

博士論文（要約）

質量分析計を用いたユビキチンシグナルの
網羅的解析

土屋 光

目次

要旨	… 1
略語一覧	… 5
序章	… 7
材料と方法	… 24
第1章	
緒言	… 38
結果	… 39
考察	… 44
図表	… 47
第2章	
緒言	… 59
結果	… 60
考察	… 69
図表	… 74
総合討論	… 102
参考文献	… 108
謝辞	… 115

略語一覽

AID: Auxin inducible degron
AQUA: absolute quantification
 β gal: β -galactosidase
CUE: Coupling of Ubiquitin to ER degradation
DUIM: double-sided ubiquitin-interacting motif
E1: ubiquitin activating enzyme
E2: ubiquitin conjugating enzyme
E3: ubiquitin-protein ligase
EH: Eps15-Homology
ENTH: Epsin N-terminal homology
ER: Endoplasmic Reticulum
ERAD: ER-associated degradation
ESCRT: endosomal sorting complexes required for transport
GAT: GGA and Tom1
GLUE: gram-like ubiquitin-binding in Eap45
LC: liquid chromatography
LLOQ: lower limit of quantitation
MS: mass spectrometry
MVB: multivesicular body
NEMO: NF- κ B essential modulator
NZF: Npl4 Zinc Finger
NZF UBP: zinc-finger ubiquitin-binding protein
NZF A20: zinc-finger in A20 protein
PFU: PLAA family ubiquitin-binding motif
PRM: parallel reaction monitoring
RBR: RING between RING fingers
PRU: pleckstrin-like receptor for ubiquitin
SRM: selective reaction monitoring
TUBE: tandem ubiquitin binding entity
Ub: ubiquitin
UBA: ubiquitin associated domain
UBAN: ubiquitin binding in ABIN and NEMO
UBD: ubiquitin-binding domain

UBM: ubiquitin-binding motif
UBL: ubiquitin-like
UBZ: ubiquitin-binding zinc finger
UEV: ubiquitin E2 variant
UFD: ubiquitin-fusion degradation
UIM: ubiquitin-interacting motif
VHS: Vps27/Hrs/STAM
WT: wild type

序章

序

細胞は自身を構成するタンパク質の分解と合成を繰り返すことにより恒常性を維持している。細胞内タンパク質分解系は、変性タンパク質などの不要タンパク質の除去のみならず、細胞内外の刺激や環境変化に応答して特定のタンパク質の量を調節することにより様々な細胞内機能を制御している。ユビキチン依存的タンパク質分解は ATP 依存的な非リソソームタンパク質分解経路として発見され、本分解経路の重要な構成因子としてユビキチン及びプロテアソームが同定された。その後、ユビキチンによるタンパク質分解系が、細胞周期の進行やシグナル伝達機構において必須の役割を果たすことが相次いで明らかとなり、ユビキチン依存的タンパク質分解系の研究は飛躍的に発展し、2004年にノーベル賞を受賞するなど細胞内におけるタンパク質分解系の重要性は生命科学全般に深く浸透している。

タンパク質分解系の一部として発見されたユビキチン修飾であるが、21世紀に入り、ユビキチン修飾がプロテアソーム依存的なタンパク質分解以外の機能、例えば DNA 修復や膜タンパク質の輸送、シグナル伝達などに関与することが相次いで報告され、今日では「ユビキチン修飾＝タンパク質分解」ではなく、リン酸化のような可逆的な翻訳後修飾として多彩な機能を発揮することが明らかとなってきた。さらに、ユビキチン修飾系の異常ががんや神経変性疾患など、様々な難治性疾患と密接に関与していることが明らかとなってきており、ユビキチン修飾系による生体調節機構は基礎研究のみならず臨床や創薬という視点からも注目される研究分野となっている。

ヒトゲノムにはユビキチン関連因子が 1000 種類以上コードされており、ユビキチン修飾によるタンパク質の機能制御は、リン酸化修飾による調節に匹敵する、非常に複雑なものであると考えられる。ユビキチン修飾が多様な生命現象を制御できる要因として、関連因子の多様性のみならず、ポリユビキチン鎖が多種多様の構造をとりえることが挙げられる。ユビキチン修飾にはモノユビキチン化と 8 種類のポリユビキチン鎖 (K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K29 鎖、K33 鎖、K48 鎖、K63 鎖及び M1 鎖) が存在し、ユビキチン鎖の「長さ」も機能上重要であること、さらには分岐鎖など複雑な構造をもつユビキチン鎖が存在することから、ユビキチン修飾の構造は、ユビキチン鎖の「種類」、「長さ」、「複雑さ」の 3 つの機能的な要素から成り立つと考えられる。このユビキチン鎖が持つ膨大な情報は、ゲノム遺伝子に刻印されたものでなく「ユビキチンコード」と呼ばれている (後述)。ユビキチン研究の進展に伴い、様々な手技、手法が開発されてきたが、現在の我々の知見は断片的かつ限定的であり、ユビキチンシグナル発動のメカニズムには不明な点が多く残されている。

ユビキチン鎖の種類を決定するもっとも有効な手法として注目されているのが質量分析計 (mass spectrometry: MS)を用いた解析法であるが、ユビキチン修飾は一過的かつ微量であるため、細胞抽出液といった複雑な生物試料からユビキチン鎖を直接定量することは、極めて困難である。そこで、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、高分解能質量分析計を用いたユビキチン鎖の超高感度絶対定量法の開発とそれを応用したユビキチン修飾の生物学的意義の解明を試みた。

ユビキチン結合タンパク質は、基質タンパク質に付加された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 (ユビキチンコードを解読する)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・相互作用解析で評価されてきたが、不思議なことに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。そこでユビキチン鎖の超高感度絶対定量法を用いて出芽酵母の主要なユビキチン結合タンパク質 14 種類について結合しているユビキチン鎖を網羅的に解析し、ユビキチン鎖の使い分けを直接評価した。

まず、序論では、多彩なユビキチン修飾、UFD (ubiquitin-fusion degradation) 経路、ユビキチン結合タンパク質、ユビキチン鎖の種類を決定する手法について概説し、本研究の目的および本論文の構成を述べる。

第一節 ユビキチン修飾系について

1. ユビキチン付加反応について

ユビキチンは標的タンパク質のリジン残基を介して共有結合することにより標的タンパク質を修飾 (ユビキチン化)する 8.6 kDa の低分子量タンパク質である。ユビキチン修飾系はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3: 連結酵素)から構成される一連の酵素群が触媒するカスケードにより成り立っている (Fig.0-1)¹。まず、E1 酵素が ATP 依存的にユビキチンとチオエステル結合を形成し、これを E2 に受け渡す。E3 リガーゼは基質タンパク質を選択的に認識しユビキチンを付加する。E3 リガーゼはドメイン構造により 2 種類に大別される。一つは RING フィンガーまたは RING フィンガー類似構造である U-box を有するユビキチンリガーゼであり²、E1 で活性化されたユビキチンとチオエステル結合した Ub-charged E2 (E2-Ub)と基質の両方が同時に会合するプラットフォームとしての役割を有し、両者の空間的近接性を確保してユビキチンの基質への付加反応を促進させる機能を有している酵素である。もう一方は HECT ドメインを有するユビキチンリガーゼであり³、E2-Ub よりユビキチンをチオエステル結合として受け取り基質にユビキチンを付加する酵素活性を有する。また 2 つの RING フィンガードメイン (RING1 と RING2) を持った RBR (RING between RING fingers) 型酵素 (RING1 でユビ

キチンとチオエステル結合しこのユビキチンを RING2 で基質に受け渡す Parkin や LUBAC などの hybrid 型酵素)も知られている⁴。さらに、ユビキチン鎖伸長因子 (E4)の存在も知られており、基質に付加されたユビキチンを認識しユビキチン鎖を伸長させる⁵。ユビキチン修飾系はリン酸化と同様に可逆的な翻訳後修飾であり、ユビキチン鎖を切断する脱ユビキチン化酵素 (deubiquitylating enzyme : DUB)が細胞内には約 100 種類程度存在する⁶。脊椎動物において E1 は 2 種類、E2 は約 40 種類、E3 リガーゼは約 600 種類存在し、基質特異性は E3 リガーゼにより規定されていると考えられている⁷。近年のヒトプロテオーム解析により、約 5,000 個のタンパク質がユビキチン化されうることが見出されており^{8,9}、細胞内では非常に多くのタンパク質がユビキチン修飾による制御を受けていることが明らかとなってきた。

2. ユビキチン修飾の構造と機能の多様性

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シグナルとしてのみならず、シグナル伝達や DNA 修復、タンパク質の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^{1,10,11}。前述の通り、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、さらには、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 (Fig.0-2)^{12,13}。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標的タンパク質の運命や機能が決定されることが考えられており、現在、ユビキチン修飾の構造多様性はユビキチンコードと称されるに至っている¹¹。例えばユビキチンの 48 番目のリジンを紹介して連結した K48 鎖はプロテアソームによるタンパク質分解のための標的シグナルとして機能する¹⁴。K63 鎖はシグナル伝達、DNA 修復や膜タンパク質の輸送などに関与することが知られている¹⁵。また近年、M1 鎖が NF- κ B シグナルの活性化に関与することが報告されている¹⁶。しかしながら、非定型ポリユビキチン鎖 (K6-、K11-、K27-、K29-、K33 鎖)は細胞内においてその存在が報告されているものの^{17,18}、機能が明確となっていない。また混合鎖や分岐鎖など複雑な構造を持つポリユビキチン鎖の細胞内での機能はほとんど未知である。一方、ユビキチン鎖の長さも重要であり、プロテアソームによるタンパク質分解には 4 つ以上の長さのユビキチン鎖が必要であることが試験管内の結合実験により明らかとなっている¹⁹。しかし、近年では、試験管内において K11 鎖や K63 鎖などのユビキチン鎖もプロテアソームの分解シグナルとなること^{20,21}、分子量の小さい基質タンパク質はモノユビキチン化のみでプロテアソーム分解を促進させるという報告もあり^{22,23}、試験管内の解析のみでユビキチン修飾の使い分けを議論することは限界がある。そこで、細胞内の内在性のユビキチン修飾を直接解析しようという必要性・機運が生まれているが、ユビキチン修飾は一過的かつ微量であるため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り、高感度定量法などの革新的な技術開発が待たれてきた。

第二節 UFD (ubiquitin-fusion degradation) 経路について

ユビキチンと β -ガラクトシダーゼ (β gal)の間に任意のアミノ酸 (X) を挿入した融合した人工タンパク質 (Ub-X- β gal)を細胞内に発現させると脱ユビキチン化酵素によりユビキチンが切断される。その結果、露出した N 末端のアミノ酸 X により β gal の安定性が規定される分解様式を N 末端則という^{24,25}。しかしながら、Ub-P- β gal (Ubiquitin-Pro- β gal)または Ub^{G76V}-V- β gal はユビキチンが切断されず、N 末端のユビキチンがデグロンとして認識されポリユビキチン鎖が付加しプロテアソーム分解へと導かれる。この融合タンパク質の分解にかかわる経路は UFD (ubiquitin-fusion degradation) 経路とよばれる²⁶。UFD 経路は酵母から哺乳類まで保存されているが²⁷、出芽酵母においてその解析が進んでおり、ユビキチン化酵素として E2 の Ubc4/5、ユビキチンリガーゼ Ufd4、ユビキチン鎖伸長因子 (E4) Ufd2 が同定されている^{5,28}。Ufd4 は 167 kDa の HECT 型 E3 であり、N 末端のユビキチンをデグロンとして認識し、UFD 基質をユビキチン化する。内在性の UFD 基質についての知見は少ないが、Ufd4 は E2 の Ubc7 及び DNA メチルトランスフェラーゼ Mgt1 (O-6-methylguanin-DNA methyltransferase)をユビキチン化しプロテアソーム分解に導くことが報告されている^{29,30}。また、Ufd4 は N 末端則に関連するユビキチンリガーゼ Ubr1 と相互作用し、N 末端則と UFD 経路の両方の活性化に関与することが報告されている³¹。点変異体ユビキチンを用いた解析により UFD 基質のユビキチン化にはユビキチンデグロンの K29 残基が必要であったことから⁵、Ufd4 は UFD 基質のユビキチンデグロンに K29 鎖のポリユビキチンを付加することが示唆されている。さらに、*in vitro* の解析により Ufd2 は Ufd4 が付加したポリユビキチン鎖にさらに K48 鎖を伸長することが示されている²⁸。本研究では Ub-P- β gal のユビキチン化を解析することによって、開発したポリユビキチン鎖定量法の有効性を検討した。

第三節 ユビキチン結合タンパク質について

1. ユビキチン結合タンパク質の種類とユビキチンとの結合について

第一節で述べたように細胞内には多彩な構造のポリユビキチン鎖が存在し、これらを使い分けられることによりユビキチン修飾が多彩な機能を発揮すると考えられている³²。ユビキチン結合ドメイン (ubiquitin-binding domain: UBD)を持つタンパク質 (ユビキチン結合タンパク質)は基質に付加したユビキチン鎖を認識し、下流の因子に情報を伝達するデコ

一分子であると考えられている。現在、20種類のUBDが同定されており、その特徴により以下の5つのファミリーに大別される³²。カッコ内にドメイン名を記した。

- ① 一つまたは複数の α -ヘリックス構造を持つもの (UBA、UIM、DUIM、MIU、CUE、GAT、VHS、UBAN)
- ② Zinc finger モチーフを持つもの (NZF、NZF UBP、NZF A20、UBZ)
- ③ Pleckstrin-homology (PH)様構造を持つもの (GLUE、PRU)
- ④ E2 様構造を持つもの (UEV、UBC)
- ⑤ その他 (UBM、PFU、Jab/MPN)

これら UBD はいずれも非共有結合でユビキチン単量体及びユビキチン鎖と結合する。ユビキチンの分子表面には Leu8、Ile44 及び Val70 を中心とした疎水性領域が存在し、ほぼ全ての UBD はこの Ile44 パッチを認識する。例外として、Ile44 パッチに近接する表面残基が異なる UBD の結合特異性に寄与することが知られている。例えば、DNA ポリメラーゼ Rev1 のユビキチン結合モチーフは Leu8 を中心とした疎水性パッチに結合し³³、タンパク輸送に関与する Rabex-5 の ZnF A20 (zinc-finger in A20 protein) ドメインはユビキチンの Asp58 と結合することが報告されている³⁴。しかしながら同定されているほとんどの UBD は Ile44 パッチを介してユビキチン単量体と 1 : 1 で結合するので³⁵、1つの UBD ではユビキチン鎖特異性を説明できない (後述のようにユビキチン鎖選択性をもつユビキチン結合タンパク質は複数の UBD を持つものが多い)。また、エンドサイトーシスに関与する多くのタンパク質が UIM (ubiquitin-interacting motif) ドメインをもつが、³⁶。試験管内の結合実験では、UIM はモノユビキチンに対し結合力が弱い ($K_d=10^{-5}$ 程度)。そのため *in vivo* においては複数のユビキチン結合タンパク質が協調してユビキチン化タンパク質を認識することで、ユビキチンとの結合親和性を高めていると考えられている。

2. ユビキチン結合タンパク質のポリユビキチン鎖選択性について

これまでにM1、K6、K11、K48、K63リンクのジユビキチン(-Ub₂) 鎖の構造が明らかとなっており³⁷⁻⁴⁰、さらにM1、K63-Ub₂はユビキチン結合ドメインとの構造も明らかとされている。本項では構造解析により明らかとなってきたユビキチン結合タンパク質のポリユビキチン鎖選択性について述べる。

2-1 K63 鎖に選択性を示すユビキチン結合タンパク質について

K63 鎖特異的ユビキチン結合タンパク質は DNA 修復やシグナル伝達やエンドソーム経路などに関与するものが多い。Rap80 (Receptor-associated protein 80)は DNA ダメージ損傷部位に2つのタンデムに配置された UIM ドメインを介して Histone H2A や H2AX などの K63 鎖が付加されたタンパク質を認識してリクルートされる⁴¹。構造解析により K63-Ub₂

と 2 つの UIM がそれぞれユビキチン単体と 1:1 で結合しており、Rap80 内の 2 つの UIM 間のリンカーの長さが K63-Ub2 の配置を決定し、特異性を生んでいることが明らかとされている⁴²。また、NF- κ B 経路の活性化に重要なタンパク質である TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase1) は、TAB2、TAB3 (Tak1-binding protein2、3)を介して K63 鎖と結合する。TAB2 と TAB3 は N 末端に CUE (Coupling of Ubiquitin to ER degradation)ドメイン、C 末端に NZF (Npl4 Zinc Finger)ドメインと 2 つの UBD を有するが、C 末端の NZF ドメインのみが K63 鎖と特異的に相互作用することが報告されている⁴³。

2-2 M1鎖に選択性を示すユビキチン結合タンパク質について

NEMO (NF- κ B essential modulator)のUBANドメインはK63鎖及びM1鎖に特異的に結合するとされているがM1鎖により強く結合することが報告されている⁴⁴。NEMOのUBANドメイン内の2つのcoiled-coilドメインとロイシンジッパーから構成されるCoZi領域は平行なcoiled-coilホモダイマーを形成し、近位のユビキチンがC末端に遠位のユビキチンがN末端のユビキチン結合サイトに結合する。

