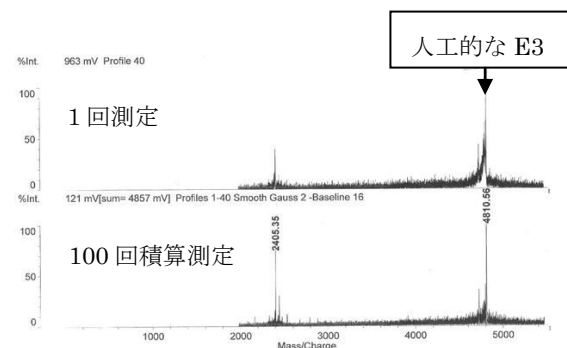


図1: MALDI-TOF を用いる質量分析

今回合成・精製した人工的E3の構造化学的な試験を円二色性分光法を用いて行った。その結果、人工的E3は、合成・精製した直後は、立体構造を形成していない状態であった。立体構造が形成されなければ、必要な酵素機能を有しない。そこで、グアニジン、ジチオトレイトールなどを含む変性剤で十分に変性させ、4℃で一晩、透析操作(リフォールディング)を行った。これらの実験操作によって、人工的E3の立体構造を形成させることができた(図2)。

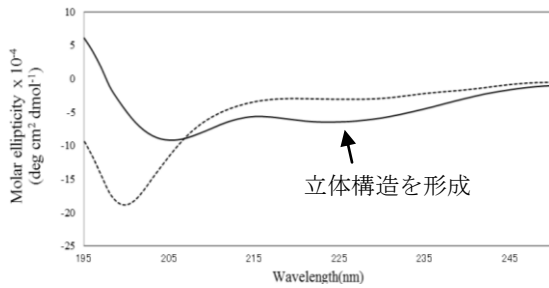


図 2 : CD スペクトル (人工的な E3 の立体構造の形成の確認)

以上の実験から、当初予定していた人工的な E3 を 98%以上の純度で得ることができ、また、リフォールディングにより立体構造の形成を行うことができた。

(2) (1) で設計合成して得られた人工的な E3 によるユビキチン化実験を行った。ユビキチン化反応に必要な各種試薬 (人工的な E3, E1, E2, ユビキチン) を混合させ、ゆっくり攪拌した後、37°C、60 分間インキュベートを行った。ユビキチン化の検出は、ユビキチン抗体および ECL を用いるウエスタンブロット法で行った (イメージアナライザー LAS-3000 装置)。この結果、図 3 に示されているように、人工的な E3 は、特異的に E2 (UbcH8) とユビキチン化反応を起こすことが示された。

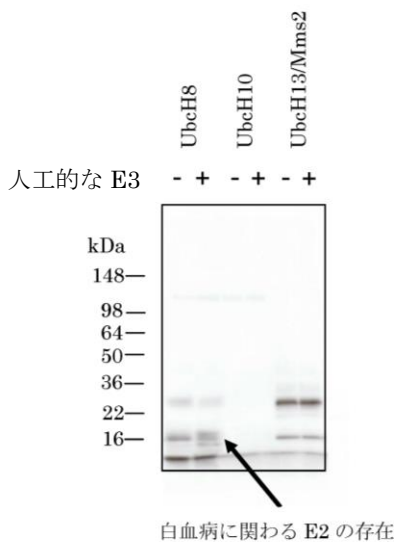


図 3 : 人工的な E3 と UbcH8 とのユビキチン化反応のウエスタンブロット

次に、単離精製されたユビキチン、E1、E2、を含む混合溶液に (1) で得た人工的な E3 を添加する。この溶液を AMIS-101 の測定センサーに投入し、37°C で温度安定させた後、

検出測定した。この時、E2 酵素に付加しているユビキチンが人工的な E3 に転移するが、これに伴って生じる溶液中の遊離プロトンの減少を AMIS-101 で高感度に測定検出したし、検出下限は、0.5 pmol/L であった (図 4)。

