

博士論文番号: 1481009

G タンパク質のユビキチン修飾を 制御する分子機構の解析

鯉森 貴行

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子情報薬理学研究室

主指導教官：伊東 広 教授

提出日：平成 29 年 3 月 17 日

目次

第1章 序論.....	-4-
1.1 ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質.....	-4-
1.2 Gas タンパク質と疾患の関係.....	-4-
1.3 ユビキチン-プロテアソーム経路.....	-5-
1.4 基質タンパク質のユビキチン鎖.....	-7-
1.5 G タンパク質のユビキチン化における分解制御.....	-8-
1.6 受容体非依存的な G シグナル制御因子: <i>ric-8</i>	-8-
1.7 Gq シグナル依存的な Gas の分解機構.....	-10-
1.8 本研究の目的.....	-10-
第2章 材料と方法.....	-12-
2.1 試薬及び抗体.....	-12-
2.2 使用したプラスミド一覧.....	-14-
2.3 細胞培養.....	-14-
2.4 遺伝子導入法.....	-14-
2.5 遺伝子のクローニングとプラスミド構築.....	-15-
2.6 Gas のリジンをアルギニンに置換した変異体プラスミドの作製.....	-16-
2.7 Alpha Screen により得られた遺伝子のプラスミド構築.....	-19-
2.8 細胞内タンパク質相互作用実験.....	-20-
2.9 <i>in vivo</i> ユビキチン化アッセイ.....	-21-
2.10 <i>in vitro</i> ユビキチン化アッセイ.....	-22-
2.11 遺伝子発現抑制実験.....	-23-
2.12 RNF125 および RNF125CA タンパク質の発現と精製.....	-28-
2.13 シクロヘキシミド (CHX) チェイス実験.....	-30-
2.14 CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色.....	-30-
2.15 タンパク質定量.....	-31-
2.16 ウェスタンブロット.....	-31-
2.17 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ.....	-33-
2.18 RNA 抽出.....	-33-
2.19 逆転写反応.....	-34-
2.20 定量 PCR.....	-34-

第3章 実験結果.....	-36-
3.1 MS解析による Gas と相互作用するユビキチン化酵素群の解析.....	-36-
3.1.1 背景.....	-36-
3.1.2 Gas と相互作用するユビキチン化関連酵素群の同定.....	-36-
3.1.3 TRAF7、USP29、USP44 と Gas の結合試験.....	-37-
3.1.4 TRAF7が Gas ユビキチン化に与える影響の検討.....	-38-
3.1.5 USP29 及び USP44 が Gas ユビキチン化に与える影響の検討.....	-38-
3.1.6 TRAF7、USP29、USP44 の 過剰発現及び発現抑制に伴う内在性 Gas 量の検討.....	-38-
3.2 Alpha Screen による Gas と相互作用する E3 リガーゼの探索.....	-49-
3.2.1 背景.....	-49-
3.2.2 候補分子の発現抑制による Gas に対する E3 リガーゼの絞り込み.....	-49-
3.2.3 E3 リガーゼ候補タンパク質と Gas との相互作用試験.....	-49-
3.2.4 MKRN1 及び RNF125 が Gas ユビキチン化に与える影響.....	-50-
3.2.5 前立腺癌細胞 (PC-3 細胞) と HEK293T 細胞を用いた RNF125 発現抑制実験.....	-50-
3.2.6 RNF125 発現抑制における Cycloheximide チェイス実験.....	-50-
3.2.7 RNF125 の WT と CA と Gas の相互作用確認実験.....	-51-
3.2.8 RNF125 の WT と CA による Gas ユビキチン化の検討.....	-51-
3.2.9 RNF125 の WT と CA タンパク質の精製.....	-52-
3.2.10 RNF125 が Gas をユビキチン化する酵素であるかの検討.....	-52-
3.2.11 RNF125 が Gs シグナルに与える影響.....	-52-
3.2.12 Ric-8B が RNF125 依存的な Gas ユビキチン化へ与える影響の検討.....	-53-
3.3 Gas ユビキチン化部位の探索.....	-74-
3.3.1 背景.....	-74-
3.3.2 Gas のユビキチン化部位の探索.....	-74-
3.3.3 Gas のユビキチン鎖の同定.....	-74-

第4章 考察.....	-81-
4.1 RNF125によるGasユビキチン化制御機構.....	-81-
4.2 Ric-8BとUSP29によるGasユビキチン化抑制機構.....	-84-
4.3 Gas変異体を用いたユビキチン化部位の探索.....	-86-
4.4 Gタンパク質シグナルを制御するRNF125の生理的機能.....	-92-
第5章 参考文献.....	-93-
謝辞.....	-103-

第 1 章 序論

1.1 ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質

ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) は、 α サブユニット ($G\alpha$) と $\beta\gamma$ サブユニット複合体 ($G\beta\gamma$) から構成されており、細胞表層に存在する G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) を介した細胞外からのシグナルを細胞内へと伝達するグアニンヌクレオチド依存性の分子スイッチとして機能する。ホルモン、光あるいは匂い物質などの細胞外のシグナルはそれぞれ特異的な GPCR によって受容され、活性化された GPCR は $G\alpha\beta\gamma$ と相互作用することによって $G\alpha$ における GDP/GTP 交換反応を触媒する。この交換反応によってできた $G\alpha$ -GTP は $G\beta\gamma$ と解離するとともに、受容体との相互作用も消失する。解離した $G\alpha$ -GTP と $G\beta\gamma$ はそれぞれ独立あるいは協調的に下流標的分子 (エフェクタータンパク質) を活性化し、さらに下流へとシグナルを伝達する。 $G\alpha$ は内在的に GTP 加水分解 (GTPase) 活性を持っており、 $G\alpha$ に結合していた GTP を GDP とリン酸へ加水分解する。結果として、GDP と結合した $G\alpha$ は再び $G\beta\gamma$ と結合し、G タンパク質シグナルは終結する。このような活性化機構は、GPCR がグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide exchange factor: GEF) として働く G タンパク質のシグナル伝達機構として良く知られている (Gilman, A. G. 1987; Kaziro, Y., *et al.* 1991)。近年、このような GPCR による G タンパク質活性化機構だけでなく、細胞質中に存在するシグナル調節因子や、 $G\alpha$ の翻訳後修飾が G タンパク質のシグナル制御に重要な働きを持つことが明らかとなりつつある (Chen, C.A., and Manning, D.R. 2001)。翻訳後修飾の一つである脂質修飾は、効率的に G タンパク質シグナルを伝達するために必須である (Huang, C., *et al.* 1999; Wedegaertner, P.B., *et al.* 1993; Iiri, T., *et al.* 1996)。

1.2 G_s シグナル

Gα は一次配列や下流のエフェクター分子との相同性から 4 つのサブファミリーに分類されている。Gαs はアデニル酸シクラーゼを活性化するタンパク質として Gα サブユニットの中で最初に見出された。一方、Gαi はアデニル酸シクラーゼに対して抑制的に働くことによって cAMP シグナルに対して拮抗的に働く。Gαq は cAMP と並びセカンドメッセンジャーとして知られる細胞内の Ca²⁺の動員を促すホスホリパーゼ C (1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta: PLC) を活性化する。PLCβ は、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PI (4, 5) P2) を分解し、セカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (Inositol trisphosphate: IP3) とジアシルグリセロール (Diacylglycerol: DAG) を産生する。IP3 は小胞体膜上に存在する IP3 受容体に作用し細胞質への Ca²⁺放出を引き起こし細胞内 Ca²⁺濃度を高め、DAG は、プロテインキナーゼ C (Protein kinase C: PKC) の活性化を引き起こす。Gα12 は p115RhoGEF 等の Rho ファミリー低分子量 GTPase に対する GEF の活性を制御することにより Rho の活性を調節し、アクチン骨格系のリモデリングを誘導する。

Gαs は生体内において普遍的に発現しており、心臓において β-アドレナリン受容体を介した心筋の収縮や拍動の調節に必須のタンパク質である (Germain-Lee, E. L., *et al.* 2002) 。Gαs をコードする *GNAS* 遺伝子の機能欠失変異は骨形成異常に関与すること、*GNAS* 遺伝子の変異に伴う Gs シグナル減弱は偽性副甲状腺機能低下症に関与すること、*GNAS* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは胎生致死となることなどが報告されている (Germain-Lee, E. L., *et al.* 2002; Regard, J. B., *et al.* 2013; Yu, S., *et al.* 1998) 。また前立腺癌と Gs シグナルはよく研究されており、恒常的な Gs シグナルによる刺激は、前立腺癌の増殖、浸潤、転移に必要であることが知られている (Hulsurkar, M., *et al.* 2017) 。このように、Gαs 及び Gs シグナルは生体内で非常に重要な機能を担う分子の一つであることが知られている。

1.3 ユビキチン-プロテアソーム経路

ユビキチン-プロテアソーム経路は酵母から哺乳類に至るまで真核生物に幅広く存在し、多くの短命なタンパク質を標的とした分解において重要な働きをし

ている。ユビキチンは異なる真核生物においてよく保存された 76 アミノ酸のタンパク質からなる。ユビキチンの C 末端カルボキシル基が細胞内のタンパク質のリジン残基の ϵ -アミノ基とイソペプチド結合する。ユビキチンに存在する 7 つのリジン残基あるいは N 末端のメチオニン残基の α -アミノ基に別のユビキチンが結合することで、ポリユビキチン鎖が形成される。ユビキチン化は、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) により構成された複数の酵素群により触媒される (Berndsen, C. E. and Wolberger, C. 2014)。タンパク質ユビキチン化の特異性は、ユビキチンが結合するための基質を動員する E3 リガーゼによって決定される (Pickart, C. M. and Eddins, M. J. 2004)。E1 は、ユビキチンとチオエステル結合を形成する。この反応によって、それに続くユビキチンと E2 の結合が可能となり、さらにユビキチンの C 末端と基質タンパク質上のリジン残基との間にイソペプチド結合を形成する。後者の結合は E3 リガーゼを必要とし、E3 リガーゼは単量体サブユニット酵素にも多量体サブユニット酵素にもなることができる。これらの酵素群はヒトにおいて E1 で 2 種類、E2 で約 30 種類発見されており、基質特異性を決定する役割を担う E3 は 600 以上の候補分子が同定されている (Deshaies, R. J. and Joazeiro, C. A. P. 2009)。E3 リガーゼはその一次構造の特徴および反応機構から、一つのサブユニット上で E2-ユビキチンからチオエステル結合でユビキチンを受け取り基質に受け渡す HECT 型、E2-ユビキチンと Zn^{2+} を配位した構造を持つ RING フィンガードメインで、基質とは各々に特異的なサブユニットで会合してプラットフォーム的役割を担う RING 型、RING 型とほぼ同様の作用機序であるが Zn^{2+} を配位しない RING フィンガー様ドメインを用いて E2-ユビキチンと会合する U-box 型の 3 つのタイプに大きく分類される (Budhidarmo, R., *et al.* 2012; Metzger, M. B., *et al.* 2014; Stewart, M. D., *et al.* 2016)。E3 はそれぞれのドメインを介してユビキチン結合酵素である E2 酵素と結合し、多様なタンパク質複合体を形成する (Dou, H., *et al.* 2012; Plechanovová, A., *et al.* 2012; Pruneda, J. N. *et al.* 2012)。

一方、ユビキチン化反応は不可逆的なものではなく、ユビキチン鎖を基質タンパク質から除去する脱ユビキチン化反応がユビキチン化反応に拮抗的に働き、その反応には脱ユビキチン化酵素が中心的に機能することが判明している。アミノ酸配列から、脱ユビキチン化酵素は構造的に 5 つのサブファミリーである、Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) ファミリー、Ubiquitin-specific protease (USP) ファミリー、ovarian tumor protease (OUT) ファミリー、Josephin ファミリーに分

類される (Amerik, A. and Hochstrasser, M. 2004; Nijman, S., *et al.* 2005)。これらの酵素はすべて Cys プロテアーゼ活性を持っており、システイン、ヒスチジン、アスパラギン酸/アスパラギン残基が高次構造を形成した際に近接することで触媒 3 残基を形成する。これら システイン残基、ヒスチジン残基によるアミノ酸配列は各サブファミリーに保存されており、USP ファミリーの場合は Cys-box あるいは、His-box として知られている (Amerik, A. and Hochstrasser, M. 2004)。これまでに脱ユビキチン化酵素の働きとして主に 2 つの機能が知られている。1 つめは、ユビキチンの生合成を促進する機能である。ユビキチンは通常、複数のユビキチンが連なった直鎖状ユビキチンの状態で翻訳される (Amerik, A. and Hochstrasser, M. 2004)。現在までに知られる多くの脱ユビキチン化酵素は、翻訳された直鎖状ユビキチンを切断する活性を有していることから、ユビキチンのプロセッシングを行う酵素であることが示唆されている (Amerik, A. and Hochstrasser, M. 2004)。2 つめは、ユビキチン化によるタンパク質量の調節に拮抗する働きである。これまでに数多くの脱ユビキチン化酵素が同定されており、その大部分の酵素は細胞内で基質タンパク質に対して脱ユビキチン化活性を示すことで、タンパク質分解に拮抗する機能を示すことが知られている (Komander, D., *et al.* 2009)。

1.4 基質タンパク質のユビキチン鎖

ユビキチン化は、基質タンパク質のリジン残基に結合した最初のユビキチンに幾つものユビキチンが結合するポリユビキチン化がよく知られている。これ以外に、基質タンパク質の 1 つのリジンに対して 1 つのユビキチンが結合するモノユビキチン化、基質分子の多数のリジン残基に其々 1 つずつのユビキチンが結合するマルチユビキチン化などもあり、これらのユビキチン化には細胞死の誘導、細胞内局在の制御、あるいはタンパク質の機能修飾などタンパク質分解制御と異なる様々な生理的意義があることが明らかになりつつある (Chen, H. and De Camilli, P. 2005; Hicke, L. 2001)。一方、どの種類のユビキチン鎖によってユビキチン化を受けるかにより、基質タンパク質の制御様式が異なることも知られている (Ikeda, F. and Dikic, I. 2008)。プロテアソームによる分解を誘導するユビキチン鎖はポリユビキチン鎖を形成することが知られており、ユビキチン内

の 48 番目のリジン残基 (K48) を介してユビキチン鎖が形成されることが知られている (Pickart, C. 2000)。K48 によってポリユビキチン化されたタンパク質は速やかに分解されるため、このユビキチン化はタンパク質の安定性や品質管理に参与していることが知られている (Voges, D., *et al.* 1999; Weissman A.M. 2001)。他方、63 番目のリジンなど K48 以外のリジンを介したユビキチン鎖は異なった機能に寄与することが示唆されている (Pickart, C. and Fushman, D. 2004; Spence, J., *et al.* 1995; Mukhopadhyay, D. and Riezman, H. 2007; Lauwers, E., *et al.* 2010)。これ以外のユビキチン鎖を介したユビキチン化において、付加される基質のリジン残基やユビキチン鎖の長さなどによって、ユビキチン化の役割が異なると考えられているが、その詳細は未だ不明である。

1.5 G タンパク質のユビキチン化における分解制御

G α のユビキチン化は分裂酵母の G α である Gpa1 で見出されており、Gpa1 のユビキチン化は不安定化を引き起こすことが示唆されている (Madura, K. and Varshavsky, A. 1994)。Gpa1 はポリユビキチン化だけでなくモノユビキチン化されることが報告されており、ポリユビキチン化された Gpa1 は細胞質でプロテアソームによる分解を受ける一方で、モノユビキチン化された Gpa1 は、液胞への輸送に参与し分解を受けることが報告されている (Wang, Y., *et al.* 2005)。さらに、Gpa1 のユビキチン化による分解制御機構はユビキチンリガーゼ複合体 SCF-Cdc4 および Cdc34 によって促進され、それによって G $\beta\gamma$ サブユニットが隔離されるのを防ぐことによって、フェロモンシグナル伝達の促進に参与することが示唆されている (Voges, D., *et al.* 1999)。哺乳類の G α タンパク質において、Gas、Gaq、Gai の 3 つの分子がユビキチン化による分解制御を受けることが知られている (Naviglio, S., *et al.* 2004; Nagai, Y., *et al.* 2010; Chishiki, K., *et al.* 2013)。

1.6 非受容体型 G タンパク質制御因子: *ric-8*

ric-8 (resistance to inhibitors of cholinesterase-8) は、線虫の遺伝学的解析によりアセチルコリンエステラーゼ阻害剤に対する耐性遺伝子として同定され、非受

容体型 G タンパク質シグナル調節因子として注目されている (Miller, K.G., *et al.* 1996)。無脊椎動物である線虫では、Ric-8 が神経伝達物質の放出において Gq シグナルを調節する因子であること、G α i に対して GEF 活性を持つことが知られている (Miller, K.G. and Rand, J.B. 2000; Afshar, K., *et al.* 2004)。哺乳動物においては Ric-8A 及び Ric-8B の 2 種類のホモログが存在し、Ric-8A あるいは Ric-8B をノックアウトしたマウスでは胎生致死を来すことが知られているほか、それぞれと相互作用する G α のサブファミリーが異なることが知られている (Tall, G.G., *et al.* 2003; Gabay, M. *et al.* 2011)。Ric-8A は *in vitro* において G α i、G α q、及び G α 13 に対して GEF 活性を持ち、細胞内で Gq シグナルの増強に寄与していることが示されている (Tall, G.G., *et al.* 2003; Nishimura, A. *et al.* 2006)。他方、Ric-8B も Gas や G α olf に対して GEF として機能することが示唆されている (Von Dannecker, L.E., *et al.* 2005; Chan, P., *et al.* 2011)。また Ric-8 は、相互作用する G タンパク質の発現量や細胞膜への局在化に影響を与えることから、翻訳後において G タンパク質のシャペロン分子として機能し、G タンパク質の構造安定性や細胞膜移行を促すものと考えられている (Gabay, M., *et al.* 2011; Chan, P., *et al.* 2013)。更に、線虫やショウジョウバエにおいて Ric-8 は初期発生過程における細胞の非対称分裂に必要であることが示され、哺乳類の Ric-8A も G α i と複合体を形成することで、適切に紡錘体の配向を規定する分子であることも見出されている (Afshar, K., *et al.* 2004; David, N.B., *et al.* 2005; Wang, H., *et al.* 2005; Cho, H. and Kehrl, J. 2008; Boullaran, C., *et al.* 2014)。このように Ric-8 は G タンパク質に対して様々な機能を持つことが報告されている。これらの機能の他に、Ric-8 はユビキチン化による G タンパク質の量的調節機構の存在が示唆されており、以下に詳述する。Ric-8B は Gas の発現量制御に密接に関与しており、Ric-8B を過剰発現した HEK293T 細胞では、Gas の mRNA 量に変化がないにもかかわらず、内在性の Gas 発現量が著しく上昇し、さらに Ric-8B を発現抑制した NIH3T3 細胞では、内在性 Gas の発現量が減少すること、同様に Ric-8B をノックアウトしたマウス胎児繊維芽 (Mouse embryonic fibroblast: MEF) 細胞では Gas の発現量が顕著に減少することが知られている (Nagai, Y., *et al.* 2010; Gabay, M., *et al.* 2011)。これらのことから、Ric-8B による Gas の発現量調節機構の存在が示唆された。さらに、Ric-8B は Gas と結合することでユビキチン化を阻害していること、Ric-8A は G α i および G α q のユビキチン化を抑制することなどが報告された (Nagai, Y., *et al.* 2010; Jenie, R. I., *et al.* 2013; Chishiki, K., *et al.* 2013)。以上の

知見から、Ric-8 が Gα タンパク質のユビキチン化を抑制することで G タンパク質シグナルを安定化させる機構の存在が示唆された。しかし、Gas のユビキチン化を実際に担う E3 リガーゼや、Ric-8B による Gαs ユビキチン化抑制の分子機構は明らかになっていない。

1.7 Gq シグナル依存的な Gas の分解機構

心臓では、G タンパク質シグナルは重要な役割を担っていることが知られている一方で、その異常は心疾患に関与している。例えば、心肥大を引き起こしたマウスの心筋細胞では Gas のタンパク質発現量の減少と Gs シグナルの減弱が起こることが報告されている (Nakamura, K., *et al.* 1996; Akhter, S., *et al.* 1997; Jenie, R. I., *et al.* 2013)。また、過剰な Gq シグナルが心肥大の発症を惹起することが知られている (Nakamura, K., *et al.* 1996; D'Angelo, D., *et al.* 1997)。そして、Gq シグナルによる Gas の分解機構の存在が明らかとなりつつある。当研究室での先行研究では、心肥大モデル心筋細胞において Gq シグナルが Gαs ユビキチン化の亢進と Gas の発現量減少を引き起こすことが示され、HEK293T 細胞においても Gαq の過剰発現により Gαs のユビキチン化が亢進することも報告されている (Jenie, R. I., *et al.* 2013)。これらの知見から、Gq シグナル依存的なユビキチン化による Gas タンパク質の分解が心肥大に関与していることが示唆されているが、その詳細は不明である。

1.8 本研究の目的

本研究では、Gas のユビキチン化による量的制御機構の解明を目指して、Gas に対するユビキチン化関連酵素群の同定、Ric-8B による Gas ユビキチン化抑制機構の解明、さらに Gas のユビキチン化の生理的な意義の解明を目的とした (図 1)。

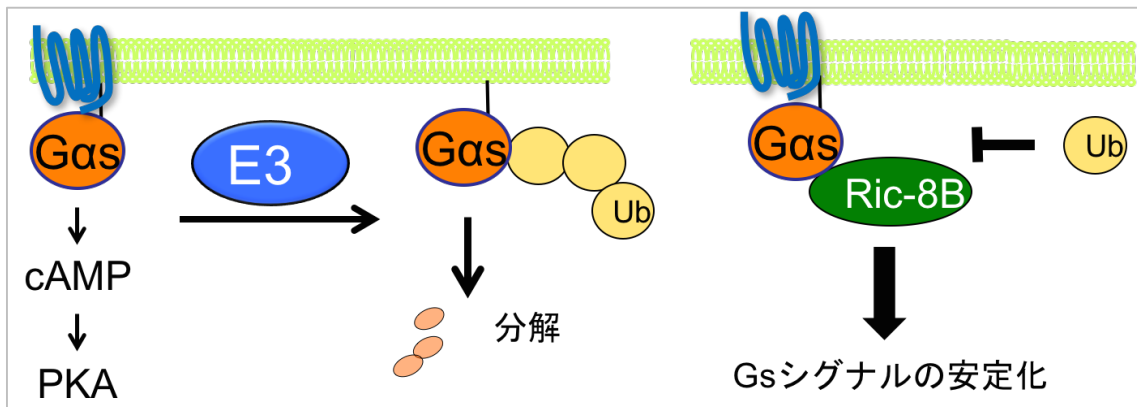


図 1: Gas のユビキチン化による量的制御機構

定常状態では、Gas は下流エフェクタータンパク質へシグナルを伝達するが、E3 リガーゼにより認識された Gas がユビキチン化による分解を受け、結果として Gs シグナルは適量に調節される (図左側)。一方 Ric-8B が結合することで Gas のユビキチン化が抑制され、Gas が安定化されることにより、Gs シグナルは増大する (図右側)。

第2章 材料と方法

2.1 試薬及び抗体

細胞への薬剤処理は、MG132 (CALBIOCHEM、#474790) 及び cycloheximide (CHX、CALBIOCHEM、#239764)、3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX、Sigma Aldrich、#I5879)、(-)propranolol (Sigma Aldrich、#P0884) を用いた。細胞への遺伝子導入にはポリエチレンイミン MAX (PEI MAX、Polysciences、#24765)、LipofectAMINE RNAi MAX (Invitrogen、#13778150) を用いた。免疫沈降、ウェスタンブロットには、Rabbit anti-Gas polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-383)、Rabbit anti-Gaq polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-393)、Rabbit anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F7425)、Rabbit anti-TRAF7 polyclonal antibody (Novus Biologicals #NB600-1399)、Rabbit anti-RNF125/TRAC-1 polyclonal antibody (LifeSpan BioSciences #LS-C358283)、Mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F1804)、Mouse anti-Ubiquitin monoclonal antibody (P4D1, Santa Cruz Biotechnology #sc-8017)、Mouse anti-Mono- and poly-ubiquitinated conjugates monoclonal antibody (FK2, Enzo Life Sciences #BML-PW8810)、Mouse anti- β -Actin monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-47778)、Mouse anti- β -Tubulin monoclonal antibody (Sigma Aldrich #T4026)、Goat anti-TRAC1/RNF125 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #C-17)を用いた。ウェスタンブロットの2次抗体として、Anti-Mouse-IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9310)、Anti-Rabbit-IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9340)、Rabbit Anti-Goat-IgG H&L (HRP) (Abcam #ab6741) を用いた。

2.2 使用したプラスミド一覧

本研究で使用したプラスミドを以下に示す。

コンストラクト	備考
pCMV-Gas WT	伊東研にて所有
pCMV-Gas K8R	本研究で作製した
pCMV-Gas K17R	本研究で作製した
pCMV-Gas K24/25/28/32R	本研究で作製した
pCMV-Gas K34R	本研究で作製した
pCMV-Gas K53/58R	本研究で作製した
pCMV-Gas K74/77/82/86R	本研究で作製した
pCMV-Gas K137R	本研究で作製した
pCMV-Gas K167/172R	本研究で作製した
pCMV-Gas K197R	本研究で作製した
pCMV-Gas K202R	本研究で作製した
pCMV-Gas K219R	本研究で作製した
pCMV-Gas K260R	本研究で作製した
pCMV-Gas K279/286R	本研究で作製した
pCMV-Gas K291/293R	本研究で作製した
pCMV-Gas K324R	本研究で作製した
pCMV-Gas-N (K53/58/77/82R)	本研究で作製した
pCMV-Gas-M (K172/197/202/260R)	本研究で作製した
pCMV-Gas-C (K286/291/293/324R)	本研究で作製した
pCMV-Myc-Ric-8B	Nagai, Y., <i>et al.</i> 2010
pCB6-6H-Ub2 WT	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K0	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K6	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K11	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K27	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K29	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K33	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K48	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCB6-6H-Ub2 K63	Brian David Dynlacht 博士 (NYU) より譲渡
pCMV-Flag-TRAF7	本研究で作製した
pCMV-Flag-USP29	本研究で作製した

pCMV-Flag-USP44	本研究で作製した
pCMV-Flag-MKRN1	本研究で作製した
pCMV-Flag-MKRN1-H307E-C310A	本研究で作製した
pCMV-Flag-RNF125 WT	本研究で作製した
pCMV-Flag-RNF125 C72/75A	本研究で作製した
pQE60-Gas WT	Graziano, M. P., <i>et al.</i> 1989; Itoh, H., Gilman, A. G. 1991; Nagai, Y., <i>et al.</i> 2010
pGEX6p-1-Ric-8B	Nagai, Y., <i>et al.</i> 2010
pET28a-Ubiquitin	Tago, K., <i>et al.</i> 2010 により永井が作製
pGEX6p-1-RNF125 WT	本研究で作製した
pGEX6p-1-RNF125 C72/75A	本研究で作製した

2.3 細胞培養

HEK293T 細胞は、10%ウシ血清 (Fetal Bovine Serum、Biosera #FB-1061/500) 、100 µg/ml streptomycin 及び 100 units/ml penicillin (Nacalai tesque #08458-16) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、Nacalai tesque #08458-16) 、PC-3 細胞は 10%ウシ胎児血清、100 µg/ml streptomycin 及び 100 units/ml penicillin を含む Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (RPMI1640、Nacalai tesque #30264-56) を用いて培養した。