3. 細胞内におけるユビキチン結合タンパク質のユビキチン鎖選択性について

上記のように、UBD のユビキチン鎖特異性は主に構造解析または試験管内の結合・相互作用解析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ない。また、UBD と Ub2 について構造解析が進められているが、細胞内には様々な長さのユビキチン鎖が存在することが想定され、長いユビキチン鎖ではどのような結合様式をとるのかは不明であり細胞内のユビキチン鎖識別機構には不明な点が多い。内在性の発現レベルでユビキチン結合タンパク質に結合するユビキチン鎖の種類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が直接評価できると考えられる。

4. 出芽酵母におけるユビキチン結合タンパク質について

本研究では、出芽酵母に見出されている約 20 種のユビキチン結合タンパク質のうち、機能が明確となっている 14 種類のユビキチン結合タンパク質に注目し解析を行った (Fig.0-3)。出芽酵母のユビキチン結合タンパク質は、その機能によりプロテアソーム分解系と液胞 (リソソーム) による分解系に大別できると考えられる (Fig.0-4)。以下に今回解析したユビキチン結合のこれまでに明らかとされている機能を述べる。

Rad23、Dsk2、Ddi1 はプロテアソームへの基質のシャトル因子である。いずれも UBD として C 末端に UBA (ubiquitin associated domain)ドメインをもち、N 末端の UBL (Ubiquitin-like)ドメインを介してプロテアソームにユビキチン化基質をリクルートする⁴⁵⁻⁴⁷。

Cdc48/p97/VCP は酵母からヒトに至るまで高度に保存された AAA-ATPase 型 シャペロ

ン様分子である。Cdc48は6量体を形成し、種々のコファクターと結合することにより様々な細胞内機能を制御している。Ufd1、Npl4及びUfd3はCdc48に結合するユビキチン結合タンパク質である。Cdc48-Ufd1-Npl4複合体は小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD)においてポリユビキチン化タンパク質をER膜から細胞質へ引きだし、プロテアソームへ運ぶと考えられている⁴⁸。Ufd1は保存されたUBDを持たないが、Nドメイン内の2カ所の領域でモノユビキチンまたはポリユビキチンと結合するとされている⁴⁹。ヒトNpl4はUBDとしてN末端にUBXドメイン、C末端にNZFドメインをもつが、酵母Npl4はNZFドメインをもたない。Ufd3はCdc48複合体においてユビキチン鎖伸長因子E4のUfd2と拮抗的にはたらくことによりユビキチン化基質を分解から保護していると考えられている⁵⁰。

Ent1、Ent2及びEde1はエンドサイトーシスに関与するユビキチン結合タンパク質である。Ent1/2(ヒトではエプシン)はUIMドメインを2つもち、Ede1(同Eps15)はUBAドメインを持つ。Ent1/2は細胞膜のPIP2に結合するENTH(Epsin N-terminal homology)ドメインをもつクラスリン小胞の構成因子である。Ede1はNPFモチーフ(Asn-Pro-Phe)に結合するEH(Eps15-Homology)ドメインを介して複数のエンドサイトーシス関連タンパク質と結合する⁵¹。

Vps27(ヒトではHRS)はESCRT(endosomal sorting complexes required for transport)-0複合体構成因子であり、エンドソーム上のユビキチン化基質を識別しMVBs(multivesicular bodies)を介してユビキチン化基質を液胞へと輸送する経路を制御している。Vps27のUIMドメインはこの経路において重要である⁵²。

Vps9、Cue1及びCue5はUBDとしてCUEドメインをもつユビキチン結合タンパク質である。Vps9は液胞へのタンパク質輸送に重要なRabファミリータンパク質Vps21のGEFとして機能する⁵³。Vps9のCUEドメインはcarboxypeptidase Y(CPY)の輸送には必要ないが、a-factor receptorであるSte3の液胞への輸送には必要である⁵⁴。Cue1はERAD(ER-associated degradation)に関与するユビキチン結合タンパク質である⁵⁵。Cue1のCUEドメインはユビキチン鎖の伸長およびERAD基質の分解に重要であることが報告されている⁵⁶。Cue5はユビキチン選択的オートファジー経路において、ユビキチンとAtg8(ヒトではLC3)のアダプター分子として機能することが報告されており、Cue5のCUEドメインは試験管内実験においてK48鎖及びK63鎖のいずれにも結合することが報告されている⁵⁷。

Gga2はゴルジ体に局在するユビキチン結合タンパク質である。Gga2のUBDとしてGATドメインをもち新規に合成されたGap1やSit1の液胞への輸送に必要であることが報告されている^{58,59}。

エンドサイトーシスやエンドソームにおけるタンパク質輸送経路において、基質の輸送にはK63鎖が重要であるという報告や⁶⁰、モノユビキチン化で十分であるという報告など相反する事象が数多く報告されており^{61,62}、細胞内においてエンドサイトーシスやエンドソーム上で機能するユビキチン結合タンパク質が実際にどの種類のユビキチン鎖を認識し

ているかは不明である。

第四節 質量分析計を用いたポリユビキチン鎖の定量について

現在ユビキチン鎖の種類を決定する手法として (1) 変異ユビキチンを用いた解析 (2) ユビキチン鎖特異的認識抗体を用いた解析 (3) 質量分析計を用いた解析が存在する (Fig.0-3)。本項では質量分析計を用いた解析法を中心にポリユビキチン鎖の種類を識別する手法について述べる。

4-1 変異ユビキチンを用いた解析

ユビキチンは分子内の7つのリジン残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48 及び K63) または N 末端のメチオニンを介してポリユビキチン鎖を形成することができる。そこでユビキチン鎖形成に利用されるリジン (K) をアルギニン (R) に変異させた変異ユビキチンが *in vitro* 及び *in vivo* いずれにおいても汎用されている。7カ所の K の1カ所を R に置換したもの (KR 変異体)、あるいは1カ所のみ K を残し、他の6カ所の K を R に置換した変異体 (シングル K 変異体) を用いてポリユビキチン鎖形成能を解析することでユビキチン鎖の種類を決定することが可能である。しかしながらユビキチン変異体を用いることでアーティファクトが生じる可能性がある。実際、本来 K63 鎖を形成するユビキチンリガーゼが K63R 変異体を用いることにより K48 鎖を形成するという報告があり²¹、変異ユビキチン用いた多くの報告・論文については、その妥当性について慎重に精査する必要がある。

4-2 ポリユビキチン鎖特異的認識抗体を用いた解析

ポリユビキチン鎖の種類を特異的に認識する抗体が開発されている。抗体はイムノブロット解析や免疫沈降、免疫染色など様々なアプリケーションに応用することができる非常に有効なツールである。しかしながら現在、K11 鎖、K48 鎖、K63 鎖及び M1 鎖に対する4種類のポリユビキチン鎖特異的抗体しか存在せず^{16, 39, 63}、それ以外のポリユビキチン鎖を解析することができない。すなわち鎖特異的抗体によりある種の特異的なポリユビキチン鎖の存在を証明することができるが、残りの種類のポリユビキチン鎖の存在を解析することができない。また、ユビキチン鎖特異的抗体の感度は1~10 pmol 程度であり、微量のポリユビキチン鎖を検出することは現実的に困難である。さらに各々のユビキチン鎖抗体の反応性・感度が大きく異なるために、免疫染色やイムノブロット分析等で相互比較した定量的な議論ができない。

4-3 質量分析計を用いたポリユビキチン鎖の解析について

上記の2つの手法の問題点より現在、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)による解析が注目されている。MS を用いた解析は網羅的にタンパク質を同定するショットガンプロテオミクスと既知のペプチドを選択的に測定することで微量タンパク質を同定・定量するターゲットプロテオミクスに大別される。本項では、本研究で使用したターゲットプロテオミクス及びユビキチン鎖定量法について述べる。

(1) Selective reaction monitoring (SRM)法

SRM 法は三連四重極 (QqQ)型 MS を用いた定量法である。特定の質量電荷比 (m/z)をもつ標的ペプチドイオンを通す質量フィルター (Q1)と、開裂によって生じるペプチド断片由来のフラグメントイオンを通過させるフィルター (Q3)の組み合わせることで、選択的に標的ペプチドを検出・定量する方法である⁶⁴。事前に標的ペプチドの Q1 と Q3 の組み合わせ (トランジション)を設定する必要があるが、数 100 種のペプチドを一度に定量できるため、現在のターゲットプロテオミクスの主流となっている。

(2) Parallel reaction monitoring (PRM)法

PRM 法は高分解能質量分析計 QqOrbitrap 型 MS のために開発された新しい定量法である^{65, 66}。上述の SRM 法と原理は類似するが、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)で検出することにより、擬陽性の少ない高感度定量が可能である。SRM 法ではすべてのプロダクトイオンをそれぞれ一種類ずつ定量するのに対し、PRM 法は一つのプレカーサーイオンに対応する複数のプロダクトイオンを同時に定量できる。本研究では PRM 法を用いてポリユビキチン鎖の高感度定量法の確立を目指した。

(3) Ubiquitin Absolute quantification (AQUA)

AQUA 法はハーバード大学の Steve Gigi 博士らのグループにより開発された手法で⁶⁷、ターゲットプロテオミクスによるペプチドの絶対定量に必須の手法である。この定量には安定同位体含有アミノ酸を用いて合成した AQUA ペプチドを内部標準として用いる。細胞由来のラベルフリーのペプチド (Light)と AQUA ペプチド (Heavy)は質量以外の物理的性質が同一であるため、LC での溶出時間、質量分析でのイオン化効率が同一である。AQUA ペプチドは安定同位体分質量が大きくなるため質量分析計による測定ではそれぞれのペプチドを区別して検出でき、ピーク面積の比較から内在性ペプチドの絶対定量が可能である。ユビキチン AQUA 法では、ユビキチン鎖特異的な AQUA ペプチドを合成し、内部標準として用いることで、試料中のユビキチン鎖を絶対定量する手法である。モノマーのユビキチンの場合、トリプシンで消化するとリジンまたはアルギニンの後ろで切断されるため、12 種類のペプチドが産生される (Fig.0-4A 上図)。しかしながらユビキチン鎖 (例、K48 鎖)をトリプシンで消化するとユビキチン鎖形成に利用されているユビキチンのリジン残基はトリプシンで切断されず、イソペプチド結合したドナーユビキチンの C 末端の GG 配列が

付加した特徴的なペプチドが生じる (Fig.0-4A 下図)。8 種類の異なるユビキチン鎖をトリプシンで消化すると、それぞれ異なるペプチドが産生されるので (Fig.0-4B)、8 種類のユビキチン鎖を MS により識別することが可能である。さらに既知の濃度の鎖特異的 AQUA ペプチドをトリプシン消化したサンプルと混合し、質量分析計で解析することによりそれぞれの種類のユビキチン鎖の絶対定量が可能である。また、ユビキチン鎖の形成に用いられないユビキチンペプチドによりユビキチン鎖の種類によらずユビキチンの絶対量を決定できる。

第五節 本研究の目的と本論文の構成

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と考えられているが、K48 鎖、K63 鎖以外の非典型的ユビキチン鎖 (K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K29 鎖、K33 鎖、M1 鎖)の機能は明確となっておらず、混合鎖や分岐鎖に至っては機能をもつか否かについても不明である。ユビキチン修飾の解析が進まない理由の一つとして、微量のユビキチン鎖を細胞抽出液から直接検出することが困難であることが挙げられる。そこで本研究では複雑なユビキチンシグナルの発動メカニズムを解明することを目的として研究に着手した。

第一章

まず、高分解能質量分析計を用いたユビキチン鎖の高感度絶対定量法 (Ub-PRM 法)の開発を試みた。また UFD 経路のモデル基質 Ub-P- β gal を用いて本手法の有効性を検討し、さらにユビキチンリガーゼの遺伝子破壊株においてポリユビキチン鎖の変動を解析した。

第二章

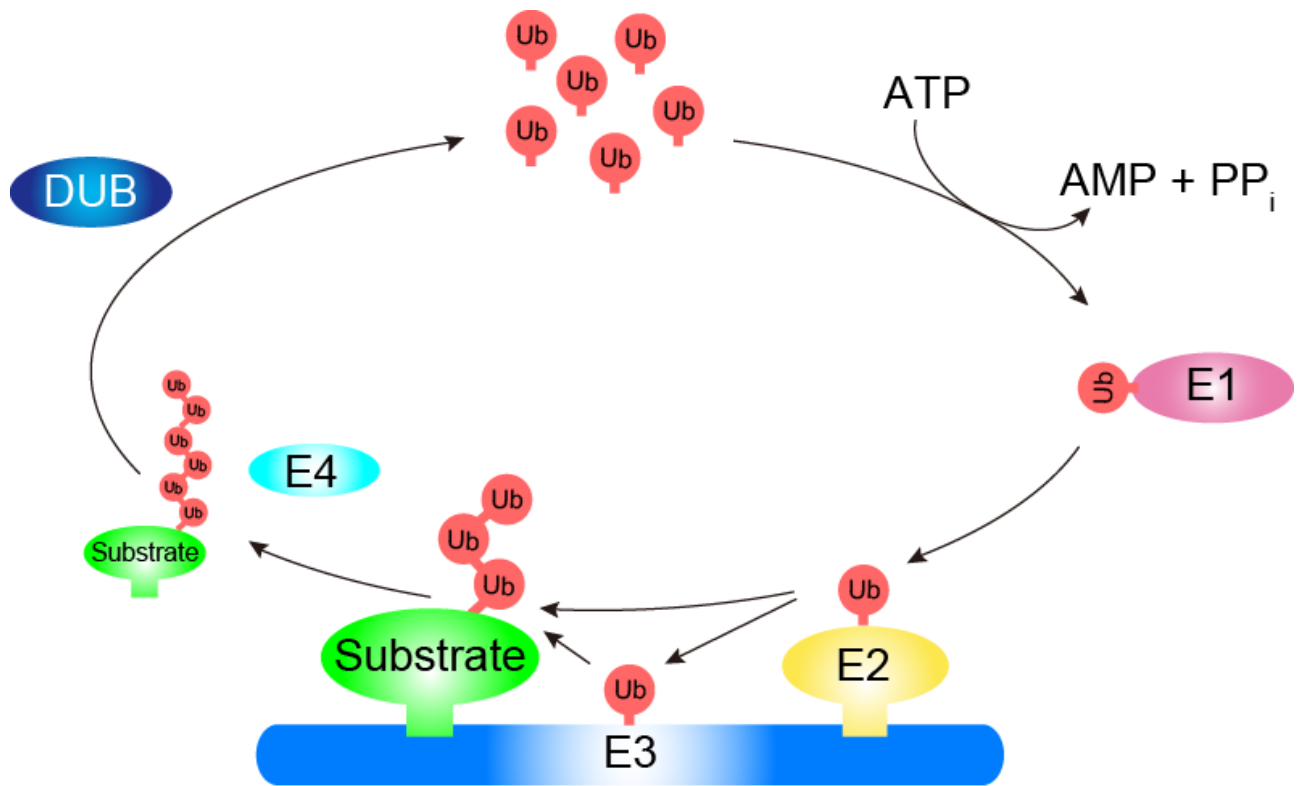
第一章で確立した Ub-PRM 法を用いてユビキチン結合タンパク質が認識するポリユビキチン鎖の選択性を検討した。まず、ユビキチン鎖に対する高親和性プローブを用いることで、ユビキチン結合タンパク質が細胞内で相互作用するユビキチン化基質を効果的に濃縮する 2 段階精製法 (後述) を開発した。さらに、出芽酵母において主要なユビキチン結合タンパク質群に着目してその認識するポリユビキチン鎖の種類を網羅的に解析した。

続いて K63 鎖に対して選択性を示したエンドサイトーシスに関連するユビキチン結合タンパク質 Ent2 および MVBs 輸送に関与するユビキチン結合タンパク質 Vps27 に着目して研究を行った。エンドサイトーシス関連因子の遺伝子破壊株を用いて Ent2 に結合する機能的なポリユビキチン鎖の種類を検討した。さらに、膜タンパクのユビキチン化に重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ Rsp5 との関連性を検討した。一方、Vps27 は K48 鎖と K63 鎖の両方が結合することが示唆されたので、これらのユビキチン鎖がエンドソーム上で機

能するのか、細胞内のどこから輸送されてくるのか、各種変異体を用いて解析した。

総合討論

総合討論では、本研究により得られた結果とこれまでの他の報告を合わせて、ユビキチン鎖の定量について、ユビキチン結合タンパク質のユビキチン鎖選択性について総合的に討論し、最後に、今回確立した解析法や本研究で得られた成果の今後の展開を述べた。



Ub: ubiquitin

E1: ユビキチン活性化酵素

E2: ユビキチン結合酵素

E3: ユビキチンリガーゼ

E4: ユビキチン伸長因子

DUB: 脱ユビキチン化酵素

Fig. 0-1 ユビキチン付加反応について

ユビキチン修飾系はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3)から構成される一連の酵素群のカスケードにより成り立っている。まず、E1酵素がATP依存的にユビキチンとチオエステル結合を形成し、これをE2に受け渡す。E3リガーゼは基質タンパク質を選択的に認識しユビキチンを付加する。さらに、ユビキチン鎖伸長因子(E4)の存在も知られており、基質に付加されたユビキチンを認識しユビキチン鎖を伸長する。ユビキチン修飾系は可逆的な翻訳後修飾であり、ユビキチン鎖を切断する脱ユビキチン化酵素 (deubiquitylating enzyme: DUB)が細胞内には約100種類程度存在する。

