

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580152

研究課題名(和文)機能未知F-boxタンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Identification of target substrates of uncharacterized F-box proteins.

## 研究代表者

吉田 雪子(YOSHIDA, Yukiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：90271543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：複合体型ユビキチンリガーゼとして知られるSCF型ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットF-boxタンパク質はヒトでは70種類存在するが、それら多くの標的分子は未知である。本研究では、ユビキチンリガーゼとポリユビキチン鎖結合プローブTR-TUBEを細胞に共発現させることで、基質のユビキチン化状態を細胞内で安定に保ち、効率的に基質を同定する方法を開発した。この方法を用いて、多くの細胞株や臓器で普遍的に発現し、機能が未知であったF-boxタンパク質FBX021の基質の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：The Skp1-Cul1-F-box protein (SCF) complex, one of the best-characterized ubiquitin ligases, is composed of three invariable components and a variable component F-box protein that serves as the substrate recognition subunit. Among the over 70 F-box proteins found in humans, less than half have been characterized. To identify substrates for uncharacterized F-box proteins, I developed a comprehensive method for identification of ubiquitinated substrates using the trypsin-resistant tandem ubiquitin-binding entity (TR-TUBE). The coexpression of TR-TUBE with a F-box protein stabilizes the ubiquitinated substrates by masking the ubiquitin chains. Using a combination of two strategies for enriching ubiquitinated substrates, TR-TUBE and ubiquitin Lys-e-Gly-Gly (diGly) remnant antibody, I successfully identified specific ubiquitin ligase-substrate pairs. Using this method, I identified target substrates of FBX021, an uncharacterized and ubiquitiously expressed F-box protein.

研究分野：分子生物学・糖鎖生物学

キーワード：ユビキチン ユビキチンリガーゼ F-boxタンパク質 プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン・プロテアソームシステムによる選択的タンパク質分解は、様々な生体反応において重要な役割を担っている。この系における最も重要な分子は、分解を受けるべく標的タンパク質を見分け、それにタイミング良くユビキチンを連結させる酵素「ユビキチンリガーゼ」であり、ヒトでは600種類以上存在することが知られている。その中で最もよく研究されているファミリーのひとつが Skp1, Cullin1, Roc1 と基質結合サブユニットである E-box タンパク質の4量体から構成される「SCF 複合体型ユビキチンリガーゼ」である。F-box タンパク質は SCF 複合体を構成するタンパク質の中で唯一の可変因子であり、SCF 複合体は F-box タンパク質を入れ替えることで様々な基質に対応できる。ヒトには約 70 種類の F-box タンパク質が存在するが、その標的分子が報告されているものは少ない。これまで、F-box タンパク質はそれ自身が不安定なことや、他のユビキチンリガーゼと同様にプロテアソーム阻害剤を用いても安定に基質との複合体を再現させることが難しいこととが多いため、F-box タンパク質側からその未知の標的分子を同定した例は国内・国外共にほとんどなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、効率的なユビキチンリガーゼの標的分子を同定する方法を確立することを目的とする。さらにその方法を用いて、機能未知の F-box タンパク質の標的分子を明らかにし、その機能を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) F-box タンパク質と標的分子の結合を安定化する系を用いたスクリーニング

Cullin1 と結合できない、すなわち SCF 複合体を形成できない Skp1 変異体と FLAG-F-box タンパク質を共発現させ、プロテアソーム阻害剤処理を行った細胞から、FLAG-F-box 蛋白質を免疫沈降により回収する。この共沈物の中に基質が存在するかどうかをウエスタンブロットングにより検出する。この方法により、これまで安定な結合を検出することができていなかった細胞周期関連 F-box タンパク質として知られる Skp2 とその基質である p27(Kip1)の結合を見ることが予備的な実験でできていた。この系を用いて Flag-F-box タンパク質を Skp1 変異体と共発現させ、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降物を LC-MS を用いて解析を行った。