2.4 遺伝子導入法

HEK293T 細胞への遺伝子導入は、リン酸カルシウム法あるいはポリエチレンイミン (PEI) を用いて行った。リン酸カルシウム法では、細胞は遺伝子導入 24 時間前に 24well plate に 1.3×10^5 cells、12well plate に 2.5×10^5 cells、6 cm dish に 1.0×10^6 cells、10 cm dish に 3.0×10^6 cells 播種したものをを用いた。プラスミド DNA を含む滅菌水に 2.5 M の CaCl_2 を加え、この溶液に 2×HBS (pH7.05)を加えた。そ

の後、混合液を全量細胞に滴下し 37 °C、5% CO₂ の条件下で培養した。遺伝子導入 12 時間後に培地を交換し、遺伝子導入 36 時間後に終濃度 10 μM の MG132 を加えた。PEI を用いた遺伝子導入でも、細胞は遺伝子導入 24 時間前にリン酸カルシウム法と同様に各ウェルに播種したものをを用いた。プラスミド DNA を含む PBS に 1 mg/ml PEI を加え、3 秒、3 回 ボルテックスし、15 分間室温でインキュベートした。インキュベート後、混合液を全量細胞に滴下した。遺伝子導入 12 時間後に培地を交換し、遺伝子導入 36 時間後に終濃度 10 μM の MG132 を加えた。

2.5 遺伝子のクローニングとプラスミド構築

ヒト TRAF7 (TRAF7: GenBank accession number NP115647) 、ヒト USP9Y (USP9Y: GenBank accession number AAC51833)、ヒト USP29 (USP29: GenBank accession number AAI30395)、ヒト USP44 (USP44: GenBank accession number NP 115523) をクローニングするために、まず HEK293T 細胞あるいは U2OS 細胞より Sepasol-RNA 1 Super G (Nacalai Tesque #09379) を用いて全 RNA を抽出した。逆転写反応は以下に示す 3'-非翻訳領域を標的としたプライマーを使用し、SuperScript III を用いて常法に従って行った。

UTR-TRAF7: 5'-AAGGTCCAGGGCTGGTTCAG-3'

UTR-USP9Y: 5'-GCCAGACACAGAGAAAGTTTGGAC-3'

UTR-USP29: 5'-GCAAGGATGAAGTACAGGATTCTC-3'

UTR-USP44: 5'-CACAGGAAGAAAACCCATTGTC-3'

得られた cDNA を鋳型として以下に示すプライマーおよび PCR 条件により PCR を行った。尚、DNA ポリメラーゼは KOD FX DNA Polymerase (TOYOBO #KFX-101) を用いた。

TRAF7(Fw): 5'-ATAAAGCTTATGAGCTCAGGCAAGAGTGC-3'

(下線部は HindIII の制限酵素部位を付加したことを示す。)

TRAF7(Rv): 5'-CGGAATTCCTTAGCAAGTCCAAACCTTCAC-3'

(下線部は EcoR I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

96 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 3 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

USP9Y(Fw): 5'-TTGTCGACATGACAGCCATCACTCATGG-3'

(下線部は Sal I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

USP9Y(Rv): 5'-ATCCCGGGTCACTGATCCTTCATC-3'

(下線部は Sma I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

96 °C 10 秒、58 °C 30 秒、68 °C 8 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

USP29-N(Fw): 5'-CGGTCGACATGATATCTCTAAAGG-3'

(下線部は Sal I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

USP29-pos.1316(Rv): 5'-CCACAAGCTTTACAAATAAGGGAGAGC-3'

(下線部は HindIII の制限酵素部位を付加したことを示す。)

96 °C 10 秒、58 °C 30 秒、68 °C 2 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

USP29-pos.1316(Fw): 5'-TTGTAAAGCTTGTGGTCATGCTG-3'

(下線部は HindIII の制限酵素部位を付加したことを示す。)

USP29-C(Rv): 5'-ATCCCGGGTCAAGCAGGTCTGTACAAAG-3'

(下線部は Sma I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

96 °C 10 秒、55 °C 30 秒、68 °C 1.5 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

USP44(Fw): 5'-AAGGATCCATGCTAGCAATGGATACGTG-3'

(下線部は BamH I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

USP44(Rv): 5'-TTCCCGGGTCAGCTAAGGATTCATTAG-3'

(下線部は Sma I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

96 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 3.5 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

得られた TRAF7、USP29、USP44 の PCR 産物は括弧内に示した制限酵素と 37°C、1.5 時間インキュベートとした後、哺乳類細胞発現ベクターである pFlag-CMV5 へ挿入した。

2.6 Gas のリジンをアルギニンに置換した変異体プラスミドの作製

Gas の 25 箇所のリジン残基に関して、1 から 5 箇所のリジン残基をアルギニンに置換した変異体を作製する為に、以下に示すプライマーを用いてインバース PCR を行った。尚、このプライマーの下線部は塩基置換部位であり、このことによりリジン残基をアルギニン残基に置換したことを示している。鋳型 DNA は、当研究室により作製された pCMV-Gas を用い、98 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 7 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。DNA ポリメラーゼとして KOD FX を用いた。

K8R (Fw) : 5'-AACGAGGAGAAGGCGCAGCGC-3'

K8R (Rv) : 5'-GCGCTGGTCCTCGGTCCTGCTGTTTCC -3'

K17R (Fw) : 5'-CAACGAGGAGAGGGCGCAGCGC-3'

K17R (Rv) : 5'-CGCTGGTCCTCGGTCTTGCTGTTTC-3'

K24/25/28/32R (Fw) : 5'-CAGAGGGACAAGCAGGTCTACCGGGCC-3'

K24/25/28/32R (Rv) : 5'-CAGCTGCCTCTCGATCCTCTGTTGGCCTC-3'

K34R (Fw) :

5'-CAGCTGCAGAAGGACAGGCAGGTCTACCGGGCCACGCACCGT-3'

K34R (Rv) : 5'-CTTCTCGATCTTCTTGTTGGCCTCGCGCTG-3'

K53/58R (Fw) : 5'-CATTGTGAGGCAAATGAGGATCCTGC-3'

K53/58R (Rv) : 5'-GTGCTCTTACCAGATTCTCCAGC -3'

K74/77/82/86R (Fw) : 5'-ATCAGAAACAACCTGAGAGAGGCCATT-3'

K74/77/82/86R (Rv) : 5'-GTCCTGCACTCTGGTGGCCCTCTCACC-3'

K137R (Fw) : 5'-GATGAAGGGGTGCGTGCCTGCTATG-3'

K137R (Rv) : 5'-CTCCCAGAGAGCCCTGGCATGCTCG-3'

K167/172R (Fw) : 5'-GTCATCAGGCAGGATGACTACGTG-3'

K167/172R (Rv) : 5'-CATCAATCCTGTCCAGGAAGTACTGGGCGC-3'

K197R (Fw) : 5'-GAGACCAGGTTCCAGGTGGACAAA-3'

K197R (Rv) : 5'-AAAGATTCCAGAAGTCAGGACACGGCA-3'

K202R (Fw) : 5'-AAGTTCCAGGTGGACCGGGTCAACTTCCACATGTTTG-3'

K202R (Rv) : 5'-GGTCTCAAAGATTCCAGAAGTCAGG-3'

K219R (Fw) : 5'-GCGATGAACGCCGCAGATGGATC-3'

K219R (Rv) : 5'-GCTGGCCGCCACGTCAAACATGTGG-3'

K260R (Fw) : 5'-CTGAACCTCTTCAGGAGCATCTGGAAT-3'

K260R (Rv) : 5'-AGCCTCCTGCAGGCGGTTGGTCTG-3'

K279/286R (Fw) : 5'-CTGGCTGAGAGAGCCTTGCTGG-3'

K279/286R (Rv) : 5'-CAGATCTTGCCTGTTGAGGAACAG-3'

K291/293R (Fw) : 5'-GCTGGAAGATTCGAGGATTGAGGACTAC-3'

K291/293R (Rv) : 5'-AAGGACTTTCTCAGCCAGCAGATCTTG-3'

K324R (Fw) : 5'-CGGGCCAGGTACTTCATTCGAGAT-3'

K324R (Rv) : 5'-GGTCACGCGTGGGTCCTCTCC-3'

プロテオーム解析法によるユビキチン化タンパク質の網羅的解析により、Gas のユビキチン化部位が報告されている(Wagner, S., *et al.* 2011)。これらの Gas ユビキチン化部位は、N 末端領域 (Gas-N : K53/58/77/82)、中間領域 (Gas-M : K172/197/202/260)、あるいは C 末端領域 (Gas-C : K286/291/293/324) にそれぞれ 4 箇所ずつ存在することから、以下に示す方法により、それぞれ 4 箇所のリジンをアルギニンに置換した Gas 変異体を作製した。尚、DNA ポリメラーゼは KOD FX を用いた。

Gas-N は、先に作製した K53/58R 変異体を鋳型として以下に示すプライマーを用いて、98 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 7 分を 25 サイクルの条件で PCR を行い、Gas-N (K53/58/77/82R) を作製した。

K77/82R (Fw) : 5'-GACATCAGAAACAACCTGAAAGAGG-3'

K77/82R (Rv) : 5'-CTGCACTCTGGTGGCCTTCTC-3'

Gas-M (K172/197/202/260R) の作製には、2 段階の行程を必要とした。まず、先に作製した K202R 変異体を鋳型として以下に示すプライマーセットを用いて、98 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 7 分を 25 サイクルの条件で PCR を行い、K172/197/202R を作製した。その後、K172/197/202R を鋳型にして、先に示した K260R プライマーセットを用いて 98 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 7 分を 25 サイクルの条件で PCR を行うことで、Gas-M (K172/197/202/260R) を作製した。

K172/197R (Fw) :

5'-CGCTGCCGTGTCCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAGGTTCC-3'

K172/197R (Rv) :

5'-GAGCAGATCCTGGTCGCTGGGCACGTAGTCATCCTGCCTGATGAC-3'

Gas-C (K286/291/293/324R) の作製は、2 段階の行程を必要とした。まず、先に作製した K291/293R 変異体を鋳型として K324R プライマーセットを用いて、98 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 7 分を 25 サイクルの条件で PCR を行い、K291/293/324R を作製した。次に、以下に示すプライマーを用い、K291/293/324R を鋳型に 98 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 7 分、25 サイクルの条件で PCR を行い、Gas-C (K286/291/293/324R) を作製した。

K286R (Fw) : 5'-CTGAGAGAGTCCTTGCTGGAAAATC-3'

K286R (Rv) : 5'-CCAGCAGATCTTGCTTGTTGAG-3'

2.7 Alpha Screen を用いたタンパク質間相互作用解析により得られた遺伝子のクローニングとプラスミド構築

ヒト MKRN1 (MKRN1: AF_192784.1) 、ヒト RNF125(RNF125: NM_017831.3) をクローニングするために、HEK293T 細胞より Sepasol-RNA 1 Super G を用い、全 RNA を抽出した。MKRN1 および RNF125 の逆転写反応は SuperScript III を用いて行い、プライマーはランダムヘキサマーを用いた。得られた cDNA を鋳型として以下に示すプライマーと条件で PCR 反応を行った。尚、DNA ポリメラーゼは KOD FX を用いた。

MKRN1 (Fw) : 5'- AAAAGCTTATGGCGGAGGCTGCAACT-3'

(下線部は HindIII の制限酵素部位を付加したことを示す。)

MKRN1 (Rv) : 5'- CCTCTAGACTATAGATCCAAGTCATAAAAATCTTCC-3'

(下線部は Xba I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

96 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 2 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

RNF125 (Fw) : 5'- AAGTCGACATGGGCTCCGTGCTGAGCAC-3'

(下線部は Sal I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

RNF125 (Rv) : 5'- AAGGATCCTTATGTGGTGTTCGAGTGA-3'

(下線部は BamH I の制限酵素部位を付加したことを示す。)

96 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 1 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

RNF125 の変異体である RNF125 C72/75A (RNF125CA) は以下に示すプライマーを用いて行った。尚、プライマーの下線部は塩基置換部位であり、このことによりシステイン残基をアラニン残基に置換したことを示している。

RNF125 C72/75A (Fw) : 5'- GGGCATATCTTCCTTCAGAAGGAG-3'

RNF125 C72/75A (Rv) : 5'- GGGCATAAGGAGCGGTCCACTTGTTG-3'

96 °C 10 秒、60 °C 30 秒、68 °C 1 分を 25 サイクルの条件で PCR を行った。

pGEX-6p-1-RNF125WT の作製は、予め作製した pFlagCMV-RNF125 を用いた。pFlagCMV-RNF125 を BamH1 で制限酵素処理し、klenow fragment を用いて平滑化した。その産物をエタノール沈殿により回収し、更に EcoR1 で処理した。DNA 断片はアガロースゲルを用いた DNA 抽出により回収し、EcoR1-Sma1 を用いて断片化した pGEX-6p-1 に挿入した。pGEX6p-1-RNF125CA も同様の方法で作製した。

2.8 細胞内タンパク質相互作用試験

発現プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞を Cell lysis buffer に懸濁した後 4 °C で 30 分間穏やかに転倒混和した。その細胞抽出液を 15,000 rpm、4 °C で 10 分間遠心分離した。得られた上清と Anti-FLAG M2 affinity Gel (Sigma Aldrich #A2220) を混和し 4 °C で穏やかに攪拌させることで反応させた。反応後、レジンを Cell lysis buffer で 6 回洗浄し、SDS-PAGE Sample buffer を用いて 95°C で 5 分間静置することにより免疫沈降物を溶出させた。これを免疫沈降サンプルとし、ウェスタンブロットに供した。

Cell lysis buffer

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)
150mM NaCl
5 mM EDTA
0.5%(v/v) NP-40
10%(w/v) Glycerol
1 mM DTT
2 µg/ml Leupeptin
0.5mM PMSF

2.9 *in vivo* ユビキチン化アッセイ

細胞内における Gas のユビキチン化は Kuo らの方法に従って解析した (Kuo, M.L., *et al.* 2004)。HEK293T 細胞に発現プラスミドを導入し、24 時間後にプロテアソーム阻害剤である 10 μ M MG132 を含む DMEM へ培地交換した。8 時間後、細胞を 8 M 尿素を含む Urea-lysis buffer に懸濁して超音波破碎した。細胞抽出液に 20 μ l (bed-volume) の Ni-NTA agarose (Qiagen #30230) を加え、4 時間穏やかに室温で攪拌した。攪拌後、レジンを 20 mM Imidazole を含む Wash buffer で 4 回洗浄し、150 μ l の Elution buffer を加え、30 分間室温で穏やかに攪拌させ溶出した。

Urea-lysis buffer

8 M Urea
10 mM NaH₂PO₄
10% (w/v) Glycerol
0.1% (w/v) Triton-X100
0.5 M NaCl
10 mM Imidazole
10 mM 2-Mercaptoethanol

Wash buffer

8 M Urea
10 mM NaH₂PO₄
10% (w/v) Glycerol
0.1% (w/v) Triton-X100
0.5 M NaCl
20 mM Imidazole
10 mM 2-Mercaptoethanol

Elution buffer

150 mM Tris-HCl (pH 6.8)
200 mM Imidazole
5% (w/v) SDS
30% Glycerol
0.72 M 2-Mercaptoethanol

2.10 *in vitro* ユビキチン化アッセイ

試験管内における Gas のユビキチン化は次の方法に従って解析した。Reaction Buffer 中に、pQE60-Gas WT を大腸菌に形質転換し精製した組換え Gas (600 ng、当研究室の永井により作製)、pET28a-Ubiquitin を大腸菌に形質転換し精製した組換え His-Ub (750 ng、当研究室の永井により作製)、UBE1 (E1 酵素、50 ng、Boston Biochem #E-305)、UbcH5a (E2 酵素、200 ng、Boston Biochem #E2-616)、pGEX6p-1-RNF125WT あるいは pGEX6p-1-RNF125CA を大腸菌に形質転換し精製した組換え RNF125WT あるいは RNF125CA (E3 酵素、500 ng、本稿 2.12 により作製) を加え、37 °C で 2 時間反応させた。反応は、Laemli Buffer を添加することにより停止し、その後、イムノブロット法により Gas のユビキチン化を検出した。

Reaction Buffer

50 mM Tris-HCl pH 8.0
150 mM NaCl
10 mM ATP
200 nM ZnCl₂
5 mM DTT

2.11 遺伝子発現抑制実験

siRNA をそれぞれ LipofectAMINE RNAi MAX と 1:1 の割合で混合したものを、HEK293T 細胞へ導入した。導入してから 5 時間後、培地交換を行い、更に 67 時間培養した。培養した細胞を回収した後、Cell lysis buffer で懸濁し、30 分間 4 °C 条件化で転倒混和した。その細胞懸濁液を 15,000 x rpm、4 °C で 10 分間遠心分離することにより、細胞抽出液を得た。この細胞抽出液に Sample buffer (5x) を加

え、95 °Cで5分間静置したものをサンプルとした。その後、このサンプルをウェスタンブロットに供し、目的の遺伝子が発現抑制出来たかを評価した。

以下に、発現抑制実験に用いた siRNA 配列を示す。

	Gene ID	Symbol		Sense	Antisense
K1	6737	TRIM21	#1	CACUCUGGAAAACAUUACU (dTdT)	AGUAAUGUUUCCAGAGUG (dTdT)
K2			#2	GAGGUAGAUGUGACAGGAA (dTdT)	UUCCUGUCACAUCUACCUC (dTdT)
K3	64219	PJA1	#1	GUGUGAGCGAAGACCUAGA (dTdT)	UCUAGGUCUUCGCUCACAC (dTdT)
K4			#2	CUAUUGAUUCCUCGUGAUU (dTdT)	AAUCACGAGGAAUCAAUAG (dTdT)
K5	152006	RNF38	#1	CAGAUAGCAGGCAGAUGUU (dTdT)	AACAUCUGCCUGCUAUCUG (dTdT)
K6			#2	CUGUACAGAUCUAACACUA (dTdT)	UAGUGUUAGAUCUGUACAG (dTdT)
K7	8315	BRAP	#1	UCGGAUAGAGAAGGACACA (dTdT)	UGUGUCCUUCUCUCCGA (dTdT)
K8			#2	CAGUGAUGGACCUGACUGA (dTdT)	UCAGUCAGGUCCAUCACUG (dTdT)
K9	51132	RNF12	#1	GUGAGAACCUAUGUCAGUA (dTdT)	UACUGACAUAGGUUCUCAC (dTdT)
K10			#2	GACCAACCUAGAGGACUCA (dTdT)	UGAGUCCUCUAGGUUGGU C (dTdT)
K11	165918	RNF168	#1	GAUCGAUUUGGAGCAUCUA (dTdT)	UAGAUGCUCAAAUCUAUC (dTdT)
K12			#2	GUUUAGUCGGCUUUACUAA (dTdT)	UUAGUAAAGCCGACUAAAC (dTdT)
K13	27246	RNF115	#1	CAGCUAUUGAAGGAAUACU (dTdT)	AGUAUCCUUCAAUAGCUG (dTdT)

K14			#2	CAGUAACUCAGGAACAAGU (dTdT)	ACUUGUUCUGAGUUACUG (dTdT)
K15	152518	NFXL1	#1	CAGUUGUGACAAAGUACUU (dTdT)	AAGUACUUUGUCACAACUG (dTdT)
K16			#2	CUCGAUCUGGGAAAAGGUU (dTdT)	AACCUUUUCCCAGAUCGAG (dTdT)
K17	867	CBL	#1	CUAAGUAGAGGGUUCUUA (dTdT)	UAAGAACCCUCUACUUUAG (dTdT)
K18			#2	GUCCUUCAGUUCCCACGUA (dTdT)	UACGUGGGAACUGAAGGAC (dTdT)
K19	9921	RNF10	#1	CAGGUUCCCAUGCAGACUU (dTdT)	AAGUCUGCAUGGGAACCCUG (dTdT)
K20			#2	GCUGAGGGUUGGAAAAGCA (dTdT)	UGCUIIUCCAACCCUCAGC (dTdT)
K21	57534	MIB1	#1	CUGGUUAGUAGUAUGUGAA (dTdT)	UUCACAUACUACUAACCAG (dTdT)
K22			#2	CUACUAUAUGCUGUUGAUA (dTdT)	UAUCAACAGCAUAUAGUAG (dTdT)
K23	23608	MKRN1	#1	CGUACUGUUUGUCCUGCAU (dTdT)	AUGCAGGACAAACAGUACG (dTdT)
K24			#2	CGACGAACUAACAGACUCU (dTdT)	AGAGUCUGUUAGUUCGUC G (dTdT)
K25	64320	RNF25	#1	GUCAUCUGCCUCUAUGGUU (dTdT)	AACCAUAGAGGCAGAUGAC (dTdT)
K26			#2	CCAAAACACCCUGUUACCA (dTdT)	UGGUAACAGGGUGUUUUG G (dTdT)
K27	54941	RNF125	#1	CUCUGUGUAUAAUGCUACA (dTdT)	UGUAGCAUUAUACACAGAG (dTdT)
K28			#2	CAGUGAAAUGAGGGCACAU (dTdT)	AUGUGCCCUCAUUUCACUG (dTdT)
K29	51070	NOSIP	#1	CACGAGAAGAAGAAGGACA (dTdT)	UGUCCUUCUUCUUCUCGU G (dTdT)

K30			#2	CCUGGAGUACAUUCUGCAC (dTdT)	GUGCAGAAUGUACUCCAGG (dTdT)
K31	89122	TRIM4	#1	GCACGGAGUUUCAAAGCU (dTdT)	AGCUUUGAAAACUCCGUGC (dTdT)
K32			#2	GAAUGUUGAACGCUUGUUA (dTdT)	UAACAAGCGUUCAACAUUC (dTdT)
K33	5930	RBBP6	#1	GAGUGUUUUGUGUGUACAU (dTdT)	AUGUACACACAAAACACUC (dTdT)
K34			#2	GUCU AACUGAAC CAGCGAU (dTdT)	AUCGCUGGUUCAGUUCGA C (dTdT)
K35	140545	RNF32	#1	AGUUCUGGGUUAAGUACUA (dTdT)	UAGUACUUAACCCAGAACU (dTdT)
K36			#2	GUGUGUGACCAGAAUCCAA (dTdT)	UUGGAUUCUGGUCACACAC (dTdT)
K37	51444	RNF138	#1	GACUAGUGAGAUUUCUGUA (dTdT)	UACAGAAAUCUCACUAGUC (dTdT)
K38			#2	GUUAAACCAUUCUGGGAUU (dTdT)	AAUCCCAGAAUGGUUUAAC (dTdT)
K39	7706	TRIM25	#1	GAGUCAAGUAGGUAACCAA (dTdT)	UUGGUUACCUACUUGACUC (dTdT)
K40			#2	GUGGAUUGGAGGUUGUCUA (dTdT)	UAGACAACCUCCAAUCCAC (dTdT)
K41	25820	ARIH1	#1	CUAUUUCUGUGACAUGGCA (dTdT)	UGCCAUGUCACAGAAAUAG (dTdT)
K42			#2	CAUGCUCUGCAAAGGCUUU (dTdT)	AAAGCCUUUGCAGAGCAUG (dTdT)
K43	11074	TRIM31	#1	GGUGGUGAAGAGAGUUGGA (dTdT)	UCCAACUCUCUUCACCACC (dTdT)
K44			#2	CCGCACUCUUUAAGCAGCU (dTdT)	AGCUGCUUAAAGAGUGCG G (dTdT)
K45	55743	CHFR	#1	GAGAAGGGCAAGUUUAUCA (dTdT)	UGAUAAACUUGCCCUUCUC (dTdT)

K46			#2	CAGUGAUUAACAAGCUGAA (dTdT)	UUCAGCUUGUUAUUCACUG (dTdT)
K47	5371	PML	#1	CGCCCUGGAUAACGUCUUU (dTdT)	AAAGACGUUAUCCAGGGCG (dTdT)
K48			#2	AACCGAGAAUCGAAACUAA (dTdT)	UUAGUUUCGAUUCUCGGU U (dTdT)
K49	84937	ZNRF1	#1	GUUUUCAGGCACUAUGUUU (dTdT)	AAACAUAGUGCCUGAAAAC (dTdT)
K50			#2	GUUCAAGCUUGGGAGAAA (dTdT)	UUUCUCCCAAGCUUUGAAC (dTdT)
K51	89870	TRIM15	#1	AGCACGGCGAGAAGAUCUA (dTdT)	UAGAUCUUCUCGCCGUGC U (dTdT)
K52			#2	AGCAGGCAGAGACUCCAU (dTdT)	AUGGGAGUCUCUGCCUGC U (dTdT)
K53	10193	RNF41	#1	CACUAGAGACUAGACAGAU (dTdT)	AUCUGUCUAGUCUCUAGUG (dTdT)
K54			#2	GUCUACCAGUAUGCAGGUU (dTdT)	AACCUGCAUACUGGUAGAC (dTdT)
K55	6015	RING1	#1	CUGCAUUCAGAACUCAUGU (dTdT)	ACAUGAGUUCUGAAUGCAG (dTdT)
K56			#2	CUCUGACUGCAUUGUCACA (dTdT)	UGUGACAAUGCAGUCAGAG (dTdT)
K57	146310	RNF151	#1	GGUGGCUAGCCAGACAAAA (dTdT)	UUUUGUCUGGCUAGCCAC C (dTdT)
K58			#2	GCGGGUAUGAUCUCAACCU (dTdT)	AGGUUGAGAUAUACCCGC (dTdT)
K59	286827	TRIM59	#1	CAGCUUUUUCAGGGAACUA (dTdT)	UAGUUCCCUGAAAAAGCUG (dTdT)
K60			#2	ACAUGCCUGUGUUUGAGAU (dTdT)	AUCUCAACACAGGUAUGU (dTdT)
K61	4193	MDM2	#1	GCUUGGCCUACAGUCAUCU (dTdT)	AGAUGACUGUAGGCCAAGC (dTdT)

K62			#2	ACUUUGGUAGUGGAAUAGU (dTdT)	ACUAUCCACUACCAAAGU (dTdT)
K63	10107	TRIM10	#1	GCUUGGCACAGAAGUAGCU (dTdT)	AGCUACUUCUGUCCCAAGC (dTdT)
K64			#2	CUGUAGUGACAUCUGAGAA (dTdT)	UUCUCAGAUGUCACUACAG (dTdT)
K65	7188	TRAF5	#1	GUCAUGGCAUGGUUUGCUU (dTdT)	AAGCAAACCAUGCCAUGAC (dTdT)
K66			#2	GAAAACUUGUGUCCUGAAU (dTdT)	AUUCAGGACACAAGUUUUC (dTdT)
K67	672	BRCA1	#1	GCUUGAAGUCUCCCUUGGA (dTdT)	UCCAAGGGAGACUUCAAGC (dTdT)
K68			#2	CUGAAACCAUACAGCUUCA (dTdT)	UGAAGCUGUAUGGUUUCA G (dTdT)
K69	222484	LNx2	#1	GAGAUGGUAAAAGCUGCACU (dTdT)	AGUGCAGCUUUACCAUCUC (dTdT)
K70			#2	CCACCACCGUAUUUAUAGCA (dTdT)	UGCUAUAAUACGGUGGUG G (dTdT)
K71	285533	RNF175	#1	GAGAUGAUCCCAAGUGUUU (dTdT)	AAACACUUGGGAUCAUCUC (dTdT)
K72			#2	GGUUGAAAUCCUUGGUCCA (dTdT)	UGGACCAAGGAUUUCAACC (dTdT)
K73	4281	MID1	#1	CAGCUAUUUACAACCUUCA (dTdT)	UGAAGGUUGUAAAUAGCUG (dTdT)
K74			#2	GUCACACACCUGAACGCUU (dTdT)	AAGCGUUCAGGUGUGUGA C (dTdT)
K75	27072	VSP41	#1	CUGCAAGAAGAUUCUCGUA (dTdT)	UACGAGAAUCUUCUUGCAG (dTdT)
K76			#2	CAGUUCGGGAUCAUUUGAA (dTdT)	UUGAAAUGAUCCCGAACUG (dTdT)
K77	84231	TRAF7	#1	CAAGUGCAAAGGGACCUUU (dTdT)	AAAGGUCCCUUUGCACUUG (dTdT)