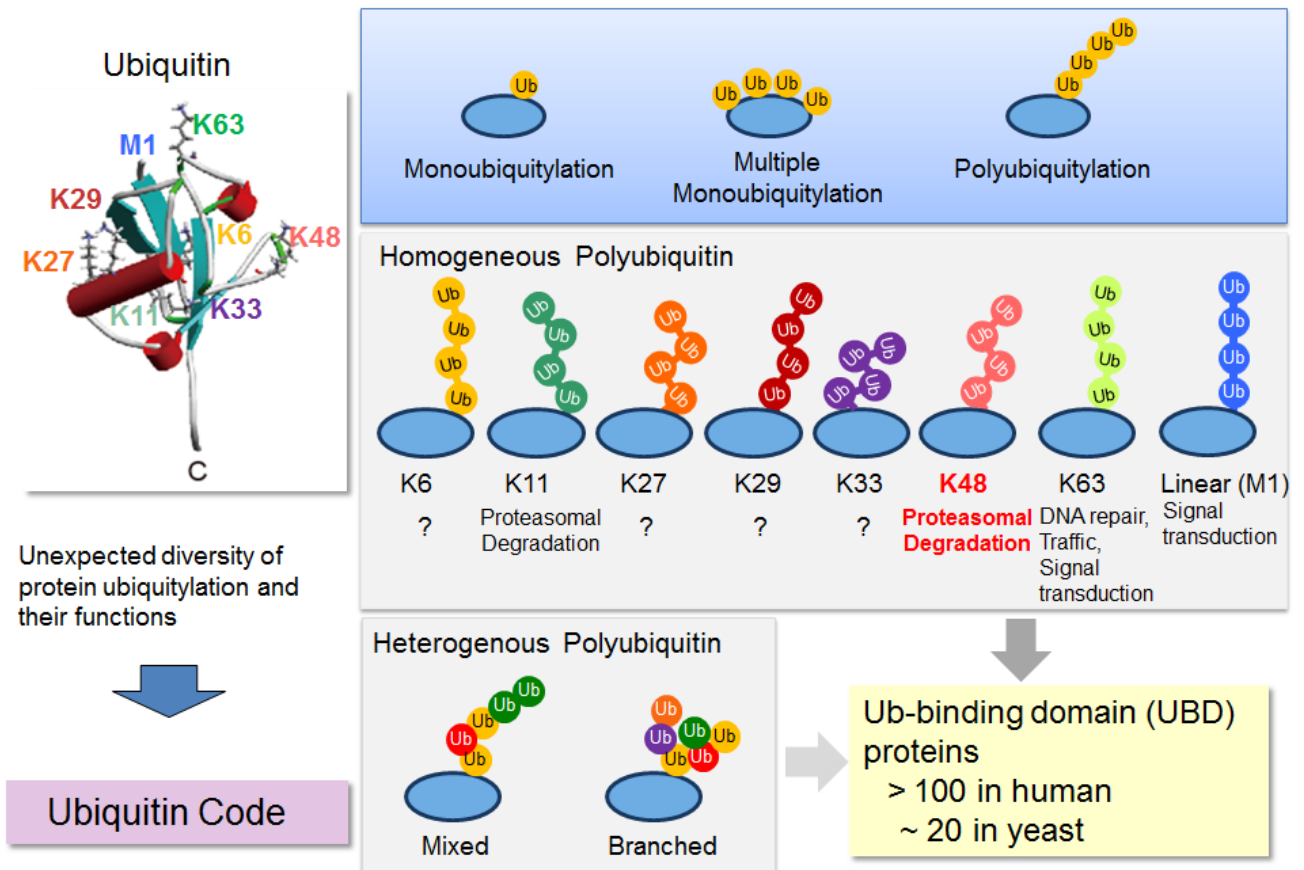


Fig. 0-2 ユビキチン修飾の構造と機能の多様性

ユビキチン修飾はモノユビキチン化、マルチプルモノユビキチン化、ポリユビキチン化に大別される。ポリユビキチン化はユビキチン分子内の異なるリジンを経由して連結したもの (K6、K11、K27、K29、K33、K48及びK63鎖)、またはN末端のメチオニンを経由して連結したもの (Linear: M1鎖)が存在する。さらに近年では混合鎖 (Mixed)や分岐鎖 (Branched)などの複雑なユビキチン鎖の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標的タンパク質の運命や機能が決定されると考えられており、現在、ユビキチン修飾の構造多様性はユビキチンコードと称されるに至っている。

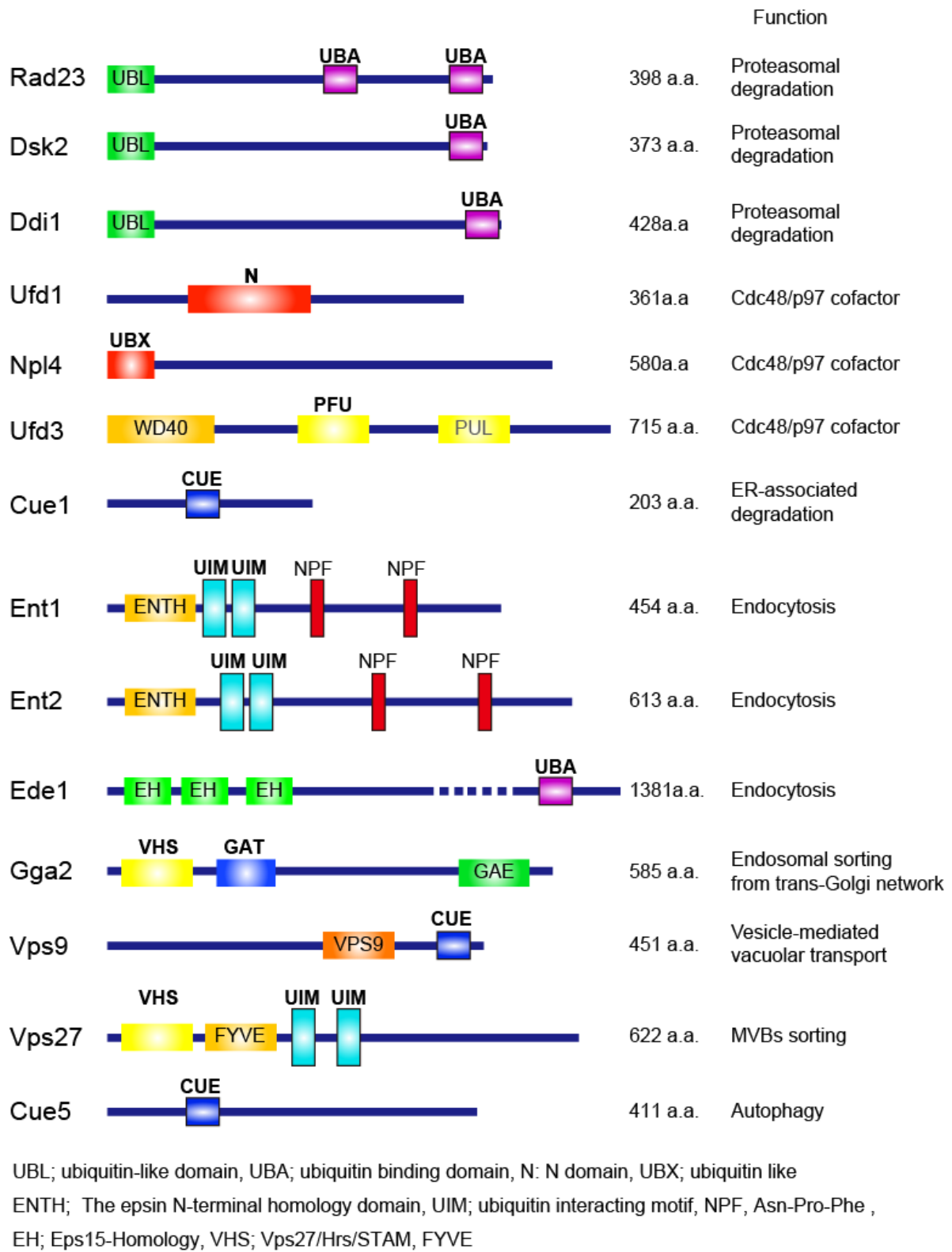


Fig. 0-1 出芽酵母における主要なユビキチン結合タンパク質の構造と機能

本研究で解析した出芽酵母の主要なユビキチン結合タンパク質とそのドメインとその機能を示した。UBDはゴシック文字で示した。

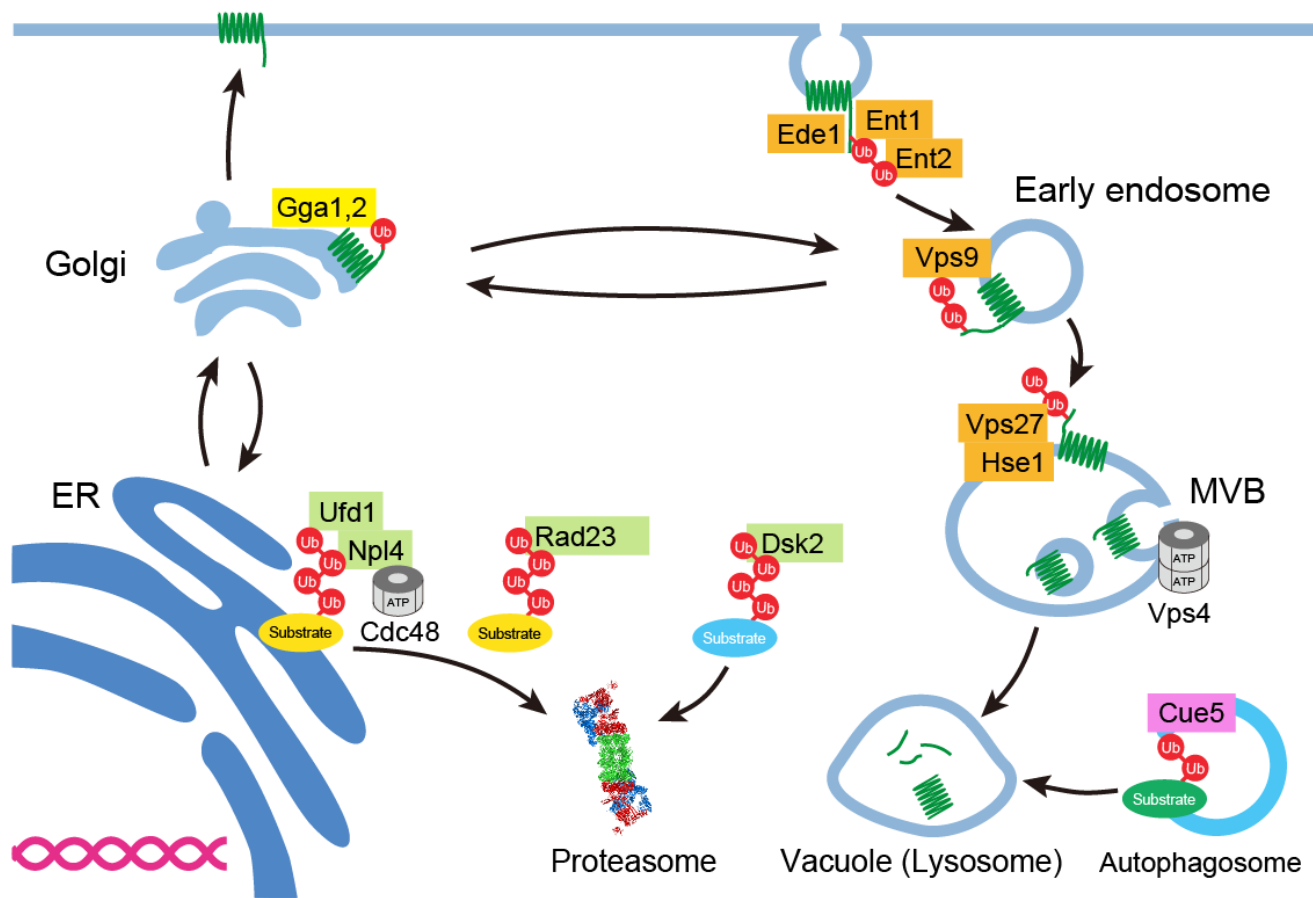
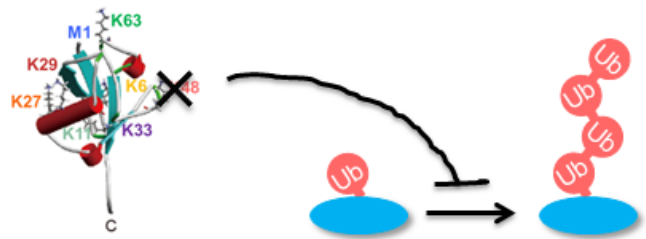


Fig. 0-2 出芽酵母における主要なユビキチン結合タンパク質とその局在
 本研究で解析した出芽酵母のユビキチン結合タンパク質とその局在の概略図を示した。

Using K->R mutant Ubs

e.g. K48R mutant



Linkage-specific polyUb antibodies



Only 4 antibodies are available

Mass spectrometry

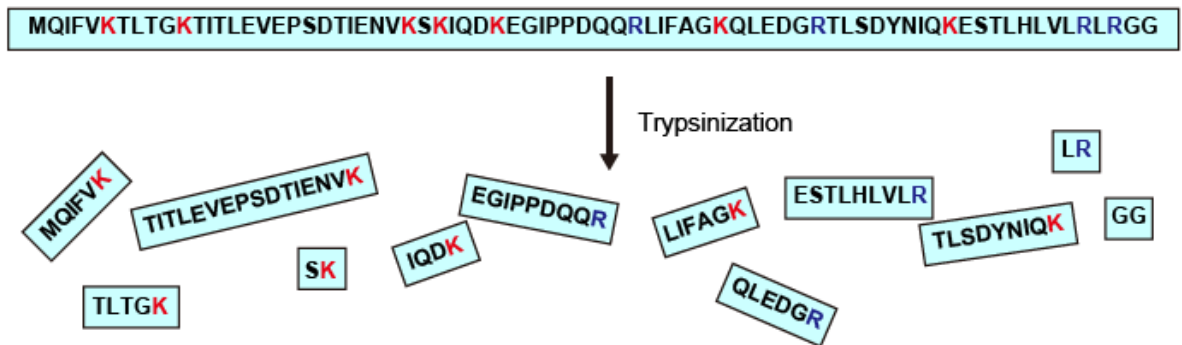
Time-consuming, but, most reliable



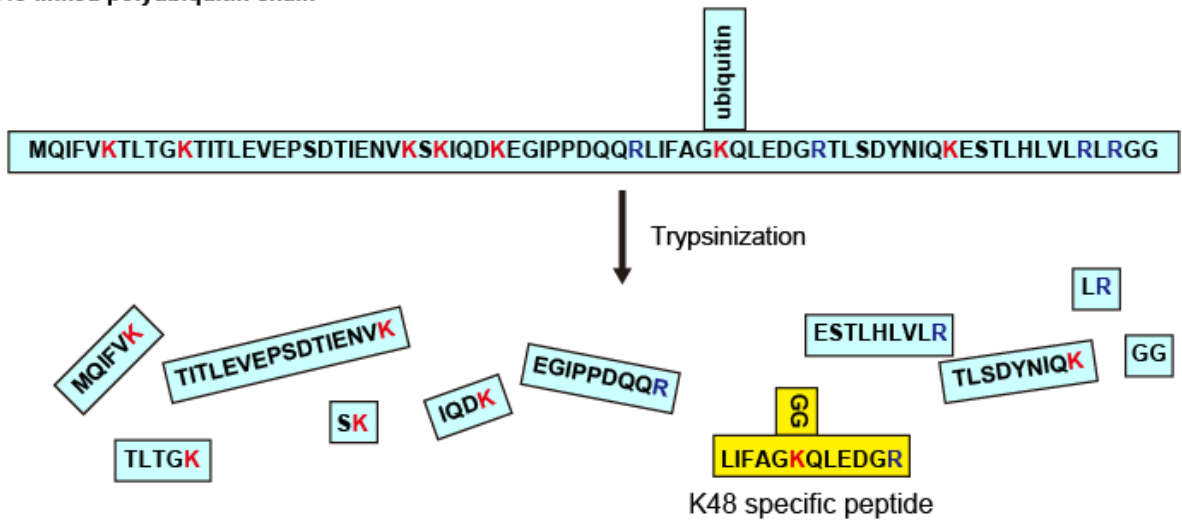
Fig. 0-3 ユビキチン鎖の種類を決定する手法について
ユビキチン鎖の種類を識別する手法の概略図を示した。

(A)

Monomer ubiquitin



K48-linked polyubiquitin chain



(B)



Fig. 0-4 質量分析計によるユビキチンの種類の識別法について

(A) モノマーユビキチンをトリプシンにより消化すると12種類のペプチドが産生する (上図)。K48鎖をトリプシンにより消化した場合はユビキチン鎖の形成に使われているK48で切断されず、C末端のグリシン(G)Gが付加したペプチドが産生する。

