

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770203

研究課題名(和文) Lys63型ポリユビキチン化修飾による細胞内シグナル伝達及び発癌機構の解明

研究課題名(英文) The roles of Lys63-typed polyubiquitination in cellular signal transduction and carcinogenesis

研究代表者

合田 仁(Gohda, Jin)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：90361617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ポリユビキチン化は、ユビキチンと呼ばれる低分子量タンパク質が標的タンパク質に鎖状に重合する現象である。ユビキチンの結合様式によって異なるパターンのポリユビキチン鎖が生じ、標的タンパク質に対して異なる生理作用を及ぼす。本研究では、63番目のリジン残基を介して重合するポリユビキチン化(K63型ポリユビキチン化)されたタンパク質を、細胞抽出液から精製する手法を開発した。さらに、レトロウイルスHTLV-1感染が原因である成人T細胞白血病の発症に、K63型ポリユビキチン化が関与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Polyubiquitination is the formation of an ubiquitin chain by the binding of ubiquitin molecules to a target protein. Polyubiquitin chains linked through different Lysine residues have different functions in the target proteins. In this study, I developed the method for purification of Lys63 (K63)-linked polyubiquitinated proteins from cell lysate. Furthermore, I demonstrated that K63-linked polyubiquitination is involved in the development of adult T-cell leukemia (ATL), which is caused by infection with HTLV-1, through regulation of NF- κ B activation by viral protein, Tax.

研究分野：分子生物学、細胞生物学、免疫学

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 細胞内シグナル伝達 発癌 自然免疫応答 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質のポリユビキチン化修飾は、ユビキチンと呼ばれる低分子量のタンパク質が、標的タンパク質に鎖状に重合する現象である。ポリユビキチン化修飾は、個々のユビキチンの結合様式の違いにより、いくつかの型に分類される。例えば、ユビキチンの48番目のリジン残基を介して次々とユビキチンが結合した K48 型ポリユビキチン鎖は、標的タンパク質を分解へと導く。一方、K63 型ポリユビキチン化は、標的因子の活性修飾を介し、様々な細胞内シグナル伝達経路の制御に関与すると考えられている。

(2) 特に、自然免疫応答、発癌過程において、K63 型ポリユビキチン化の重要性が示唆されている。K63 型ポリユビキチン連結酵素 TRAF6 の活性化は、主に転写因子 NF- κ B、AP-1 の活性化を誘導し、感染防御、免疫・炎症反応を制御するが、TRAF6 の活性制御機構は不明である。

(3) 一方、K63 型ポリユビキチン化修飾の異常と癌の発症・進行との関連性について示唆されている。成人 T 細胞白血病(ATL)は、レトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-I)の CD4+T 細胞への感染により引き起こされる重篤な白血病である。ATL 発症には HTLV-I 由来タンパク質 Tax による NF- κ B の活性化が必須であるが、近年、この活性化に K63 型ポリユビキチン化修飾の関与が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) K63 型ポリユビキチン修飾を受けたタンパク質を精製し、プロテオミクス解析により、それらタンパク質を網羅的に同定する実験系を樹立する。

(2) TRAF6 による K63 ポリユビキチン化誘導に関わる因子を同定し、その生理的機能を解明する。

(3) K63 型ポリユビキチン化修飾が Tax による転写因子 NF- κ B 活性化をどのように制御するのか明らかにし、ポリユビキチン化が誘導されるタンパク質を同定するとともに、それらの生理的役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) TAB2 タンパク質由来 K63 ポリユビキチン鎖 (K63 鎖) 結合領域 (NZF) を用いたアフィニティカラムを作製する。このカラムを用いて、細胞抽出液から K63 ポリユビキチン化修飾を受けたタンパク質を精製し、質量分析法によるプロテオミクス解析により、精製したタンパク質を網羅的に同定する。

(2) TRAF6 による K63 型ポリユビキチン化の誘導には、ユビキチン結合酵素(E2)が必要であると考えられる。そこで、24 種類の E2 のドミナントネガティブ変異体を作製し、それらを細胞に発現させ、TRAF6 シグナルに影響を与える E2 を同定する。

(3) Tax による NF- κ B の活性化には、リン酸

化酵素 IKK などの様々な因子の活性化が必要である。そこで、それらの因子が K63 型ポリユビキチン化修飾を受けるか検討する。修飾を受ける因子に対して、K63 鎖を特異的に脱ユビキチン化する酵素 CYLD を作用させ、NF- κ B の活性化に対する影響を検討する。