K78			#2	GGUUGAAAUAAAUGCUGCA (dTdT)	UGGAGCAUUUAAUUUCAACC (dTdT)
K79	84101	USP44	#1	GAAGAUJGGUGUJCAUGUU (dTdT)	AACAUGAACACCAAUUCUUC (dTdT)
K80			#2	CUGCAAUGAUUCCAAACUA (dTdT)	UAGUUJGGAAUCAUJGCAG (dTdT)
K81		USP29	#1	CCCAUCCAAGUUUAGAGGAU (dTdT)	GGAAUAJGCUGAAGGAAAU (dTdT)
K82			#2	GGAAUAJGCUGAAGGAAAU (dTdT)	AUUUCCUJGCAGCAUAUJCC (dTdT)

2.12 RNF125 および RNF125C72/75A リコンビナント蛋白質の発現と精製

大腸菌発現系には宿主として B strain 由来の大腸菌株である Competent Cell BL21 (DE3) pLysS 株 (BioDynamics Laboratory Inc. #DS260) を用いた。pGEX-6p.1-RNF125 あるいは pGEX-6p.1-RNF125 C72/75A によって形質転換した BL21 (DE3) pLysS 株を LB plate 培地に播種し 37 °C で 12 時間静置した。発現した大腸菌コロニーが目的とするプラスミド遺伝子が挿入されているかを Colony PCR 法を用いて確認した。目的のプラスミドが形質転換された単一クローンを LB plate 培地より採取し LB/Glucose 培地中で OD₆₀₀ = 0.3 になるまで 37°C で振盪培養した。OD₆₀₀ = 0.3 に達したとき、氷上で 10 分間インキュベートした後に終濃度 0.01 mM イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG、Nacalai tesque #19742-94) を加え、37°C で 4 時間振盪培養することによってタンパク質発現を誘導した。4 時間後、遠心分離することによって菌体を回収した。回収した菌体を Extraction buffer に懸濁し、超音波破碎した。得られた細胞抽出液に終濃度 0.5% (v/v) になるように Triton-X100 を添加し 4°C で 30 分間穏やかに懸濁した。得られた細胞溶解液を 15,000 g で 20 分間遠心分離し、Glutathione-Sepharose 4B (20 μl resin/20 ml 細胞懸濁液、GE Healthcare #17075605) を加えた。3 時間穏やかに攪拌した後に、Wash buffer でレジンを洗

浄し、27 G 注射針付きシリンジ(TERMO #NN-2719S)を用いて Wash buffer を完全に除去した後、2.5units の PreScission Protease (GE Healthcare #27084301) を含む Wash buffer 300 μ l 加え、4 °C で 16 時間穏やかに攪拌した。16 時間後、遠心分離することによって上清を回収し、4 °C で保存した。

LB/Glucose 培地

1% trypton
0.5% Yeast extract
1% NaCl
1 mM NaOH
50 μ g/ml Ampicillin
2% (w/v) Glucose

Extraction buffer

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)
100 mM NaCl
1 mM DTT
1 mM EDTA
10% glycerol
0.5 mM PMSF
2 μ g/ml leupeptin

Wash buffer

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)
100 mM NaCl
1 mM DTT
1 mM EDTA
10% (v/v) Glycerol
0.5% (v/v) Triton-X100

2.13 シクロヘキシミド (CHX) チェイス実験

HEK293T 細胞に LipofectAMINE RNAi MAX を用いて siRNA をトランスフェクションし、5 時間後に培地交換し、さらに 67 時間培養した。その後、細胞を 100 µg/ml CHX で図中に示した時間処理した。細胞を遠心分離により回収し、Cell lysis buffer を用いて細胞抽出液を調製した。得られた細胞抽出液をウェスタンブロットにより解析した。

2.14 CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色

サンプルを SDS-PAGE で分離した後、CBB 染色液を用いて染色した。染色されたゲルは脱色液を用いて脱色した。

2.15 タンパク質定量

タンパク質の濃度は CBB G-250 溶液 (5 倍濃縮) (Nacalai tesque #29449-15) を用いた Bradford 法により行った。iMark マイクロプレートリーダー (BIO-RAD #168-1135JA) を用いて、595 nm の吸光度を測定後、BSA を用いた検量線をもとにタンパク質濃度を算出した。

2.16 ウェスタンブロット

調製したサンプルを、10 %アクリルアミドゲル及び 1x SDS-PAGE Running buffer を用いて SDS-PAGE により分離し、その後 1x Blotting buffer を用いて polyvinylidene difluoride membrane (PVDF、Millipore #IPVH00010) に転写した。転写後、メンブレンを Blocking buffer に 1 時間浸透させ、ブロッキング操作を行った。Blocking buffer で希釈した一次抗体とメンブレンを 4 °C で一晩静置させ一次抗体反応を行った。その後、10 分毎に 3 回 PBS-T で洗浄し、Blocking buffer に

よって希釈した HRP 標識二次抗体とメンブレンを室温で 1 時間静置させ二次抗体反応を行った。反応後、メンブレンを PBS-T で 3 回洗浄し、化学発光検出試薬である Chemi-Lumi One L (Nacalai tesque #07880-70) にメンブレンを反応させ、医療用 X 線フィルム (Fuji Film #47410-26617) を用いて化学発光を検出した。

SDS-PAGE Running buffer

25mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (pH 8.3)
192mM Glycine
0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Blotting buffer

25mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (pH 8.3)
192mM Glycine
20% (v/v) methanol

PBS-T

137 mM NaCl
8 mM NaHPO₄
1.5 mM KH₂PO₄
0.5 % (w/v) Tween-20

Blocking buffer

PBS-T
3 %(w/v) Skim milk

使用した抗体の濃度

一次抗体

- Rabbit anti-G α s polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-383) : 1/5000
Rabbit anti-G α q polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-393) : 1/5000
Rabbit anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F7425) : 1/500
Rabbit anti-TRAF7 polyclonal antibody (Novus Biologicals #NB600-1399) : 1/500
Rabbit anti-Anti-RNF125 / TRAC-1 polyclonal antibody (LifeSpan BioSciences #LS-C358283) : 1/1000
Mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F1804) : 1/10000
Mouse anti-Ubiquitin monoclonal antibody (P4D1, Santa Cruz Biotechnology #sc-8017) : 1/5000
Mouse anti-Mono- and poly- ubiquitinated conjugates monoclonal antibody (FK2, Enzo Life Sciences #BML-PW8810) : 1/3000
Mouse anti- β -Actin monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-47778) : 1/3000
Mouse anti- β -Tubulin monoclonal antibody (Sigma Aldrich #T4026) : 1/10000
- Goat anti-TRAC1/RNF125 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #C-17) : 1/500

二次抗体

- Anti-Mouse-IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9310) : 1/15000
Anti-Rabbit-IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9340) : 1/15000
Anti-Goat-IgG H&L (HRP) (Abcam #ab6741) : 1/10000

2.17 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

HEK293T 細胞へ pEF-renilla-luc、各レポーター遺伝子、各発現プラスミドを PEI 法により遺伝子導入した。遺伝子導入して 48 時間後、PBS を用いて細胞の洗浄を 2 回行い、Dual-Luciferase Reporter Assay キット (Promega #E1910) の Passive Lysis バッファーを各 well に 100 μ l ずつ加え、室温で 30 分間振とうすることで細胞を完全に融解させた。発光の測定は、1420 プレートリーダー ARVO MX (PerkinElmer) を用いた。計測値から、ホタル-ルシフェラーゼ活性とウミシイタケ-ルシフェラーゼ活性の比をとり、導入効率および細胞数による影響を補正した値を用いた。

2.18 RNA 抽出

24-well プレートで細胞を培養し、Sepasol を 1 ml 加え細胞を懸濁し、室温で 5 分静置した。次に Chloroform を 0.2 ml 加え転倒混和した。室温で 2~3 分間、静置した後 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。その後、水層を新しい 1.5 ml チューブへ移して Isopropyl alcohol を 0.5 ml 加え、室温で 10 分間静置した後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を取り除いて 75% エタノールを 1 ml 加えて混和した。15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した後に上清を完全に除去し、2 分間ほど沈殿を乾かした。その後、Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理した MilliQ 水を 50 μ l 加え溶解した後に RNA 濃度を、分光光度計を用いて測定した。

2.19 逆転写反応

ReverTraAce qPCR RT Kit (TOYOBO #FSQ-101) を用いて反応を行った。100 ng ~500 ng/7 μ l となるように調製した RNA を 65°C で 5 分間置いた後、氷上で 1 分間静置し、RNA 7 μ l に対し、5 \times RT Buffer 2 μ l、RT Enzyme Mix 0.5 μ l、Primer Mix 0.5 μ l を加え、37°C で 15 分、98°C で 5 分の条件で逆転写反応を行った。

2.20 定量 PCR

逆転写反応により得られた cDNA を用いて Reaction mix を調製し、95°C で 60 秒反応させた後、95°C 10 秒、56°C 30 秒を 40 サイクルの条件で PCR を行った。qPCR に用いたプライマーの配列を以下に示す。

Reaction mix

cDNA 0.5 µl
10 µM Forward Primer 0.3 µl
10 µM Reverse Primer 0.3 µl
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 5 µl
MilliQ 3.9 µl

GAPDH

hGAPDH qFw1: 5'- GGCTGAGAACGGGAAGCTTG -3'
hGAPDH qRv1: 5'-ACTCCACGACGTACTCAGCG -3'

RNF125

hRNF125 qFw1: 5'- CGTGTGCCTTGAGGTGTTAC -3'
hRNF125 qFw1: 5'- GGCAATAAGGACAGGTCCAC -3'

hRNF125 qFw2: 5'- GACAGCTTGCTGGATCATTG -3'
hRNF125 qRv2: 5'- GCTTGGATTCTCATCGGGTA -3'

第3章 実験結果

これまでに、Gas がユビキチン化による分解制御を受け、Gs シグナルの減弱が引き起こされることが示されている (Naviglio, S., *et al.* 2004; Nagai, Y., *et al.* 2010)。そこで、Gas のユビキチン化反応を担う E3 リガーゼ、及び脱ユビキチン化酵素の同定を行い、Gas のユビキチン化制御機構の解明を目指した。

第3章1節(3.1)では、Gas、Ric-8B と相互作用するユビキチン化関連酵素を質量分析法により探索した。第3章2節(3.2)では、先行研究で既に得られている Gas と相互作用を示す 39 種類の Ring-finger E3 リガーゼから、Gas に対する E3 リガーゼの同定を試みた (西村 基喜 本学修士論文)。第3章3節(3.3)では、Gas がユビキチン化された場合の細胞応答や生理的意義を解析するために、Gas ユビキチン化部位の同定を目指した。

3.1 MS 解析を用いた Gas、Ric-8B と相互作用するユビキチン化酵素群の探索

3.1.1 背景

先で述べた通り、Gas のユビキチン化を制御する酵素分子の存在が想定された。そこで、Gas のユビキチン化が確認されている HEK293T 細胞を用いて、Gas と相互作用するユビキチン化関連酵素群 (E3 ユビキチンリガーゼ、脱ユビキチン化酵素) の同定を試みた。また、Ric-8B がユビキチン化関連酵素群と相互作用する可能性も有るため、併せて相互作用分子を探索した。

3.1.2 MS 解析を用いた Gas、Ric-8B と相互作用するユビキチン化関連酵素群の同定

Gas に対するユビキチン修飾関連酵素を同定する為に、HEK293T 細胞に Flag タグを付加した Gas あるいは Ric-8B を一過性に発現させ、細胞を可溶化後、

Anti-FLAG M2 affinity Gel を用いて免疫沈降した。その免疫沈降物を LC-MS/MS に供し、Gas あるいは Ric-8B と相互作用する分子群を網羅的に探索した (図 2A)。MS 解析の結果、Gas の相互作用分子が 101 個、Ric-8B の相互作用分子が 145 個、双方と相互作用する分子は 56 個得られた (図 2B)。そのうち、Gas と相互作用する E3 リガーゼ候補分子として TRAF7、Gas と相互作用する脱ユビキチン化酵素候補分子として USP9Y、Ric-8B と相互作用する脱ユビキチン化酵素候補分子として USP29、および Gas と Ric-8B のいずれとも相互作用する脱ユビキチン化酵素候補分子として USP44 が得られた (表 1)。得られた 4 分子について現在までに報告されていることを以下に記述する。TRAF7 は、主に細胞質に局在し、NF-kappaB essential modulator (NEMO) のユビキチン化による NF-κB シグナルを正に調節すること、あるいは c-Myb の SUMO 化を担う E3 リガーゼであることが知られている (Tsikitis M, *et al.* 2010; Morita, Y., *et al.* 2005)。USP29 は酸化ストレスを受けて p53 の安定化に寄与する脱ユビキチン化酵素であり、USP44 は有糸分裂後期で働く Cdc20 の脱ユビキチン化酵素であることが知られている (Stegmeier, F., *et al.* 2007)。また、USP29 と USP44 は主に核に局在することが報告されている (Mosbech A, *et al.* 2013)。一方、USP9Y は、無精子症の原因遺伝子として同定されているが、細胞内での機能は殆ど分かっていない (Kuo, P., *et al.* 2004)。

3.1.3 TRAF7、USP29、あるいは USP44 と Gas の結合試験

LC-MS/MS により同定された分子のうち、USP9Y を除く TRAF7、USP29、および USP44 の cDNA を、哺乳類細胞発現ベクター (pCMV5-Flag) へサブクローニングした。一方、USP9Y の cDNA は取得出来なかった。まず、HEK293T 細胞への一過性発現系を用いて、これらのタンパク質が発現するかどうかを検討した。その結果、TRAF7、USP29、および USP44 の推定分子量位置にバンドが認められた。次に、これら 3 分子と Gas が相互作用するかを検討するために、Flag-TRAF7、Flag-USP29、あるいは Flag-USP44 と Gas をそれぞれ HEK293T 細胞に共発現させた後、抗 Flag 抗体を用いて免疫共沈降実験を行った。その結果、Gas と Flag-TRAF7 あるいは Flag-USP44 との共沈降が明瞭に認められた (図 3,4)。一方、Flag-USP29 と Gas の共沈降実験では、免疫沈降後の Flag-USP29 量が十分

ではないものの、Flag-USP29の免疫沈降に伴ったGasの共沈降も認められた(図4)。これらの結果から、TRAF7、USP29及びUSP44がGasと相互作用することが示唆された。

3.1.4 TRAF7がGasユビキチン修飾に与える影響の検討

Gasと相互作用したTRAF7がGasのユビキチン化に影響を与えるかを検討するために、*in vivo*ユビキチン化アッセイによる評価を行った。HEK293T細胞にHis-tag融合ユビキチン(His-Ub)およびGasをTRAF7と共に過剰発現させ、プロテアソーム阻害剤MG132で8時間処理した。Ureaを含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA担体を用いてユビキチン化されたタンパク質をPull downし、その共沈物を各種抗体で検出した。その結果、TRAF7の発現によりユビキチン化タンパク質量が増大した(図5A)。一方でTRAF7の発現によりユビキチン化されたGasのラダー状のバンドが減少した(図5B)。これらの結果から、TRAF7は細胞内でE3リガーゼとしてタンパク質のユビキチン化を促進する活性を持つ一方で、Gasのユビキチン化を促進せず、むしろ抑制することが示唆された。

3.1.5 USP29及びUSP44がGasユビキチン修飾に与える影響の検討

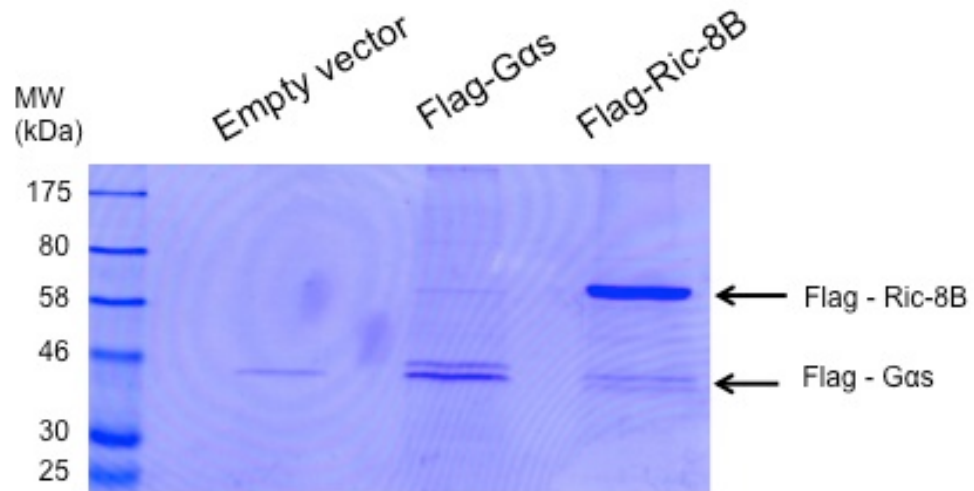
Gasと相互作用したUSP29及びUSP44がGasのユビキチン化に影響を与えるかを検討するために、*in vivo*ユビキチン化アッセイによる評価を行った。その結果、USP44の発現によりユビキチン化されたGasのラダー状のバンドは変化がなかった一方で、USP29の過剰発現はユビキチン化されたGasのラダーバンドを減少させた(図6)。これらの結果から、USP44は細胞内でGasのユビキチン化に関与しない一方で、USP29はGasのユビキチン化を抑制する脱ユビキチン化酵素である可能性が示唆された。

3.1.6 TRAF7、USP29、USP44の過剰発現及び発現抑制に伴う内在性Gas量の検討

逆に、其々の分子に対して 2 種類の異なる siRNA で処理した時の Gas の発現量を検討した。その結果、USP29 あるいは USP44 の発現抑制に伴う Gas の発現量には変化がなかった (図 9)。また、TRAF7 の発現抑制による内在性 Gas の発現量を、HEK293T 細胞を用いて検討した。その結果、TRAF7 発現抑制における Gas 発現量に有意な差が認められなかった (図 11, グラフ内 K77 及び K78)。以上の結果から、Gas と相互作用が認められた 3 分子の発現抑制はどれも、Gas 安定化に影響を与えない可能性が示唆された。

以上の結果から、TRAF7、USP29 がそれぞれ Gas の E3 リガーゼ、脱ユビキチン化酵素である可能性が示唆された。しかし、定常状態の Gas のユビキチン化を制御し細胞内タンパク質量に寄与する可能性は低いことから、さらに Gas ユビキチン化制御分子の探索を継続した。

(A)



(B)

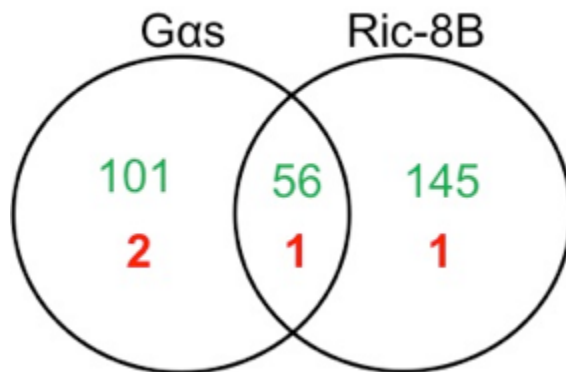


図 2: MS 解析による Gas あるいは Ric-8B に対する相互作用分子の解析

Flag-Gas あるいは Flag-Ric-8B を HEK293T 細胞に発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。Flag ペプチドを用いて溶出した後、LC-MS/MS を用いて相互作用分子を網羅的に解析した。(A) MASS 解析に供したサンプルの CBB 染色した SDS-PAGE の写真を示す。(B) LC-MS/MS 解析により同定されたタンパク質の数を示す。緑色は同定された全タンパク質の数、赤色はユビキチン修飾関連酵素の数を示す。

表1: G α sあるいはRic-8Bと相互作用するユビキチン修飾関連酵素

Protein	Mock	Flag-Gas	Flag-Ric-8B
TRAF7 (E3 ligase)		35	
USP9Y (Deubiquitinase)		19	
USP29 (Deubiquitinase)			34
USP44 (Deubiquitinase)		33	31

Flag-GasあるいはFlag-Ric-8Bの免疫沈降物から同定されたユビキチン修飾関連酵素を示す。MASCOT解析によるProtein scoreを数値で示す。

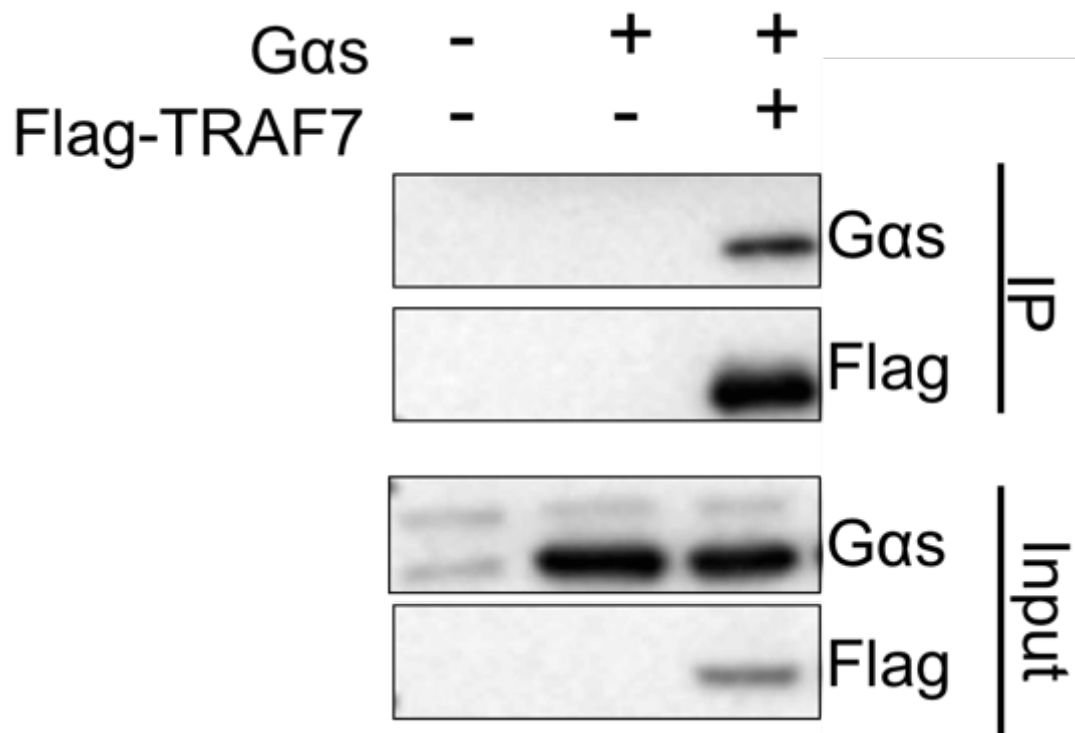


図 3: TRAF7 と Gas の結合試験

Flag-TRAF7 を HEK293T 細胞に Gas と共に過剰発現させ、48 時間培養した。細胞を可溶化後、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、各種抗体を用いたウェスタンブロットによる検討を行った。

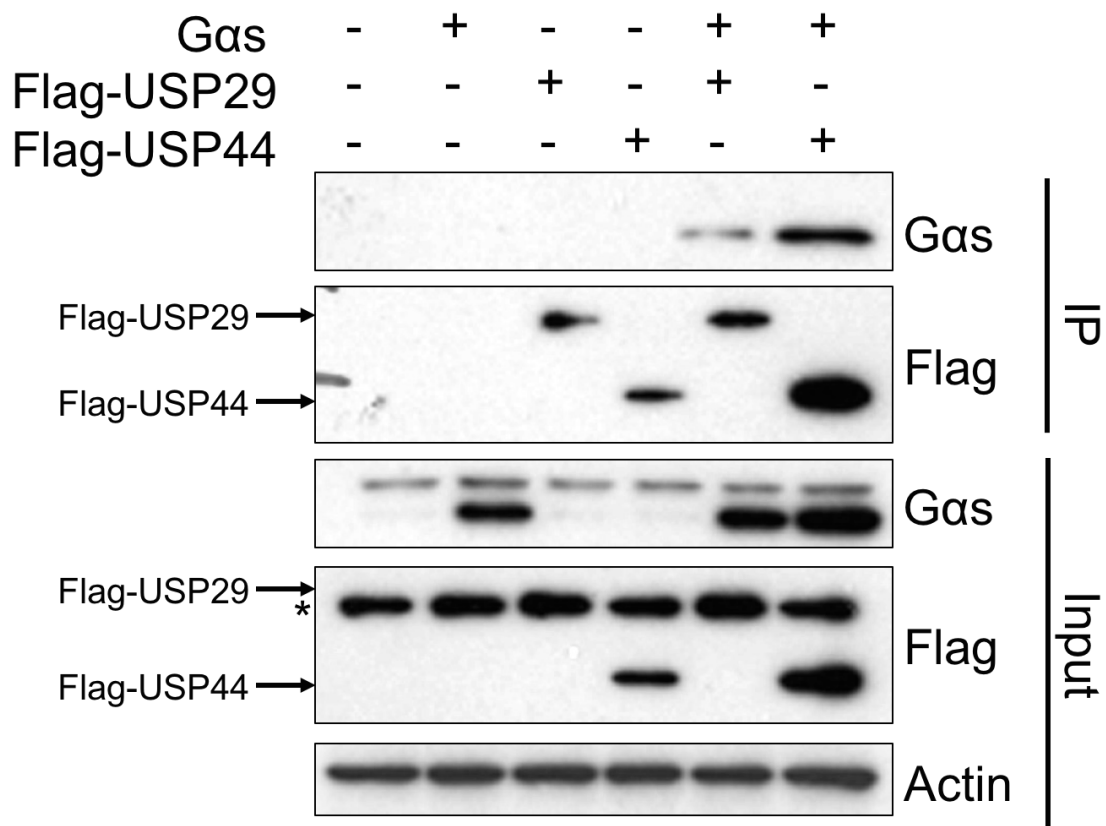
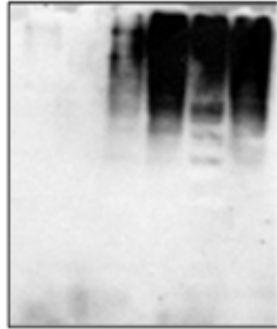


図 4: USP29、USP44 と Gas の結合試験

HEK293T 細胞に Flag-USP29 あるいは Flag-USP44 を Gαs と共に過剰発現させ、48 時間培養した。細胞を可溶化後、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、各種抗体を用いたウェスタンブロットによる検討を行った。*印は抗 Flag 抗体による非特異的なシグナルを示す。

(A)