(B) トリプシンによる消化時において、8種類のユビキチン鎖特異的に産生されるペプチドを示した。

材料と方法

第一節 材料

1. 酵母株

本研究で使用した酵母の株は Table 0-1 に示した。出芽酵母株については公益財団法人東京都医学総合研究所・蛋白質代謝研究室・佐伯泰博士に御供与頂いた。

2. 培地

培養にあたり、以下の培地を用事調製し、オートクレーブにより滅菌(121°C 15分)した後使用した。

- ・ SC 培地: 0.67% yeast nitrogen base without amino acid (Difco)、5% casamino acid (Difco)、2% glucose (Wako)、20 mg/l uracil (Wako)
- ・ YPD 培地: 2% glucose (Wako)、1% yeast extract (Difco)、2% peptone (Difco)
- ・ YPR 培地: 2% raffinose (Wako)、1% yeast extract (Difco)、2% peptone (Difco)

3. 抗体

イムノブロット解析には以下の抗体を用いた。

- ・ 抗 ubiquitin 抗体 (P4D1): SANTA CRUZ、sc-8017 (HRP) (1: 500 diluted with blocking buffer)
- ・ 抗 β gal 抗体: Promega Z378B (1:2000 dilution with blocking buffer)
- ・ 抗 ubiquitin K48 linkage 抗体 (Apu2): Merck Millipore 05-1307 (1: 500 dilution with blocking buffer)
- ・ 抗 FLAG 抗体: Sigma A8592 (1: 2000 dilution with blocking buffer)
- ・ 抗 Pgc1 抗体: Life Technologies #459250 (1: 1000 dilution with blocking buffer)
- ・ 抗 HA 抗体: MBL 561-7 (1: 1000 dilution with blocking buffer)
- ・ 抗 NEDD4 (Rsp5)抗体: abcom ab14592 (1: 1000 dilution with blocking buffer)

4. AQUA peptide

同位体ラベルした合成ペプチドは SIGMA (Custom AQUA peptide)または Thermo Fisher Scientific (AQUA Ultimate grade)で委託合成し購入した。ペプチドは 10% アセトニトリル、0.1% 蟻酸で溶解または希釈し、ペプチド混合物を終濃度 200 fmol/ μ l として -

80°C保存した。

5. 酵素阻害剤・ホルモン

- Velcade (Bortezomib): LC Laboratories B-1408
DMSO で 10 mM となるように溶解し-20°Cで保存した。
- MG132: ペプチド研究所 3175-v
DMSO で 10 mM となるように溶解し-20°Cで保存した。
- Iodoacetamide: Amersham Biosciences RPN6302
DMSO で 1 M となるように溶解し使用した (用事調製)。
- Auxin (3-Indole acetic acid): SIGMA I2886
エタノールで 100 mM に溶解し、-20°Cで保存した。

6. ユビキチン鎖トランスファーのためのへの高親和性プローブ (TR-TUBE) の作成

Tandem ubiquitin binding entity (TUBE) は、ユビキチン鎖に対する高親和性プローブであり、ユビキチン結合ドメインをフレキシブルリンカー (GGGS リンカー) により 4 つタンデムに結合した人工タンパク質である⁶⁸。本研究では Ubiquilin 1 の UBA ドメインをタンデムにつなげたコンストラクトを作成した (Fig.0-5)。また、トリプシン消化から保護するために UBA ドメイン内のすべてのアルギニンをアラニンに置換した (Trypsin resistant TUBE: TR-TUBE と命名)。さらに高親和性にするため UBA ドメインを 6 個つないだものを作成した。上記のコンストラクトを pRSET-A ベクター (Life Technologies) に挿入した。また、ビオチンタグ付加のために N 末端にシステインを挿入した。

7. その他の試薬

なお、以下の記述で、一般的な購入方法で入手できる試薬等に関しては、購入元の記載を省略した。

第二節 方法

1. 培養条件

それぞれの培地において 28°C で培養し、OD₆₀₀ = 0.8~1.0 の間で細胞を回収した。

2. TR-TUBE の作成

大腸菌 (Rosetta2 (DE3)) にトランスフォーメーションし、0.2 mM IPTG (22°C、15 時間) でタンパクを発現した。細胞を lysis buffer (50 mM sodium phosphate、300 mM NaCl、10% glycerol、1mM Tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride) に懸濁し、フレンチプレス (大岳機器) を用いて細胞を溶解した。TritonX-100 (final 1%) を加えた後、15,000 rpm 30 分遠心分離を行った。上清を TALON resin (Clontech) と混合し、4°C で 2 時間ローテートした。TR-TUBE を溶出 buffer (50 mM sodium-HEPES [pH7.1]、100 mM NaCl、0.2 M imidazol) で溶出し、EZ-link Maleimide-PEG2-Biotin (Thermo Scientific) を用いて付属の説明書通りにシステインをビオチン化した。ビオチン化した TR-TUBE をさらに Superdex75 10/100 GL (GE Healthcare) を用いて精製した。

3. サンプルの調整

(1) Total cell lysate の調整

TCA サンプル調整

1 OD₆₀₀ 相当 (=8x10⁸ cells) の細胞を遠心分離により集菌し、100 µl の Milli-Q 水に懸濁後 17 µl の 1.85 M NaOH/7.4% (v/v) - 2 メルカプトエタノールを加え氷上にて 10 分間静置した。8 µl の 100% トリクロロ酢酸 (w/v) を加えボルテックス後、氷上で 10 分間静置した。14,000 rpm (18,700 g) で 10 分間遠心分離し、上清を除いた後、500 µl の冷却したアセトンでタンパクペレットを洗浄し、14,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除去後、1X NUPAGE LDS sample buffer (Life Technologies) を 100 µl 加えペレットを再懸濁し 70°C 10 分間保温し、SDS-PAGE に供した。

Mild-アルカリ法

1 OD₆₀₀ 相当の細胞に 100 µl の 0.1 M NaOH を加え懸濁後、氷上に 10 分間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心分離後、上清を完全に取り除き 1X NuPAGE LDS sample buffer を 100 µl 加えボルテックスにより沈殿を完全に溶解した。溶解後、70°C で 10 分間保温し、SDS-PAGE に供した。

(2) 細胞抽出液の調整

40 OD₆₀₀ 相当の細胞を 200 µl の lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5)、100 mM NaCl、

10% glycerol、10 μ M velcade、10 mM iodoacetamide、1X complete protease inhibitor cocktail (Roche、EDTA free)で懸濁しガラスビーズを用いて MULTI-BEADS SHOKER (YASUI KIKAI)を用いて細胞を破碎した。200 μ l の lysis buffer (+2% TritonX 100) を加え vortex 後、氷中で 30 分間静置した。15,000 rpm で 10 分遠心分離後、上清を回収し、細胞抽出液とした。Ub-P- β gal の解析には 200 OD₆₀₀ 相当の細胞を終濃度 0.1% TritonX 100 となるように細胞抽出液を調製した。

(2) 免疫沈降

Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, CA, USA) を用いたブラッドフォード法によってタンパク質濃度を算出した (ウシ血清アルブミンを標準タンパク質とした)。ユビキチン結合タンパク質の解析には、タンパク 1 mg 相当の細胞抽出液に 30 μ l の抗 FLAG beads (anti-DDDDK-tag mAb-Magnetic beads、MBL M185-9)を加え 4°C で 2 時間、免疫沈降反応を行った。次いで、lysis buffer (+1% TritonX100)で免疫沈降物を 3 回洗浄した。

Ub-P- β gal の解析には 200 OD₆₀₀ から得た細胞抽出液にあらかじめ 11 μ g の抗 β gal 抗体を結合した Dynabeads Protein G (1.5 mg 相当、Life Technologies)を加え 4°C で 30 分間、免疫沈降を行った。

(3) ユビキチン鎖のプロープ (TR-TUBE)へのトランスファー

ユビキチン結合タンパク質の解析について、抗 FLAG タグ抗体の免疫沈降物に 5 μ g のビオチン化 TR-TUBE を加え、4°C で 1 時間ローテートすることで、ユビキチン化タンパク質をビオチン化 TR-TUBE に移した。上清を回収し、lysis buffer (+1% Triton X100)により平衡化済の Dynabeads myone streptavidin C1 (50 μ l、Life Technologies、65001)を加え 4°C で 1 時間ローテートした。反応後、lysis buffer (+1% TritonX100)で沈降物を 3 回洗浄した。

4. イムノブロット解析

(1) SDS-PAGE、PVDF 膜への転写

前述の方法でタンパク質濃度を測定し、試料間のタンパク質濃度が等しくなるよう希釈した試料、あるいは、前述の免疫沈降で得た沈降物を細胞溶解液で希釈した試料に、3X NUPAGE LDS sample buffer を加えて 70°C、10 分間保温後、SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は、NuPAGE 4-12% gel (Life Technologies)を用い電気泳動 (150V 定電圧、1 時間)を行った。SDS-PAGE 終了後、タンパク質を PVDF 膜 (Immobilon-P、Millipore)に転写した (30 mA、定電流、1 時間)。

(2) 抗体反応、検出

転写終了後、PVDF 膜を blocking buffer (組成後述)に浸し、室温で 30 分間ブロッキング

した。ブロッキングした後、PVDF膜を一次抗体とともにパッキングし、室温で1時間保温した。TBS-T (Tris buffered saline-Tween20、組成後述)で10分間、3回洗浄後、HRP標識二次抗体と室温で1時間保温した。反応後、TBS-Tで10分間3回洗浄した。発光反応はECL prime Western blotting Detection Reagent (GE Healthcare: RPN2232)を用い、LAS4000 (GE Healthcare)を使用して検出した。

PVDF膜から抗体を除去する場合は、PVDF膜をstripping buffer (組成後述)で15分間2回洗浄し、さらにTBS-Tで10分間2回洗浄した。再度イムノブロット解析を行う場合は、上記のブロッキングの操作より行った。

使用した溶液

- ・ TBS-T: 20 mM Tris-HCl (pH7.6)、137 mM NaCl、0.1% Tween 20
- ・ blocking buffer: TBS-T +5% スキムミルク
- ・ stripping buffer: 200 mM glycine (pH2.8)、500 mM NaCl

5. 質量分析用サンプルの調製

(1) ゲル内トリプシン消化

SDS-PAGE終了後 (ユビキチン鎖の定量時は3 cmのみ泳動した)、ゲルを脱色液 (50% MeOH、10% AcOH) に浸し、室温で10分間振とうし固定した。次いで、Milli-Q水で10分間3回洗浄した後、染色液 (Bio-safe Coomassie G-250 Stain, Bio-Rad) に浸し、室温で30分間振とうすることでタンパク質を検出した。LAS4000により電気泳動像の画像を取得後、目的のゲルを切り出し (ユビキチン鎖の定量時は62 kDa以上の領域)、1 mm四方程度に切り、低吸着エッペンドルフチューブ (LoBindチューブ、 eppendorf) に回収した。ゲル断片は30% ACN (Acetonitril)-50 mM AMBC (Ammonium bicarbonate)溶液1 ml、50% ACN-50 mM AMBC溶液を1 mlにより各1時間洗浄した。次いで、100% ACN、100 μ lにより脱水後、5分間風乾させた。ゲル片がすべて浸かる量のトリプシン溶液 (20 ng/ μ l trypsin、5% ACN、50mM AMBC)を添加し、37°Cで12-15時間インキュベートした。ここまでの操作は、すべてクリーンベンチ内で行った。インキュベート後、50% ACN - 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)溶液50 μ l (1時間vortex)、70% ACN - 0.1% TFA溶液50 μ l (30分間vortex)によりゲル片よりペプチドを抽出した。回収した上清を混合し、減圧エバポレーターにより9 μ l以下まで濃縮後、終濃度0.1% となるよう1% TFAを添加し、質量分析用のサンプルとした。ユビキチン鎖定量用のサンプルは、AQUA mix (終濃度10 fmol/ μ l)、H₂O₂ (終濃度0.05%)と懸濁し、4°Cで一晩静置しメチオニンを完全に酸化させた。

6. 質量分析計を用いた解析

(1) 質量分析計の装置

装置は、液体クロマトグラフィー (Easy nLC 1000、Thermo Fisher Scientific) をQ

Exactive MS (Thermo Fisher Scientific) に接続し、エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization: ESI) 法によりイオン化を行った。液体クロマトグラフィーのカラムはC18 analytical column (Reprosil-Pur 3 μm , 75 μm id x 12 cm packed tip column, Nikkyo Technos Co. Ltd.) を用い、0.1% ギ酸 (Solvent A) と100% ACN - 0.1% ギ酸 (Solvent B) の2種類のバッファーを流速300 nl/minで用いた。イオン化は1.8 kV、250°Cの条件下で行った。ペプチドの開裂は、高エネルギー衝突解離 (HCD: Higher-energy collisional dissociation) により行った。

(2) 質量分析計の設定：ショットガンプロテオミクス

MSおよびMS/MSスペクトルの測定はペプチド測定に適した設定にした。MSスペクトルを測定するトリガーとして、イオンの量 (AGC target) を 3×10^6 に、経過時間 (Maximum IT) を60 msに設定した。これにより、装置に 3×10^6 のイオンが蓄積する、あるいは、60 ms経過するとMSスペクトルを測定するようにした。分解能 (Resolution) を70,000とし、測定する質量電荷比 (Scan range) は350- 1300とした。また、MS/MSスペクトルの測定 (loop count) は、MSの測定ごとに存在量の最も多い10種類のイオンをMS/MSに供する設定にした (top10)。MS/MSスペクトル測定は、AGC targetを 1×10^5 、Maximum ITを60 msに設定した。また、一度MS/MSスペクトルを測定したプレカーサーイオンに関しては、90秒間MS/MSスペクトルの測定は行わないようにした (Dynamic exclusion)。Resolutionを17,500とし、プレカーサーイオンを単離する質量幅 (Isolation window) を2.0 m/z、電荷 (Charge excl unassigned) が2-4、質量電荷比 (Fixed first mass) が100.0以上のイオンのみを測定、開裂させる際のエネルギー (NCE; normalized collision energy) を28.0、に設定した (Table.0-2)。ペプチドはSolvent B により12分の2段階のグラジエント(0-35% 10分、35-100% 2分)で分離した。

(3) 質量分析計の設定：parallel reaction monitoring (PRM) 法

MSスペクトルの質量電荷比と電荷を設定し、その設定に合致するMSスペクトルのみのMS/MSスペクトルを測定した。MS/MSスペクトル測定は、AGC targetを 1×10^6 、Maximum ITを200 msに設定した。Resolutionを70,000とし、Isolation windowを2.0 m/z、Fixed first massは120.0、NCEを27に設定した (Table. 0-3)。ペプチドはSolvent B により80分の3段階のグラジエント (0-10% 5分、10-25% 70分、25-80% 5分)で分離し測定した。合成ペプチド及び内在性ペプチドのリテンションタイム (RT)を設定して測定を行った (Table.0-4)。

(4) データ解析

タンパク質、ペプチドの同定を目的とした測定の結果解析は、解析ソフトとしてProtein Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) を、データベースとしてMascotを用いた。Ub-P- βgal の解析にはUniProtデータベースにUb-P- βgal 配列を加えたものを

SEQUEST検索エンジンで解析した。ペプチド同定の際の偽陽性率 (false discovery rate: FDR) は1%以下とした。

PRM法によるペプチドの結果解析には、解析ソフトとしてPinpoint version 1.2 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

Table.0-1 本研究で使用した酵母株リスト

Strain name	Genotype
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
Y04859	<i>MATa ufd4Δ::KanMX4</i>
Y03888	<i>MATa ufd2Δ::KanMX4</i>
YHT20	<i>MATa fcy1::P_{TEFI}-Ub-P-βgal-T_{CYC1}</i>
YHT24	<i>MATa ufd4Δ::KanMX4 fcy1::P_{TEFI}-Ub-P-βgal-T_{CYC1}</i>
YHT26	<i>MATa ufd2Δ::KanMX4 fcy1::P_{TEFI}-Ub-P-βgal-T_{CYC1}</i>
YYS2086	<i>W303 ufd4Δ::KanMX Δpdr5::HphMX Δlys2::LEU2</i>
YYS2087	<i>W303 ufd4C1450A::KanMX pdr5Δ::HphMX lys2Δ::LEU2</i>
Y4814	<i>MATa ubr1Δ::KanMX4</i>
YHT74	<i>W303 pdr5Δ::HphMX lys2Δ::LEU2 fcy1::TEF1pr-Ub-P-βgal-CYC1term</i>
YHT75	<i>W303 pdr5Δ::HphMX lys2Δ::LEU2 ufd4Δ::KanMX fcy1::TEF1pr-Ub-P-βgal-CYC1term</i>
YHT76	<i>W303 pdr5Δ::HphMX lys2Δ::LEU2 ufd4C1450A::KanMX fcy1::TEF1pr-Ub-P-βgal-CYC1term</i>
YYS2161	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 RAD23-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2162	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 DSK2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2163	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 DDII-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2169	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 UFD1-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2170	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 NPL4-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2171	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SHP1-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2172	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 UFD3-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2164	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ENT1-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2165	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ENT2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2168	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 EDE1-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2166	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 VPS27-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2167	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 CUE1-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2304	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 GGA2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2305	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 VPS9-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2306	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 CUE5-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2233	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 dsk2Δ::HphMX RAD23-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2234	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rad23Δ::HphMX DSK2-PreScission</i>