(2) ポリユビキチン結合プローブ TR-TUBE を用いた F-box タンパク質の標的分子のスクリーニング

ユビキチン化されたタンパク質は多くの場合、プロテアソームにより分解されるために細胞内での存在量が少ないか、細胞内に存在する脱ユビキチン化酵素によりユビキチ

ン鎖をはずされてしまうため、細胞内にユビキチン鎖が付いた状態で存在する量は極わずかである。そこで、ユビキチン鎖に結合するタンパク質 TUBE(ユビキチン結合ドメイン(UBA))を4つタンデムに繋いだもの: tandem ubiquitin-binding entity)を発現させることでユビキチン化されたままの基質タンパク質を細胞内に蓄積させることができるのではないかと考えた。質量分析の際に用いるトリプシンに耐性を付与し、高いバックグラウンドになると考えられるユビキチンを保護すべく、アミノ酸置換によりアルギニンをアラニンに置換したユビキチン結合タンパク質 FLAG-TR-TUBE を発現するベクターを作成した。これを F-box タンパク質と共発現させ、FLAG-TR-TUBE を免疫沈降することで、ユビキチン化タンパク質を濃縮する。この際、内在性のユビキチンリガーゼによりユビキチン化を受けるタンパク質も多くあるため、コントロールとして、FLAG-TR-TUBE とベクターのみを発現させるもの、さらには SCF を形成できない F-box ドメインを欠いたドミナントネガティブ変異型 F-box タンパク質を FLAG-TR-TUBE と発現させたものをネガティブコントロールとして用いる。これらの3種類の免疫沈降物をトリプシン分解し、トリプシン分解の際生じるユビキチンシグニチャーを認識する diGly 抗体 (Cell Signaling 社製)を用いたペプチド免疫沈降をさらにを行い、LC-MS 解析により、タンパク質の同定を行った。3つのプロファイルと比較し、野生型 F-box タンパク質を発現させた時にのみユビキチン化ペプチドが著しく増えるタンパク質をスクリーニングする。同定法の概略を図1に示す。

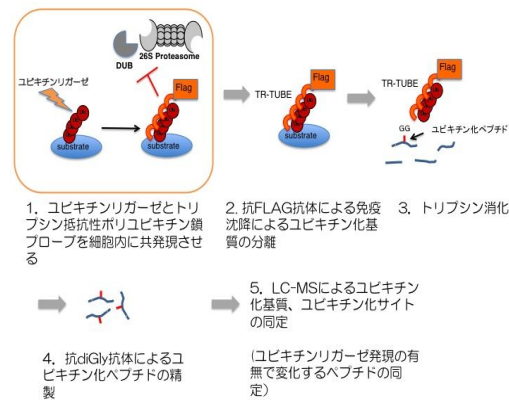


図1. ポリユビキチン化基質の効率的同定法の概略図

(3) TR-TUBE を用いたユビキチンリガーゼ基質候補の確認

細胞に TR-TUBE と F-box タンパク質、または TR-TUBE とドミナントネガティブ変異型 F-box タンパク質を共発現させ、TR-TUBE を免疫沈降する。これを、上記(2)のスクリーニング法で基質候補としてピックアップされたタンパク質の抗体を用いて、ウエスタンブロットングにより、ユビキチン化を確認する。基質である場合には、野生型 F-box

タンパク質を発現したフラクションのみに高分子のスマア-として内在タンパク質のユビキチン化が検出される。基質候補のタンパク質の良い抗体が入手・作成できない場合は、cDNA をクローニングし、Myc タグなどを付加したタンパク質を共発現し、タグ抗体を用いたウエスタンブロットングによりユビキチン化を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) F-box タンパク質と標的分子の結合を安定化する系を用いたスクリーニング

これまでに多くの研究がなされている F-box タンパク質 Skp2, BTRC(FBXW1)を用いて、条件検討を行った。その結果、既知の基質は同定されるものの、これら基質以外に数百のタンパク質が同定されてしまい、本来の基質がどれか決定するまでに相当な苦労があることが判明した。そこで、この方法によるスクリーニングを断念し、以下(2)の TR-TUBE を用いた方法に切り替えた。

(2) TR-TUBE 法を用いたユビキチン化基質検出法の確立

TR-TUBE 法により、過剰発現させた F-box タンパク質によりユビキチン化された基質が細胞内に蓄積するかどうかを F-box タンパク質 Skp2 に対する既知の基質 p27 について調べた。その結果、293T 細胞に TR-TUBE と Skp2 を発現するプラスミドをトランスフェクション後 48 時間の画分にユビキチン化された基質タンパク質の顕著な蓄積が観察された(図2)。Skp2 の他の基質 CDT1 や、他の F-box タンパク質 FBXW7, BTRC の基質でも同様の結果が得られた。さらに、F-box タンパク質以外のユビキチンリガーゼ MDM2 を用いた場合も p53 のユビキチン化が認められ、SCF 複合体以外のユビキチンリガーゼ一般に使用できるものと考えられる。また、TR-TUBE を発現させた場合には、プロテアソーム阻害剤や脱ユビキチン化阻害剤を全く添加しない条件でもユビキチン鎖が付いた内在基質が効率よく検出された。

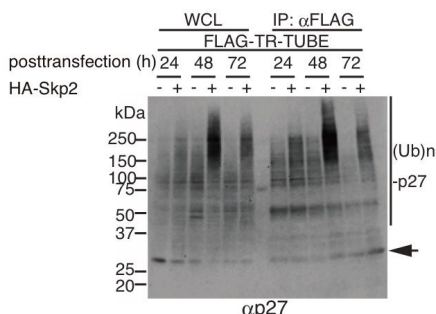


図2. TR-TUBE発現下でのSkp2による基質p27のユビキチン

(3) TR-TUBE と diGly 抗体を用いた基質同定法の確立

(2) 項の結果より、F-box の発現により顕著に内在する基質のユビキチン化物が細胞

内に蓄積することが判明した。そこで、トランスフェクション後 48 時間目の細胞を用いて、TR-TUBE による免疫沈降を行い、その沈降物をトリプシン消化し、diGly 抗体を用いた免疫沈降によりユビキチン化ペプチドを濃縮した。コントロールとして、TR-TUBE と共にドミナントネガティブ型 F-box タンパク質や F-box タンパク質を発現させないものからペプチドを同様に調整した。LC-MS により、タンパク質を同定し、野生型 F-box タンパク質を発現させた時に強く検出されるものをピックアップした。Skp2 を用いた実験では、p27, p21, CDT1 などの既知の基質はいずれも Skp2 を発現させた時に効率よく、また、再現良く検出された。