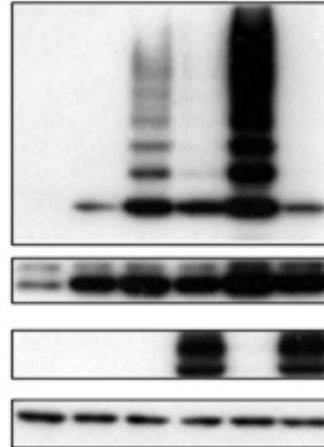
Gas	-	+	+	+	+	+
His-Ub	-	-	+	+	+	+
Flag-TRAF7	-	-	-	+	-	+
MG132	-	-	-	-	+	+



MG132: プロテアソーム阻害剤

(B)

Gas	-	+	+	+	+	+
His-Ub	-	-	+	+	+	+
Flag-TRAF7	-	-	-	+	-	+
MG132	-	-	-	-	+	+



Gas

Pull-down

Gas

Input

Flag

Actin

図 5: TRAF7 共発現における Gas ユビキチンアッセイの結果

His-tag 融合ユビキチン(His-Ub)および Gas を TRAF7 と共に HEK293 細胞に発現させ、MG132 で 8 時間処理した。Urea を含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体を用いて Pull-down assay を行った。抗 Ub 抗体を用いたウェスタンブロットの結果 (A) を、抗 Gas 抗体を用いたウェスタンブロットの結果(B) を其々示す。

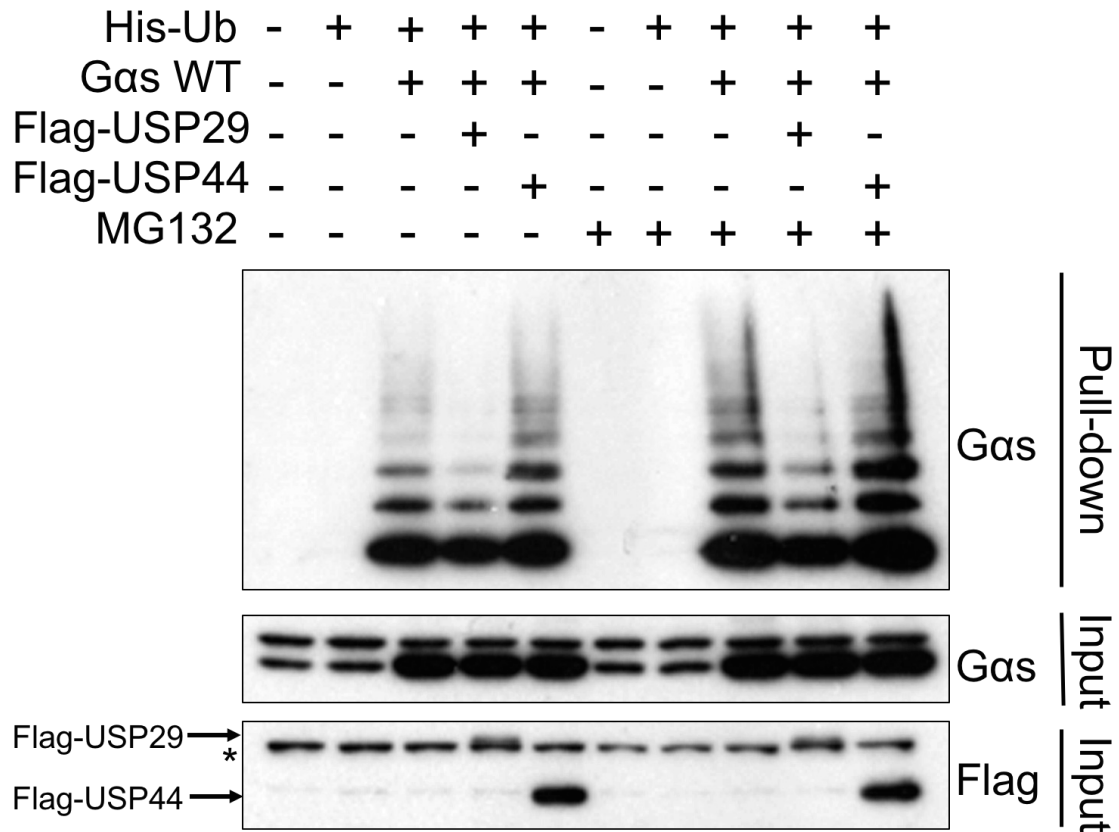


図 6: USP29、USP44 共発現における Gas ユビキチンアッセイの結果

His-tag 融合ユビキチン (His-Ub) および Gas を USP29 あるいは USP44 と共に HEK293 細胞に導入し、MG132 で 8 時間処理した。Urea を含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体による Pull-down assay を行い、抗 Gas 抗体を用いたウェスタンブロットの結果を示す。*印は抗 Flag 抗体による非特異的なシグナルを示す。

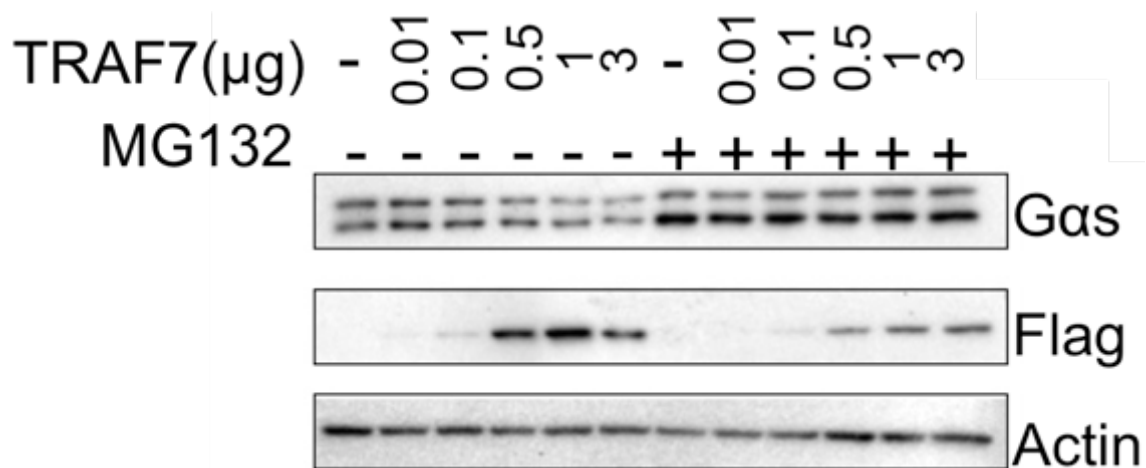


図 7: TRAF7 の過剰発現に伴う内在性 Gas 量の検討

HEK293T 細胞へ TRAF7 を過剰発現させ、内在性の Gas の発現量を検討した。

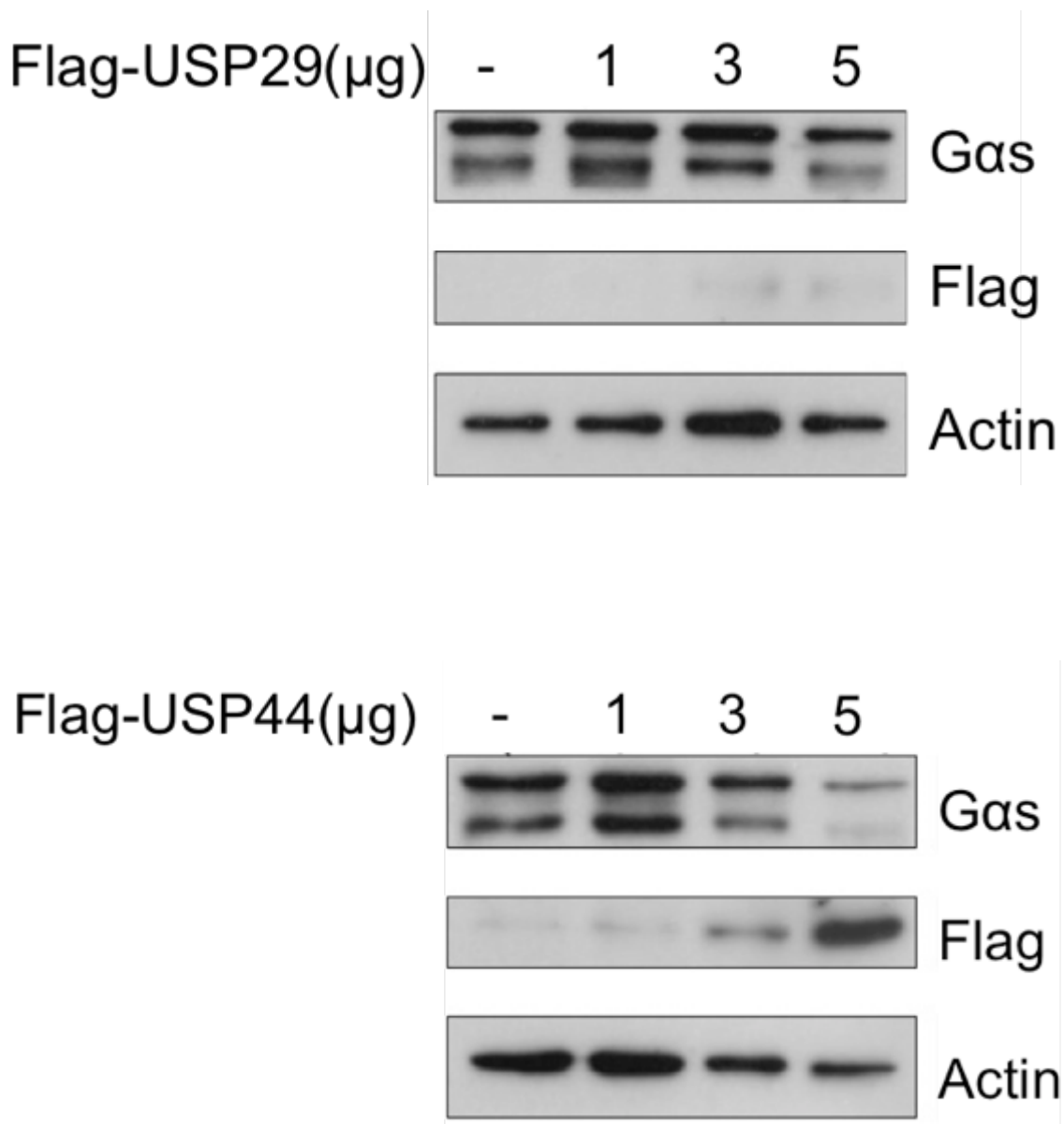


図 8: USP29 あるいは USP44 の過剰発現に伴う内在性 Gas 量の検討

HEK293T 細胞へ USP29 あるいは USP44 を過剰発現させ、内在性の Gas の発現量を検討した。

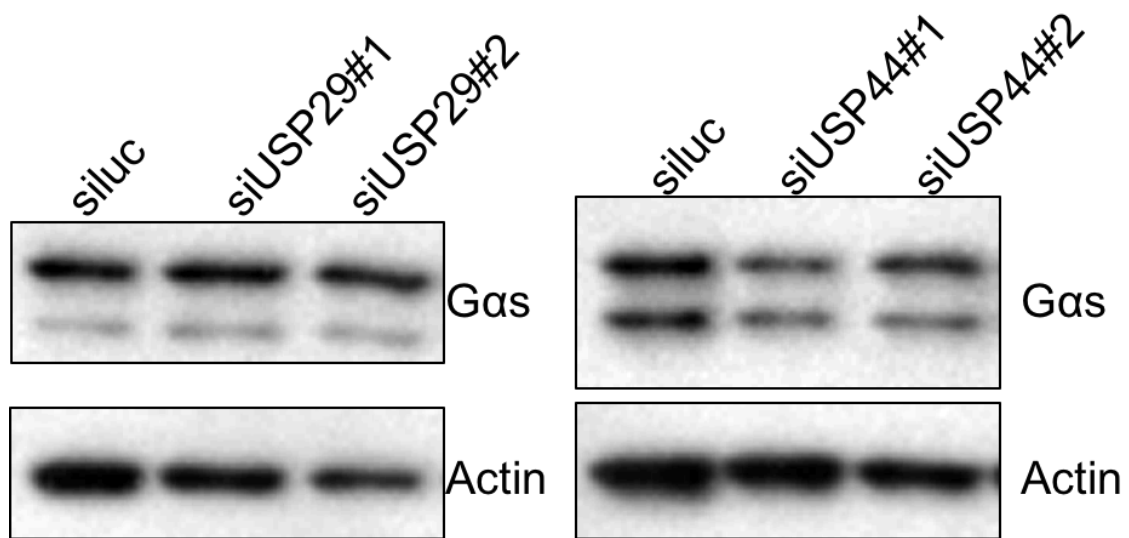


図 9: USP29 あるいは USP44 の発現抑制に伴う内在性 *Gas* 発現量の検討

其々の分子に対して 2 種類の異なる siRNA を HEK293T 細胞へ導入し、72 時間培養後、内在性の *Gas* の発現量を検討した。

3.2 Alpha Screen による Gas と相互作用する E3 リガーゼの探索

3.2.1 背景

愛媛大学の澤崎達也教授との共同研究により、無細胞タンパク質合成系で作製した 225 種類の Ring-finger E3 リガーゼと Gas の分子間相互作用が網羅的に解析された。その結果、Gas と相互作用を示す 39 種類の E3 リガーゼが同定された (図 10、西村 基喜 本学修士論文)。そこで、Gas と強く相互作用する可能性を示した 39 種類の E3 リガーゼから Gas に対する E3 リガーゼを同定することを試みた。

3.2.2 39 種の候補分子の発現抑制による Gas に対する E3 リガーゼの絞り込み

Gas の発現量に影響を与える E3 リガーゼを探索するために、HEK293T 細胞において 39 種類の E3 リガーゼに対する異なる 2 種類の siRNA を用いて発現抑制実験を行い、内在性 Gas の発現量を調べた。その結果、RNF38、MKRN1、RNF125 に対する siRNA を導入した細胞において、有意に Gas 発現量の上昇が観察された (図 11)。RNF38 は核に局在し、核内に存在する p53 を分解することが知られている (Sheren, J. and Kassenbrock, C. 2013)。MKRN 1 は p53 や p21 を分解制御することにより細胞分裂の停止やアポトーシスを調節することが知られている (Omwancha, J., *et al.* 2006; Lee, E., *et al.* 2009)。RNF125 は T cell 受容体シグナルによる T 細胞の活性化に応答して発現する分子として同定された (Zhao, H., *et al.* 2005)。RNF125 はヒトの自然免疫応答に関与する RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene-I) を分解することでインターフェロンの産生を負に調節すること、また BRAF 阻害剤に耐性を示すメラノーマ細胞において、免疫細胞の活性化とインターフェロン反応に必須の役割を果たす JAK1 (Janus kinase 1) のユビキチン化による分解を担い、メラノーマ細胞の増殖を抑制することが知られている (Arimoto, K., *et al.* 2007 ; Kim, H., *et al.* 2015)。

3.2.3 E3 リガーゼ候補タンパク質と Gas との相互作用試験

これらの E3 リガーゼ候補タンパク質が Gas と相互作用するかを調べるために、MKRN1 と RNF125 の cDNA を pCMV5-Flag ベクターにサブクローニング後、HEK293T 細胞に Flag-MKRN1 および Flag-RNF125 を Gas と共発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫共沈降を行った。その結果、Gas は MKRN1、RNF125 と共沈降した (図 12)。一方、RNF38 も同様に pCMV5 ベクターに挿入したが、HEK293T 細胞における発現が認められなかった (データ不掲載)。

3.2.4 MKRN1 及び RNF125 が Gas ユビキチン化に与える影響の検討

Gas と相互作用した MKRN1 及び RNF125 が Gas のユビキチン化に影響を与えるかを検討するために、*in vivo* ユビキチン化アッセイによる評価を行った。その結果、MKRN1 の発現によりユビキチン化された Gas のラダー状のバンドは減少した一方で、RNF125 の過剰発現はユビキチン化された Gas のラダーバンドを増加させた (図 13)。これらの結果から、MKRN1 は細胞内で Gas のユビキチン化を促進しない一方で、RNF125 は Gas のユビキチン化を促進する E3 リガーゼである可能性が示唆された。

3.2.5 前立腺癌細胞 (PC-3 細胞) と HEK293T 細胞を用いた RNF125 発現抑制実験

RNF125 の発現抑制により Gas の発現量が上昇することの一般性を確かめるために、HEK293T 細胞に加えて PC-3 細胞を用いて RNF125 発現抑制時の Gas 量を検討した。その結果、両細胞株において 3 種類のうち 2 種類の異なる siRNA (siRNF25#2 及び RNF125#4) により内在性 Gas タンパク質発現量が上昇した (図 14)。一方、RNF125 発現抑制した HEK293T 細胞において Gas の mRNA 量は変化しなかった。以上の結果から、RNF125 は異なる種類の細胞において翻訳後の過程で Gas の発現量を調節していることが示唆された。

3.2.6 RNF125 発現抑制における Cycloheximide チェイス実験

RNF125 が Gas タンパク質の分解に関与するかを調べるために、HEK293T 細胞を CHX で処理し、内在性 Gas タンパク質量の経時変化を調べた。その結果、コントロール細胞では CHX 処理による経時的な Gas タンパク質の減少、すなわち分解が観察されたが、RNF125 発現抑制細胞では Gas タンパク質の分解が抑制された (図 15)。この結果から、RNF125 は Gas タンパク質の分解に関与することが示唆された。

3.2.7 RNF125WT、RNF125CA と Gas の相互作用試験

RNF125 野生型 (RNF125WT) は、活性化ドメインである RING ドメイン、Zn²⁺ フィンガードドメインである C2H ドメインを 3 つ有している(図 16)。RNF125 活性欠失変異体 (RNF125CA) は既に報告されており、RING ドメインの 72 番目と 75 番目の 2 つのシステイン残基をアラニン残基に置換した変異体である (Arimoto, K., *et al.* 2007)。変異体発現プラスミドを作製後、Gas との相互作用を検討するために、HEK293T 細胞に Flag-RNF125WT、Flag-RNF125CA を Gas と共発現させた後、抗 Flag 抗体を用いて免疫共沈降実験を行った。その結果、RNF125CA の免疫沈降に伴って共沈降した Gas は RNF125WT の場合と比較して遜色なかった (図 17)。この結果から、RNF125 と Gas の相互作用に RNF125 の酵素活性を必要としないことが示唆された。

3.2.8 酵素活性依存的な RNF125 による Gas ユビキチン化の亢進の検討

酵素活性依存的に RNF125 が Gas のユビキチン化に影響を与えるかを検討するために、*in vivo* ユビキチン化アッセイによる評価を行った。その結果、RNF125WT の過剰発現により、外来的に発現させた Gas のユビキチン化ラダーバンドは増加した一方で、RNF125CA の過剰発現は Gas のユビキチン化ラダーバンドを増加させなかった (図 18)。また、内在性の Gas に対しても同様の結果を得た (図 19)。これらの結果から、RNF125 は酵素活性依存的に Gas のユビキチン化を促進する E3 リガーゼであることが示唆された。

3.2.9 RNF125WT、RNF125CA タンパク質の精製

pGEX-6P-1-RNF125WT あるいは pGEX-6P-1-RNF125 CA によって形質転換した BL21 (DE3) pLysS 株を用いて LB/Glu 培地に終濃度 0.01mM になるように IPTG を添加し、37°C で 4 時間振盪培養することによってタンパク質発現を誘導した。誘導後、目的のタンパク質を glutathione-Sepharose 4B に吸着させた。吸着したタンパク質から目的タンパク質のみを単離するために PreScission Protease を用いて GST タグからの切り出しを行った。得られた反応上清を SDS-PAGE に供した。その結果、RNF125WT 及び RNF125CA は目的とする分子量位置 (25kDa) に得られた(図 20, lane 2, 3)。また、抗 RNF125 抗体を用いたウェスタンブロットの結果、RNF125 の 25kDa バンドが認識された (データ不掲載)。以上の結果から、RNF125WT 及び RNF125CA の組換えタンパク質は精製できたと考えた。尚、*in vitro* ユビキチン化アッセイに用いた E2 は、RNF125 と複合体を形成し、基質タンパク質をユビキチン化することが既知の rUbcH5a を用いた (Arimoto, K., *et al.* 2007; Bijlmakers, M., *et al.* 2016)。

3.2.10 RNF125 が直接 Gas をユビキチン化する酵素であるかの検討

RNF125 が Gas を直接ユビキチン化する E3 リガーゼであるかを検討するために、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、RNF125WT の添加により Gas のバンドシフトを確認できた一方、RNF125CA の添加では Gas のバンドシフトは見られなかった (図 21)。次に、このバンドシフトが Gas のユビキチン化バンドであることを確認するために、*in vitro* ユビキチン化反応を行った後、抗 Ubiquitin 抗体 (P4D1) を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロットで評価した。その結果、RNF125WT の添加によりユビキチン化された Gas が検出された一方、RNF125CA の添加に伴ったユビキチン化された Gas は確認出来なかった (図 22)。以上の結果から、RNF125 は Gas を直接ユビキチン化する酵素であることが証明された。

3.2.11 RNF125 が Gs シグナルに与える影響

RNF125 が Gs シグナルに関わるかどうか調べるために、レポーター遺伝子アッセイを行った。Gas の活性化は、cAMP の産生を促し、cAMP-Responsive element (CRE) 依存的な転写を促進することが知られている。HEK293T 細胞に Gas と共役することが示されているセロトニン受容体 HTR6 及び RNF125WT あるいは RNF125CA を導入した (Kohen, R., *et al.* 1996)。導入して 48 時間後に細胞を回収しレポーター遺伝子アッセイを行い、Gs シグナルを検討した。その結果、RNF125 を発現させた細胞においては、コントロール細胞と比べて HTR6 依存的な Gs シグナルが減弱した (図 23)。一方、HTR6 及び RNF125 を発現させた細胞の HTR6 発現量は、HTR6 単独発現のそれと比べて増えていた。この結果から、RNF125 は Gs シグナルを抑制する働きがあることが示唆された。

次に、RNF125 を発現抑制した PC-3 細胞を用いて、Gas と共役する β -アドレナリン受容体のアゴニストである Isoproterenol で刺激した際の cAMP 応答を評価した。その結果、コントロール細胞と比較して RNF125 を発現抑制した PC-3 細胞では、Isoproterenol 刺激による cAMP 産生量が有意に増加した (図 24)。これらの結果から、RNF125 は Gas を分解することにより、Gs シグナル量を負に調節することが示唆された。

3.2.12 Ric-8B が RNF125 依存的な Gas ユビキチン化へ与える影響の検討

これまでの先行研究から、Ric-8B は Gas のユビキチン化を抑制する働きを持つことが知られている (Nagai, Y., *et al.* 2010)。そこで、Ric-8B が RNF125 過剰発現による Gas のユビキチン化促進に対して抑制効果を示すかを検討するために、*in vivo* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、RNF125 の発現によりユビキチン化 Gas のラダーバンドは増加した一方で、Ric-8B の共発現は RNF125 に誘導された Gas のユビキチン化ラダーバンドを減少させた (図 25)。さらに、RNF125 による Gas ユビキチン化に対する Ric-8B の効果を検証するために、GST-Ric-8B を用いた *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、コントロールでは RNF125 により誘導される Gas のユビキチン化バンドが認められ、Ric-8B の添加は RNF125 により誘導される Gas のユビキチン化を阻害した (図 26)。

次に Ric-8B が Gas に対する脱ユビキチン化酵素である可能性を考え、*in vitro* 脱ユビキチン化アッセイを行った。本実験では、先に RNF125 による Gas ユビキチン化を誘導した後に、Ric-8B を添加して Gas のユビキチン化バンドを評価する系で行った。その結果、Ric-8B を添加した後の RNF125 による Gas ユビキチン化バンドは GST 添加のコントロール群と比較して差がなかった (図 27)。さらに、RNF125、Gas、Ric-8B の 3 者の結合様式を調べるために、3 者を過剰発現した HEK293T 細胞における免疫共沈降を行った。その結果、RNF125 と Gas の共沈降は Ric-8B を発現させることで著しく減少したが、RNF125 と Ric-8B の共沈降は認められなかった (図 28)。これらの結果から、Ric-8B は Gas に結合することで Gas と RNF125 の結合を阻害し、RNF125 による Gas のユビキチン化を抑制することで、Gas の安定化に寄与していることが示唆された。

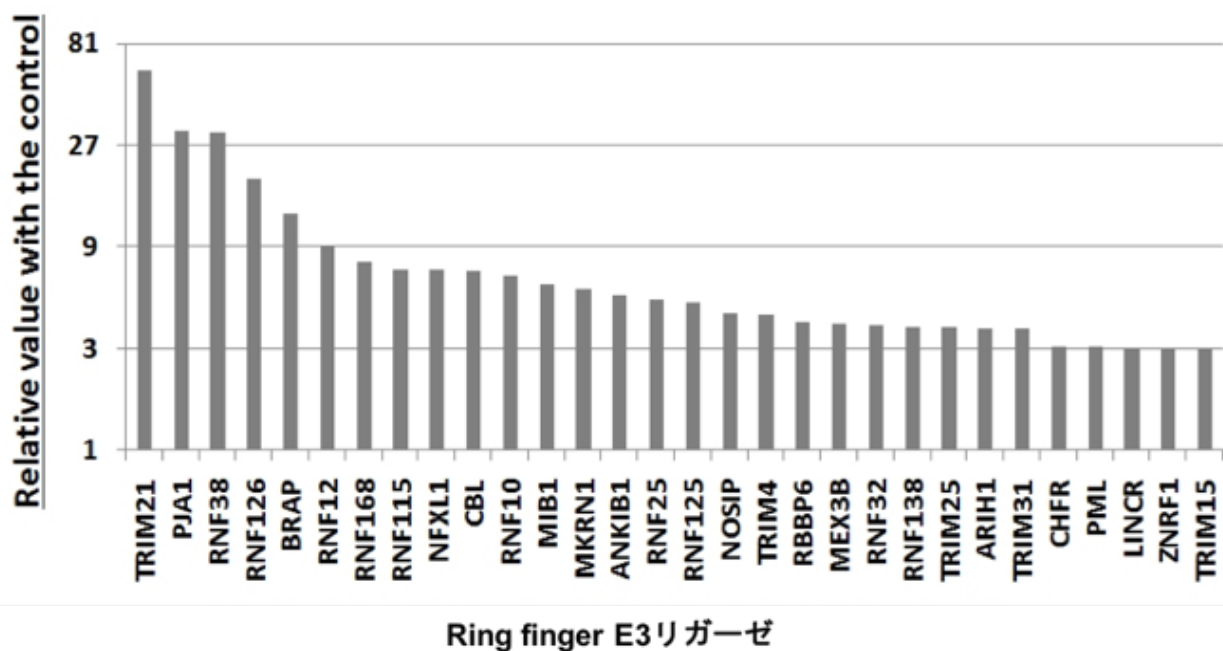


図 10: 先行研究で行われた Alpha screen による Gas と相互作用する RING finger タンパク質の探索

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた E3 ユビキチンリガーゼの Alpha Screening の結果を示した。Gas と強い結合が検出された上位 30 種の RING finger protein について、コントロールとの相対値を結合シグナル強度として示した (西村 基喜 修士論文 (2010) を基に改変)。