	<i>site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2236	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dsk2Δ::KanMX4 rad23Δ::HphMX</i>
YYS2233	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δdsk2::HphMX RAD23-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2234	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δrad23::HphMX DSK2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2235	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dsk2Δ::KanMX4 rad23::HphMXΔ</i>
YYS2174	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δotu1::HphMX UFD1-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2175	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 otu1Δ::HphMX NPL4-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2177	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 otu1Δ::HphMX UFD3-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2178	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pdr5Δ::HphMX RAD23-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2179	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pdr5Δ::HphMX UFD1-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2199	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pdr5Δ::HphMX ENT2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2213	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pdr5Δ::HphMX VPS27-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2198	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 abp1Δ::HphMX ENT2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2200	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sla1Δ::HphMX ENT2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2237	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 hse1Δ::HphMX VPS27-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2173	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 doa4Δ::HphMX VPS27-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2180	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 vps4Δ::HphMX VPS27-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>
YYS2255	<i>MATa fcy1::FCY1-GAL1pr-OsTIRI-5HA-URA3 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ</i>
YYS2256	<i>MATa TEF1pr-2xmini-AID-RSP5::His3MX fcy1::FCY1-GAL1pr-OsTIRI-5HA-URA3 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
YYS2258	<i>MATa ENT2-PreScission site-3xFLAG::KanMX</i>

	<i>TEF1pr-2xmini-AID-RSP5::His3MX fcy1::FCY1-GAL1pr-OsTIR1-5HA-URA3 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
YYS2259	<i>MATa VPS27PreScission site-3xFLAG::KanMX TEF1pr-2xmini-AID-RSP5::His3MX fcy1::FCY1-GAL1pr-OsTIR1-5HA-URA3 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
YYS2341	<i>ura3-52 leu2-3 112 trp1-289 his3 his4 (ANY20)</i>
YYS2343	<i>MATa VPS27-PreScission site-3xFLAG::KanMX ura3-52 leu2-3 112 trp1-289 his3 his4</i>
YYS2344	<i>MATa VPS27-PreScission site-3xFLAG::KanMX sec12-4 ura3 leu2 trp1 his3 his4</i>
YYS2321	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 VPS27-PreScission site-3xFLAG::HphMX</i>
YYS2322	<i>MATaVPS27-PreScission site-3xFLAG::HphMX Δubc7::KanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
YYS2323	<i>MATaVPS27-PreScission site-3xFLAG::HphMX hrd1Δ::KanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
YYS2324	<i>MATa VPS27-PreScission site-3xFLAG::HphMX doa10Δ::KanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
YYS2340	<i>MATa VPS27-PreScission site-3xFLAG::HphMX hrd1Δ::His3MX doa10Δ::KanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>

Table 1-2-1 質量分析計の設定

ショットガンプロテオミクスにおける質量分析計の設定

Properties																																																													
Properties of the method																																																													
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">Global Settings</td> </tr> <tr> <td>use lock ma:</td> <td>if all present</td> </tr> <tr> <td>Chrom. peel</td> <td>15 s</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Time</td> </tr> <tr> <td>Method dura</td> <td>60.00 min</td> </tr> </table>		Global Settings		use lock ma:	if all present	Chrom. peel	15 s	Time		Method dura	60.00 min																																																		
Global Settings																																																													
use lock ma:	if all present																																																												
Chrom. peel	15 s																																																												
Time																																																													
Method dura	60.00 min																																																												
Properties of Full MS / d																																																													
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">General</td> </tr> <tr> <td>User Role</td> <td>Standard</td> </tr> <tr> <td>Runtime</td> <td>0 to 60 min <input type="button" value="v"/></td> </tr> <tr> <td>Polarity</td> <td>positive</td> </tr> <tr> <td>Default char</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Inclusion</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Exclusion</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Tags</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Full MS</td> </tr> <tr> <td>Resolution</td> <td>70,000</td> </tr> <tr> <td>AGC target</td> <td>3e6</td> </tr> <tr> <td>Maximum IT</td> <td>60 ms</td> </tr> <tr> <td>Scan range</td> <td>300 to 1300 m/z</td> </tr> <tr> <td colspan="2">dd-MS² / dd-SIM</td> </tr> <tr> <td>Resolution</td> <td>17,500</td> </tr> <tr> <td>AGC target</td> <td>1e5</td> </tr> <tr> <td>Maximum IT</td> <td>60 ms</td> </tr> <tr> <td>Loop count</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>TopN</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Isolation wirt</td> <td>2.0 m/z</td> </tr> <tr> <td>Fixed first m</td> <td>100.0 m/z</td> </tr> <tr> <td>NCE</td> <td>28.0</td> </tr> <tr> <td colspan="2">dd Settings</td> </tr> <tr> <td>Underfill rati</td> <td>0.1 %</td> </tr> <tr> <td>Intensity thr</td> <td>1.7e3</td> </tr> <tr> <td>Apex trigger</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Charge excl</td> <td>unassigned, 1, 6 -</td> </tr> <tr> <td>Peptide mat</td> <td>on</td> </tr> <tr> <td>Exclude isot</td> <td>on</td> </tr> <tr> <td>Dynamic ex</td> <td>90.0 s</td> </tr> </table>		General		User Role	Standard	Runtime	0 to 60 min <input type="button" value="v"/>	Polarity	positive	Default char	2	Inclusion	—	Exclusion	—	Tags	—	Full MS		Resolution	70,000	AGC target	3e6	Maximum IT	60 ms	Scan range	300 to 1300 m/z	dd-MS² / dd-SIM		Resolution	17,500	AGC target	1e5	Maximum IT	60 ms	Loop count	10	TopN	10	Isolation wirt	2.0 m/z	Fixed first m	100.0 m/z	NCE	28.0	dd Settings		Underfill rati	0.1 %	Intensity thr	1.7e3	Apex trigger	—	Charge excl	unassigned, 1, 6 -	Peptide mat	on	Exclude isot	on	Dynamic ex	90.0 s
General																																																													
User Role	Standard																																																												
Runtime	0 to 60 min <input type="button" value="v"/>																																																												
Polarity	positive																																																												
Default char	2																																																												
Inclusion	—																																																												
Exclusion	—																																																												
Tags	—																																																												
Full MS																																																													
Resolution	70,000																																																												
AGC target	3e6																																																												
Maximum IT	60 ms																																																												
Scan range	300 to 1300 m/z																																																												
dd-MS² / dd-SIM																																																													
Resolution	17,500																																																												
AGC target	1e5																																																												
Maximum IT	60 ms																																																												
Loop count	10																																																												
TopN	10																																																												
Isolation wirt	2.0 m/z																																																												
Fixed first m	100.0 m/z																																																												
NCE	28.0																																																												
dd Settings																																																													
Underfill rati	0.1 %																																																												
Intensity thr	1.7e3																																																												
Apex trigger	—																																																												
Charge excl	unassigned, 1, 6 -																																																												
Peptide mat	on																																																												
Exclude isot	on																																																												
Dynamic ex	90.0 s																																																												

Table 0-3-2 質量分析計の設定

PRM法における質量分析計の設定

Properties of Targeted-MS²

General	
User Role	Standard
Runtime	0 to 90 min
Polarity	positive
Default charge state	2
Inclusion	on
MS²	
Resolution	70,000
AGC target	1e6
Maximum IT	200 ms
Isolation window	2.0 m/z
Fixed first mass	120.0 m/z
NCE	27.0

Table.0-4 PRM法のトランジションリスト

Abbreviation	Peptide Sequence	Precursor m/z (charge state)	Product ions for PRM	RT min
EST	ESTLHLVLR	534.314 (+2)	y3, y4, y5, y6, y7, y8	39.37
	ESTLHLVL[HeavyL]R	537.8226 (+2)		
K6 (ox)	M[Oxid]QIFVK[di-GlyGly]TLTGK	465.927 (+3)	y3, y4, y5, y6, y7	38.62
	M[Oxid]QIFVK[di-GlyGly]TL[HeavyL]TGK	468.266 (+3)		
K11	TLTGK[di-GlyGly]TITLVESSDTIDNVK	793.4147 (+3)	y5, y7, y8, y9, y10, y11,	57.54
	TLTGK[di-GlyGly]TITLVESSDTIDNV[HeavyV]K	795.4193 (+3)		
K27	TITLVESSDTIDNVK[di-GlyGly]SK	698.3584 (+3)	y5, y6, y7, y8, y9, y10, y11	47.85
	TITLVESSDTIDNV[HeavyV]K[di-GlyGly]SK	700.363 (+3)		
K29	SK[di-GlyGly]IQDK	416.7297 (+2)	y2, y3, y4, y5	21.44
	SK[di-GlyGly]I[HeavyI]QDK	420.2383 (+2)		
K33	IQDK[di-GlyGly]EGIPPDQQR	546.6129 (+3)	y3, y4, y5, y6	22.42
	IQDK[di-GlyGly]EGIPP[HeavyP]DQQR	548.6175 (+3)		
K48	LIFAGK[di-GlyGly]QLEDGR	487.6 (+3)	y3, y5, y6, y8, y9	40.52
	LIFAGK[di-GlyGly]QL[HeavyL]EDGR	489.9391 (+3)		
K63	TLSDYNIQK[di-GlyGly]ESTLHLVLR	561.805 (+4)	y8, y9, y10	57.64
		748.7376 (+3)		
	TLSDYNIQK[di-GlyGly]ESTLHLVL[HeavyL]R	563.5593 (+4) 751.0766 (+3)		
M1 (ox)	GGM[Oxid]QIFVK	448.2389 (+2)	y2, y3, y4, y5, y6	28.53
	GGM[Oxid]QIFV[HeavyV]K	451.2458 (+2)		

第一章

質量分析計を用いたポリユビキチン鎖の 絶対定量法の確立

緒言

ユビキチン修飾にはモノユビキチン化、8種類の異なる構造のポリユビキチン鎖、さらには混合鎖や分岐鎖が存在し、これら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により細胞内において多彩な機能を発揮すると考えられている。例えば K48 鎖はタンパク質の分解シグナルとして機能し、K63 鎖はシグナル伝達や DNA 修復などに関与することが明確となっている。しかしながらその他のユビキチン鎖や分岐鎖、混合鎖などの機能は明確となっていない。これらのユビキチン鎖は細胞内にごく微量しか存在せず、細胞抽出液から直接定量することが困難であることから解析が立ち遅れている。現在ユビキチン鎖の種類を識別する最も有効な手法として質量分析計 (MS) を用いた解析が注目されているが、K29 鎖や M1 鎖などの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は依然として困難であった。近年、高分解能質量分析計 QqOrbitrap 型 MS を用いたターゲットプロテオミクスの新手法 Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法が開発された。本手法は従来型 MS の定量法 (QqQ 型 MS による selective reaction monitoring 法) とは異なりフラグメントイオンを高分解能の Orbitrap 部にて分離・定量するため複雑試料中においても目的のペプチドを高感度で検出・定量することが可能である。

そこで本章では PRM 法を用いて ポリユビキチン鎖の超高感度絶対定量法の確立を試みた (ubiquitin-parallel reaction monitoring: Ub-PRM 法)。まず、ユビキチン依存性タンパク質分解系のモデル基質に付加されたユビキチン鎖を解析することにより Ub-PRM 法の有効性を検討し、さらにユビキチンリガーゼ遺伝子破壊株におけるユビキチン鎖の変動を解析した。

結果

1. PRM 法を用いたユビキチン鎖の定量法の確立 (Ub-PRM)

(1) M1 鎖、K6 鎖定量のための過酸化水素処理の検討

質量分析解析の試料調製過程においてメチオニンを含むペプチドの一部は酸化される。そのため M1 ペプチド (GGMQIFVK) および K6 ペプチド (MQIFVK[di-GlyGly]TLTGK) は酸化体 (-ox) と非酸化体が混合した状態となる。修飾を受けたペプチドは非修飾体と異なる質量をもつので、酸化体と非酸化体が混合した状態では正確に MS で定量することができない。そこでメチオニンを含むペプチドをすべて酸化体に変換してから定量を行うことを検討した。ユビキチン AQUA ペプチドを終濃度 0.01% または 0.05% の過酸化水素 (H_2O_2) で処理し (4°C で一晩)、Ub-PRM 法により定量した。その結果、0.05% の H_2O_2 処理により K6 鎖ペプチド及び M1 鎖ペプチドのいずれも 9 割以上が酸化体になっていることが明らかとなった (Fig.1-1)。またメチオニンを含まないユビキチンペプチド (EST) は量の変動がないことを確認した。よって本研究では、試料を 0.05% H_2O_2 で前処理した後 (メチオニンを酸化体に変換後) に MS 定量に供することにした。

(2) Ub-PRM 法のための装置の最適化

微量のペプチドは吸着などにより取り扱いが困難である。実際、K11 鎖ペプチド及び K63 鎖ペプチドは 100 μM 以下の濃度では、安価な 1.5 ml チューブや MS バイアル中で吸着がみられ、4 時間程度で約 8 割が吸着により消失した。そこで、タンパク質やペプチドの吸着が少ない eppendorf 製の低吸着チューブと AMR 製の MS バイアルを用いた。

また、K29 鎖ペプチドは SK[di-GlyGly]IQDK と短く親水性のペプチドであり、ナノ LC のトラップカラム (C18 担体) への保持が非常に難しく測定が困難であった。そこで、トラップカラムを使用せず分析カラムへ試料を直接注入すること (one column setting) で K29 鎖ペプチドを測定することに成功した。また、ペプチド試料の溶媒として通常はギ酸が用いられるが、TFA を用いることでピーク形状が改善した。さらにグラジエント勾配等を最適化することで、一回の測定で 8 種類のユビキチン鎖ペプチドを検出することに成功した。

(3) Ub-PRM 法のためのユビキチンペプチド標準曲線の作製

次に、複雑試料中における Ub-PRM 法の定量性を検討した。質量分析による定量において、存在量が少ないものやイオン化し難いペプチドは夾雑イオンに埋もれてしまい検出されにくい。そのため、単純な試料で検出されたり定量性があつたとしても、細胞抽出液などの様々なペプチドが含まれる複雑試料においては、感度が大幅に低下したり定量性が失

われる可能性がある。そこで複雑試料中における Ub-PRM 法の定量性を検討するため、出芽酵母細胞抽出液トリプシン消化物 (500 ng 相当/注入) に系列希釈したユビキチン AQUA ペプチド(100 amol~ 1 pmol/注入)を混合し Ub-PRM 法により各々定量し、標準曲線を作成した (Fig.1-2A)。この結果、9 種類すべてのユビキチンペプチドにおいて良好な直線性が得られた ($R^2 = 0.968\sim 0.998$)。さらに酵母細胞抽出液トリプシン消化物に極微量のユビキチン AQUA ペプチド混合物を加え (50~200 amol)、Ub-PRM 法により解析することにより定量下限値 (lower limit of quantitation : LLOQ)を検討した⁶⁹。この結果、K11 鎖は 75 amol から、その他のペプチドは 50 amol から直線性が得られた ($\pm 20\%$) (Fig.1-2B)。以上の結果よりユビキチン鎖の超高感度絶対定量法 Ub-PRM 法を確立した。

(4) ヨードアセトアミド処理による影響解析

細胞抽出液からポリユビキチン鎖を正確に定量するためにはサンプル調製時に脱ユビキチン化酵素を阻害する必要がある、Cys プロテアーゼ阻害剤ヨードアセトアミド(IAA)が汎用されている。一方、高濃度の IAA は Cys のアルキル化剤の試薬として用いられているが、最近、Cys 残基のみならず Lys 側鎖を修飾することが報告された⁶⁹。この Lys の IAA 化 (+114.0429) はユビキチン化 (GlyGly 付加 : +114.0429) と同じ質量をもち MS/MS 解析を行っても両者を区別できない。そのため、IAA 付加のペプチドは偽ユビキチン化と呼ばれ、真のユビキチン化サイト決定 (ユビキチン鎖も含む) の障害となることが示唆されているものの⁷⁰、現在までに定量的に解析されたことはない。そこで私は Ub-PRM 法によりユビキチンに対する IAA の影響を定量的に解析した。Ub-PRM 法では AQUA ペプチドを内部標準とするため、同じ保持時間で共溶出されるペプチドを解析することが可能である。まず、ユビキチンモノマー (2 μg) を高濃度 (50 mM) の IAA と混合し、室温で 30 分反応させた。反応物を SDS-PAGE に供しゲル切り出し後、トリプシン消化し Ub-PRM 法による定量解析を行った (100 fmol/注入)。その結果、IAA 化ユビキチンペプチドは 8 種類のユビキチン鎖 AQUA ペプチドとは共溶出されなかった (Fig.1-3 Light)。このことは 50 mM IAA 処理ではユビキチンの IAA 化が起こらない (定量下限値以下)、あるいは LC 溶出時に IAA 化ペプチドとユビキチン化ペプチドの保持時間が異なることを示唆しており、少なくとも本研究における試料調製 (10 mM IAA, 4°C 反応) では、偽ユビキチン化の影響は排除できると判断した。

2. Ub-P- βgal に付加したユビキチン鎖の解析

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。そこでユビキチン依存性タンパク質分解系のモデル (ubiquitin fusion degradation: UFD)経路のモデル基質 Ub-P- βgal のユビキチン化を解析することにより Ub-PRM 法の有効性を検討した。さらに、UFD 経路に関連するユビキチンリガーゼの遺伝子破壊株を用いて Ub-P- βgal に付加さ

