

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659099

研究課題名(和文)新しいスカフォールド分子の生成機構とその生理的意義

研究課題名(英文) Mechanism of unanchored polyubiquitin chain production

研究代表者

服部 明 (Hattori, Akira)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50300893

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)：本研究では、遊離型ポリユビキチン鎖の生成機構を解明する目的で、タンパク質上に形成されたポリユビキチン鎖を遊離するエンド型脱ユビキチン化酵素の存在について検討した。エンド型脱ユビキチン化酵素に対する活性測定用基質および活性型酵素検出用プローブの作製に成功した。これらツールを用いた結果、がん細胞の悪性化や炎症反応の抑制に関わるエンド型脱ユビキチン化酵素が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that unanchored Lys63-linked polyubiquitin chains can act as a scaffold protein linking TAK1 and TAB2 in the NF-kappaB signaling pathway. In this study, we synthesized a novel fluorogenic substrate, x3Ub(G76V)-Ub-AMC and an activity-based probe, x3Ub(G76V)-Ub-VS, which enable detection of the unanchored polyubiquitin chain-liberating activity by a native chemical ligation strategy. We showed that the activity profile for the x3Ub(G76V)-Ub-AMC hydrolysis in MonoQ fractions of HeLa cell extract was different from those for Ub-AMC and Ub-GrB hydrolysis, suggesting a possibility of the substrate for endo-cleavage type deubiquitinating enzymes. We also revealed that the x3Ub(G76V)-Ub-AMC hydrolyzing activity in HT1080 cells was attenuated by tumor necrosis factor stimulation, suggesting an involvement of endo-cleavage type deubiquitinating enzymes in inflammatory responses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：ユビキチン 脱ユビキチン化酵素 activity-based probe

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のユビキチン化 (Ub) 修飾は様々な生理機能に関わる重要な翻訳後修飾である。標的タンパク質上の Lys 残基 ε アミノ基と Ub の C 末端カルボキシル基との間にイソペプチド結合が形成することで Ub が付加され、その後、Ub 分子内のアミノ基に対して別の Ub 分子の C 末端が次々に結合して Ub 鎖が形成される。

ごく最近、遊離型の Lys63 結合型ポリ Ub 鎖が、dsRNA に応答する自然免疫シグナル伝達経路の重要なスキャフォールド分子として機能する可能性が提示された。しかしながら、この遊離型ポリ Ub 鎖の生成機構は全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

遊離型ポリ Ub は、タンパク質上で形成された Lys63 結合型ポリ Ub 鎖が脱ユビキチン化酵素 (DUB) によって遊離されることで生成すると推察される。しかしながら、ポリ Ub 鎖のまま遊離することができる「エンド型 DUB」の存在は知られていない。従来の DUB 研究で用いられてきた市販の活性測定基質では、エキソ型とエンド型 DUB の活性を区別することができない。そこで本研究では、エンド型 DUB に選択性を持たせた独自の基質やプローブを開発し、それを用いて生化学・細胞生物学的解析を展開することでエンド型 DUB の分子実体を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

x3Ub(G76V)-Ub-GrB タンパク質はバキュロウイルス発現系によって発現し、Ni²⁺-NTA カラムによって精製した。granzyme B (GrB) をレポーターとして用いたエンド型 DUB 活性の測定は、DUB の作用によって生成した成熟型 GrB とその特異的蛍光基質である IETD-AMC を反応させ、遊離した AMC の量を蛍光プレートリーダーにて定量することにより行った。

各種培養細胞の細胞抽出液は、各細胞を 0.5% Triton-X100 を含む低張バッファーに溶解後、遠心分離によって得られた上清を用いた。各細胞抽出液を陰イオン交換カラム (MonoQ カラム) により分画した後、各画分に含まれるエンド型 DUB 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) エンド型 DUB 活性測定用基質 x3Ub(G76V)-Ub-GrB の作製

我々は、従来の研究にてユビキチン (Ub) と成熟型 GrB との融合タンパク質 (Ub-GrB) を作製し、これが新しい DUB 活性測定用基質として有用であることを示している。そこで Ub-GrB のエンド型 DUB 用基質への改変を試みた。

4 分子の Ub からなる直鎖 Ub を作製し、その C 末端側に GrB を連結した融合タンパ

ク質をコードする x3Ub(G76V)-Ub-GrB 遺伝子を作製した。その際、DUB による N 末端側からの Ub 分子の遊離を防ぐ目的で、N 末端側 3 分子の Ub に対しては Gly-76 残基から Val 残基への置換変異を導入した。x3Ub(G76V)-Ub-GrB 発現バキュロウイルスを作製し、Sf9 細胞に感染させた。感染 72 時間後の培養上清を回収し、陰イオン交換クロマトグラフィー、Ni²⁺-キレートクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーを組み合わせて、x3Ub(G76V)-Ub-GrB を精製した。