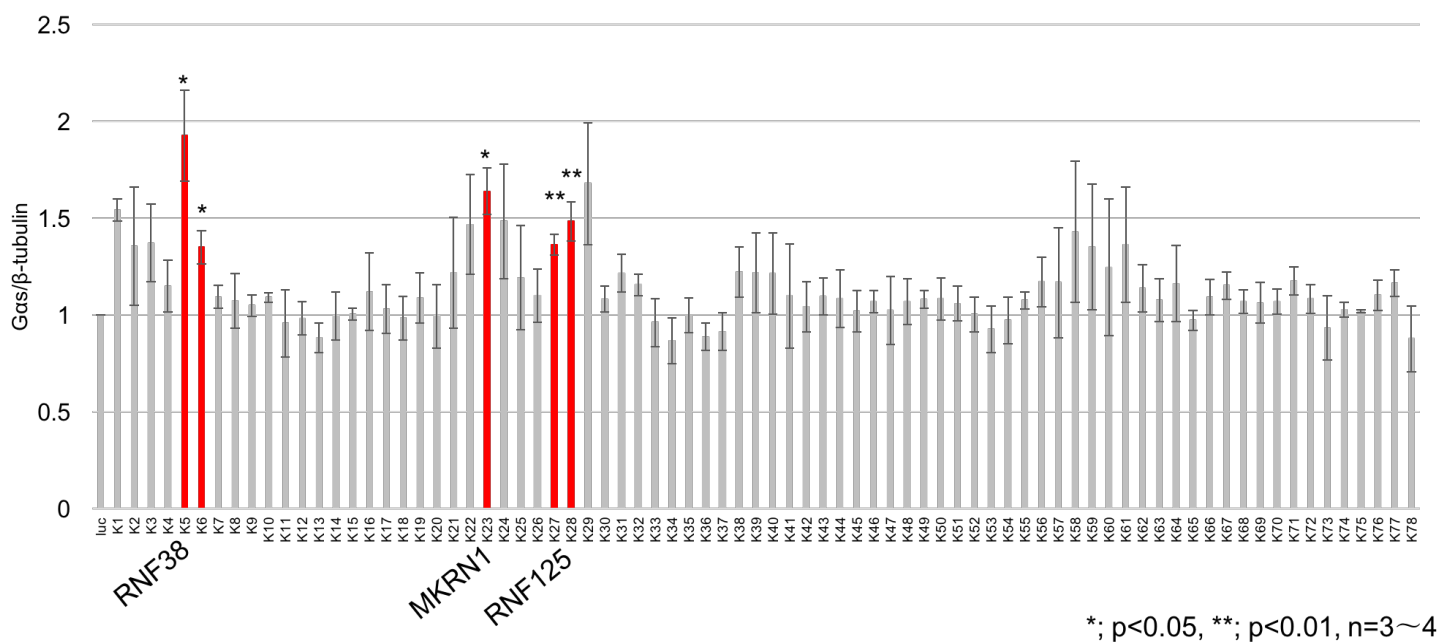


図 11: Alpha Screen により Gas と相互作用した 39 分子の発現抑制実験

其々の分子に対して 2 種類の異なる siRNA を HEK293T 細胞へ導入し、72 時間培養後、内在性の Gas の発現量を、抗 Gas 抗体を用いたウェスタンブロットにより検討した。β-チューブリンのシグナルを内部標準としてコントロールの siRNA を導入した際の発現レベルを 1 とした。3~4 回の実験の平均値を示す。エラーバーは SEM を示している。

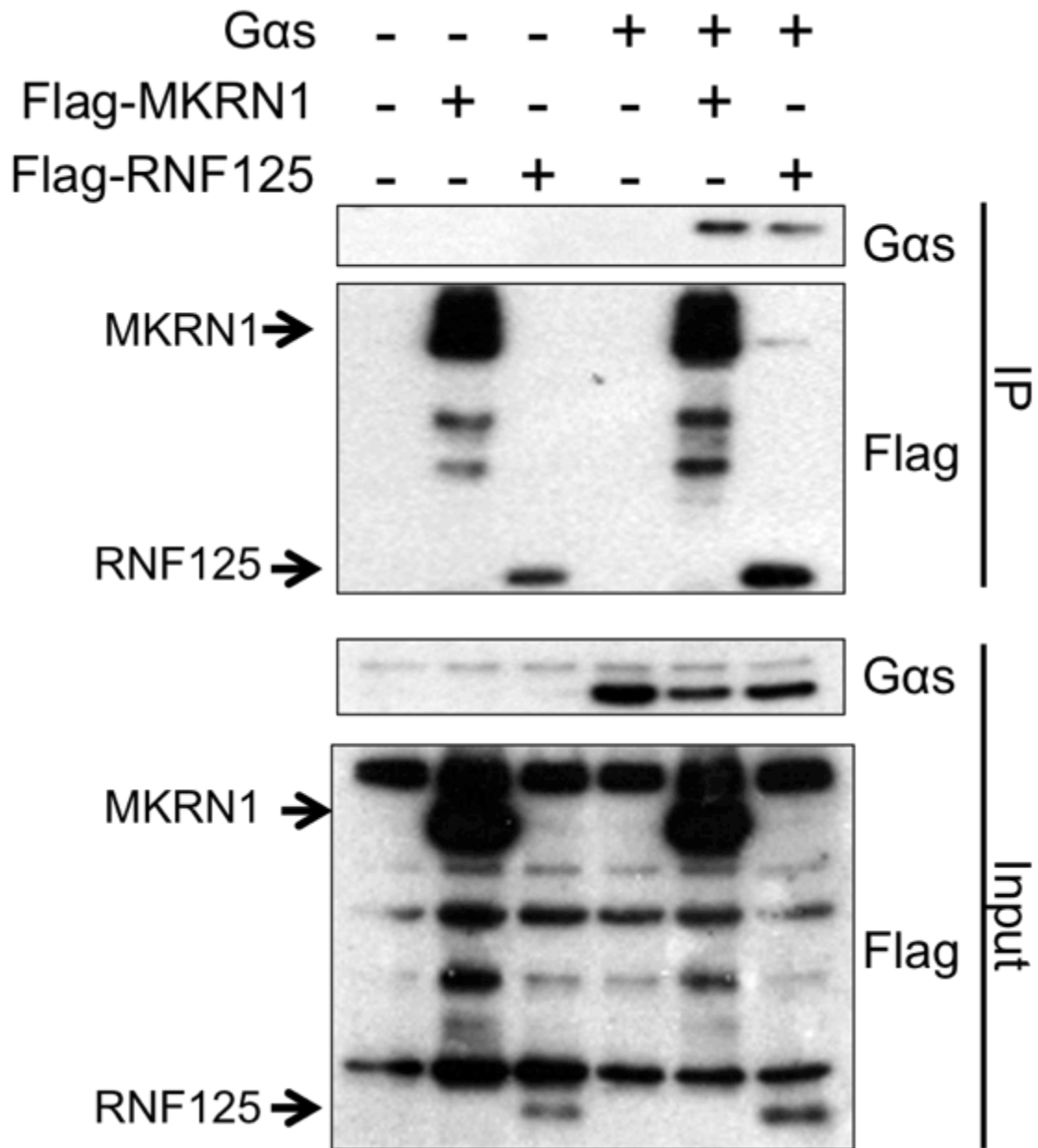


図 12: MKRN1 あるいは RNF125 と Gas の結合試験

HEK293T 細胞に Flag-MKRN1 あるいは Flag-RNF125 を Gas と共に過剰発現させ、48 時間培養した。細胞を可溶化後、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った後、各種抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。

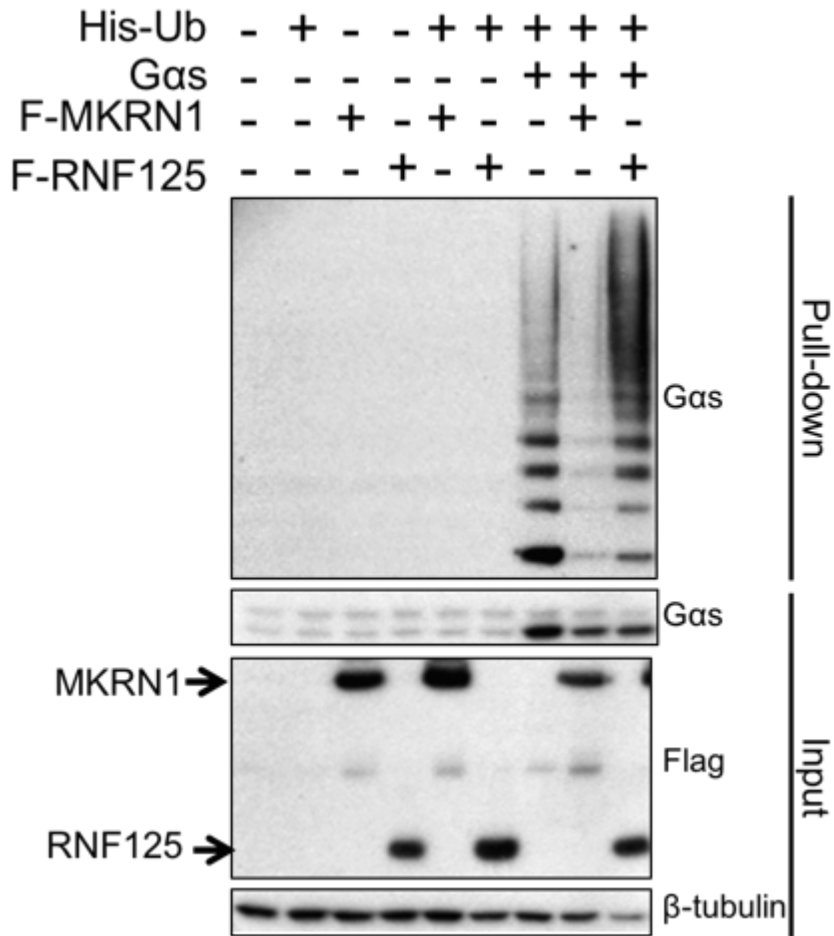
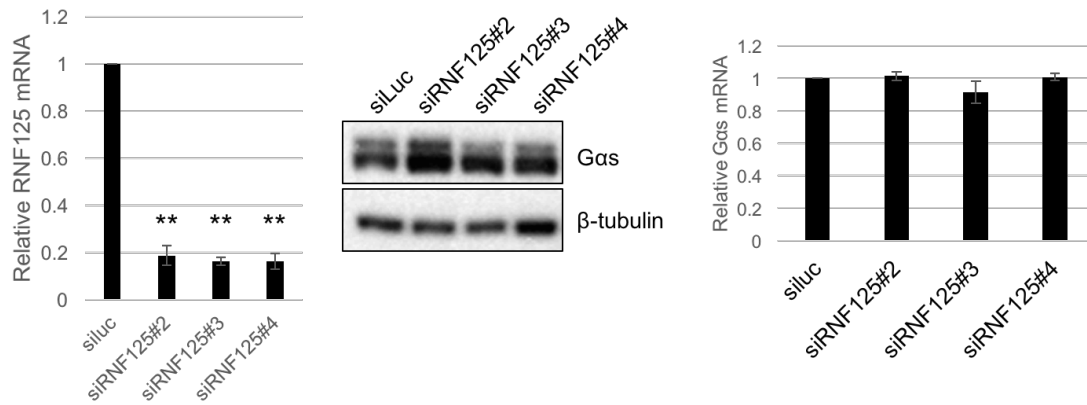


図 13: MKRN1 あるいは RNF125 共発現における Gas ユビキチンアッセイの結果

His-tag 融合ユビキチン (His-Ub) および Gas を MKRN1 あるいは RNF125 と共に HEK293 細胞に導入し、MG132 で 8 時間処理した。尿素を含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体による Pull-down assay を行い、抗 Gas 抗体を用いたウェスタンブロットの結果を示す。

HEK293T cells



PC-3 cells

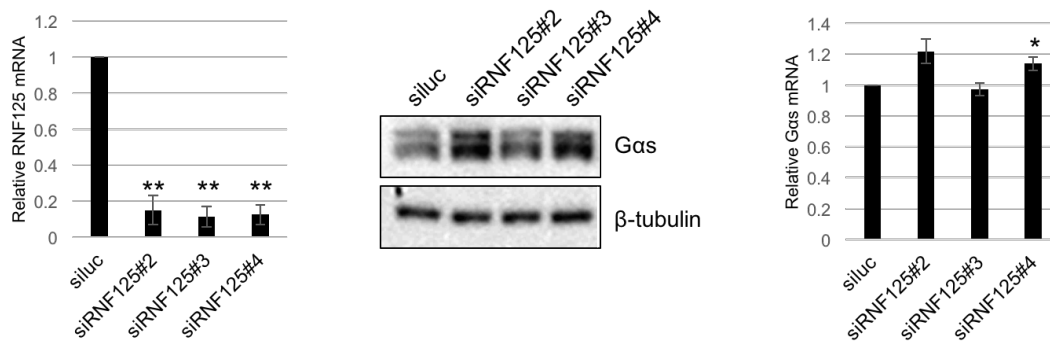


図 14: 前立腺癌細胞 (PC-3 細胞) と HEK293T 細胞を用いた RNF125 発現抑制実験

PC-3 細胞と HEK293T 細胞を用いて RNF125 発現抑制時の Gas 発現量を検討した (上段: HEK293T 細胞、下段: PC-3 細胞)。各種 siRNA を細胞へ導入した。導入してから 5 時間後、培地交換を行い、更に 67 時間培養した。培養した細胞を回収した後、各種抗体を用いたウェスタンブロットに供した。一方、2 種類の細胞へ siRNA を導入した後、RNA を回収し、RNF125 と Gas に対するプライマーを用いた RT-PCR を行った。エラーバーは SEM を示す。

HEK293T cells

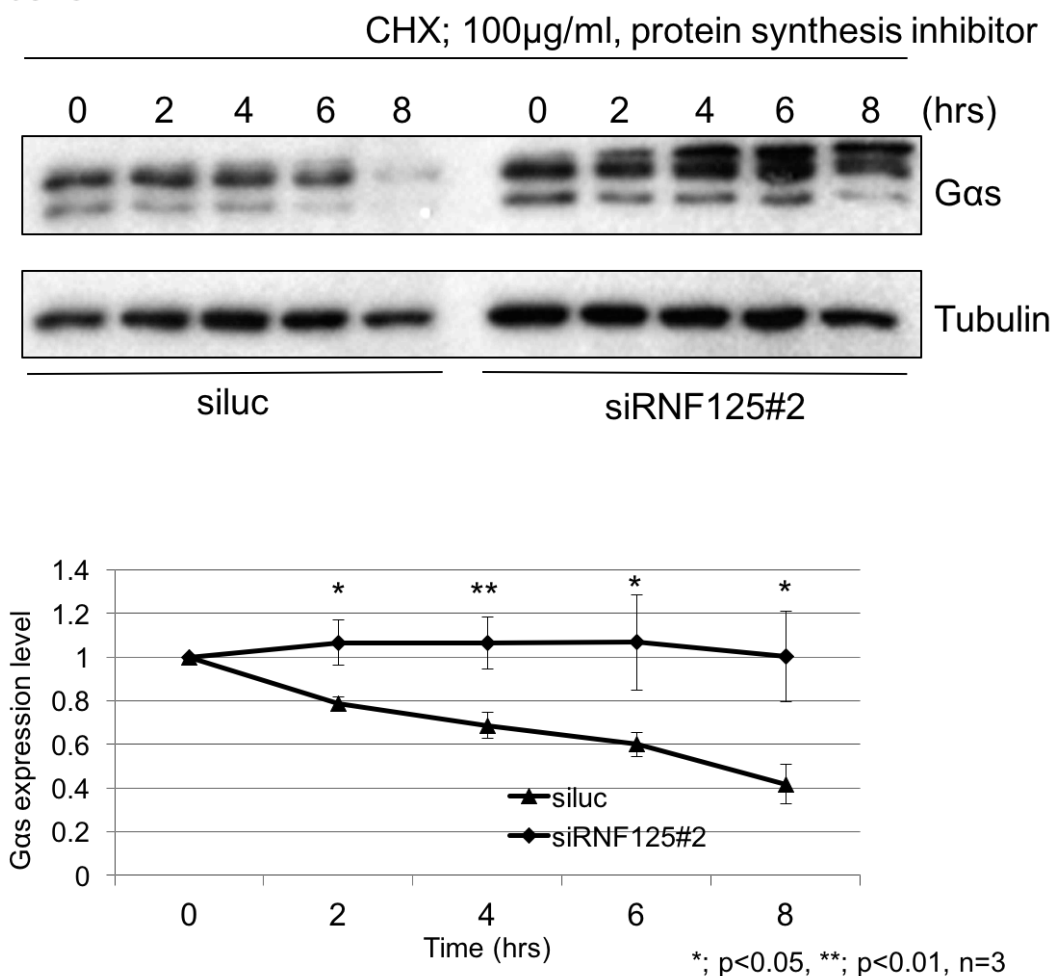


図 15: RNF125 発現抑制における Cycloheximide チェイス実験

HEK293T 細胞に siRNA をトランスフェクションし、5 時間後に培地交換し、さらに 67 時間培養した。その後、細胞を 100 µg/ml CHX で図中に示した時間処理した。その後、細胞を回収し、各種抗体を用いたウェスタンブロットによりタンパク質発現量を評価した。ウェスタンブロットの結果を図上段に示す。独立して 3 回実験を行った結果を定量したグラフを図下段に示す。エラーバーは SEM を示す。

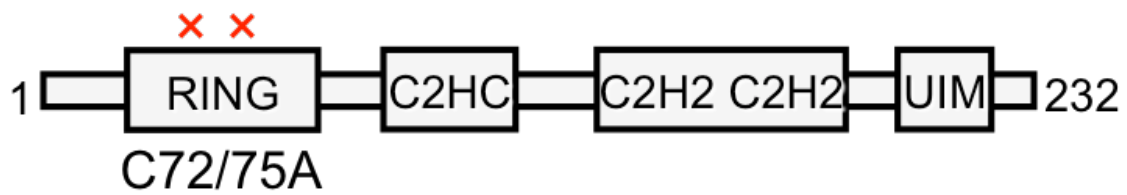


図 16: RNF125 活性欠失変異体 (RNF125CA) の概略図

RNF125 は活性化ドメインである RING ドメイン、Zn フィンガードドメインである C2H ドメインを 3 つ有している。RNF125CA は、RING ドメインの 2 つのシステイン残基をアラニン残基に置換した変異体である。

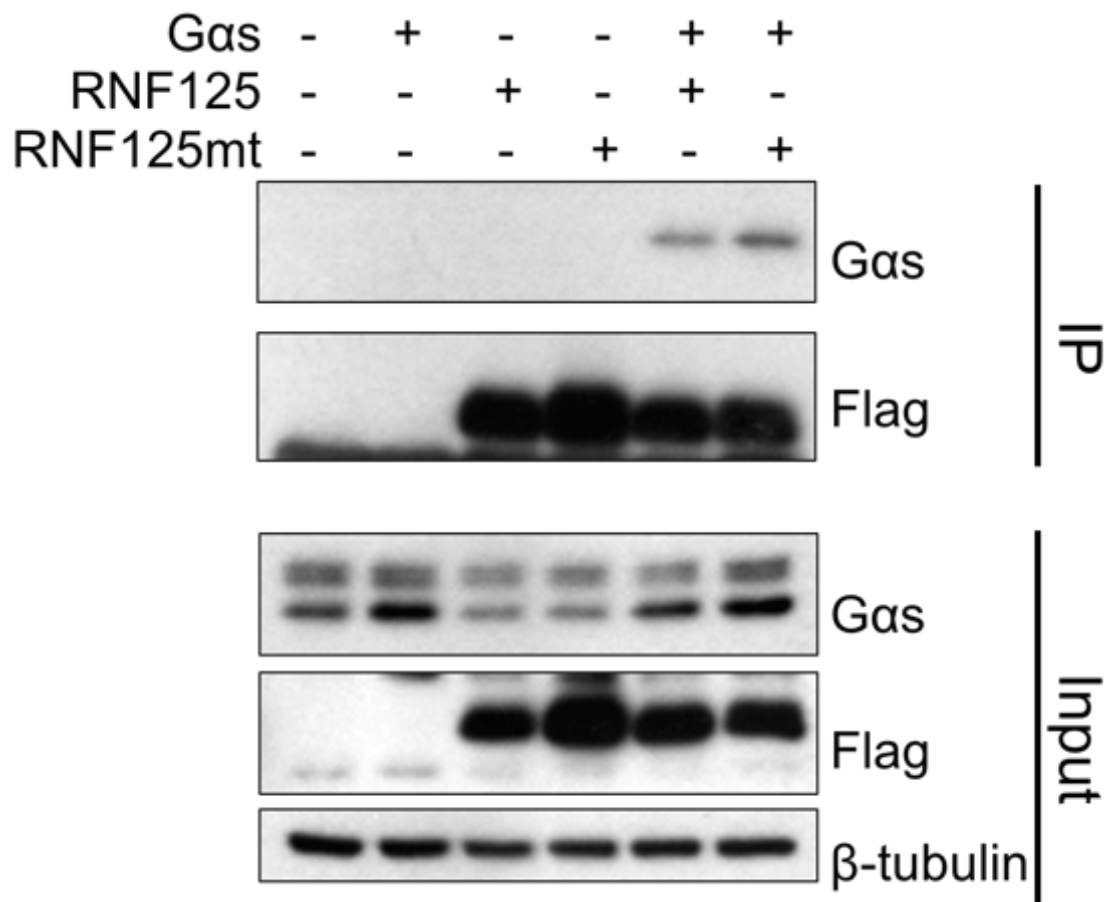


図 17: RNF125WT あるいは RNF125CA と *Gas* の共沈降実験

HEK293T 細胞に Flag-RNF125WT あるいは Flag-RNF125CA を *Gas* と共に過剰発現させ、48 時間培養した。細胞を可溶化後、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った後、各種抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。

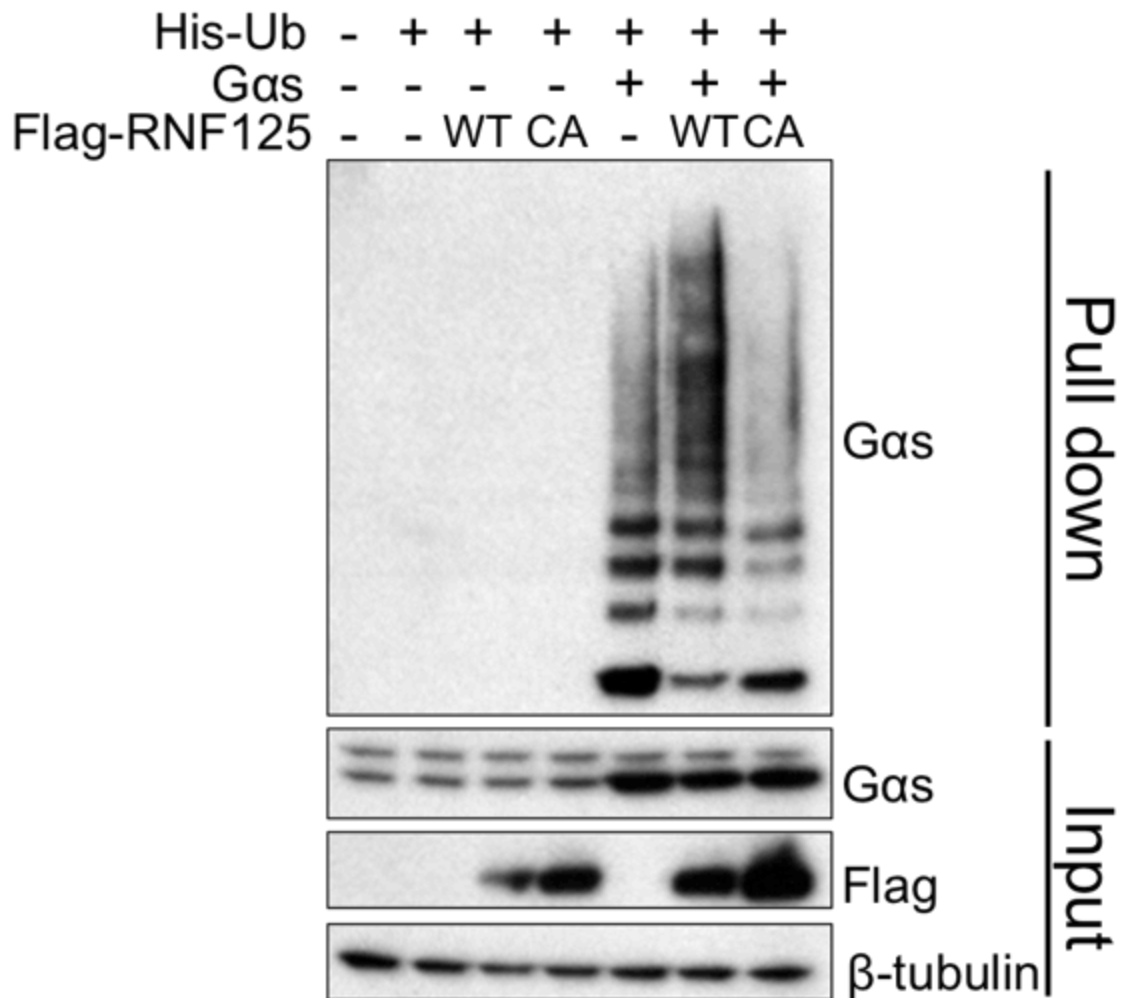


図 18: RNF125CA の共発現における Gas のユビキチン化

His-tag 融合ユビキチン(His-Ub)および Gas を RNF125WT あるいは RNF125CA と共に HEK293 細胞に導入し、MG132 で 8 時間処理した。尿素を含むバッファで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体による Pull-down assay を行い、抗 Gas 抗体を用いたウェスタンブロットの結果を示す。

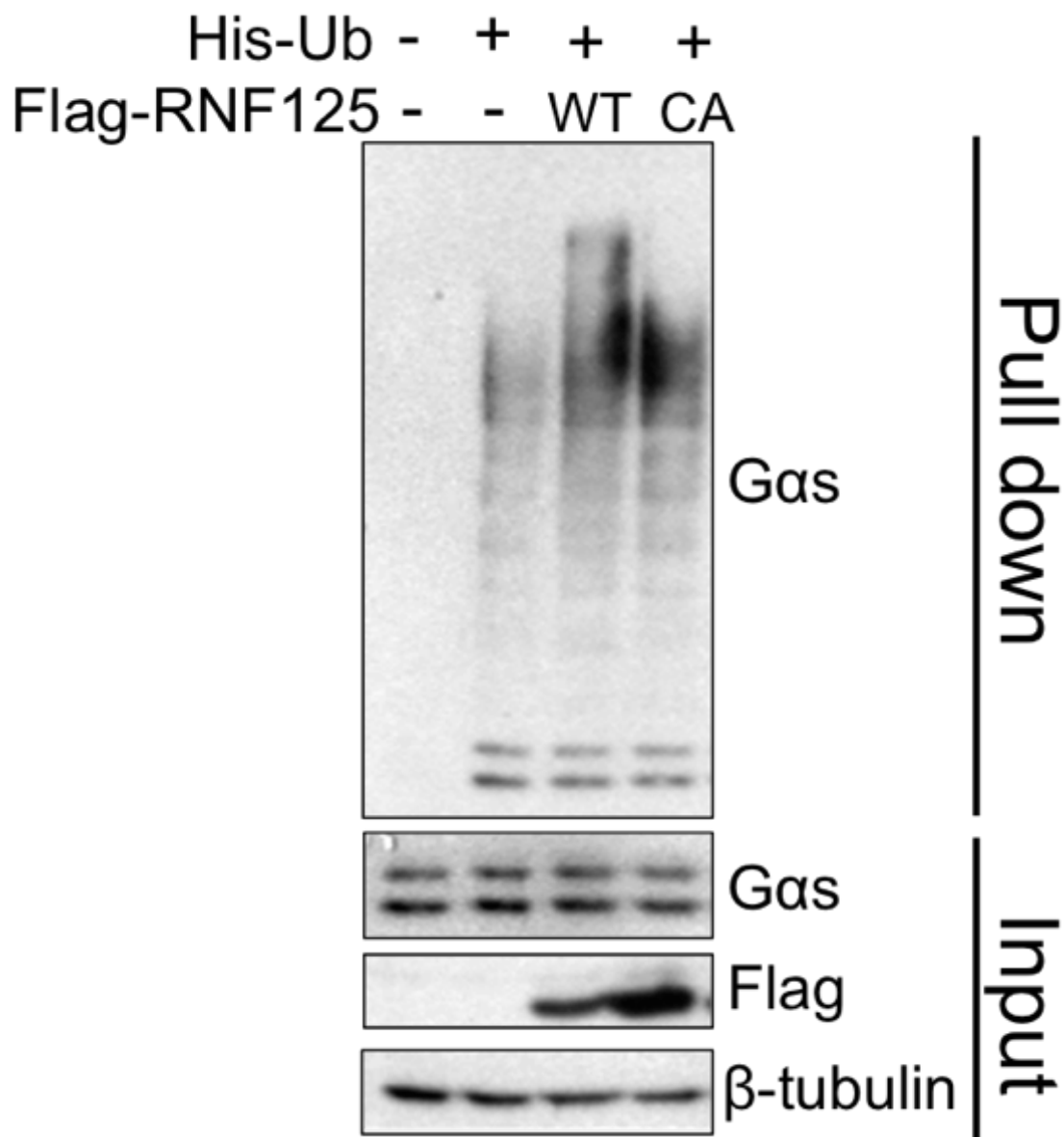


図 19: 内在性 *Gas* のユビキチン化に対する RNF125 の影響

His-tag 融合ユビキチン (His-Ub) を RNF125WT あるいは RNF125CA と共に HEK293 細胞に導入し、MG132 で 8 時間処理した。尿素を含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体による Pull-down assay を行い、抗 *Gas* 抗体を用いたウェスタンプロットの結果を示す。

