

ユビキチン化基質網羅的同定による免疫炎症制御機構の解明

渡部 昌

北海道大学大学院医学研究院 生化学分野

【研究の背景】

ユビキチンによるタンパク質の可逆的修飾は、リン酸化、アセチル化、メチル化などと同様に、様々な生命現象を支える極めて重要な翻訳後修飾の一つである。ユビキチン化は、ヒトゲノム中に約 1000 遺伝子(全遺伝子の約 5%)存在するユビキチンリガーゼ (E3) が選択的に基質を認識することによって起こる。したがって個々の E3 に特異的な基質を同定しそのユビキチン化部位を決定することは様々な生命現象を理解する上で重要である。我々はこれまで、E3 遺伝子群のサブファミリーの 1 つである TRIM 型 E3 の基質の同定およびその機能の解析を中心に研究を行ってきたが、近年、数多くの TRIM 型 E3 が自然免疫シグナルの制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

一方 E3 の基質同定に関しては、多くの研究者のこれまでの取組みにも関わらず、膨大な E3 酵素の数に比して基質同定の成功例は極めて少なく、検証に多大な時間を要するのが現状であった。これは、E3 と結合力の強いタンパク質はユビキチン化を受けない場合が多いことや、偽陽性が多いことなどの特異度の低さが課題であった。近年、質量分析計を用いたアプローチが一般的となっているが、質量分析計を用いて標的を同定する際に最も重要なことは、標的基質のみを濃縮して精製することである。近年になり、ユビキチン結合ドメインよりも 1000 倍高い結合親和性を持つユビキチン高親和性人工タンパク質 (TUBE) と、ユビキチン化ペプチドを認識する抗体 (K-ε-GG 認識抗体) が開発された (引用文献 1、2)。筆者は、ユビキチン化を受けた基質を特異的に精製するために、K-ε-GG 認識抗体と TUBE を用いることに着目し、新規基質同定法の確立に取り組んでおり、既知の基質に加えて、新規の基質候補の同定にも成功している。

【目 的】

TRIM 型ユビキチンリガーゼ (E3) が免疫炎症シグナルの制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。しかし、TRIM 型 E3 が免疫炎症シグナル時にどの基質にどの程度ユビキチンを付加しているかという網羅的な情報は得られていない。そこで本研究では、パターン認識受容体を介した IRF シグナルに着目し、これらのシグナルに關与する TRIM 型 E3 の基質を新規手法によって網羅的に同定することで、免疫炎症応答の定量的な理解を目指した。

【方 法】

われわれは E3 の基質を同定する新規手法を確立しており、その手順は下記ようになる。すなわち、1) TRIM 型 E3 の基質を同定するためのプローブを作製し、2) プローブ安定発現細胞株を樹立し、3) 抗 FLAG 抗体を用いて基質を含む複合体を精製し、4) トリプシンによってペプチドへと分解する。5) ユビキチン化の痕跡を認識する抗体 (抗 diGly 抗体) を用いてユビキチン化を受けたペプチドのみを再精製し、6) IonTrap-Orbitrap 型質量分析器により基質を同定し、7) ユビキチン化アッセイによってその妥当性を評価する。免疫炎症応答の 1 つの例として、プローブ安定発現細胞内に polyI:C を導入し、2、4、6 時間後に回収し、未刺激の細胞と共にサンプル調製を行い、基質の同定を行った。

【結 果】

20 の TRIM 型 E3 (TRIM1, TRIM3, TRIM5a, TRIM6, TRIM11, TRIM14, TRIM15, TRIM18, TRIM21, TRIM25, TRIM27, TRIM31, TRIM32, TRIM36, TRIM38, TRIM42, TRIM45, TRIM50, TRIM59, TRIM67) について基質の同定を試みた。このうち、13 の E3 遺伝子について何らかの基質候補を得ることができた。また、このうち 8 の E3 遺伝子については polyI:C 刺激に応答してユビキチン化を受ける基質候補を同定することができた。

【考 察】

今後、得られた基質候補に対して個別にユビキチン化アッセイを行うことにより、真の基質であるかどうかを検討する。現時点で得られている基質候補が持つと考えられる機能は多岐に渡っている。詳細に検討していくことで、免疫炎症応答時の TRIM 型 E3 の役割を明らかにしていきたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

自然免疫・炎症シグナルにおける酵素・基質関係の全貌を明らかにすることにより、炎症関連疾患の新たな薬剤標的を得ることが期待できる。疾患における意義を今後検討していきたい。

【参考・引用文献】

1. Hjerpe, R. et al. Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. EMBO Rep. 10(11),1250-1258, 2009.
2. Xu G et al. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. Nat Biotechnol. 28(8):868-73., 2010.