(2) エンド型 DUB 活性測定用基質 x3Ub(G76V)-Ub-AMC の作製

前項と同様に蛍光物質 aminomethyl coumarin (AMC) を利用したエンド型 DUB 基質の作製を試みた。x3Ub(G76V)-Ub-GrB と同様に N 末端側 3 分子の Ub には Gly76Val 変異を導入した Ub 鎖 x3Ub(G76V)-Ub(1-75) と intein との融合タンパク質 x3Ub(G76V)-Ub(1-75)-intein を大腸菌発現系にて発現させた。x3Ub(G76V)-Ub(1-75)-intein を Ni²⁺-キレートカラムに吸着させた後、2-mercaptoethane sulfonate Na (MesNa) を反応させ、x3Ub(G76V)-Ub(1-75)-MesNa を得た。N-hydroxysuccinimide (NHS) を用いた活性化の後、native chemical ligation によって Gly-AMC を付加することで x3Ub(G76V)-Ub-AMC を得た。

(3) エンド型 DUB 検出用 activity-based probe の作製

x3Ub(G76V)-Ub の C 末端側に酵素活性中心の SH 基によって求核攻撃を受けうる反応官能基を付加した Activity-based probe の作製を試みた。前項にて作製した x3Ub(G76V)-Ub(1-75)-MesNa を NHS を用いて活性化した後、glycine vinylmethyl sulfone を用いた native chemical ligation によって x3Ub(G76V)-Ub-VS を得た。

(4) エンド型 DUB 活性の検出

本研究にて作製したエンド型 DUB 用基質の有用性について検討を行った。HeLa 細胞抽出液を調製した後、陰イオン交換カラムによって分画した。各溶出画分中に含まれる x3Ub(G76V)-Ub-GrB 分解活性を測定したところ、1 つのピークとして観察された。一方、上記画分中の Ub-GrB 分解活性ならびに市販基質である Ub-AMC 分解活性は複数ピークとして得られたことから、x3Ub(G76V)-Ub-GrB 基質が特定のエンド型 DUB に対する活性測定基質としてなりうる事が示された。

また、x3Ub(G76V)-Ub-AMC についても HeLa 細胞抽出液を用いて評価を行った結果、x3Ub(G76V)-Ub-GrB とは異なる活性プロファイルが観察され、各基質がエンド型 DUB

の活性測定に有用であることが示された。

(5) 細胞内エンド型 DUB 活性プロファイルの細胞間比較ならびに動態解析

ヒト二倍体線維芽細胞培養細胞株 IMR90 細胞とヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 細胞のエンド型 DUB 活性プロファイルを比較検討した。x3Ub(G76V)-Ub-AMC 基質を用いた解析の結果、各細胞から調製した細胞抽出液の MonoQ カラム分離後の各画分における x3Ub(G76V)-Ub-AMC 分解活性プロファイルは互いに大きく異なっており、IMR90 細胞では2つのピークからなるプロファイルが得られたのに対して、HT1080 細胞では3つのピークが得られた。また、いずれの活性画分においても、HT1080 細胞の方が IMR90 細胞に比べて高いエンド型 DUB 活性が認められた。これらの結果は、エンド型 DUB 活性とがん細胞の悪性化との関連を示唆するものであり興味深い。

また、HT1080 細胞をマクロファージが産生し、炎症反応の惹起に深く関わるサイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) で刺激した際におけるエンド型 DUB 活性の挙動を解析した。その結果、当初の予想に反して、エンド型 DUB 活性は TNF 刺激によって低下することを見出した。このことから、エンド型 DUB 活性が炎症反応を抑制している可能性が示唆された。

さらに現在、上記の解析にて見出した HT1080 細胞の x3Ub(G76V)-Ub-AMC 分解活性画分に含まれるエンド型 DUB を同定するため、本研究にて作製した activity-based probe を用いた解析を進めている。

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 11 件)

1. Goto Y, Ogawa K, Nakamura TJ, Hattori A, Tsujimoto M. (2014) TLR-Mediated Secretion of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 from Macrophages. **J Immunol.** 192: 4443-4452 (査読有) 10.4049/jimmunol.1300935.
2. Ogawa Y, Ohnishi A, Goto Y, Sakuma Y, Watanabe J, Hattori A, Tsujimoto M. (2014) Role of glutamine-169 in the substrate recognition of human aminopeptidase B. **Biochim Biophys Acta** 1840: 1872-1881 (査読有) 10.1016/j.bbagen.2014.01.002
3. Hattori A, & Tsujimoto M. (2013) Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry,

physiology and pathology. **J Biochem** 154: 219-228 (査読有)

