

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 24 年度博士課程 進学
氏名 土屋 光
指導教員名 秋山 徹

論文題目

質量分析計を用いたユビキチンシグナルの網羅的解析

ユビキチンによるタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質分解のみならず、シグナル伝達や、タンパク質の細胞内輸送など広汎な生命機能を制御することが明らかとなってきた。ユビキチン修飾にはモノユビキチン化と 8 種類の異なる構造のポリユビキチン鎖（異なるリジン残基を介して連結した K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K33 鎖、K48 鎖、K63 鎖及び、N 末端のメチオニンを介して連結した M1 鎖）が存在する。さらに近年では、異なる種類のユビキチン鎖が連結した混合鎖や、一つのユビキチンに複数のユビキチン鎖が付加した分岐鎖など複雑なユビキチン鎖も細胞内に存在することが示唆されている。多種多様な構造のユビキチン修飾が使い分けられることでユビキチン修飾は多彩な機能を発揮することが明確となってきた。例えば、K48 鎖はプロテアソームによるタンパク質分解シグナルとして機能し、K63 鎖はタンパク質輸送、シグナル伝達や DNA 修復等に関与することが知られている。しかしながら、その他のユビキチン鎖や混合鎖、分岐鎖の機能は明確ではない。その理由の一つとして、微量なユビキチン鎖を細胞抽出液から直接定量することが依然として困難であることが挙げられる。近年、ポリユビキチン鎖の種類を識別するもっとも有効な手法として質量分析計 (MS) が注目されている。本研究では、ユビキチンシグナルを解明することを目的として MS を用いたユビキチン鎖の超高感度絶対定量法を確立した。さらにユビキチン修飾のデコーダー分子であるユビキチン結合タンパク質群のユビキチン鎖選択性を網羅的に解析した。

質量分析計を用いたユビキチン鎖の絶対定量法の確立

本研究では、高分解能質量分析計 QqOrbitrap 型 MS によるターゲットプロテオミクスの新手法 Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法を用いることで複雑試料中からユビキチン鎖を絶対定量する方法を開発した (Ub-PRM 法)。本手法は従来型 MS の定量法 (QqQ 型 MS による selective reaction monitoring 法) と異なり

フラグメントイオンを高分解能の Orbitrap 部にて分離、検出するため、複雑試料中においても目的のペプチドを高 S/N 比 (Signal-to-noise ratio) で検出することが可能である。8 種類の鎖特異的ユビキチンペプチドについて安定同位体標識したコントロールペプチド (absolute quantification: AQUA ペプチド) を作成し、機器を最適化することで全ての種類のユビキチン鎖を少なくとも 100 amol から定量可能であることを明らかにした (Fig.1)。まず、ユビキチン依存性タンパク質分解系のモデル基質 Ub-P-βgal (Ubiquitin-Pro-βgal) のユビキチン化を解析することにより本手法の有用性を検討した。その結果、野生株において、Ub-P-βgal は K29 鎖及び K48 鎖が 1 : 5 の比で結合した混合型のユビキチン化修飾を受けることが明らかとなった。次いで、Ub-P-βgal のユビキチン化酵素変異株を用いた解析により K29 鎖は Ufd4 により付加され、さらに Ufd2 (ユビキチン鎖伸長因子) により K48 鎖が付加されることが明らかとなった。以上より本手法は複雑なユビキチンシステムを解析するために有用な定量法であると考えられる。

ユビキチン結合タンパクのユビキチン鎖選択性の網羅解析

ユビキチン結合タンパク質は、基質上のユビキチン鎖を識別し、下流の因子に情報を伝達するデコーダー分子であると考えられている。これまでユビキチン結合タンパク質のユビキチン鎖選択性は主に構造生物学または試験管内の結合で評価されてきたが、多くのユビキチン結合ドメインはユビキチン鎖選択性があまりみられず、細胞内のユビキチン鎖識別機構には不明な点が多い。私の開発した Ub-PRM 法は超微量なユビキチン鎖を絶対定量できるため、内在性の発現レベルでの解析が可能である。そこで出芽酵母における主要な 14 種類のユビキチン結合タンパク質に FLAG タグを付加した株を用いてユビキチン結合タンパク質に結合しているユビキチン鎖を網羅的に解析することにより、ユビキチン鎖の使い分けを直接評価できると考えた。さらにユビキチン結合タンパク質自身に付加されたユビキチン修飾の影響を除外するために、ユビキチン鎖に対する高親和性結合プローブ (trypsin-resistant tandem ubiquitin-binding entities: TR-TUBE) を