(4) 機能未知の F-box タンパク質の基質のスクリーニング

機能未知の F-box タンパク質の基質を同定するために、まず、293T 細胞の中で SCF を形成している F-box タンパク質を同定した。FLAG タグをつけた Cul1 を発現させ、免疫沈降物に含まれる F-box タンパク質を調べたところ 12 個のタンパク質が同定された。その中で全く報告の無い FBXO21 の基質を TR-TUBE 法により同定することとした。その結果、スレオニン tRNA 合成酵素(TARS)と EID1(EP300 に結合する分化抑制因子 1) の 2 つのタンパク質が再現性良く FBXO21 でユビキチン化されることが判明した(図3)。

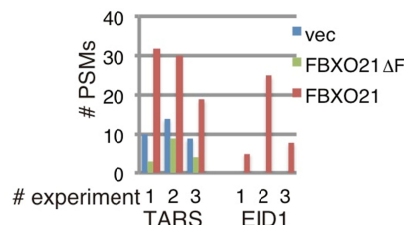


図3. TR-TUBE法によるFBXO21の基質の同定

(5) FBXO21 の基質の解析

EID1 の解析

ウエスタンブロットングにより、EID1 は FBXO21 によりユビキチン化を受けることが確認された。一方、293T 細胞で発現している FBXO21 以外の F-box タンパク質を TR-TUBE と発現させても EID1 のユビキチン化の向上は認められなかった。さらに、FBXO21 を siRNA によりノックダウンした場合には、ユビキチン化が抑えられ、EID1 タンパク質が安定化することも観察された。これらの結果より、EID1 は FBXO21 によりユビキチン化された後、プロテアソームにより分解されることが明らかとなった。これまで、いくつかの論文により、EID1 は MDM2 によりユビキチン化され、分解を受けると報告されていた。しかし、TR-TUBE を用いた系では MDM2 による EID1 のユビキチン化は検出されず、MDM2 の siRNA によるノックダウン実験においても EID1 の安

定化は認められなかった。

#### TARS の解析

TR-TUBE を用いて FBX021 による TARS のユビキチン化は検出された。しかし、TARS は tRNA の合成に必要な生命の維持に必須なタンパク質でありリボソームタンパク質並に存在量の多いタンパク質であるため、タンパク質の分解を検出することは困難であった。そのため、FBX021 によるユビキチン化は検出されてもシクロミドチェイス実験などにより、分解に関わることを証明することはできなかった。一方で、過酸化水素処理による酸化ストレスを与えることで、FBX021 による TARS のユビキチン化が増強することは認められた。しかし、この場合もタンパク量に変化は認められなかった。

#### 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)

Yoshida, Y., Saeki, Y., Murakami, A., Kawawaki, J., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Shindo, M., Tanaka, K. A comprehensive method for detecting ubiquitin ligase substrates using TR-TUBE. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**. 査読有、112 巻、2015、4630-4635. DOI: 10.1073/pnas.1422313112

##### [学会発表](計 4 件)

吉田雪子、佐伯泰、村上有沙、川脇純子、土屋光、吉原英人、進藤真由美、田中啓二。ユビキチン結合プローブ Ub-catcher を用いたユビキチン化基質の検出と同定。第 37 回日本分子生物学会年会。2014 年 11 月 26 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

吉田雪子、佐伯泰、村上有沙、土屋光、田中啓二。ポリユビキチン結合タンパク質を利用したポリユビキチン化基質の効率的同定法の確立。第 36 回日本分子生物学会年会。2013 年 12 月 5 日 神戸国際会議所(兵庫県・神戸市)

吉田雪子、村上有沙、進藤真由美、田中啓二。FBX017 is involved in formation of stress granule. 第 86 回日本生化学会大会。2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

吉田雪子、村上有沙、田中啓二。Skp1 変異体を用いた F-box 蛋白質の基質の同定。第 85 回日本生化学会大会。2012 年 12 月 15 日 博多サンパレス(福岡市・福岡県)

#### [産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称: ポリユビキチン化基質の同定方法  
発明者: 吉田雪子、佐伯泰、土屋光、村上有沙、田中啓二。  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014/08053  
出願年月日: 2014 年 11 月 13 日  
国内外の別: 外国

名称: ポリユビキチン化基質の同定方法  
発明者: 吉田雪子、佐伯泰、土屋光、村上有沙、田中啓二。  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-237362  
出願年月日: 2013 年 11 月 15 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

#### [その他]

ホームページ等  
<http://www.igakuken.or.jp/protein/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉田 雪子 (YOSHIDA, Yukiko)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員  
研究者番号: 90271543