

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 28 年 4 月 26 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 愛媛大学プロテオサイエンスセンター
職 名 教授
研究代表者 澤崎 達也

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 13016)

1. 共同研究課題名	コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた網羅的ユビキチン化解析		
2. 共同研究目的	代謝シグナルに関与するユビキチンリガーゼの同定と生物学的役割の解明を目指す。		
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担
(研究代表者) 澤崎 達也	愛媛大学プロテオサイエ ンスセンター	教授	研究立案
(分担研究者) 竹田 浩之 高橋 宏隆 上松 篤史 土居 耕介 中島 達朗 山中 聡士	愛媛大学プロテオサイエ ンスセンター	助教 助教 大学院生 大学院生 大学院生 大学院生	スクリーニング実験 細胞生物学的実験 細胞生物学的実験 生化学実験 生化学実験 薬剤スクリーニング
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	分子細胞制御分野	氏 名 徳永文稔

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

1. CYLD を分解する新規 E3 リガーゼについて、直鎖型 Ub 鎖を介した NF- κ B シグナル活性化経路における役割について生化学的手法および細胞生物学的手法を用いて明らかとする。さらに、新規 E3 リガーゼによる CYLD の分解が、TNF- α やその他の細胞刺激によって制御されているか否かを調べ、CYLD 分解の生理的意義と NF- κ B 経路における役割を明らかにする。
2. DUB のプロテインアレイの完成を目指し、クローニングおよび転写鑄型の構築を行っていく。またすでにタンパク質合成に成功している DUB については、活性の有無やその基質特異性決定などの生化学的な解析を行う。さらに CYLD や OTULIN など、直鎖型ユビキチン鎖を分解する DUB については、東京大学創薬オープンイノベーションセンターより分与頂いた 9,600 種類の化合物ライブラリーを用いて阻害剤探索を行う。
3. 直鎖型 Ub 鎖とヒトのタンパク質 20,000 種類の *in vitro*における網羅的な相互作用解析を行い、直鎖型 Ub 鎖に結合する新規 Ub 結合タンパク質を同定し、直鎖型 Ub 鎖を介したシグナル伝達経路ネットワークの解明を試みる。

7. 共同研究の成果

1. CYLD を分解する E3 リガーゼについて、TNF- α を介して惹起される NF- κ B 経路における詳細な作用点の解析を行った。その結果、この E3 リガーゼの新たな相互作用因子として RIP などの重要な因子が同定された。さらにこの E3 リガーゼのノックアウト細胞株の樹立に成功し、現在この細胞株を用いて分子メカニズムの解明を行っている。
2. これまでに約 80 種類の DUB について、タンパク質アレイ化に成功した。この DUB タンパク質アレイを用いて、NF- κ B 経路の主要な制御因子である NEMO と結合する新規 DUB の探索を行った結果、この NEMO に結合し、NF- κ B の活性化を有意に抑制する新規 DUB を同定した。現在、この DUB の NF- κ B 抑制の詳細なメカニズムを解析している。
3. ヒトの 20,000 種類組換えタンパク質を用いて、直鎖型 Ub 鎖結合タンパク質の網羅的探索を行い、約 50 種類のタンパク質を同定した。これらのタンパク質の中には既報の直鎖 Ub 鎖結合タンパク質 10 種類が含まれており、本スクリーニングが機能していることを示している。またこれまでに直鎖 Ub 鎖に結合する報告がない 40 種類のタンパク質についても、そのほとんどがアミノ酸配列にユビキチン鎖結合モチーフを有しており、これらが新規な直鎖型 Ub 鎖である可能性は非常に高い。現在、これらについて詳細な機能解析を行っている。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

<国際学会>

1. Takahashi H, Doi K, Yamanaka Y, Kuwada S, Goto E, Tokunaga F, Sawasaki T. Establishment of deubiquitinating enzyme protein array based on wheat cell-free system for a novel biochemical tool. Ubiquitin signaling joint with the meeting on NF- κ B and MAP kinase signaling in inflammation, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (13-17th, 2016, Whistler, British Columbia, Canada) 口頭発表。
2. Uematsu A, Takahashi H, Takeda H, Imai Y, Yanagihara Y, Tokunaga F, Yamada R, Miyagi R, Sawasaki T. A novel oncogene E3 ligase degrades deubiquitinating enzyme CYLD and promotes NF- κ B activity. Ubiquitin signaling joint with the meeting on NF- κ B and MAP kinase signaling in inflammation, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (13-17th, 2016, Whistler, British Columbia, Canada). ポスター発表。
3. Yamanaka S, Takahashi H, Tokunaga F, Sawasaki T. Development of CYLD and OTULIN inhibitors based on wheat cell-free system. Ubiquitin signaling joint with the meeting on NF- κ B and MAP kinase signaling in inflammation, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (13-17th, 2016, Whistler, British Columbia, Canada). ポスター発表。

<国内学会>

口頭発表 2件、ポスター発表 2件