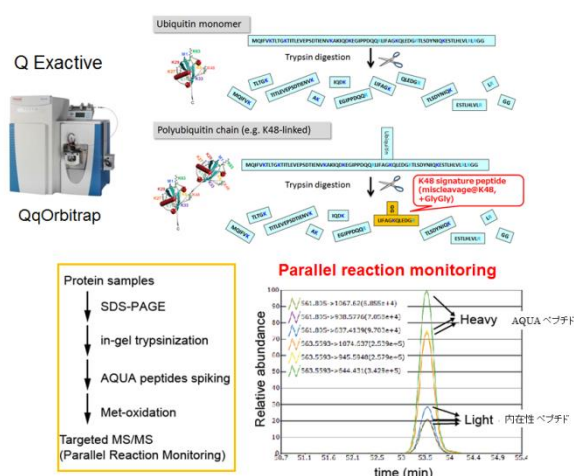


Fig.1 Ub-PRM 法の概略図

利用した2段階精製を行った。

ユビキチン結合タンパク質に結合しているユビキチン鎖の絶対定量を行ったところ、プロテアソーム分解に関与する Rad23、ユビキチン化基質の仕分けに関与する Cdc48/p97 のコファクターで Ufd1 及び Npl4 は細胞内において他のユビキチン結合タンパク質より著しく強くユビキチン鎖と結合することが明らかとなった。また予想通り、これらユビキチン結合タンパク質は K48 鎖に対して高い選択性を示した (90%以上)。対照的にエンドサイトーシス、MVBs (multivesicular bodies) 輸送やオートファジーなどのタンパク質輸送に関与する一連のユビキチン結合タンパク質は K63 鎖に対して選択性を示したが (40~70%)、K48 鎖も結合していることが明らかとなった。そこで以降の研究では主にエンドサイトーシスに関与する Ent2 及び MVBs 輸送に関与する Vps27 に着目し研究を進めた。

Ent2 が認識するユビキチン鎖の種類解析

Ent2 はエンドサイトーシス制御に関与するユビキチン結合タンパク質である。Ent2 の下流で機能するアクチン重合タンパク質 Sla1 の遺伝子破壊株において Ent2 に結合するユビキチン鎖が増加した。Ub-PRM 法により定量したところ、K48 鎖ではなく K63 鎖のみが増加していることが明らかとなった。よってエンドサイトーシスによる基質の取り込みにおいて K63 鎖が重要であることが示唆された。

ユビキチンリガーゼ Rsp5 は、膜タンパクなどの基質をユビキチン化することが知られている。RSP5 は生存に必須であるため、オーキシン誘導デグロン (auxin-induced degron: AID) 法を用いて条件的に Rsp5 を欠失させたとき Ent2 に結合するユビキチン鎖を解析した。その結果、Rsp5 の分解誘導により Ent2 に結合する K63 鎖が減少した。以上の結果より、Ent2 は細胞膜上で Rsp5 が基質に付加した K63 鎖を認識していることが明らかとなった。

Vps27 が認識するポリユビキチン鎖の解析

ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) はエンドソーム上のユビキチン化基質を識別し MVBs を介して液胞へ輸送する経路を制御する複合体である。ESCRT で最も初期に機能する ESCRT-0 の構成因子 Vps27 に結合するポリユビキチン鎖を解析した。まず、Vps27 とヘテロダイマーを形成する Hse1 の遺伝子破壊株において Vps27 に結合する K48 鎖及び K63 鎖が減少した。さらに、後期エンドソーム内腔への取り込みに重要な機能を果たす Vps4 の遺伝子破壊株において Vps27 と結合する K48 鎖及び K63 鎖が増加した。以上の結果より、Vps27 はエンドソーム上で K48 鎖及び K63 鎖の両方を認識していることが示唆された。