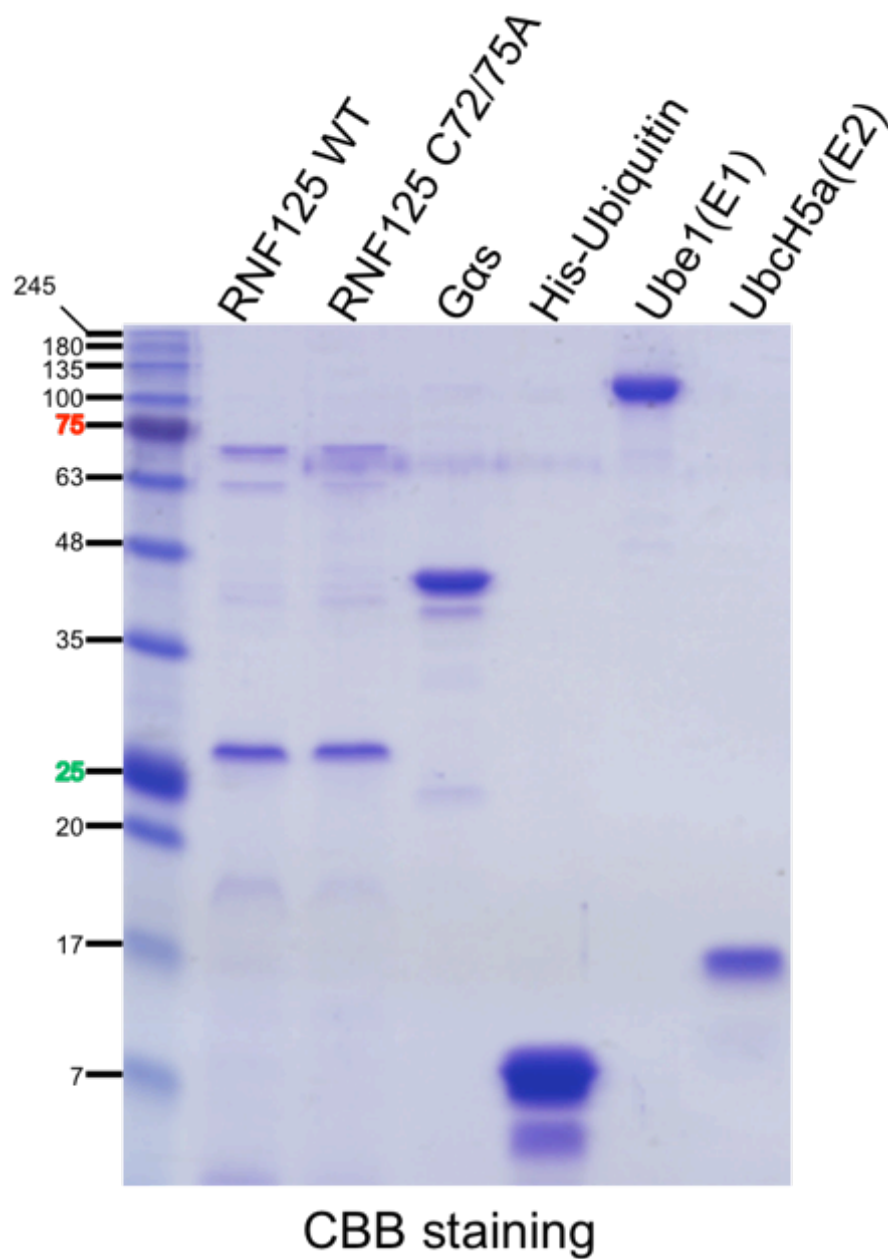


図 20: *In vitro* ユビキチン化アッセイに用いた精製タンパク質の CBB 染色像

RNF125 及び RNF125CA (レーン 2、3)、Gas 及び His-Ub (レーン 4、5)、UBE1 及び UbcH5a (レーン 6、7) を其々電気泳動し、ゲルを CBB で染色した。これらのタンパク質を用いて *in vitro* ユビキチン化を検討した。

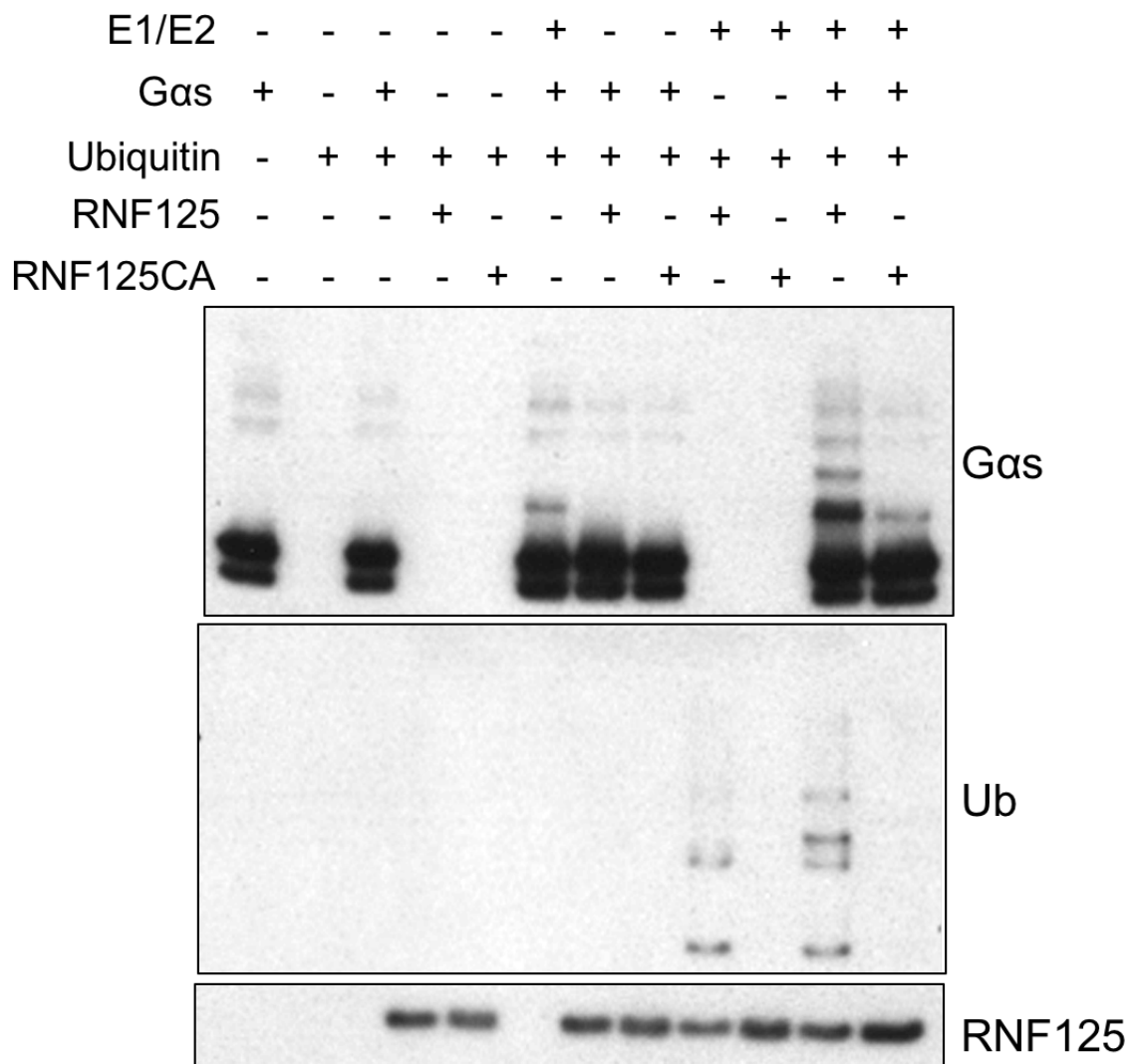


図 21: *in vitro* ユビキチン化アッセイによる RNF125 が Gas ユビキチン化に与える効果

精製した RNF125WT あるいは Flag-RNF125CA を Gas、His-Ub、UBE1 (E1) 及び UbcH5a (E2) と共に混合し、37°C で 2 時間静置した。その後、各種抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。

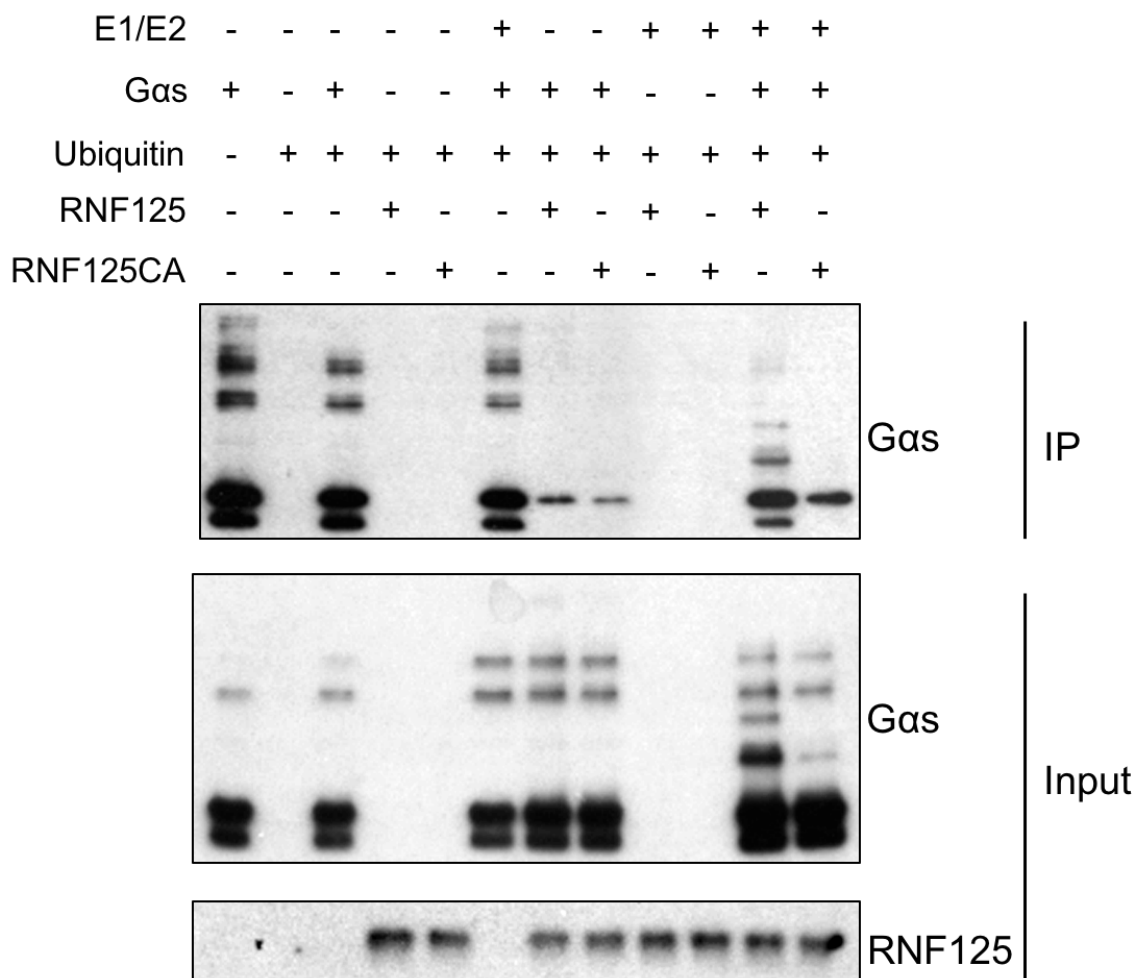


図 22: ユビキチン化された **Gas** タンパク質の検出

精製した RNF125WT あるいは Flag-RNF125CA を Gas、His-Ub、UBE1 (E1) 及び UbcH5a (E2) と共に混合、37°C で 2 時間静置し、ユビキチン化を誘導した。その後、Cell lysis buffer を加え、抗 Ubiquitin 抗体 (P4D1) を用いて 4°C で 3 時間攪拌して免疫沈降を行い、ユビキチン化されたタンパク質を沈降させた。抗 Gas 抗体を用いたウェスタンブロットでユビキチン化された Gas を評価した。

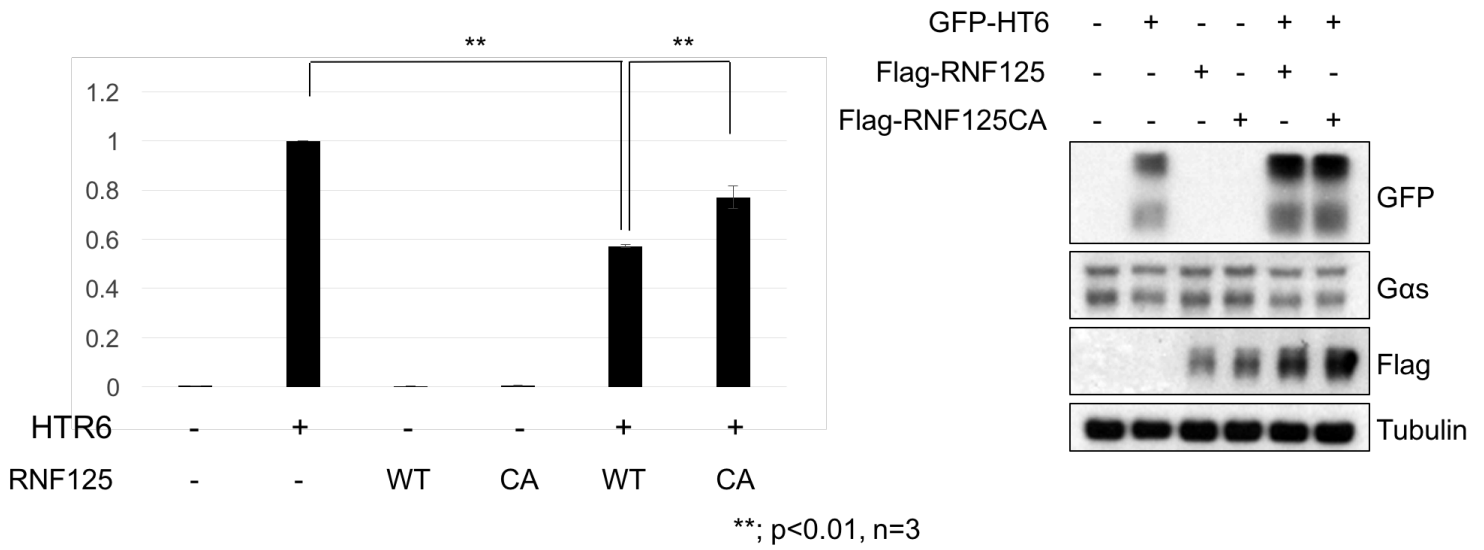


図 23: RNF125 過剰発現の Gs シグナルへの効果

HEK293T 細胞に RNF125WT あるいは RNF125CA 及びセロトニン受容体 HT6 を導入した。導入して 48 時間後に細胞を回収した後、レポーター遺伝子アッセイにより Gs シグナルを検討した。その結果を左図に示す。エラーバーは SEM を示している。右図は細胞におけるそれぞれのタンパク質の発現を示している。

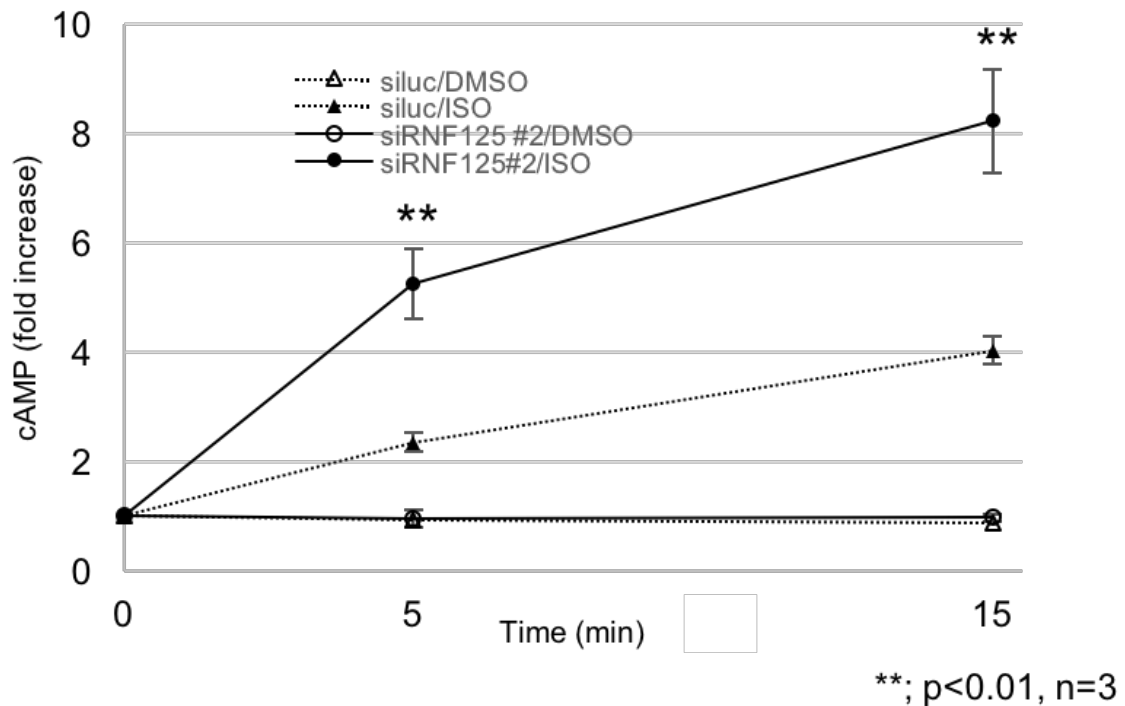


図 24: Isoproterenol で刺激した際の cAMP 応答に対する RNF125 発現抑制の効果

RNF125 を発現抑制した PC-3 細胞を用いて、G α s と共役する β -アドレナリン受容体のアゴニストである Isoproterenol で刺激した際の cAMP 動態を評価した。コントロール細胞 (破線グラフ、黒三角) と比較して RNF125 を発現抑制した PC-3 細胞 (実線グラフ、黒丸) では、Isoproterenol 刺激による cAMP 産生量が有意に増加した。白三角、白丸は Isoproterenol 刺激をしていない細胞の cAMP 量を表す。無刺激の cAMP 量を 1 とした。エラーバーは SEM を示す。

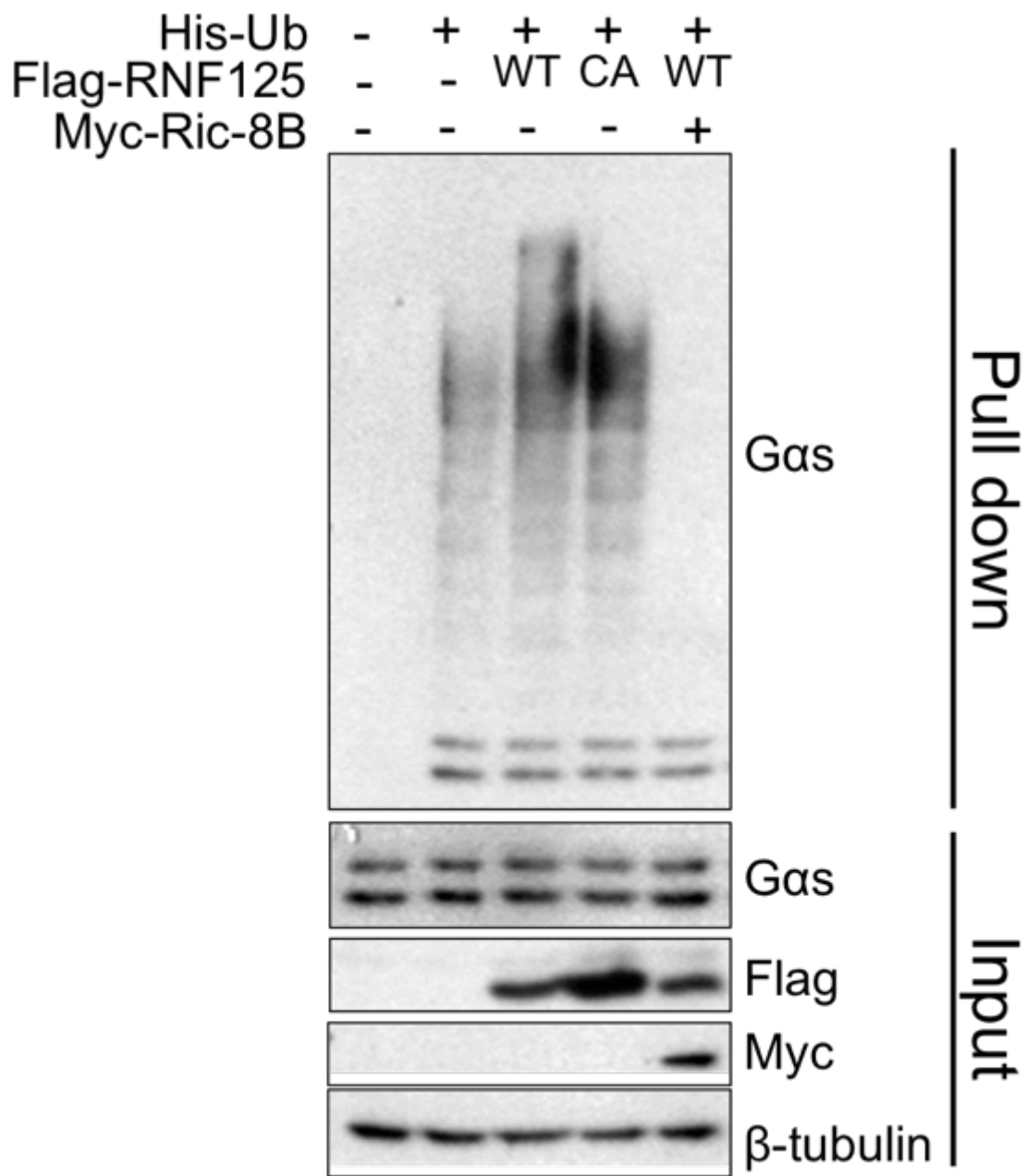


図 25: Ric-8B が RNF125 依存的な Gas ユビキチン化へ与える影響
 内在性 Gas に対する *in vivo* ユビキチン化アッセイの結果を示す。