れたポリユビキチン鎖の変動を検討した。

(1) 変異体における Ub-P-βgal の発現レベルの確認

Ub-P-βgal の解析にあたり、WT 及び UFD 経路に関与するユビキチンリガーゼ Ufd4、ユビキチン鎖伸長因子 Ufd2 の遺伝子破壊細株 (*ufd4Δ*、*ufd2Δ*) に Ub-P-βgal を発現させた株を作成し、各変異体における Ub-P-βgal のタンパク安定性を検討した。細胞抽出液及び抗βgal 抗体による免疫沈降物を抗ユビキチン抗体及び抗βgal 抗体によるイムノブロット解析を行ったところ、WT と比較して *ufd4Δ* 及び *ufd2Δ* において Ub-P-βgal の蓄積がみられた (Fig.1-4A)。また WT 及び *ufd2Δ* では Ub-P-βgal のユビキチン化が明瞭に検出されたが、*ufd4Δ* ではユビキチン化が減弱していた (Fig.1-4A 下図)。よって Ufd4 および Ufd2 は Ub-P-βgal の代謝安定性に関与していることが示唆された。

(2) Ub-P-βgal の精製

続いて Ub-P-βgal の精製を試みた。Ub-P-βgal の免疫沈降産物を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った (Fig.1-4B 左図)。a~c に相当するマイナーなバンドを切り出し、質量分析計に供しショットガン解析を行ったところ、Ub-P-βgal のダイマー化したもの及びタンパク質シヤペロンである Hsp70 と Hsp90 であった (Fig.1-4B 右表)。よって夾雑物はほとんど入っておらず、Ub-P-βgal はユビキチン鎖を定量に十分な精製度と考えた。

(3) 質量分析計による Ub-P-βgal に付加されたユビキチン鎖の定量

次に Ub-P-βgal に付加されたポリユビキチン鎖の種類を検討した。Fig.1-4B のポリユビキチン化された Ub-P-βgal に相当するゲル領域を切り出し、Ub-PRM 法により解析した (Fig.1-5A)。その結果、WT に発現させた Ub-P-βgal には 310 fmol のユビキチンが付加されていること (Fig.1-5A, EST)、ユビキチン鎖は K29 鎖ペプチド (~23 fmol) 及び K48 鎖ペプチド (~89 fmol) が含まれていることが分かった。定量値より、Ub-P-βgal は K29 鎖及び K48 鎖が 1 : 4 の比で結合した混合型のユビキチン鎖が付加されていることが明らかとなった (Fig.1-5B)。

WT とは対照的に *ufd4Δ* では、ユビキチン化量および K29 鎖及び K48 鎖が著しく減少していた (Fig.1-5B ; EST, K29, K48)。一方、*ufd2Δ* ではユビキチン化量及び K29 鎖、K48 鎖の量が WT と比較して半分程度に減少した。以上の結果より Ufd4 は Ub-P-βgal に K29 鎖を付加するユビキチンリガーゼであり、Ufd2 は Ufd4 が付加したポリユビキチン鎖に K48 鎖をさらに付加し伸長させることが示唆された (Fig.1-6)。

3. 細胞内において Ufd4 が形成するポリユビキチン鎖の解析

上記の研究ではモデル基質を用いて Ufd4 が K29 鎖を生成することが明らかとなった。しかしながら Ufd4 が K29 鎖生成の主要な酵素なのかは不明である。そこで細胞抽出液に

においてユビキチン鎖の変動を解析することにより Ufd4 の重要性を検討した。

(1) Ufd4 の遺伝子破壊株におけるポリユビキチン鎖の変動解析

Ufd4 による細胞内のユビキチン鎖の変動の解析を試みた。まず、WT 及び *ufd4Δ* における細胞内のユビキチン化レベルを抗ユビキチン抗体によるイムノブロット解析により検討した。その結果、WT と *ufd4Δ* におけるユビキチン化タンパク質の量は同程度であり、Ufd4 はグローバルなユビキチン化に大きく影響しないことが示唆された (Fig.1-7A)。次にポリユビキチン鎖の種類を明らかとするために、細胞抽出液を SDS-PAGE で分離後、ポリユビキチン化タンパク質が濃縮されている 62 kDa 以上の領域のゲル切り出しを行い、Ub-PRM 法によりユビキチン鎖を定量した。その結果、WT と比較し *ufd4Δ* において K29 鎖が約 70%まで、K6 鎖が約 50%まで減少していることが明らかとなった (Fig.1-7B)。K6 鎖および K29 鎖は非典型的ユビキチン鎖として、あまり機能が明確ではないため、以下の解析を行った。

(2) プロテアソーム阻害時における Ufd4 の形成するポリユビキチン鎖の解析

ufd4Δ において Ub-P-βgal が安定化することが明らかとなったので (Fig.1-4A)、プロテアソーム阻害時におけるポリユビキチン鎖の定量を試みた。薬剤感受性である Pdr5 の遺伝子破壊株 (*pdr5Δ*) をプロテアソーム阻害剤 MG132 (100 μM、4 時間) で処理した後、細胞抽出液を調製し Ub-PRM 法により解析した (Fig.1-8)。この結果、*ufd4Δ* では MG132 処理による K29 鎖の増加が WT と比較し半分程度であった。K6 鎖は MG132 処理により WT と同程度の量に増加した。

(3) Ufd4 ユビキチンリガーゼ活性中心変異体を用いたポリユビキチン鎖の解析

Ufd4 が細胞内で K29 鎖及び K6 鎖を形成することが示唆されたため、次に Ufd4 のユビキチンリガーゼ活性中心 (Cys1450) 変異体²⁹ (*ufd4C1450A: ufd4CA*) を用いて Ub-PRM 法により解析した。その結果、予想通り、WT と比較し *ufd4CA* では K29 鎖が減少したが、K6 鎖の減少がみられなかった (Fig.1-9)。よって細胞内において Ufd4 は K29 鎖を形成する主要なユビキチンリガーゼであることが明らかとなった。

3-4 UFD 関連 E3 遺伝子破壊株を用いた K6 鎖の解析

興味深いことに、Ufd4 は他のユビキチンリガーゼ Ubr1 と複合体を形成することや³¹、ユビキチン鎖伸長因子 Ufd2 と相互作用することが知られている⁵。*ufd4CA* において *ufd4Δ* でみられた K6 鎖の減少が回復したことから、Ufd4 と相互作用する別のユビキチンリガーゼが K6 鎖を付加していると推察された。そこで、Ufd2 及び Ubr1 の遺伝子破壊株 (*ufd2Δ*、*ubr1Δ*) から調製した細胞抽出液を Ub-PRM により解析した。その結果、*ufd2Δ* 及び *ubr1Δ* では K6 鎖の減少がみられなかったため (Fig.1-10)、少なくとも Ufd2 および Ubr1 は K6

鎖の生成に関与しないことが明らかとなった。

3-5 Ub-P-βgal における K6 鎖の解析

続いて K6 鎖が Ub-P-βgal に付加されているか検討した。WT、*ufd4Δ*及び *ufd4CA* に Ub-P-βgal を発現させ Ub-PRM 法により Ub-P-βgal に付加されたユビキチン鎖を定量した。その結果、*ufd4Δ*においてみられた K6 鎖の減少が *ufd4CA* で回復しなかった (Fig.1-11)。Ub-P-βgal に付加している K6 鎖の量は全ユビキチンの約 0.07%であったため、Ufd4 による K29 鎖、K48 鎖形成の副産物と考えられ、少なくとも Ufd4 と相互作用する他のユビキチンリガーゼにより付加されるわけではないことが示唆された (Fig.1-12)。

考察

質量分析計を用いたユビキチン鎖定量法の確立

本研究ではすべての種類のポリユビキチン鎖を 75 amol から絶対定量できる Ub-PRM 法を確立した。従来の QqQ 型 MS を用いた SRM 法によるポリユビキチン鎖定量では K48 鎖以外の定量下限値が 10 fmol であり⁷¹、このことから Ub-PRM は現在最も高感度なユビキチン鎖定量法である。またユビキチン鎖鎖特異的抗体についても現在 4 種類 (K11、K48、K63、M1 鎖)しか存在しないため、抗体を用いた解析では未だ全てのユビキチン鎖の変動を解析することができない。また、抗体を用いた解析では、抗体の反応性・感度が異なるために同一のユビキチン鎖の変動を解析することはできるが他の種類のユビキチン鎖との量比を比較することはできない。今回 Ufd4 が K29 鎖及び K6 鎖の形成に関与する可能性が示唆された。混合鎖や分岐鎖が細胞内でどの程度存在するか不明であるが、ユビキチン修飾による細胞内制御機構を解析するにあたり 1 種類のユビキチン鎖の変動を解析するだけでは不十分であると考えられる。Ub-PRM 法を用いた絶対定量により全種類のユビキチン鎖の変動を検討することが可能となった。以上のことから、本研究により確立した Ub-PRM 法によるユビキチン鎖の絶対定量は複雑なユビキチンシステムを解析するために非常に有効な解析法であると考えられる。

Ub-P-βgal のユビキチン化

本研究では Ub-PRM 法によるポリユビキチン鎖定量法の有効性を Ub-P-βgal に付加されたユビキチン鎖を解析することにより検討した。この結果、Ub-P-βgal は細胞内において Ufd4 により付加された K29 鎖に Ufd2 が K48 鎖を付加した混合型のユビキチン修飾を受けていることが明らかとなった (Fig.1-6)。ユビキチンデグロンの変異体を用いた解析により Ufd4 がユビキチン鎖を形成するにはは K29 が重要であること、²⁶、UFD 経路の *in vitro* 再構築系を用いた解析において、Ufd2 は Ufd4 が付加したユビキチン鎖に K48 鎖を伸長することが示されており²⁸、このモデルを裏付けるものであると考えられる。しかしながら今回の解析では Ufd2 の E4 活性が明確にはみられなかった。今回の解析ではユビキチン化された Ub-P-βgal のすべてのゲル領域を切りだして解析を行ったので、分子量ごとに分画して解析することにより Ufd2 の E4 活性が明確に示される可能性が推察される。

本研究により Ub-P-βgal は K29 鎖及び K48 鎖が 1 : 4 の比で結合した混合型のユビキチン鎖が付加されていることが示唆された。しかしながら今回の解析では UFD 基質の量がわからないため、一つの基質に何個のユビキチンがついているかは不明である。本来ならば UFD 基質に対する AQUA ペプチドを作製し、基質の量を明確する必要がある。しかしながら、AQUA ペプチドが高価であること、ユビキチン鎖の長さがヘテロであることから、いずれにしろ平均値しか算出することができない。このため今回は、複雑な *in vivo* にお

る混合型のユビキチン修飾において、どの種類のユビキチン鎖がどのくらい存在しているのかユビキチン鎖の比を出すことに焦点を合わせた。

K29 鎖と K48 鎖を使い分ける生理的意義については全く不明である。*ufd2Δ*において Ub-P-βgal が安定することから (Fig.1-4)、Ub-P-βgal の分解には Ufd4 により付加される K29 鎖のみでは不十分であると考えられる。プロテアソームによるタンパク質分解には 4 つ以上の長さのユビキチン鎖が必要であることが試験管内の結合・分解実験により明らかとなっていることから¹⁹、Ufd4 による Ub-P-βgal へのユビキチン鎖付加が 4 つ未満である可能性が想定される。あらかじめ Ub-P-βgal にユビキチン鎖を付加しておくことにより、刺激や環境変化に応じて Ufd2 がユビキチン鎖を伸長し、速やかに分解に導く可能性が推察される。Ufd4 の内在性の基質に関してはほとんど未知である。今後、Ufd4 のユビキチン化基質を網羅的に同定することにより Ufd4 が関与する制御機構の解明につながると考えられる。

Ub-P-βgal に含まれる K29 鎖 K48 鎖以外の種類のユビキチン鎖

Ub-P-βgal に付加されたポリユビキチン鎖の定量により、K29 及び K48 鎖以外のユビキチン鎖 (K6 鎖、K11 鎖、K33 鎖及び K63 鎖) も同定された。しかしながらこれらのユビキチン鎖の量は Ub-P-βgal に付加された全ユビキチン量の 1.2% 程度であった。また、これら微量なポリユビキチン鎖も *ufd4Δ* において減少し、*ufd2Δ* では WT の半分程度減少するという K29 鎖と同様の変動を示した (Fig1-5)。また *ufd4CA* では *ufd4Δ* の遺伝子破壊株と同様に減少したままであった (Fig.1-11)。このことから、これらの微量に含まれるポリユビキチン鎖はおそらく Ufd4 により誤って付加された副産物であると推察される。ユビキチン変異体を用いた解析においては誤った種類ポリユビキチン鎖を形成される例が報告されているが²¹、内在性レベルでの解析においてそのような報告はないため大変興味深い。細胞内におけるユビキチン鎖形成において、鎖の種類の厳密性がどの程度存在するのか検討する必要がある。さらには細胞内にどの種類のユビキチン鎖がどのくらいの長さで存在し、ユビキチン鎖のどこがユビキチン結合タンパク質に認識されているのかを解析する必要がある。

Ufd4 が制御するポリユビキチン鎖について

ufd4Δ において細胞抽出液中の K29 鎖及び K6 鎖が減少したことから、Ufd4 が K6 鎖に関与することが初めて明らかとなった。K6 鎖の細胞内における機能は、変異体ユビキチンを用いた解析によりプロテアソーム分解に関与するという報告や⁷²、DNA 修復に関与するユビキチンリガーゼ BRCA1/BARD1 が K6 鎖を形成する⁷³などの限定的な情報しかなく、その機能はほとんど未知である。Ufd4 による細胞内制御機構を解析することにより K6 鎖の生理的意義の機能にもつながる可能性が示唆された。また、Ufd4 ユビキチンリガーゼ活性中心変異体では K29 鎖は減少したままであったが K6 鎖は減少しなかった (Fig.1-9)、Ufd4 は K29 鎖を付加するユビキチンリガーゼであり、K6 鎖形成には Ufd4 の E3 活性が

必要ないことが明らかとなった。つまり、Ufd4 は間接的に他の E3 と協調して細胞内の K6 鎖形成を制御することが示唆された。これまで Ufd4 と相互作用することが報告されている Ufd2 および Ubr1 は K6 鎖形成に影響しなかったことから未知の E3 が K6 鎖を制御することが示唆された。Ufd4 の結合因子の網羅的解析により K6 鎖を制御するユビキチンリガーゼが同定できると考えられる。

まとめ

以上の結果から、*in vivo* における複雑試料中から微量なポリユビキチン鎖を絶対定量することができる Ub-PRM 法を確立した。本手法を用いて Ufd4 が K29 鎖を付加する E3 であることを明らかとした。次いで、第二章では Ub-PRM 法を用いてユビキチン修飾系のデューダー分子であるユビキチン結合、タンパク質のユビキチン鎖選択性について解析を進めた。

