

# TR-TUBE method

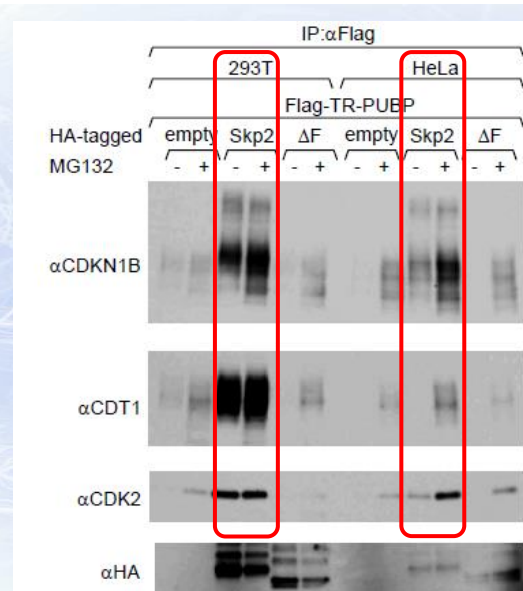
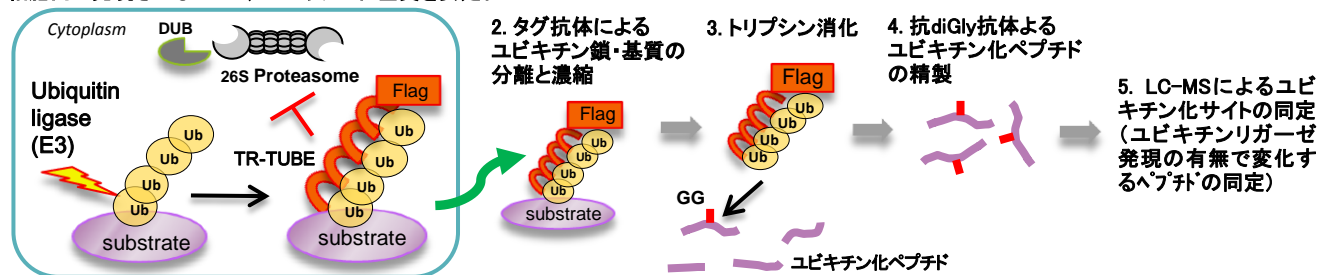
## — ユビキチン化基質の効率的な同定法の開発 —

### 【研究の背景と経緯】

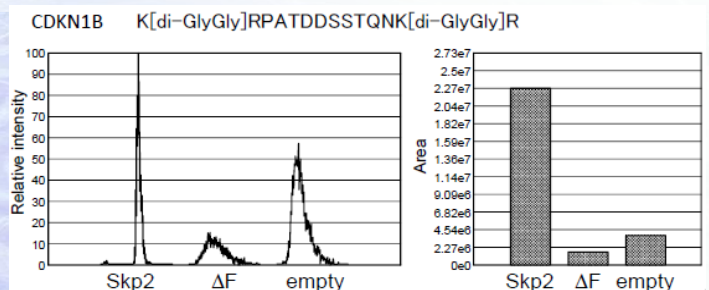
- ◆ ユビキチンを目印としたプロテアソームによる選択的分解系「ユビキチン-プロテアソーム系」は、細胞内の不要なタンパク質や異常タンパク質を速やかに除去させる役割を担っています。この系は、正しい細胞周期の進行や細胞内の恒常性の維持に寄与しているため、異常が生じると、神経変性疾患やがん等、多様な疾患の原因となることが知られています。また、最近では、ユビキチン鎖は細胞の情報伝達系・損傷DNAの修復や細胞表面にある膜タンパク質の細胞内への取り込みの信号として働くことなども明らかになっています。
- ◆ ユビキチン-プロテアソーム系は、ユビキチン化活性化酵素(E1)・ユビキチン結合酵素(E2)・ユビキチンリガーゼ(連結酵素:E3)の3種類の酵素群の働きにより進められます。どのタンパク質にユビキチン鎖を付けるのかその選択性を決めるのは、ヒトではおよそ600種類あるユビキチンリガーゼ(E3)ですが、その標的分子(基質)が分かっているユビキチンリガーゼはごく一部に過ぎません。
- ◆ ユビキチン化基質は多くの場合プロテアソームにより分解されてしまうため、もしくは細胞内に存在する脱ユビキチン化酵素(DUB)によりユビキチン鎖がはずされてしまうため、ユビキチン鎖が付いた状態で細胞内に存在する量は極わずかです。そのため、プロテアソームや脱ユビキチン化酵素の阻害剤で細胞を処理します。また、Tandem ubiquitin-binding entities (TUBE) や diGly抗体(トリプシン消化に露出するユビキチン化サイト(Lys-ε-Gly-Gly (diGly) を認識)が使用されています。しかし、そのような従来法では細胞から抽出したタンパク質に反応させて行なうこともあり、目的のユビキチンリガーゼの基質を優先的に安定に保つことは困難でした。
- ◆ 今回開発した「TR-TUBE法」で、細胞内でのユビキチン化基質タンパク質を効率良く同定することが可能となりました。

### 【研究技術の概要】

1. ユビキチンリガーゼとTrypsin-Resistant(TR)-TUBEを細胞内に発現させることで、ユビキチン化基質を安定化



(左図) 293T細胞とHeLa細胞にFlag-TR-TUBEとHAタグを付けた空ベクター、ユビキチンリガーゼE3であるSkp2、Skp2ドミナントネガティブ体(ΔF)のいずれかを共発現させ、既知の基質タンパク質CDKN1B、CDT1、CDK2、について確認している。



(上図) 左図に確認した既知の基質タンパク質のうち、CDKN1Bについてペプチドの定量解析を行った。右パネルは、左パネル中のピーク面積を定量したものである。

その他のユビキチンリガーゼE3特異的な基質タンパク質について確認、そして新規のユビキチン基質タンパク質を同定中。

Paper ■ Y. Yoshida et. Al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 14;112(15):4630-5. A comprehensive method for detecting ubiquitinated substrates using TR-TUBE  
Patent Application

■ US 61/901452, A Novel Versatile Method For Determining Ubiquitin Chain Length Reveals Functional Units Of Polyubiquitin Chains In Cells  
■ PCT 2014/JP2014/008053, into the national stage [US, EP, JP \*] Method For Identifying Polyubiquitinated Substrate

\*JP; 2015-547782, EP; 14863005.6, US; 15/035357

本技術を導入し、自社内での創薬開発研究にご利用いただく企業様を募集中です。



Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science  
公益財団法人東京都医学総合研究所 知的財産活用センター 担当 牧野  
<http://www.igakuken.or.jp/tlo/> e-mail:chizai@igakuken.or.jp