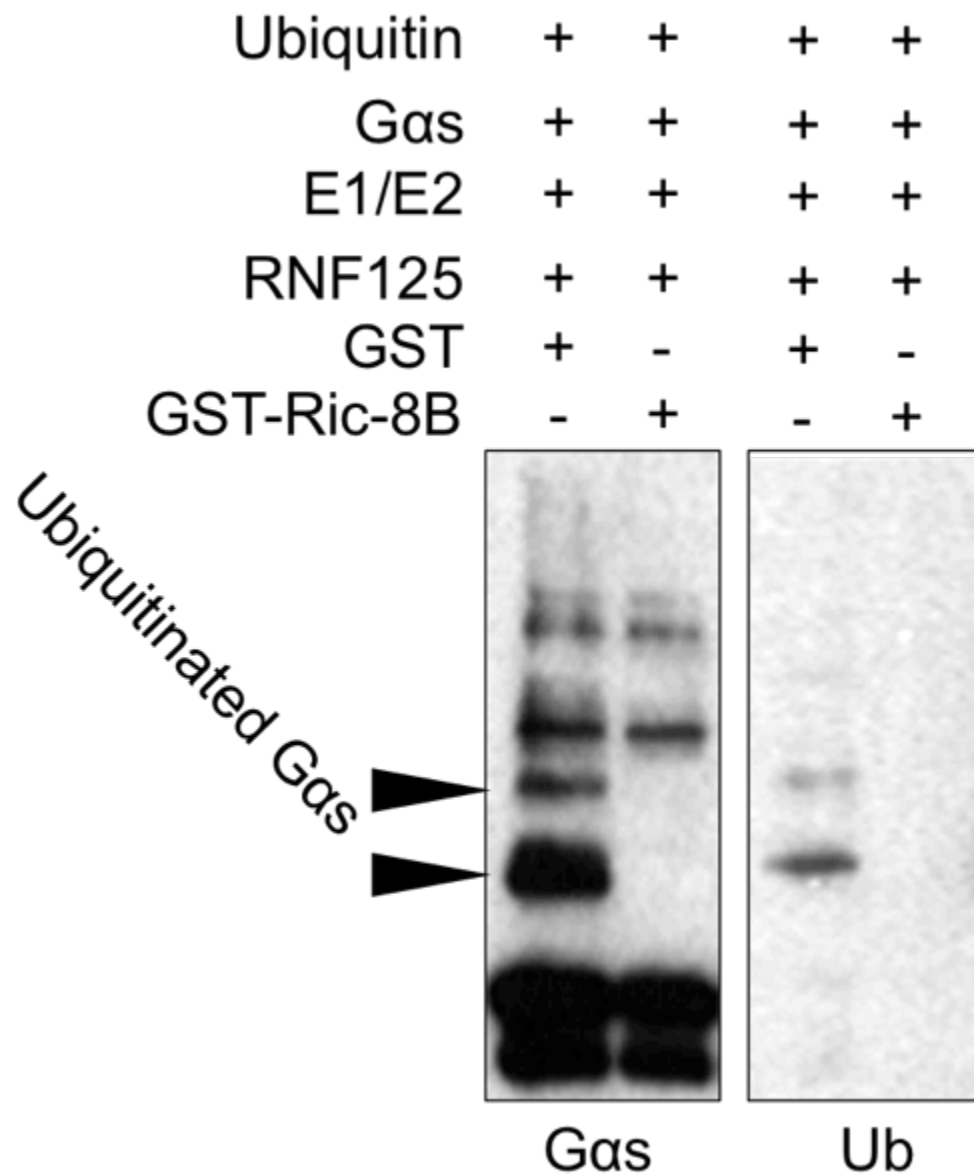


図 26: *Gas*、RNF125、Ric-8B の 3 者の結合様式の検討

RNF125、*Gas*、Ric-8B の 3 者の結合様式を調べるために、3 者を過剰発現した HEK293T 細胞を用いた免疫共沈降を行った。

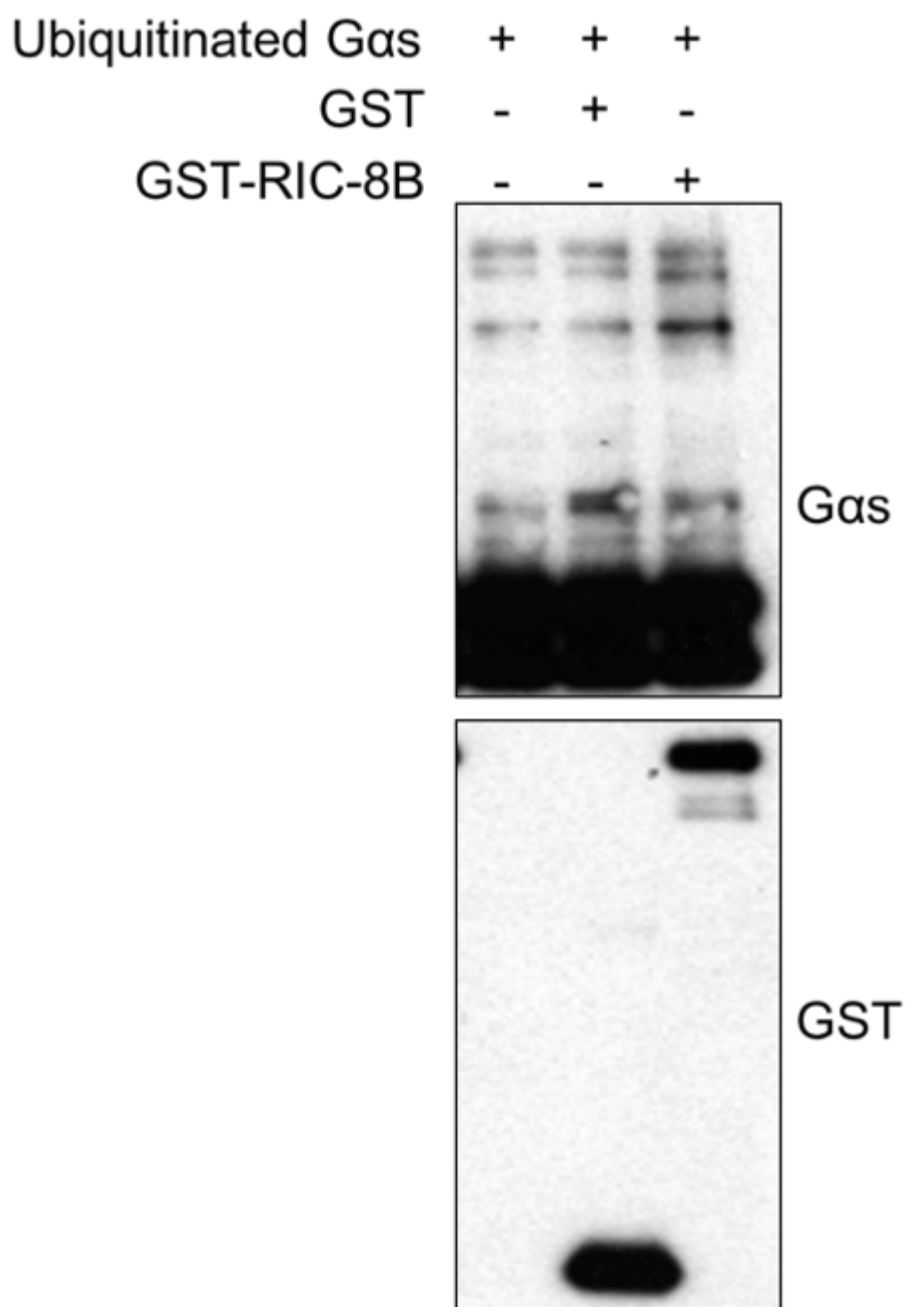


図 27: Ric-8B による *in vitro* 脱ユビキチン化アッセイ

Gas に対する *in vitro* ユビキチン化アッセイを予め行い、Gas のユビキチン化を誘導した。そのサンプルを 3 等分し、それぞれ左側から MiliQ 水、GST、GST-Ric-8B を加えてさらにインキュベートした。

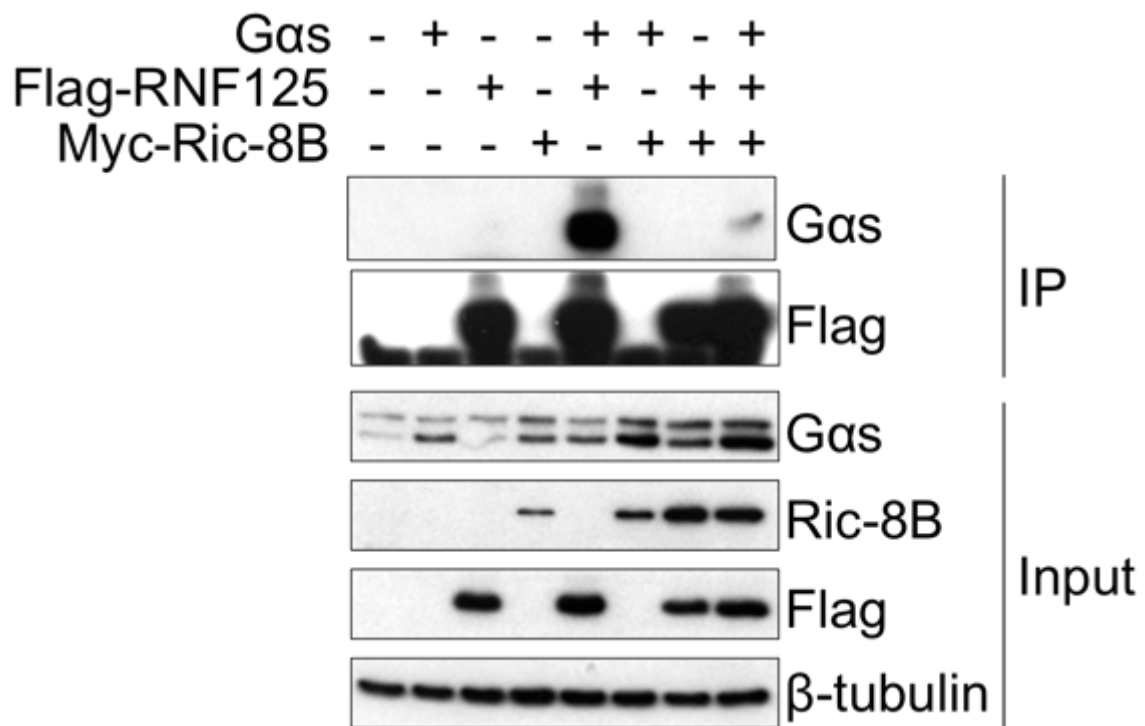


図 28: *Gas*、*RNF125*、*Ric-8B* の 3 者の結合様式

RNF125、*Gas*、*Ric-8B* の 3 者の結合様式を調べるために、3 者を過剰発現した HEK293T 細胞における免疫共沈降を行った。

3.3 Gas ユビキチン化部位の探索

3.3.1 背景

Gas がユビキチン化された場合の細胞応答や生理的意義を調べるため、Gas のユビキチン化部位とユビキチン鎖の種類を同定することを目的とした。

3.3.2 Gas のユビキチン化部位の探索

Gas のユビキチン化部位を決定するため、Gas のリシンをアルギニンに置換した 15 種類の変異体を作製し、*in vivo* ユビキチン化アッセイを行った。Gas には 25 箇所のリシン残基が存在し (図 29A) 、その全てのリシン残基について検討した。その結果、K34R、K74/77/82/86R 変異体の過剰発現は、Gas ユビキチン化を減少させた (図 30、表 2) 。この結果から、K34、K74、K77、K82、K86 の計 5 箇所がユビキチン化部位の候補である可能性が示唆された。

また、これまでに、MS を用いたユビキチン化タンパク質の網羅的解析により、Gas のユビキチン化部位として 12 箇所のリジン残基が報告されている (Wagner, S., *et al.* 2011、図 29B) 。これらの Gas ユビキチン化部位は、N 末端領域 (Gas-N : K53/58/77/82) 、中間領域 (Gas-M : K172/197/202/260) 、あるいは C 末端領域 (Gas-C : K286/291/293/324) にそれぞれ 4 箇所ずつ存在することから、それぞれ 4 箇所のリジンをアルギニンに置換した Gas 変異体を作製し、*in vivo* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、Gas-C においてユビキチン化の減少が観察された。一方、Gas-N は野生型と同程度ユビキチン化され、Gas-M は発現を確認することができなかった (図 31) 。これらの結果から、K34/74/86/286/291/293/324 の 7 つのリシン残基が Gas のユビキチン化部位であることが示唆された。

3.3.3 Gas のユビキチン鎖の同定

Gas のユビキチン化がどのユビキチン鎖を介して形成されているかを調べるために、変異型ユビキチンプラスミドを用いて検討した。HEK293T 細胞に変異型ユビキチンを過剰発現させ、*in vivo* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、K11, K27, K29, K33, K48 を其々導入した細胞ではコントロール (K0) と比較して Gas のユビキチン化が増加した (図 32)。以上の結果から、Gas は複数の種類のユビキチン鎖で修飾されていることが示唆された。

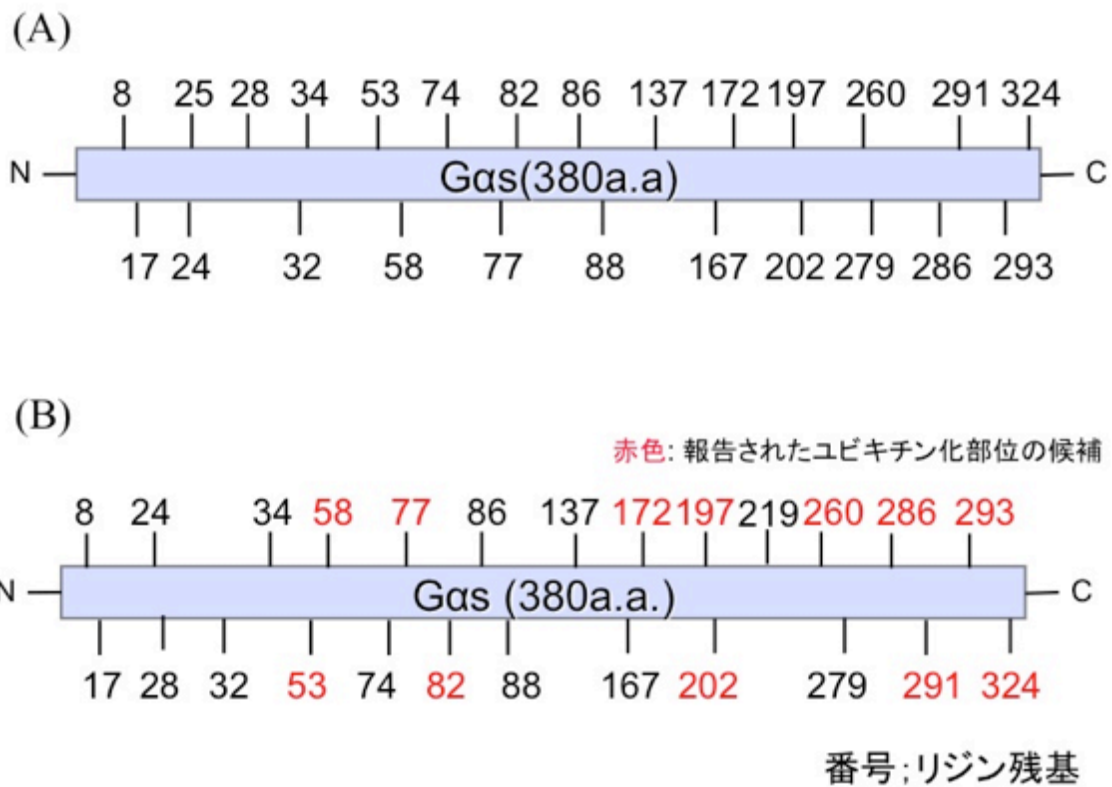


図 29: Gas の 25 箇所のリジン残基と報告されたユビキチン化部位の候補
 (A): Gas に存在するリジン残基を示す。(B): MS 解析によるユビキチン化タンパク質の網羅的解析による Gas のユビキチン化部位の候補を赤色で示す。

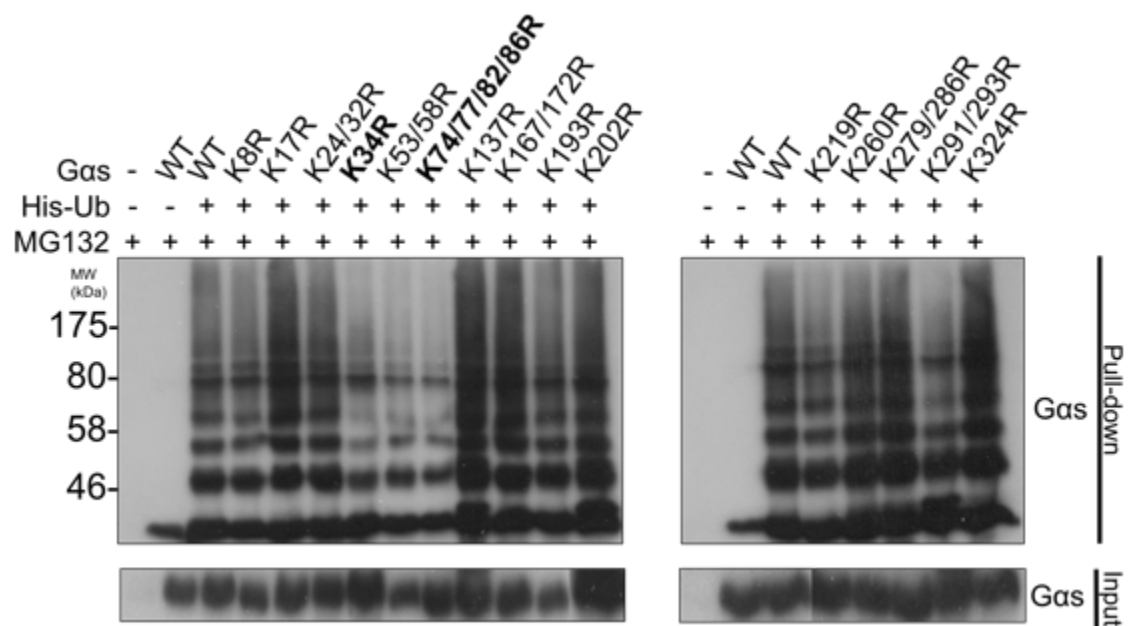


図 30: Gas 変異体を用いたユビキチン化アッセイ

His-Ub および Gas/野生型あるいはリジン残基をアルギニン残基に置換した各種 Gas/変異体を HEK293T 細胞に発現させ、MG132 で 8 時間処理した。Urea を含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体を用いて Pull-down assay を行った。その後、Gas ユビキチン化を各種抗体を用いたウエスタンブロットにより検討した。

表2: Gas変異体を用いたユビキチン化部位の検討

		K53					K291/							
		/58	K77/82	K172 K197 K202			K260	K286	293	K324				
K8R	K17R	K24/ 28/32R	K34 R	K53 /58R	K74/77/82 /86/88R	K137 R	K167 /172R	K197 R	K202 R	K219 R	K260 R	K279 /286R	K291 /293R	K324 R
0/5	0/2	0/5	4/7	0/2	3/4	0/2	0/4	2/5	2/7	0/2	1/5	0/2	1/5	1/5

Gas変異体を用いたユビキチン化アッセイの結果を示す。分母の数字はアッセイを行った回数、分子の数字はユビキチン化が減少した回数を示す。黄色で塗りつぶした箇所は報告されたユビキチン化部位を、また水色で塗りつぶした部位は3回以上の実験でユビキチン化が減少した変異体を示す。

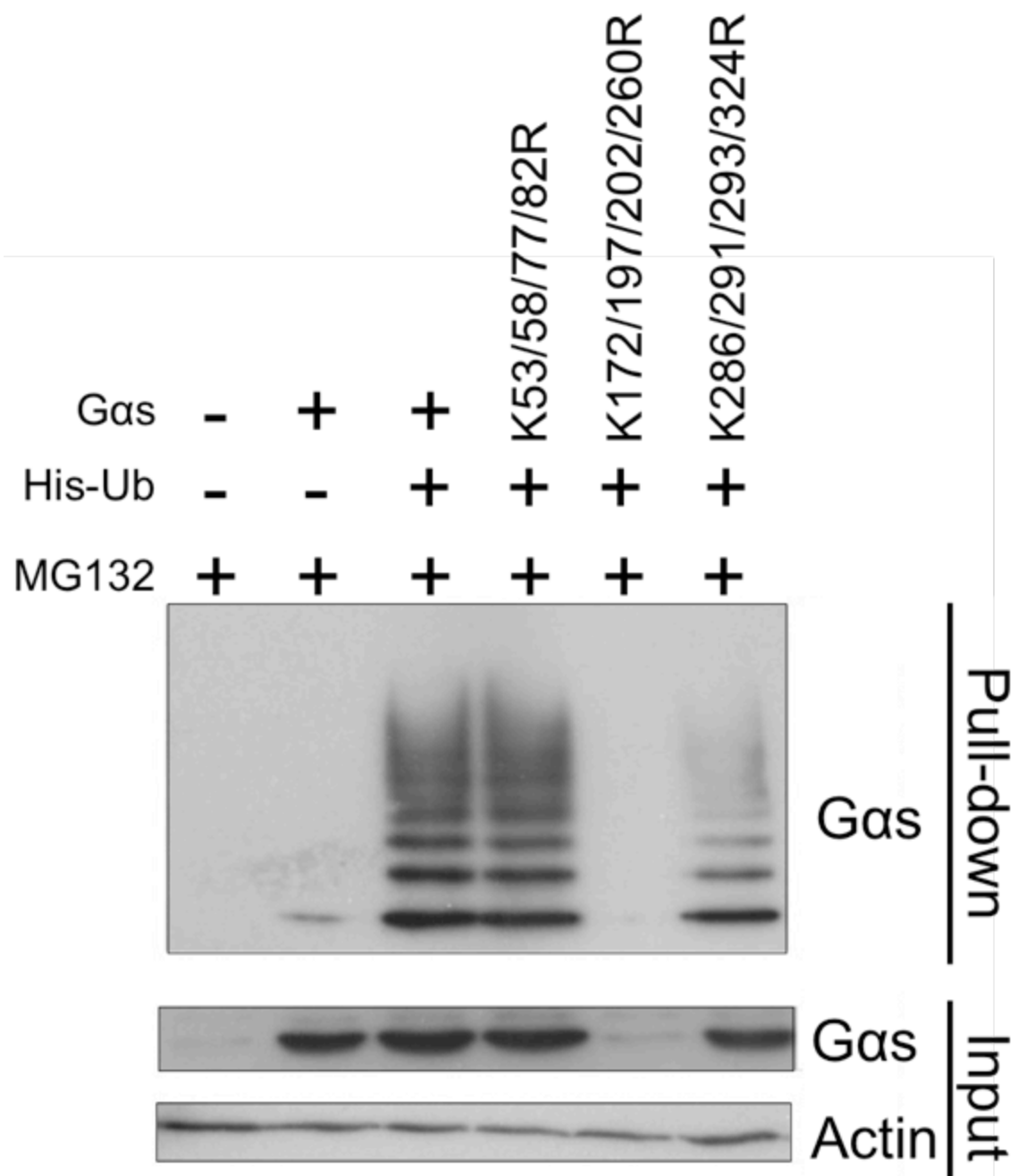


図 31: 報告された *Gas* ユビキチン化部位におけるユビキチン化アッセイ

His-Ub および *Gas* 野生型 あるいはリジン残基をアルギニン残基に置換した各種 *Gas*/変異体を HEK293T 細胞に発現させ、MG132 で 8 時間処理した。Urea を含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体を用いて Pull-down assay を行った。

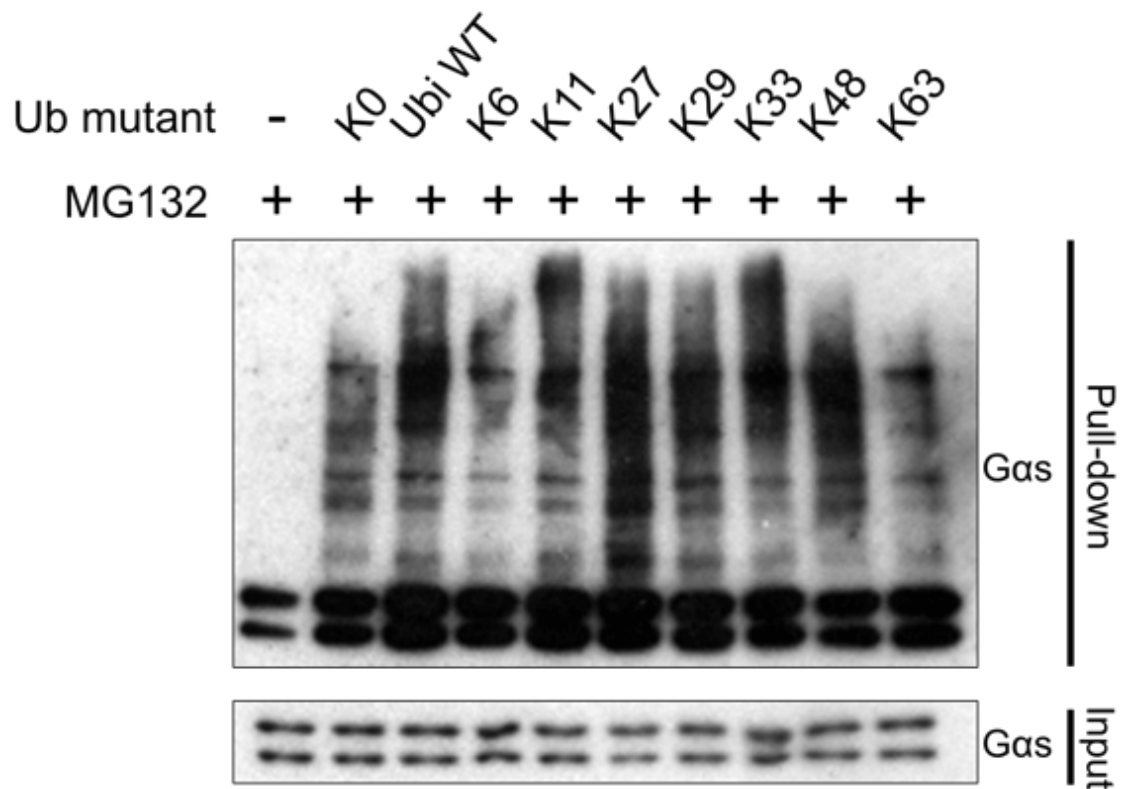


図 32: 変異型ユビキチンによる *Gas* のユビキチン化

ユビキチンのリジン残基をアルギニン残基に置換した His-変異型ユビキチン (2.2 参照) を HEK293T 細胞に発現させ、MG132 で 8 時間処理した。Urea を含むバッファーで細胞を可溶化後、Ni-NTA 担体を用いて Pull-down assay を行った。

第4章 考察

本研究では、Gas のユビキチン化による量的制御機構の解明を目指して、Gas に対するユビキチン化関連酵素群の同定、Ric-8B による Gas ユビキチン化抑制機構の解明などに取り組んだ。3.2 の結果に示したように、Alpha Screen による解析結果を基に Gas と相互作用する E3 リガーゼとして RNF125 を絞り込み、RNF125 が酵素活性に依存して Gas のユビキチン化を促進させ、Gs シグナルに影響を与えることを明らかにした。また Ric-8B は、RNF125 による Gas のユビキチン化を抑制したが、ユビキチン化された Gas を脱ユビキチン化する活性は示さなかった。これらの結果から、RNF125 は Gas の E3 リガーゼであること、Ric-8B はユビキチン化から保護することで Gas の安定性を担保することが明らかとなった。これらのことから本章では主に、3.2 で得られた結果について考察する。

4.1 RNF125 による Gas ユビキチン化制御機構

タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を添加した後の Gas の分解の経時変化を調べた実験では、RNF125 の発現抑制により Gas の分解が顕著に抑制された (図 15)。HEK293T 細胞を用いた共発現実験及び *in vitro* 実験の両方において、RNF125 は Gas と相互作用し Gas に対して E3 リガーゼ活性を示すことが判明した(図 17-22)。また RNF125 の過剰発現は Gs シグナルを減弱させ、RNF125 の発現抑制は Gs シグナルを増強させた (図 23, 24)。これらの結果から、RNF125 が Gas のユビキチン化を促進するより分解を誘導し、Gs シグナルを負に制御する E3 リガーゼであることが示唆された。

一方、RNF125 の発現抑制は Gas 発現量を増加させるが (図 14)、RNF125 の過剰発現は Gas の発現量は減少させなかった (図 12、lane 1, 3)。RNF125 に誘導される Gas のユビキチン化について、HEK293T 細胞を用いたユビキチン化アッセイでは、ポリユビキチン化 Gas が多く検出されているのに対して、*in vitro* ユビキチン化アッセイでは、ポリユビキチン鎖ではなく比較的少数のユビキチ

ンが連結した Gas バンドが検出された (図 21, 22) 。これらの結果の差異から、RNF125 は Gas の分解に必要であるが十分では無く、RNF125 による Gas ユビキチン化だけでは分解されず、他の E3 リガーゼによるユビキチン化が必要である可能性が考えられる。つまり、Gas の分解には i) まず RNF125 により少数のユビキチン化が付加された後、ii) この少数ユビキチン化が分解シグナルとして他の E3 リガーゼを誘導しポリユビキチン化されることで分解へ導く、という複数の異なる E3 リガーゼによる多重な制御機構が働いている可能性が考えられる (図 33) 。このモデルを検証するためには、RNF125 と協調して Gas のユビキチン化を促進させる新たな E3 リガーゼを同定する必要がある。その候補として、本研究で同定された TRAF7, MKRN1, RNF38 が挙げられる。TRAF7 は Gas と相互作用しユビキチン化は抑制したが、Gas の発現量を減少させる傾向を示した (図 3, 5B, 7) 。従って、TRAF7 がユビキチン酵素活性非依存的に Gas の発現量を減少させる可能性も考えられる。今後、これらの E3 リガーゼを用いた *in vitro* ユビキチン化アッセイにより、RNF125 により誘導されたユビキチン化 Gas に対するポリユビキチン化反応を促進させるかを検討する必要がある。