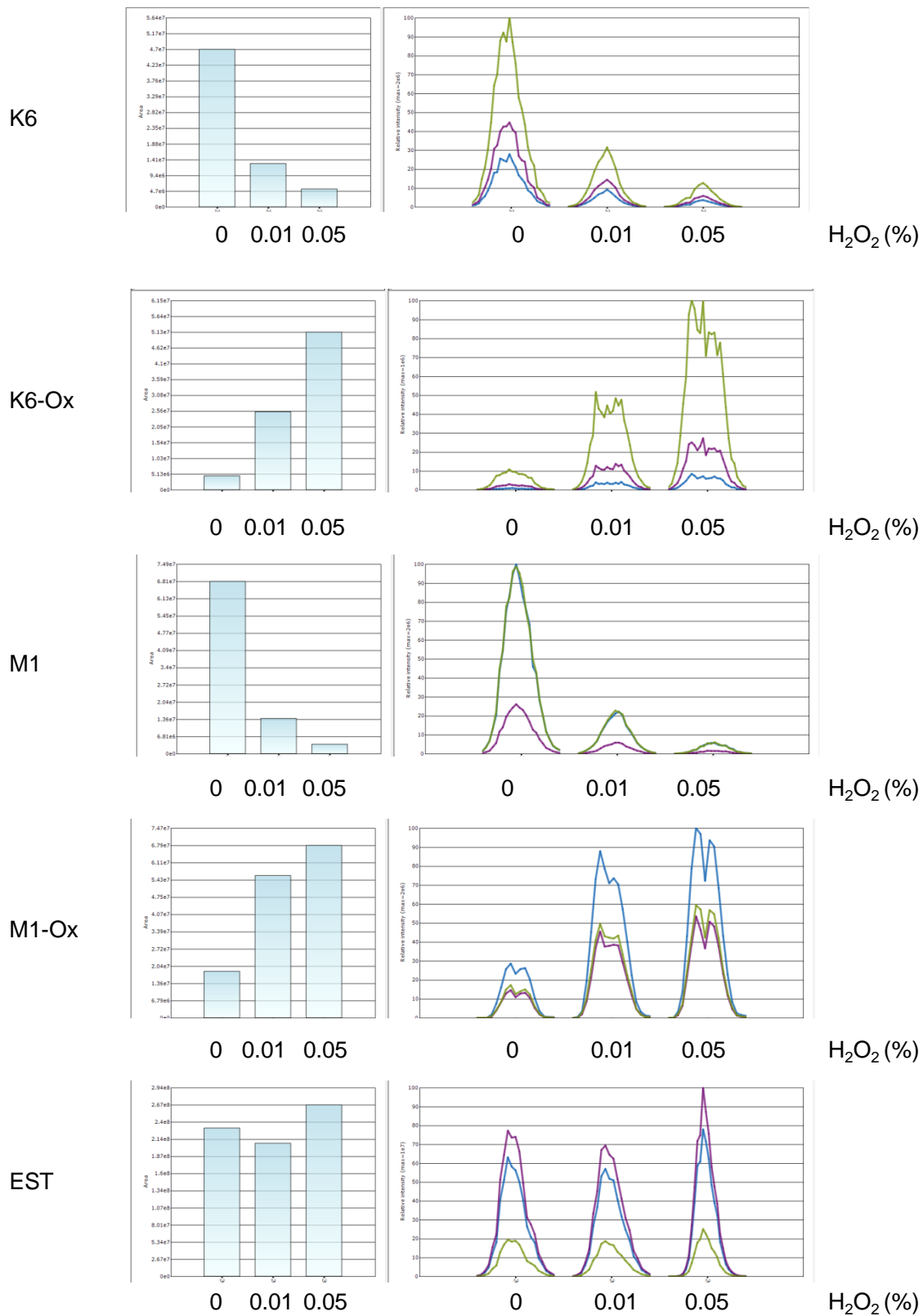
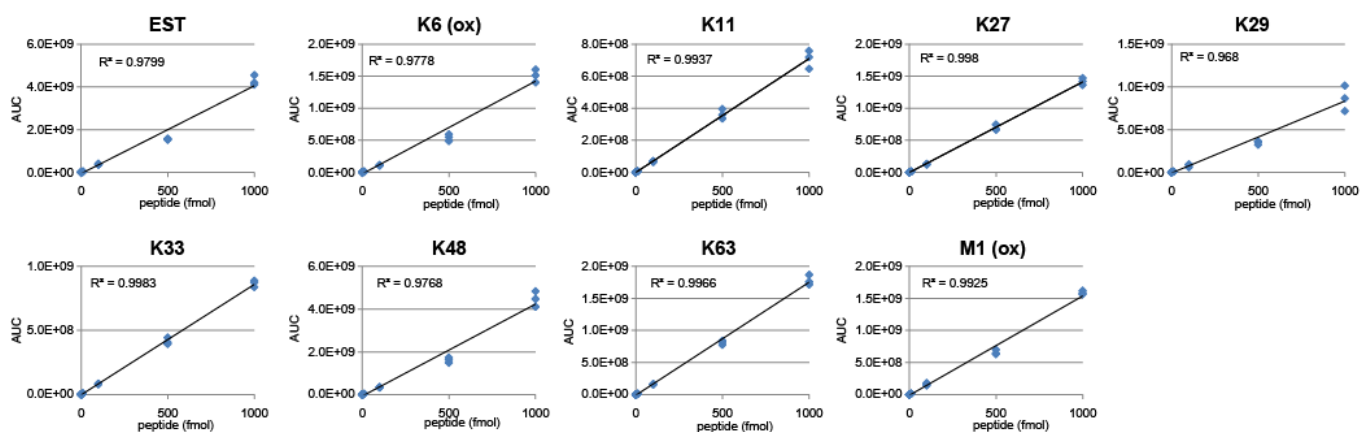


Fig.1-1 M1鎖、K6鎖定量のための過酸化水素処理の検討

ユビキチンAQUAペプチドを終濃度0.01%, 0.05%のH₂O₂処理を行った後、Ub-PRM法にて解析した。K6およびM1ペプチドのメチオニン残基の非酸化体及び酸化体(-Ox)のクロマトグラムのピーク面積(左図)および強度(右図)を示した。

(A)



(B)

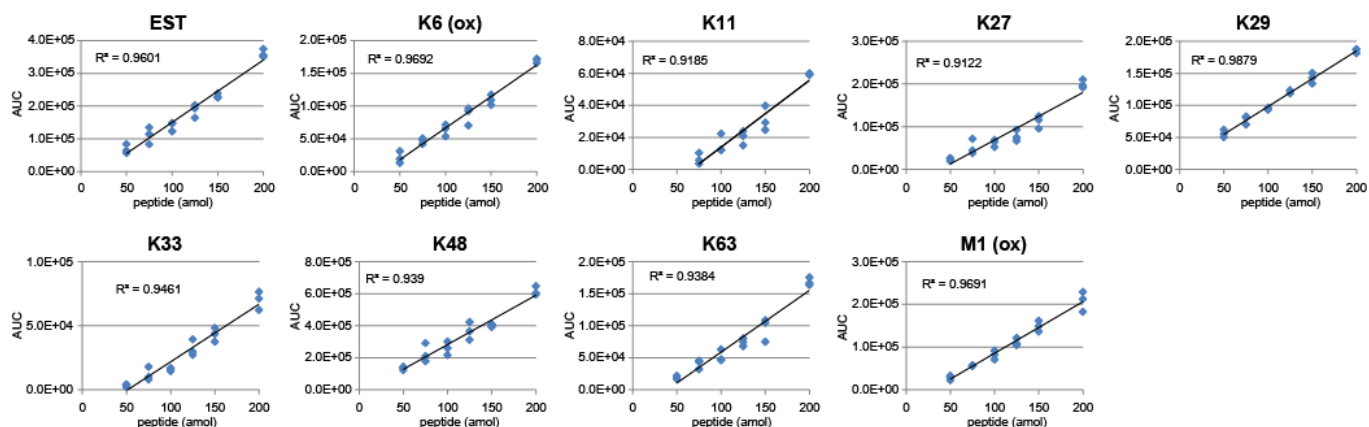


Fig.1-2 Ub-PRM法によるユビキチンペプチドの標準曲線

(A) 100 amol~1 pmolの9種類ユビキチンAQUA (8種類のポリユビキチンリンケージおよび ESTLHVLR: EST) を 500 ngの酵母抽出液トリプシン消化物とを混合した後、Ub-PRM法にて解析し検量線を作成した (n=3, R² = 0.968-0.998)。

(B) 9種類のユビキチンAQUAペプチドを50, 75, 100, 125, 150, 200 amolの濃度で酵母抽出液トリプシン消化物と混合し、Ub-PRM法にて解析し定量下限値 (lower limit of quantitation: LLOQ) を決定した。

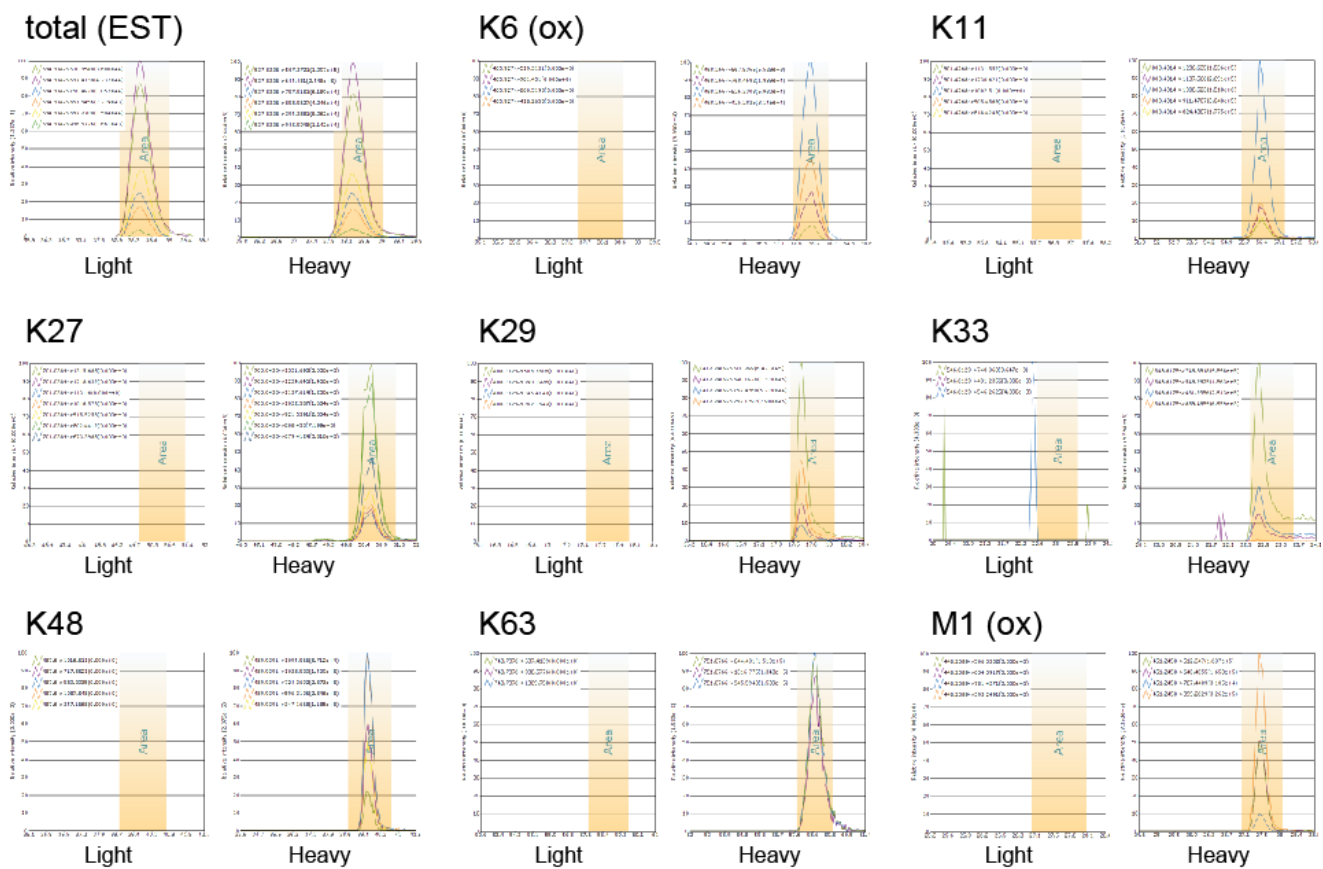
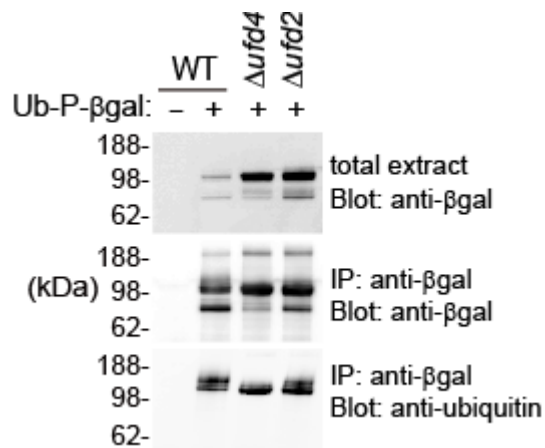


Fig.1-3 ヨードアセトアミド処理による偽ユビキチンペプチドの検出

先行研究により高濃度のヨードアセトアミド (IAA)処理により人工的に偽ユビキチンペプチドを生成することが報告されている。そこでユビキチンモノマーを50 μ MのIAA処理し、そのトリプシン消化物をUb-PRM法にて解析した。内在性のユビキチンペプチド (light)および内部標準であるユビキチンAQUAペプチド (Heavy)のプロダクトイオンのクロマトグラムを示した。

(A)



(B)

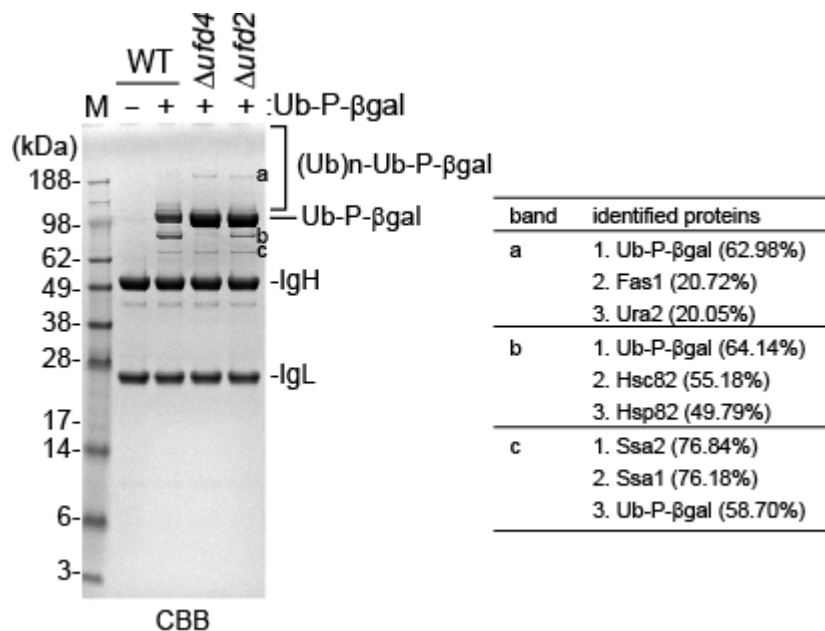
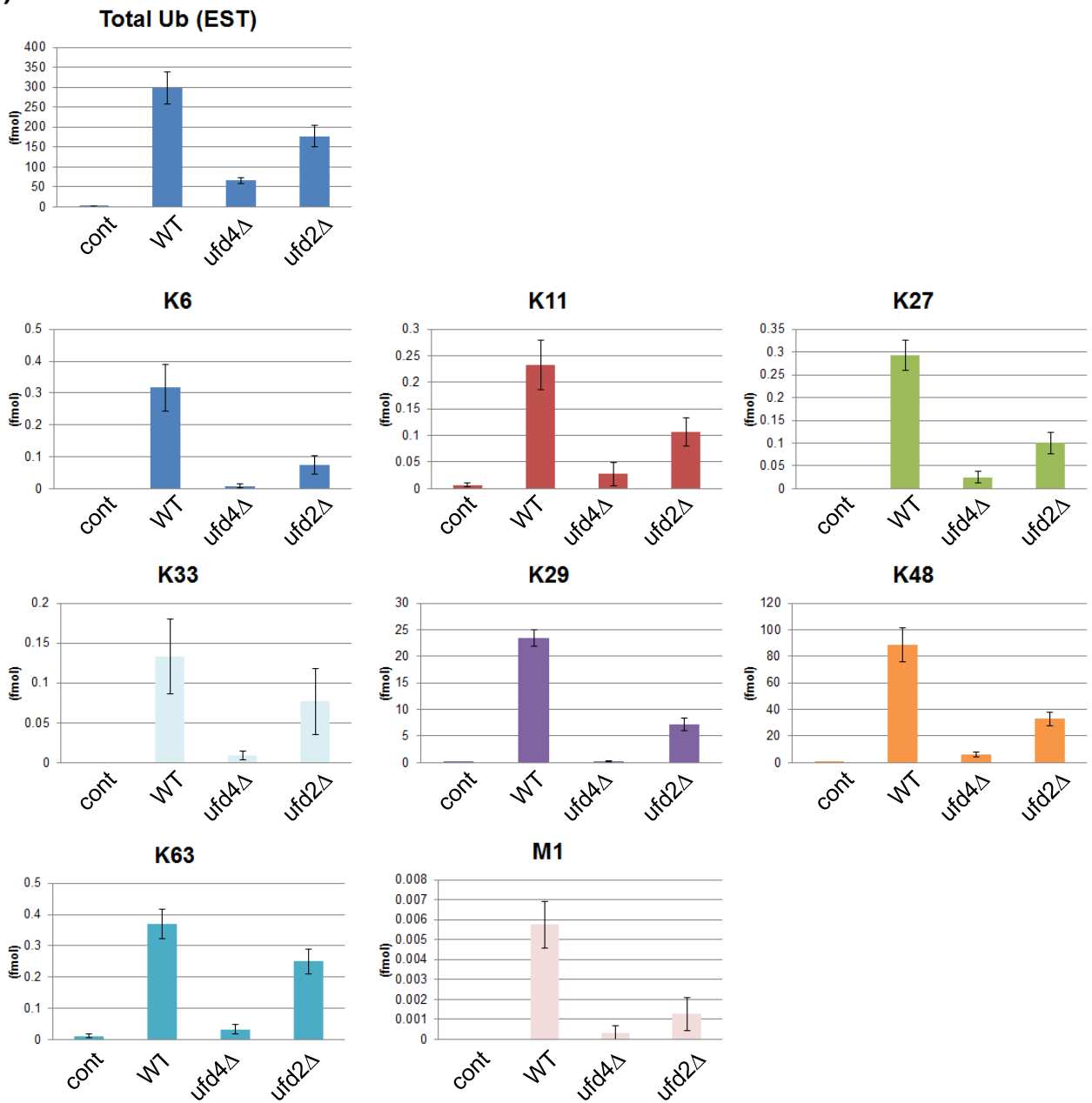


Fig.1-4 UFD変異体株におけるUb-P-βgalの安定性

(A) WT及びUfd4及びUfd2の遺伝子破壊株 ($ufd4\Delta$, $ufd2\Delta$)におけるUb-P-βgalのタンパクレベルを細胞抽出液及び免疫沈降産物においてイムノブロット解析した。

(B) 各変異体から調製したUb-P-βgal精製サンプルをSDS-PAGEに供しCBB染色を行った(左図)。a~cに相当するバンドを切り出し、質量分析計に供した。ハイスコアで同定されたタンパク質を右表に示した(%=coverage)。