Vps27 に結合するユビキチン鎖の由来

上記の結果よりエンドソームには K48 鎖及び K63 鎖の両方が輸送されていることが

示唆された。そこで、以後の研究では Vps27 が認識する K48 鎖及び K63 鎖がどこで生じるか検討した。まず、AID 法により Rsp5 を分解誘導した際の Vps27 に結合するユビキチン鎖を解析したところ K63 鎖が減少した。よって K63 鎖はおそらくエンドサイトーシスされた膜タンパク質に由来することが示唆された。次に、Vps27 が認識するユビキチン化基質が小胞体 (ER) からゴルジ体を経て送られてくる可能性を検討した。ER-ゴルジ体間のタンパク質輸送に必須な Sec12 の温度感受性変異株 (*sec12-4*) を用いて Vps27 に結合するポリユビキチン鎖を解析したところ、Vps27 に結合する K48 鎖が増加した。このことから、Vps27 に結合する K48 鎖は小胞体からゴルジ体を介さず直接送られてくることが示唆された。さらに小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD) に関与するユビキチン化酵素 Ubc7 の遺伝子破壊株においても Vps27 に結合する K48 鎖が減少した。これらの結果から、Vps27 により認識される K63 鎖は Rsp5 に由来し、K48 鎖は ERAD 関連因子に由来していることが示唆された。

以上述べたように本研究ではユビキチン鎖の超高感度絶対定量法 Ub-PRM 法を確立した。これにより、解析が困難であった内在性の発現レベルでのユビキチン鎖の解析が可能となった。さらに本手法を用いてユビキチン結合タンパク質のユビキチン鎖選択性を網羅的に解析した。その結果、細胞内には K48 鎖が大量に存在し、Rad23 や Cdc48 がこれをプロテアソームに運ぶことが明らかとなった。一方、K63 鎖はエンドサイトーシス、MVBs やオートファジーにおけるタンパク質輸送に関与することが明確となった。また、新しい知見として ERAD 関連因子により付加された K48 鎖が Vps27 を介して液胞に輸送されるという新しい経路の存在が示唆された (Fig.2)。近年ユビキチン修飾系の破綻ががんや神経変性疾患等の様々な疾患と深く関与していることが明らかとされている。本研究により開発した新規手法を応用することにより、生命現象の解明及び病態解明につながることを期待される。

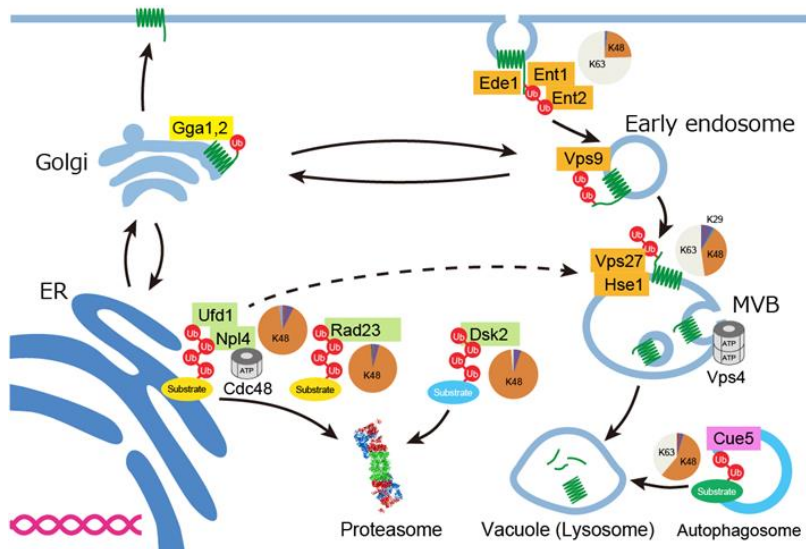


Fig.2 本研究の概略図