4. 研究成果

(1) K63 鎖に特異的に結合する TAB2 タンパク質の NZF 領域のペプチド(NZF-F)および一部のアミノ酸残基を置換した5種類の変異ペプチド(NZF-M, FM1-4)を合成し、担体に結合させたカラムを作製した。それぞれのカラムに対して、精製済みの K63 型ポリユビキチンを結合させたところ、NZF-F が最も効率良くポリユビキチンと結合することがわかった(表 1)。

表 1 NZF ペプチドの合成および K63 型ポリユビキチンとの結合

name	sequence	M.W. (Iso.)	amount of peptide (μ mol) ²⁾	binding ratio (%) ³⁾
NZF-F	DEGAQWNCTACTFLNHPA LIRCEQCEMPRHF	3619.567	0.55	62.5 ~ 31.3
NZF-M	DEGAQWNCTACTALNAPAIRCAQCEMPRHF	3377.462	0.38	15.6 >
NZF-FM1	DEGAQWNATAATFLNHPALIRCEQCEMPRHF	3555.623	0.15	31.3 ~ 15.6
NZF-FM2	DEGAQWNCTACTFLNHPALIRAEQAEPRHF	3555.623	0.21	31.3 ~ 15.6
NZF-FM3	DEGAQWNATAATFLNHPALIRAEQAEPRHF	3491.679	0.15	15.6 >
NZF-FM4	DEGAQWNATAATFLNAPALIRAEQAEPRAF	3359.635	0.16	15.6 >
Blocking ¹⁾				15.6 >

1) The formyl groups are blocked with 1.0 mol/L Tris-HCl buffer (pH=7.8).
 2) Amounts of each peptide (μ mol) are calculated by comparison of peak heights obtained from HPLC analysis.
 3) Binding ratios of recombinant Lys63-linked polyubiquitin chains are calculated base on the Dot plot analysis.

(2) これらの K63 鎖結合カラムを用いて、細胞抽出液中に存在する K63 型ポリユビキチン化タンパク質を精製することができるのか検討するために、HEK293T 細胞に K63 型ポリユビキチン修飾を誘導する TRAF6 を過剰発現させ、細胞抽出液を調製し、カラム精製を試みた。その結果、NZF-FM1 カラムよりも NZF-F カラムの方が、より特異的に K63 型ポリユビキチン化タンパク質を精製することがわかった(図 1)。また、NZF は Zn フィンガーであり、その構造維持には Zn イオンが必要であるが、精製中に Zn イオンを添加しない場合は、ほとんど K63 型ポリユビキチン化タンパク質に結合しなかった(図 1)。

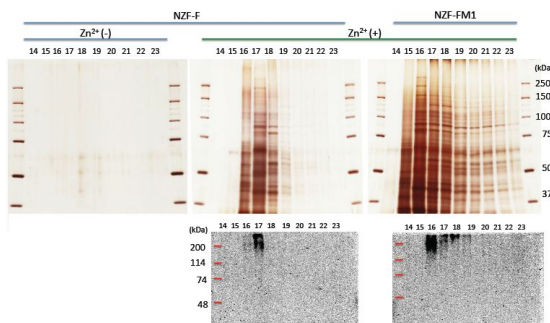


図 1 NZF カラムを用いた細胞抽出液からの K63 型ポリユビキチン化タンパク質の精製
 上段：精製画分の銀染色
 下段：抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロット

これらの結果は、NZF-F カラムを用いることで、細胞抽出液から効率良く K63 型ポリユビキチン化タンパク質の精製が可能であることを示しており、当初の目的の K63 型ポリユビキチン精製法を確立することができた。

(3) TRAF6 の K63 型ポリユビキチン化誘導に必要な E2 を同定するため、16 種類の E2 においてユビキチン結合に必要なシステイン残基に変異を入れたドミナントネガティブ変異体を作製し、TRAF6 を HEK293T 細胞に過剰発現させたときに誘導される NF- κ B 活性化に対する影響を検討した。その結果、これまで TRAF6 の E2 として知られている E2N 以外に、E2L3 の変異体が NF- κ B の活性化を抑制することが分かった。このことは、TRAF6 は、E2 を使い分けることにより、NF- κ B の活性化を制御する可能性を示唆している。今後、それぞれの E2 を介して、どのような因子が K63 型ポリユビキチン化修飾を受けるのか、樹立した精製手法を用いて、修飾タンパク質を網羅的に同定する予定である。