(A)



(B)

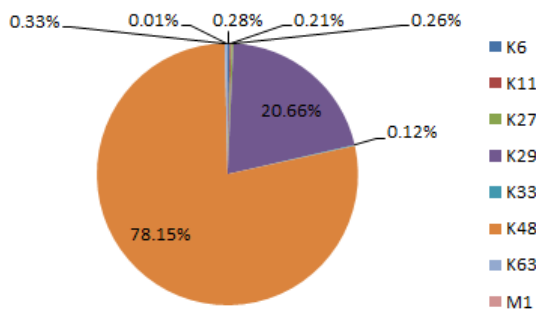


Fig. 1-5 UFD基質に付加されるポリユビキチン鎖の解析

(A) Ub-P-βgalに付加されたユビキチン鎖をUb-PRM法にて定量した。それぞれの種類のポリユビキチン鎖をグラフにて示した (mean±s.e.m.; n=3)。

(B) WTにおいてUb-P-βgalに付加された各ユビキチン鎖の比を円グラフにて示した。

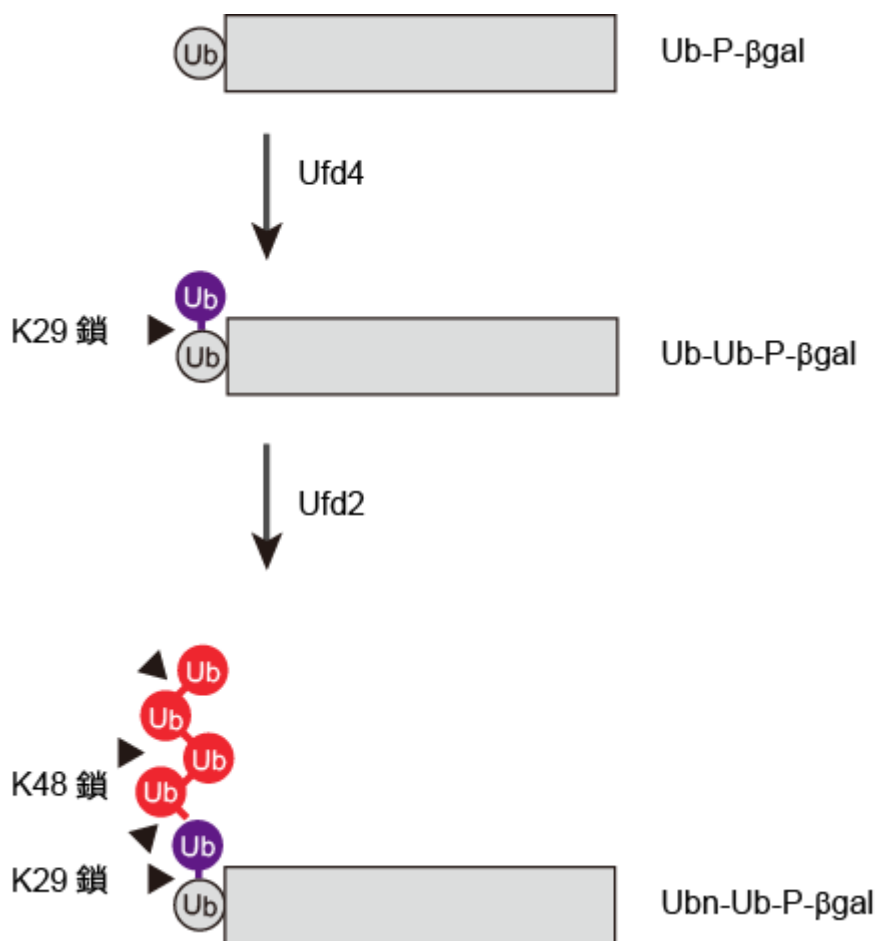


Fig.1-6 UFD基質へのポリユビキチン鎖付加反応の作業仮説

本研究によりUfd4はUFD基質を認識してK29鎖を付加する。続いてUfd2がそのポリユビキチン鎖にK48鎖を伸長するというモデルが示唆された。

総合討論

本章では、本研究により得られた結果と、これまでの他の報告を合わせて、

第一節 本論文のまとめとその意義、

第二節 ユビキチン鎖の高感度絶対定量法について

第三節 Ufd4 による細胞内のポリユビキチン鎖制御について

第四節 細胞内におけるユビキチン結合タンパク質のポリユビキチン鎖選択性について

第五節 エンドサイトーシス基質に K48 鎖及び K63 鎖が含まれる意義について

第六節 ERAD 関連因子により付加された K48 鎖質が Vps27 に認識される意義

の順に議論したい。最後に第七節において今後の展望を述べたい。

第一節 本論文のまとめとその意義

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絶対定量法 Ub-PRM 法を確立した。また、ポリユビキチン鎖に対する高親和性プローブの改良 (TR-TUBE) 及びこれを用いたユビキチン結合タンパク質が認識するポリユビキチン鎖の 2 段階精製という新規手法を開発した。Ub-PRM 法により複雑試料中から 8 種類のポリユビキチン鎖を高感度に検出することが可能となり、内在性レベルの発現でユビキチン鎖の変動の解析が可能となった。また、TR-TUBE を用いたユビキチン結合タンパク質が認識するポリユビキチン鎖の 2 段階精製法はユビキチン結合タンパク質自身に付加されるユビキチン鎖を除くことができ、これら 2 つの新規手法を組み合わせることにより、これまでほとんど構造生物学や試験管内反応でのみ議論されていたユビキチン結合タンパク質のユビキチン鎖選択性を細胞内において直接評価した点で学術的意義も大きいと考えている。

また、今回開発した TR-TUBE はユビキチン化タンパク質を精製する非常に有用なツールであると考えられ、これを応用することによりユビキチン修飾系の分子機構の解明につながると考えられる(第 6 節)。今回開発した手法は、これまで解析が困難であった微量にしか存在しないポリユビキチン鎖の種類、ユビキチン化による制御機構の解明、ユビキチン化タンパク質の濃縮及び網羅的解析等様々な解析に利用することが可能であり、ユビキチン研究領域の基礎研究及びユビキチン修飾系を標的とした薬剤 (リード化合物) のスクリーニングなどの応用研究の発展につながるものと考えている。

第二節 ユビキチン鎖の高感度絶対定量法について

ユビキチン研究においてこれまで細胞内にごく微量しか存在しない種類のポリユビキチン鎖は検出することが困難であったためほとんど無視されてきた。また、ユビキチン鎖の

参考文献

1. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479 (1998).
2. Petroski, M.D. & Deshaies, R.J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 9-20 (2005).
3. Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A. & Melino, G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* **14**, 10-21 (2008).
4. Spratt, D.E., Walden, H. & Shaw, G.S. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J* **458**, 421-437.
5. Koegl, M. *et al.* A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-644 (1999).
6. Ventii, K.H. & Wilkinson, K.D. Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J* **414**, 161-175 (2008).
7. Deshaies, R.J. & Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434 (2009).
8. Kim, M.S. *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature* **509**, 575-581. (2014)
9. Wilhelm, M. *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* **509**, 582-587. (2014)
10. Grabbe, C., Husnjak, K. & Dikic, I. The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 295-307.
11. Komander, D. & Rape, M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203-229.
12. Kim, H.T. *et al.* Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* **282**, 17375-17386 (2007).
13. Meyer, H.J. & Rape, M. Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell* **157**, 910-921.
14. Chau, V. *et al.* A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583 (1989).
15. Pickart, C.M. & Fushman, D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-616 (2004).
16. Tokunaga, F. *et al.* Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol* **11**, 123-132 (2009).
17. Peng, J. *et al.* A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-926 (2003).

18. Gerlach, B. *et al.* Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* **471**, 591-596. (2011)
19. Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C.M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**, 94-102 (2000).
20. Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I. & Rape, M. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* **133**, 653-665 (2008).
21. Saeki, Y. *et al.* Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* **28**, 359-371 (2009).
22. Dimova, N.V. *et al.* APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1. *Nat Cell Biol* **14**, 168-176. (2012)
23. Shabek, N. *et al.* The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation. *Mol Cell* **48**, 87-97. (2012)
24. Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186 (1986).
25. Bachmair, A. & Varshavsky, A. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* **56**, 1019-1032 (1989).
26. Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. & Varshavsky, A. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**, 17442-17456 (1995).
27. Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M. & Masucci, M.G. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol* **18**, 538-543 (2000).
28. Saeki, Y., Tayama, Y., Toh-e, A. & Yokosawa, H. Definitive evidence for Ufd2-catalyzed elongation of the ubiquitin chain through Lys48 linkage. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 840-845 (2004).
29. Ravid, T. & Hochstrasser, M. Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat Cell Biol* **9**, 422-427 (2007).
30. Hwang, C.S., Shemorry, A. & Varshavsky, A. Two proteolytic pathways regulate DNA repair by cotargeting the Mgt1 alkylguanine transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2142-2147 (2009).
31. Hwang, C.S., Shemorry, A., Auerbach, D. & Varshavsky, A. The N-end rule pathway is mediated by a complex of the RING-type Ubr1 and HECT-type Ufd4 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* **12**, 1177-1185. (2010)
32. Husnjak, K. & Dikic, I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem* **81**, 291-322. (2012)

33. Bomar, M.G. *et al.* Unconventional ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding motif within the Y family DNA polymerases iota and Rev1. *Mol Cell* **37**, 408-417. (2010)
34. Penengo, L. *et al.* Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell* **124**, 1183-1195 (2006).
35. Dikic, I., Wakatsuki, S. & Walters, K.J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 659-671 (2009).
36. Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R. & Andre, B. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol* **20**, 196-204. (2010)
37. Komander, D. *et al.* Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep* **10**, 466-473 (2009).
38. Virdee, S., Ye, Y., Nguyen, D.P., Komander, D. & Chin, J.W. Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. *Nat Chem Biol* **6**, 750-757. (2010)
39. Matsumoto, M.L. *et al.* K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol Cell* **39**, 477-484. (2010)
40. Cook, W.J., Jeffrey, L.C., Carson, M., Chen, Z. & Pickart, C.M. Structure of a diubiquitin conjugate and a model for interaction with ubiquitin conjugating enzyme (E2). *J Biol Chem* **267**, 16467-16471 (1992).
41. Yan, J. & Jetten, A.M. RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. *Cancer Lett* **271**, 179-190 (2008).
42. Sato, Y. *et al.* Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO J* **28**, 2461-2468 (2009).
43. Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A. & Fukai, S. Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by NZF domains of TAB2 and TAB3. *EMBO J* **28**, 3903-3909 (2009).
44. Rahighi, S. *et al.* Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* **136**, 1098-1109 (2009).
45. Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T.G. & Madura, K. Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep* **2**, 933-938 (2001).
46. Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T. & Kobayashi, H. Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 745-750 (2002).
47. Kaplun, L. *et al.* The DNA damage-inducible UbL-UbA protein Ddi1 participates in Mec1-mediated degradation of Ho endonuclease. *Mol Cell Biol* **25**, 5355-5362 (2005).

48. Bays, N.W. & Hampton, R.Y. Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr Biol* **12**, R366-371 (2002).
49. Park, S., Isaacson, R., Kim, H.T., Silver, P.A. & Wagner, G. Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites. *Structure* **13**, 995-1005 (2005).
50. Rumpf, S. & Jentsch, S. Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* **21**, 261-269 (2006).
51. de Beer, T., Carter, R.E., Lobel-Rice, K.E., Sorkin, A. & Overduin, M. Structure and Asn-Pro-Phe binding pocket of the Eps15 homology domain. *Science* **281**, 1357-1360 (1998).
52. Shih, S.C. *et al.* Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **4**, 389-393 (2002).
53. Hama, H., Tall, G.G. & Horazdovsky, B.F. Vps9p is a guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport. *J Biol Chem* **274**, 15284-15291 (1999).
54. Davies, B.A. *et al.* Vps9p CUE domain ubiquitin binding is required for efficient endocytic protein traffic. *J Biol Chem* **278**, 19826-19833 (2003).
55. Biederer, T., Volkwein, C. & Sommer, T. Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278**, 1806-1809 (1997).
56. Bagola, K. *et al.* Ubiquitin binding by a CUE domain regulates ubiquitin chain formation by ERAD E3 ligases. *Mol Cell* **50**, 528-539. (2013)
57. Lu, K., Psakhye, I. & Jentsch, S. Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. *Cell* **158**, 549-563.
58. Scott, P.M. *et al.* GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **6**, 252-259 (2004).
59. Erpapazoglou, Z. *et al.* Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic* **9**, 1372-1391 (2008).
60. Kim, H.C. & Huibregtse, J.M. Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Mol Cell Biol* **29**, 3307-3318 (2009).
61. Shih, S.C., Sloper-Mould, K.E. & Hicke, L. Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J* **19**, 187-198 (2000).
62. Terrell, J., Shih, S., Dunn, R. & Hicke, L. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* **1**, 193-202 (1998).
63. Newton, K. *et al.* Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* **134**, 668-678 (2008).

64. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* **4**, 222 (2008).
65. Michalski, A. *et al.* Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111 011015. (2011)
66. Peterson, A.C., Russell, J.D., Bailey, D.J., Westphall, M.S. & Coon, J.J. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics* **11**, 1475-1488. (2012)
67. Kirkpatrick, D.S. *et al.* Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol* **8**, 700-710 (2006).
68. Hjerpe, R. *et al.* Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep* **10**, 1250-1258 (2009).
69. Simicevic, J. *et al.* Absolute quantification of transcription factors during cellular differentiation using multiplexed targeted proteomics. *Nat Methods* **10**, 570-576. (2013)
70. Nielsen, M.L. *et al.* Iodoacetamide-induced artifact mimics ubiquitination in mass spectrometry. *Nat Methods* **5**, 459-460 (2008).
71. Mirzaei, H. *et al.* Characterizing the connectivity of poly-ubiquitin chains by selected reaction monitoring mass spectrometry. *Mol Biosyst* **6**, 2004-2014. (2010)
72. Shang, F. *et al.* Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation. *J Biol Chem* **280**, 20365-20374 (2005).
73. Wu-Baer, F., Lagrazon, K., Yuan, W. & Baer, R. The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem* **278**, 34743-34746 (2003).
74. Shih, S.C. *et al.* A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *EMBO J* **22**, 1273-1281 (2003).
75. Dunn, R. & Hicke, L. Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem* **276**, 25974-25981 (2001).
76. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. & Kanemaki, M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* **6**, 917-922 (2009).
77. Odorizzi, G., Babst, M. & Emr, S.D. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* **95**, 847-858 (1998).
78. Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A. & Stevens, T.H. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389-1402 (1992).

79. Nakano, A., Brada, D. & Schekman, R. A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* **107**, 851-863 (1988).
80. Dores, M.R., Schnell, J.D., Maldonado-Baez, L., Wendland, B. & Hicke, L. The function of yeast epsin and Ede1 ubiquitin-binding domains during receptor internalization. *Traffic* **11**, 151-160. (2010)
81. Schneider, M. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus replication is severely impaired by MG132 due to proteasome-independent inhibition of M-calpain. *J Virol* **86**, 10112-10122. (2012)
82. Xu, P. *et al.* Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133-145 (2009).
83. Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A. & Wolf, D.H. Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem Sci* **36**, 515-523. (2011)
84. Suraweera, A., Munch, C., Hanssum, A. & Bertolotti, A. Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Mol Cell* **48**, 242-253. (2012)
85. Ghaddar, K. *et al.* Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Mol Cell Biol* **34**, 4447-4463. (2014)
86. Soetens, O., De Craene, J.O. & Andre, B. Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* **276**, 43949-43957 (2001).
87. Kimura, Y. *et al.* An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell* **137**, 549-559 (2009).
88. Amerik, A.Y., Nowak, J., Swaminathan, S. & Hochstrasser, M. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* **11**, 3365-3380 (2000).
89. Koyano, F. *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162-166. (2014)
90. Ohtake, F. *et al.* Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO reports in press* (2014).
91. Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T. & Kaiser, P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **192**, 319-360. (2012)
92. Kaiser, S.E. *et al.* Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods* **8**, 691-696. (2011)
93. Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L. & Finley, D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* **15**, 1265-1273 (1995).

94. Mizuno, E. *et al.* Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol Biol Cell* **16**, 5163-5174 (2005).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始丁寧かつ熱心なご指導を賜りました秋山徹教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）、田中啓二所長（東京都医学総合研究所タンパク質代謝研究室）に心より御礼を申し上げます。本研究において常に親身にご指導くださり、適切なお助言を頂きました佐伯泰博士（東京都医学総合研究所タンパク質代謝研究室）に深く感謝いたします。温かいご指導とお心遣いを賜りました吉原英人博士（東京都医学総合研究所タンパク質代謝研究室）に深く感謝いたします。また、親身に相談に乗って下さいました同研究室の海保愛氏、新井直子氏に深く感謝いたします。

*Sec12-4*株を御供与頂いた Dr. Randy Schekman (Department of Molecular and Cell Biology, Howard Hughes Medical Institute, University of California, Berkeley)、GFP-CPS プラスミドを御供与頂いた Dr. Scott Emr (Department of Molecular Biology and Genetics, Cornell University, Ithaca)に深く感謝いたします。そして、研究生活全般にわたり支えてくださった家族、友人に深く感謝いたします。