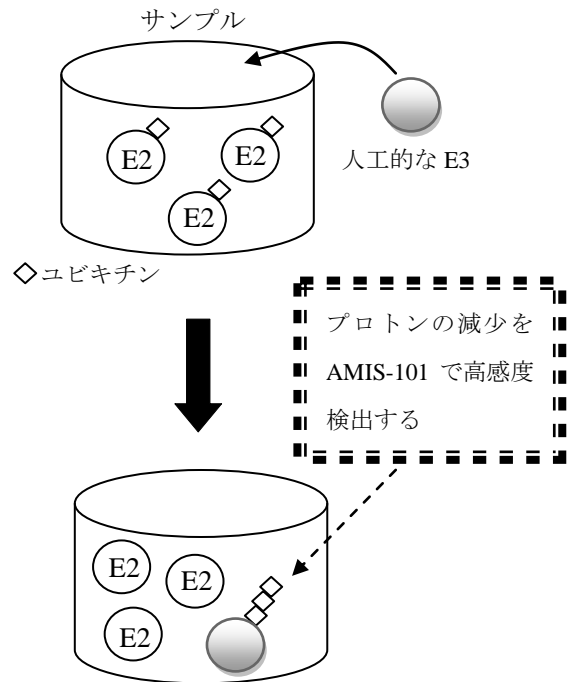


図 4 : AMIS-101 を用いるユビキチン化の高感度検出

(3) E2 酵素が高発現している急性骨髄性白血病細胞株 (NB4) に抗がん剤ボルテゾミブを添加し、アポトーシスを誘導させ、培養上清中に E2 を漏出させた。その上清を、AMIS-101 の測定センサーに投入し、37°C で温度安定させた後、人工的な E3 を添加してユビキチン化の反応を生じさせた混合液中の遊離プロトンの減少をリアルタイムに検出し定量的・高感度に測定を行った。その結果、ユビキチン化による遊離プロトンの減少を AMIS-101 で高感度検出でき、その減少量に基づき、ユビキチン化の度合いを捉えることに成功した。また、抗がん剤ボルテゾミブの添加量の条件を変えて (0, 10, 100 μM) 培養上清中に漏出してくる E2 の量を変化させたサンプルを用意し、それらを AMIS-101 の測定センサーに投入し、ユビキチン化による遊離プロトンの減少を高感度検出・測定した。その結果、E2 濃度依存的に変化するユビキチン化の度合いを高感度に検出し捉えることに成功した。この結果を踏まえて、現在被検体を尿サンプルに移行するための最適な測定条件を検討しているところである。

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 4 件)

1. Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Murata E, Ueda K, Abe M, Miyamoto K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M. Oligopeptides derived from autophosphorylation sites of EGF receptor suppress EGF-stimulated responses in human lung carcinoma A549 cells.

Eur J Pharmacol., 698, 87-94(2013).

査読有

DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.10.007

2. Watanabe A, Hichiri H, Takenokuchi M, Miyamoto K, Kadoyama K, Taniguchi T

アレルギー性皮膚炎の治療薬

—シコニンの効果—

Small Animal Dermatology, 9, 60-65(2013).

査読有

3. K. Miyamoto

Ubiquitination of an artificial RING finger without a substrate and a tag :

Journal of Peptide Science, 18,

135-139(2012).

査読有

DOI: 10.1002/psc.1426

4. K. Miyamoto and K. Togiya

Solution structure of LC4 transmembrane segment of CCR5:

PLoS One, 6, e20452(2011).

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0020452

[学会発表] (計 2 件)

1. Miyamoto K

An artificial ubiquitin-ligating (E3) enzyme by the method of alpha helical region substitution:

第 35 回日本分子生物学会,

福岡国際会議場(九州)

2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 11 日

2. Miyamoto K

Creation of an artificial RING finger without a substrate and a tag:

第 48 回ペプチド討論会

札幌コンベンションセンター (北海道)

2011 年 9 月 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本和英 (MIYAMOTO KAZUHIDE)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 10415317