(4) HTLV-1 由来 Tax タンパク質による NF- κ B 活性化に対するポリユビキチン修飾の役割を明らかにするために、昆虫細胞発現系によりリコンビナント Tax タンパク質を調製し、細胞抽出液に添加することで、NF- κ B 活性化シグナルを検討した。Tax タンパク質の添加により、NF- κ B 活性化誘導に必要な I- κ B のリン酸化が検出された。一方、細胞抽出液にポリユビキチン化を阻害するリジン残基を持たないユビキチン変異体タンパク質や、リジン残基がすべてメチル化されたユビキチンタンパク質を加えた場合、I- κ B のリン酸化が顕著に抑制された。このことは、Tax による NF- κ B 活性化誘導にはポリユビキチン化反応が必要であることを示唆している。

(5) これまで Tax を細胞に発現させた場合、I- κ B のリン酸化を誘導する IKK 複合体の構成因子 NEMO が、K63 型ポリユビキチン化を受けることが知られている。しかし、NEMO のポリユビキチン化誘導は、NF- κ B 活性化に関与しないことがわかっている。そこで、新たなポリユビキチン化標的因子を探索したところ、NEMO 以外の IKK 複合体である IKKa および IKKb が K63 型ポリユビキチン化を受けることがわかった。

(6) そこで、K63 鎖を特異的に脱ユビキチン化する CYLD を共発現させたところ、Tax によって誘導される IKK のポリユビキチン化は顕著に抑制されたが、NF- κ B 活性化には影響を与えなかった。

(7) これらの結果は、Tax による NF- κ B 活性化には IKK 複合体のポリユビキチン化は関与せず、未知の因子のポリユビキチン化の関与が示唆される。現在、それら因子の同定を試みるとともに、Tax による K63 型ポリユビキチン化修飾のメカニズム、IKK 複合体のポリユビキチン化修飾の生理的役割について、解明を進めている。

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 3 件)

Kojima A, Akizawa T, Gohda J, Ueda Y, Inoue J.

Partial purification of Lys63 ubiquitinated proteins by using a column switch HPLC method.

PEPTIDE SCIENCE, 161-164, 2012

Shibata Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Han X, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J.

P47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO.

Nat. Commun., 3(1061), 1-13, 2012

Shibata Y, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J.

Activation of the I κ B kinase complex by HTLV-1 Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination.

J. Biochem., 150, 679-686, 2011

[学会発表](計 5 件)

・山村広斗、小嶋絢、合田仁、井上純一郎、谷口将済、小西元美、秋澤俊史
NZF-F ペプチドと K63 型ポリユビキチン鎖の結合性の確認
日本薬学会第 134 年会
2014 年 3 月 29 日
熊本市総合体育館

・出口隼也、小嶋絢、今村亮介、合田仁、井上純一郎、谷口将済、小西元美、秋澤俊史
カラムスイッチ HPLC を用いた TAB2 由来 NZF ペプチドの金属結合性の検討
日本薬学会第 134 年会
2014 年 3 月 29 日
熊本市総合体育館

・今村亮介、小嶋絢、出口隼也、合田仁、井上純一郎、谷口将済、小西元美、秋澤俊史
TAB2 由来 NZF ペプチドの 2 次構造解析
日本薬学会第 134 年会
2014 年 3 月 29 日
熊本市総合体育館

・Yuri Shibata, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Jin Gohda, Jun-ichiro Inoue.

P47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO.

第 35 回分子生物学会年会

2012 年 12 月 12 日

福岡国際会議場

5 Yuri Shibata, Yuetsu Tanaka, Jin Gohda,
Jun-ichiro Inoue.

Activation of the I κ B kinase complex by
HTLV-1 Tax requires cytosolic factors
involved in Tax-induced
polyubiquitination.

第 85 回日本生化学会大会

2012 年 12 月 15 日

福岡国際会議場

〔その他〕

本研究成果に関する発表論文については、東京
大学医科学研究所・分子発癌分野のホームペ
ージに掲載。

[http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Bunshi
Hatsugan/index.html](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/BunshiHatsugan/index.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

合田 仁 (GOHDA JIN)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：90361617

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：