

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 26 年 4 月 30 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 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
勤務先所在地 〒 790-8577
愛媛県松山市文京町3
電 話 番 号 089-927-8530
ファックス番号 089-927-9941
E - メ - ル sawasaki@ehime-u.ac.jp

下記により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 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日				
4. 共同研究組織					
氏 名	年齢	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 澤崎 達也	46	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 上松 篤史	37 23	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	助教 大学院生	スクリーニング実験 細胞生物学的実験	
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

本研究においては、炎症反応や免疫応答の主要な調節因子である NF- κ B シグナル経路を負に制御する CYLD に着目し、CYLD の細胞内におけるタンパク質量を調節する E3 ユビキチンリガーゼ (以下、E3) の同定を目指した。これまでに、愛媛大学プロテオサイエンスセンターが有するコムギ無細胞タンパク質合成系 (以下、コムギ無細胞系) を基盤とした網羅的なタンパク質-タンパク質相互作用システムを用いて、*in vitro* において CYLD に結合する E3 を複数同定している。そこで、本共同研究において、E3 の CYLD 結合部位の特定、細胞内における CYLD-NEMO 複合体との相互作用解析、諸条件における NF- κ B 活性測定などを行い、CYLD ユビキチン化および分解の生理的意義と NF- κ B 経路における役割について主に細胞生物学的手法を用いて明らかにする。

また、同じくコムギ無細胞系を用いた E3 スクリーニングによって、細胞増殖やエネルギー代謝に重要な役割を担う LKB1 の分解を誘導する E3 の探索・同定を行い、ユビキチン化 LKB1 の生物学的役割を細胞レベルで解析する。

さらに、直鎖状ユビキチン鎖を含む各結合様式のユビキチン鎖と我々が保有しているタンパク質ライブラリを相互作用させ、特定のユビキチン鎖を認識、結合する因子の探索を行う。

7. 共同研究の成果

本共同研究において、コムギ無細胞系を用いた相互作用解析によって同定された CYLD 結合 E3 の一つが、細胞内でも CYLD と結合し、ユビキチン-プロテアソーム系を介して CYLD を分解することを見出した。また、この新規 E3 の高発現細胞において、TNF- α や LUBAC によって誘導される NF- κ B の転写活性を亢進させ、逆にロックダウン細胞では同活性を減少させることが明らかとなった。前述のように CYLD は NF- κ B を負に制御する因子であることから、新規 E3 が CYLD を分解することで NF- κ B シグナルを亢進させていると考えられ、NF- κ B 経路の新たな調節機構の発見が期待される。

CYLD はがん抑制タンパク質としても知られているが、この E3 を高発現させたマウス繊維芽細胞では、細胞の増殖速度の亢進や、がん化した細胞に特徴的な軟寒天培地上での増殖が認められた。この結果は、新規 E3 が細胞内で CYLD を分解することでがん化を促進するがんの原因タンパク質として機能している可能性を強く示唆しており、この E3 をターゲットとした創薬の可能性も期待される。

また、本研究では LKB1 結合 E3 の一つが細胞内においても分解することを見出した。この E3 の細胞や個体レベルでの機能はほとんど明らかとなっていないが、本研究ではこの LKB1 分解 E3 が前述のエネルギー代謝シグナルや細胞増殖の制御に関わることを見出した。

さらに、コムギ無細胞系を用いてユビキチン鎖に相互作用するタンパク質の網羅的なスクリーニングを行い、いくつかの E3 やプロテインキナーゼがユビキチン鎖に結合することを見出した。現在、これらのタンパク質の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

<国際学会>

Uematsu A, Takahashi H, Takeda H, Tokunaga F and Sawasaki T 「**Identification of a Novel E3 Ubiquitin Ligase for Tumor Suppressor CYLD by Wheat Cell-free Based Protein Array**」, KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, The Ubiquitin system: From basic science to drug discovery (A2), Montana, U.S.A. 2014. Jan. 7-12th.

<国内学会>

Uematsu A, Takahashi H, Takeda H, Tokunaga F and Sawasaki T 「Identification of a Novel E3 Ubiquitin Ligase for Tumor Suppressor CYLD by Wheat Cell-free Based Protein Array」, 『第 86 回 日本生化学会大会』, 横浜, 2013 年 9 月

Uematsu A, Takahashi H, Takeda H, Tokunaga F and Sawasaki T 「Identification of a Novel E3 Ubiquitin Ligase for Tumor Suppressor CYLD by Wheat Cell-free Based Protein Array」, 『第 36 回 日本分子生物学会年会』, 神戸, 2013 年 12 月