10.1093/jb/mvt066

4. Ohno Y, Hattori A, Yoshiki T, & Takeya H. (2013) Association of epigenetic alterations in the human C7orf24 gene with the aberrant gene expression in malignant cells. **J Biochem** 154: 355-362 (査読有) 10.1093/jb/mvt063
5. Mizutani S, Tsunemi T, Mizutani E, Hattori A, Tsujimoto M, & Kobayashi H (2013) New insights into the role of aminopeptidases in the treatment for both preeclampsia and preterm labor. **Expert Opin Investig Drugs** 22:1425-1436 (査読有) 10.1517/13543784.2013.825248
6. Nagamoto Y, Hattori A, Takeya H, Takemoto Y, & Takasu K (2013) pH-sensitive DNA cleaving agents: in situ activation by ring contraction of benzo-fused cyclebutanols. **Chem Commun** 49: 262-264 (査読有) 10.1039/c3cc39246e.
7. Otsuki S, Nishimura S, Takabatake H, Nakajima K, Takasu Y, Yagura T, Sakai Y, Hattori A, & Takeya H (2013) Chemical tagging of a drug target using 5-sulfonyl tetrazole. **Bioorg Med Chem Lett** 23:1608-1611 (査読有) 10.1016/j.bmcl.2013.01.092.
8. Hattori A, Goto Y & Tsujimoto M (2012) Exon 10 coding sequence is important for endoplasmic reticulum retention of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. **Biol Pharm Bull** 35:601-605 (査読有) 10.1248/bpb.35.601
9. Ohno Y, Hattori A, & Takeya H (2012) C7orf24/gamma-glutamyl cyclotransferase as a molecular target for cancer chemotherapy. **Nihon Rinsho**, 70:723-727 (査読有)
10. Horie A, Fujiwara H, Sato Y, Suginami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I, & Hattori A (2012) Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. **Hum Reprod** 27: 1267-1276 (査読有) 10.1093/humrep/des068

11. Kishimoto S, Tsunematsu Y, Nishimura S, Hayashi Y, Hattori A, & Kakeya H (2012) Tumescenamide C, an antimicrobial cyclic lipodepsipeptide from *Streptomyces* sp. ***Tetrahedron*** 68: 5572-5578 (査読有)
10.1016/j.tet.2012.04.075

〔学会発表〕(計7件)

1. 脱ユビキチン化酵素(USP)47 の分子内ドメインの機能解析
青木 豊, 朴 錦花, 小林万祐子, 服部明, 掛谷秀昭
日本薬学会 134 年会 平成 26 年 3 月 27 日 ~ 30 日 熊本大学 (熊本県)
2. 脱 Urm1 化活性の検出および分子同定
小林万祐子, 服部明, 青木 豊, 掛谷秀昭
日本薬学会 134 年会 平成 26 年 3 月 27 日 ~ 30 日 熊本大学 (熊本県)
3. 脱ユビキチン化酵素(USP)47 の活性発現機構の解析
朴 錦花, 服部明, 青木 豊, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
日本薬学会第 133 年会 平成 25 年 3 月 27 日 ~ 30 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
4. 脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 は酸化ストレスの標的タンパク質である
服部明, 西川未来子, 朴 錦花, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
第 85 回日本生化学会 平成 24 年 12 月 14 日 ~ 16 日 福岡国際会議場(福岡県)
5. 脱ユビキチン化酵素(USP)47 の活性発現における分子内ユビキチン様ドメインの役割
朴 錦花, 服部明, 青木 豊, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
第 85 回日本生化学会 平成 24 年 12 月 14 日 ~ 16 日 福岡国際会議場(福岡県)
6. Activity-based Profiling による酸化ストレス感受性脱ユビキチン化酵素の同定
服部明, 西川未来子, 朴 錦花, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会 平成 24 年 6 月 7 日 ~ 9 日 京都大学 (京都府)
7. Enzymatic properties of recombinant human ubiquitin specific protease 47
朴 錦花, 田代亜衣香, 西川未来子, 森吉英子, 服部明, 掛谷秀昭

Organization for Oncology and Translational Research (OOTR) 8th Annual Meeting 平成 24 年 4 月 20・21 日 ウェスティン都ホテル(京都府)

〔図書〕(計1件)

1. Hattori A, Maruyama M, Fujiwara H, & Tsujimoto M (2013) Aminopeptidase Q/Laeverin. ***in Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed*** 442-444 (査読有)
10.1016.B978-0-12.382219-2-00089-2
6. 研究組織
- (1)研究代表者
服部明 (HATTORI AKIRA)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号: 50300893
 - (2)研究分担者
大石真也 (OISHI SHINYA)
京都大学・薬学研究科・講師
研究者番号: 80381739
 - (3)連携研究者
西村慎一 (NISHIMURA SHINICHI)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号: 30415260