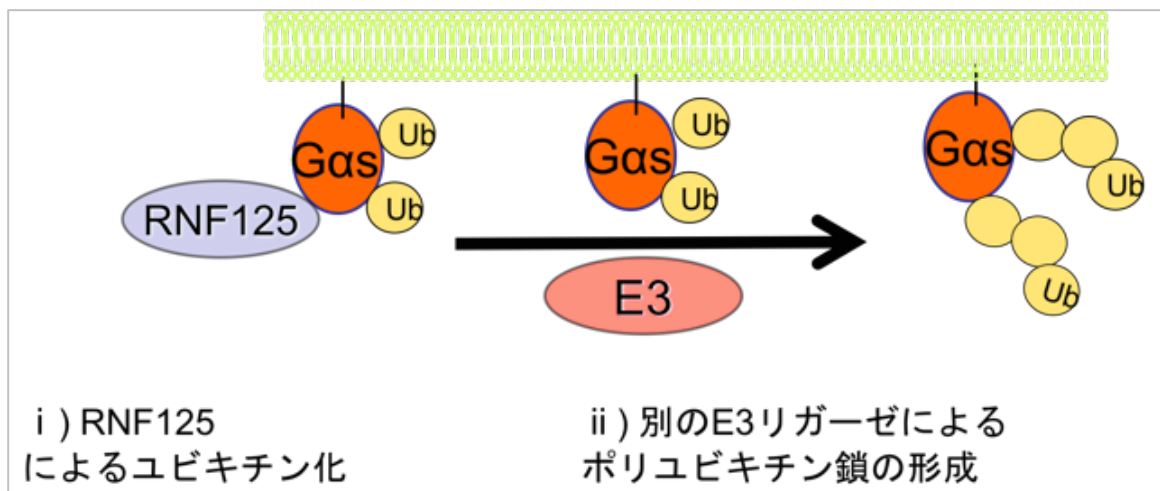


図 33: 複数の異なる E3 リガーゼによる多重に制御された Gas 分解機構モデル

Gas の分解に関与する複数のステップのモデル。i) RNF125 によりモノユビキチン化された後、ii)モノユビキチン化が分解シグナルとして他の E3 リガーゼを誘導しポリユビキチン化されることで分解へ導く、多重に制御された Gas 分解機構の概念図。

4.2 Ric-8B と USP29 による Gas ユビキチン化抑制機構

本研究結果から、HEK293T 細胞において Ric-8B の過剰発現が RNF125 による Gas ユビキチン化を抑制すること、また *in vitro* 系において Ric-8B の添加が RNF125 による Gas のユビキチン化を抑制することが明らかとなった (図 25, 26)。Ric-8B は、RNF125 による Gas のユビキチン化を抑制することで、Gas を安定化するという、Ric-8B による Gas ユビキチン化抑制機構の詳細が見えてきた。また、Ric-8B はユビキチン化された Gas に対して脱ユビキチン化活性を示さなかった (図 27)。さらに RNF125 と Gas の相互作用は Ric-8B 存在下で著しく減少するのに対して、RNF125 と Ric-8B の相互作用は認められなかった (図 28)。これらのことから、Ric-8B による Gas のユビキチン化の抑制は、RNF125 と結合する前に Ric-8B が Gas と結合することで RNF125 と Gas の会合を阻害し、Gas のユビキチン化を抑制していることが考えられる。

一方、ポリユビキチン化された Gas に対して、Ric-8B が脱ユビキチン化酵素をリクルートする可能性は残されている。USP29 は Ric-8B と相互作用する分子として同定され、Gas に対する脱ユビキチン化活性を持つ可能性が示唆された (図 4, 6, 表 1)。これらのことから、Ric-8B は Gas と結合することで RNF125 によるユビキチン化を抑制するが、すでにユビキチン化された Gas においては Ric-8B が USP29 をリクルートすることで Gas ユビキチン化を抑制する可能性が残っている (図 34)。この仮説を検証するためには、*in vitro* 実験系において、Gas、Ric-8B、USP29 が 3 者複合体を形成するかどうか、RNF125 によって誘導したポリユビキチン化 Gas に対し Ric-8B、USP29 を添加した場合に脱ユビキチン化が起こるかどうかを検討する必要がある。

本研究結果から、RNF125 は Gas に対して E3 リガーゼ活性を示し、Gas の分解に寄与することで、リガンド刺激による Gs シグナルを負に制御する分子であることが示された。また Ric-8B は、RNF125 による Gas のユビキチン化を抑制することで、Gas を安定化していることが明らかとなった。本研究結果は、細胞外部からの刺激に応じた GPCR を介した古典的な Gs シグナルの調節機構に加え、細胞内部において RNF125 と Ric-8B によるユビキチン-プロテアソーム経路を介した Gas の量的制御に伴う Gs シグナルの調節機構が存在することを強く示唆するものである。

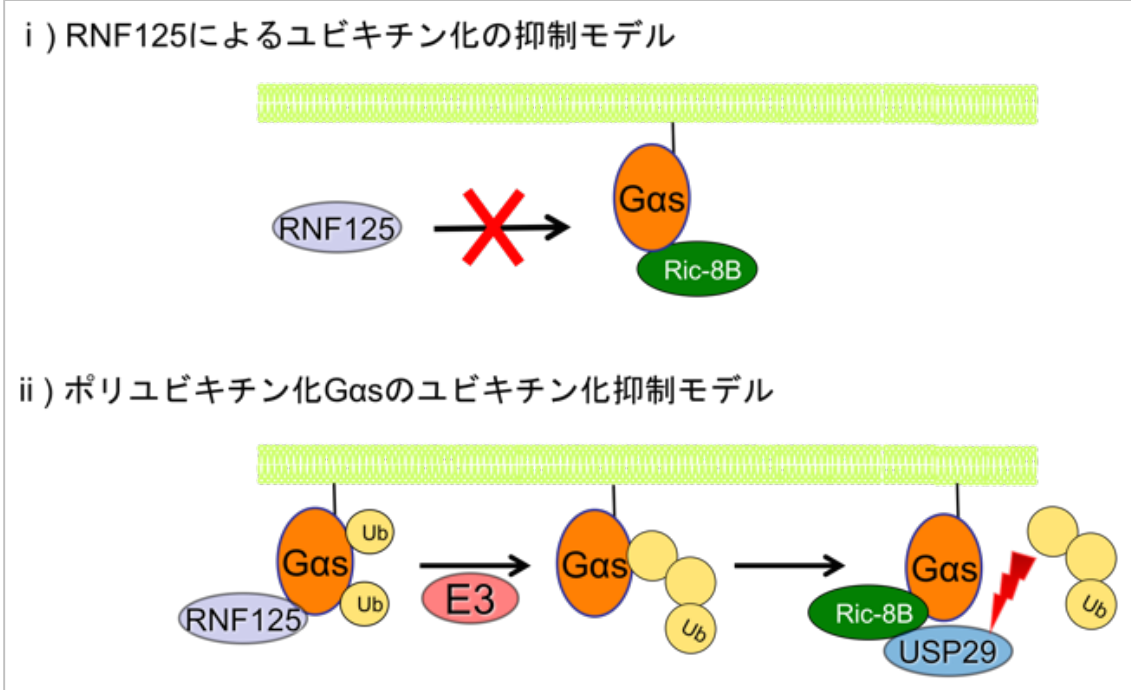


図 34: Ric-8B による Gas のユビキチン化抑制機構モデル

Ric-8B による Gas のユビキチン化抑制機構として、以下に示す 2 つの機構が存在する可能性が考えられる。i) RNF125 による Gas のユビキチン化抑制は、Ric-8B は Gas と結合することで RNF125 によるユビキチン化を抑制する。ii)すでにユビキチン化された Gas においては Ric-8B が USP タンパク質 (例えば USP29) をリクルートすることで脱ユビキチン化を促し、Gas タンパク質の安定化に寄与する。Ric-8B による Gas のユビキチン化抑制機構の概念図。

4.3 Gas 変異体を用いたユビキチン化部位の探索

Gas のユビキチン化部位を決定するため、Gas のリジンをアルギニンに置換した変異体を作製し、*in vivo* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、K34R、K74/77/82/86R 変異体でユビキチン化の僅かな減少が見られた (図 10、表 2)。またプロテオーム解析により、Gas のユビキチン化部位として報告された 12 箇所のリジン残基において、それぞれ 4 箇所のリジンをアルギニンに置換した Gas 変異体を作製し、ユビキチン化アッセイを行った。その結果、Gas-C においてユビキチン化の減少が観察された (図 11)。これらの結果から、Gas の C 末端側のリジン残基である K286/291/293/324 にユビキチン化部位が存在することが示唆された。加えて、先に示したユビキチン化部位候補である K74/77/82/86R はユビキチン化の減少が認められた一方で、Gas-N(K53/58/77/82R)変異体ではユビキチン化の減少が認められなかった (図 31)。これらの結果から、Gas のユビキチン化を減少させなかった K53/58/77/82R 変異体(Gas-N)には存在せず、Gas のユビキチン化が減少した K74/77/82/86R 変異体に存在する K74/86 も有力なユビキチン化部位であることが考えられる。本研究での各種変異体のユビキチン化解析結果から、Gas のユビキチン化には K34/74/86/286/291/293/324 の 7 つのリジン残基が重要であることが示唆された。

最近 β 2-アドレナリン受容体と G タンパク質複合体の X 線結晶構造解析から、GDP 解離状態の G タンパク質の構造が明らかとなった (Rasmussen, S., *et al.* 2011, 3sn6 の結晶構造を基に改変)。この Gas タンパク質の結晶構造を用いて、本研究結果から見出された Gas ユビキチン化部位について考察する。Gas タンパク質の構造を緑色で示し、本研究で示唆された 7 種のリジン残基を赤色で示した (図 35-37)。この結晶構造を基にした解析から、K34、K74、K286、K291、K293 の 5 つのリジン残基は Gas タンパク質の表面上に露出していることが明らかとなった (図 35)。一方、K86、及び K324 は Gas の内部に局在していることがわかった (図 36)。以上、K86、及び K324 は Gas の構造内部に位置していることから通常の構造である Gas のユビキチン化部位として考えにくく、K34、K74、K286、K291、K293 の 5 つのリジン残基が Gas のユビキチン化候補部位であると考えられた。しかし、今回用いた変異体である K74/77/82/86R あるいは K286/291/293/324 は、4 つのリジン残基をアルギニン残基に変異させており、これらの変異による構造変化などが原因となりユビキチン化を受けないことも考えられる。今後、2 つの変異体のリジン残基の任意の 1 つのリジン残基に対して詳細に解析する必要が

ある。またこれらの部位のアルギニンをリジンに変異した変異体が、RNF125 によるユビキチン化を受けるかどうか、確認することも今後の検討課題と思われる。

Ric-8B による Gas ユビキチン化抑制機構、特に RNF125 に誘導される Gas のユビキチン化抑制は、Ric-8B が Gas と結合することで Gas のユビキチン化を抑制していることが示唆された。Ric-8B が結合することで Gas ユビキチン化部位を覆い隠す可能性が考えられる。Ga はエフェクター分子との結合に必要な Switch region を持っており、Ric-8B は Gas の Switch region II と結合することでユビキチン化を抑制することが示唆されている (Nishimura, Y., *et al.* 2010)。このことから、Ric-8B が結合する Gas の Switch region II 近傍でのユビキチン化部位を調べた。その結果、Ric-8B の結合領域である Gas Switch region II の近傍には Gas ユビキチン化部位であるリジン残基が認められなかった (図 37)。以上の結果から、Ric-8B による Gas ユビキチン化抑制機構として、Ric-8B の結合により Gas のユビキチン化部位を覆うことでユビキチン化できない可能性を支持せず、Ric-8B が Gas と結合することで RNF125 による Gas のユビキチン化を阻害するという、本研究結果で得られた仮説を支持している。

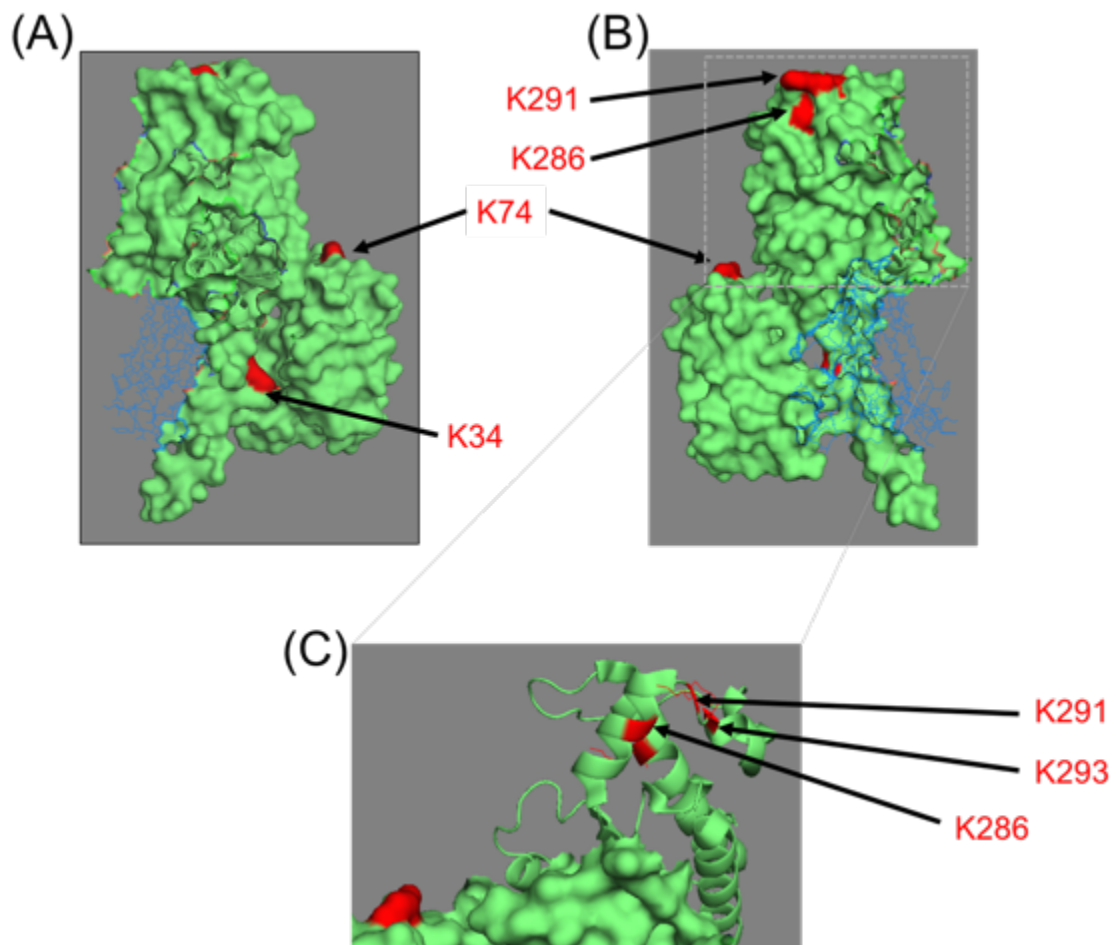


図 35: Gas の結晶構造を用いた Gas ユビキチン化部位予測

(A): Gas 結晶構造 (緑) の空間充填図を示しており、本研究から明らかとなった Gas ユビキチン化に影響を与えるリジン残基 7 箇所のうち、結晶構造から予測される Gas ユビキチン化部位を赤色で示す。なお、この図を正面とする。K34 及び K74 が露出していることが分かる。(B): (A)を右側に 180°回転させた図。(C): (B)の破線部を拡大写真。尚、S250 から L394 までの領域をリボンモデルで示した。K286、291、及び 293 が Gas タンパク質の表面に露出していることが分かる。

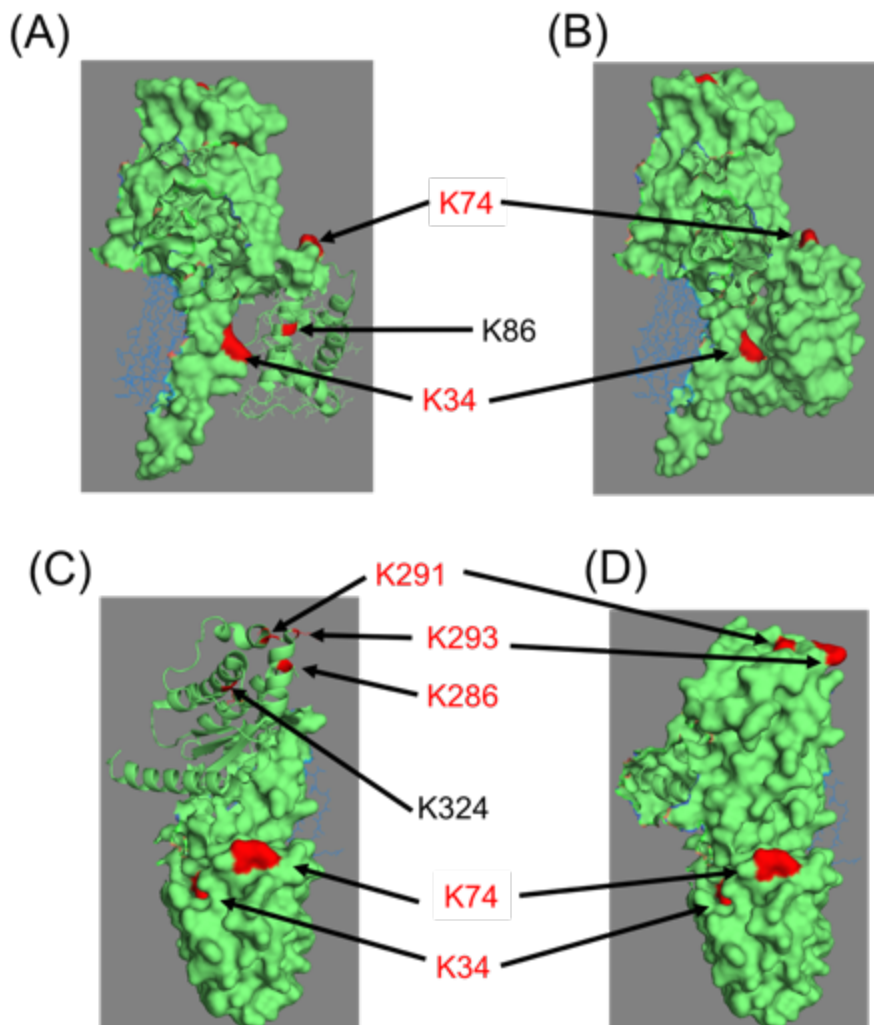


図 36: Gas ユビキチン化部位である K86 及び K324 は Gas 構造の内部に位置する

(A): Gas 結晶を正面から示しており、T90 から C200 までの領域をリボンモデルで示した。尚、Gβ1 を青色の線状構造で示し、Gas との結合領域部である L55 から F180 を掲載した。(B): T90 から C200 までの領域を空間充填モデルとして示す。(A)と比較して、K86 は構造内部に存在することが分かる。(C): 正面図を左に 45°回転させた図を示す。S250 から L394 までの領域をリボンモデルで示した。(D): S250 から L394 までの領域を空間充填モデルとして示す。(C)と比較して、K324 は構造内部に存在することが分かる。

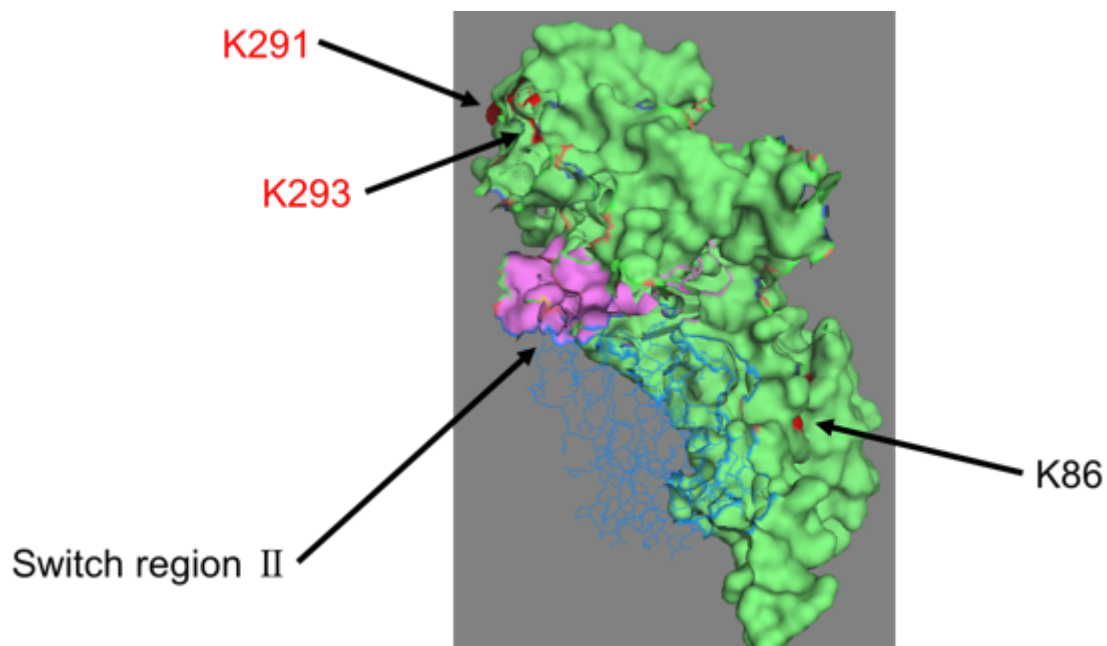


図 37: Ric-8B との結合部位である Gas の Switch region II

Ric-8B との結合に重要な Gas の Switch region II を紫色で示す。尚、Gβ1 を青色の線状構造で示し、Gas との結合領域部である L55 から F180 を掲載した。Ric-8B の結合領域である Gas Switch region II の近傍には Gas ユビキチン化部位であるリジン残基が認められなかった。

4.4 Gタンパク質シグナルを制御する RNF125 による Gas 分解の生理的機能

本研究結果から、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を添加した後の Gas の分解の経時変化を調べた実験において、RNF125 の発現抑制により Gas の分解が顕著に抑制された (図 15)。このことから、RNF125 は Gas の発現量を負に調節する分子であることが示唆された。また、RNF125 の他に Gas のユビキチン化による分解に関与する分子として Gαq と Ric-8B がある。Gαq は心肥大発症において重要な役割を果たすことが知られている。細胞内での Gαq の過剰発現は、ユビキチン化により Gas の発現量を減少させ、Gs シグナルを負に調節することが知られている (Tang, T., *et al.* 2008; Jenie, R. I., *et al.* 2013)。これらのことから、Gαq を介したシグナルが Gas の分解に関わることが示唆される。また、Ric-8B は、Gas と結合することでユビキチン化を減弱させることが報告されており、Ric-8B は Gq シグナルによる Gas のユビキチン化を阻害することが示されている (Jenie, R. I., *et al.* 2013)。これらのことから、Gq シグナルによって Gas は分解されるが、Ric-8B は Gas のユビキチン化による分解を開始させないことが示唆された。本研究において Gas のユビキチン化を制御する E3 リガーゼとして RNF125 を同定したこと、Ric-8B は RNF125 と Gas の結合を阻害することで RNF125 による Gas のユビキチン化を開始させなかったことを踏まえて、Gq シグナルにより RNF125 の発現量上昇あるいは活性化反応が起こることで Gas のユビキチン化反応が亢進するといった、RNF125 による Gas の量的制御を介した Gs シグナル調節機構の存在が考えられる。現在までによく知られている GPCR を介した古典的活性制御だけでなく、ユビキチン化による新規 Gタンパク質シグナルによる制御機構の一端を RNF125 が担っている可能性がある。

Gq シグナルの持続的な過剰刺激により起こる心肥大時に Gas の発現量が低下するとともに Gas を介する cAMP 応答が減弱し心機能が低下することが知られている (Nakamura, K., *et al.* 1996; Akhter, S., *et al.* 1997; Jenie, R. I., *et al.* 2013)。本研究で同定した RNF125 は Gas の分解を担う E3 リガーゼであり、心肥大における心機能の低下に関与する E3 リガーゼである可能性も考えられる。心肥大の発症には過剰な Gq シグナルを必要とすることは、良く知られている。一方、心肥大発症に伴う心機能低下が Gas の分解を介していることを報告した例は殆ど無い。今後、心筋細胞や心肥大モデル心筋細胞を用いて RNF125 の発現抑制や過

剰発現を行い Gas 発現量や心筋細胞の拍動数を測定することで、心機能における Gas 分解の重要性と生理的意義が明らかになることが期待される。

第 5 章 参考文献

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent $G\alpha$ function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell*. **119**, 219-230.

Akhter, S., Milano, C., Shotwell, K., Cho, M., Rockman, H., Lefkowitz, R. and Koch, W. (1997). Transgenic mice with cardiac overexpression of 1β -adrenergic receptors: IN VIVO 1 -ADRENERGIC RECEPTOR-MEDIATED REGULATION OF ADRENERGIC SIGNALING. *J. Biol. Chem.* **272**, 21253-21259.

Amerik, A. and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Mol. Cell. Res.* **1695**, 189-207.

Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T. and Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 7500-7505.

Berndsen, C. E. and Wolberger, C. (2014) New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 301–307.

Bijlmakers, M., Teixeira, J., Boer, R., Mayzel, M., Puig-Sàrries, P., Karlsson, G., Coll, M., Pons, M. and Crosas, B. (2016) A C2HC zinc finger is essential for the RING-E2 interaction of the ubiquitin ligase RNF125. *Sci. Rep.* **6**, 29232.

Boullaran, C., Kamenyeva, O., Cho, H. and Kehrl, J. (2014). Resistance to Inhibitors of Cholinesterase (Ricc)-8A and Gai Contribute to Cytokinesis Abcission by Controlling Vacuolar Protein-Sorting (Vps)34 Activity. *PLoS ONE*. **9**, e86680.

Budhidarmo, R., Nakatani, Y. and Day, C. L. (2012) RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 58–65.

Chen, C.A., and Manning, D.R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* **20**, 1643-1652.

Chen, H. and De Camilli, P. (2005). The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 2766-2771.

Chan, P., Gabay, M., Wright, F. and Tall, G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G proteins guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 19932-19942.

Chan, P., Thomas, C., Sprang, S. and Tall, G. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein α subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **110**, 3794-3799.

Chishiki, K., Kamakura, S., Yuzawa, S., Hayase, J. and Sumimoto, H. (2013). Ubiquitination of the heterotrimeric G protein α subunits Gai2 and G α q is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **435**, 414-419.

Cho, H. and Kehrl, J. (2008). Beyond the plasma membrane: New functions for heterotrimeric G-protein signaling in asymmetric and symmetric cell division. *Cell Cycle.* **7**, 573-577.

D'Angelo, D., Sakata, Y., Lorenz, J., Boivin, G., Walsh, R., Liggett, S. and Dorn, G. (1997). Transgenic Gq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 8121-8126.

David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., and Bellaiche, Y. (2005). Drosophila Ric-8 regulates Gai cortical localization to promote Gai-

dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1083-1090.

Deshaies, R. J. and Joazeiro, C. A. P. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399–434.

Dou, H., Buetow, L., Sibbet, G. J., Cameron, K. and Huang, D. T. (2012) BIRC7-E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 876–883.

Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D. and Tall, GG. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Sci Signal.* **4**, ra79

Germain-Lee, E. L., Ding, C. L., Deng, Z., Crane, J. L., Saji, M., Ringel, M. D. and Levine, M. A. (2002) Paternal imprinting of Galpha(s) in the human thyroid as the basis of TSH resistance in pseudohypoparathyroidism type 1a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 67-72.

Gilman, A. G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649.

Graziano, M. P., Freissmuth, M., Gilman, A. G. (1989) Expression of Gs alpha in Escherichia coli. Purification and properties of two forms of the protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 409–418.

Hayakawa, Y. (2003). Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Gq-transgenic mice. *Circulation.* **108**, 3036-3041.

Hicke, L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell.* **106**, 527-530.

Huang, C., Duncan, J.A., Gilman, A.G., and Mumby, S.M. (1999). Persistent membrane association of activated and depalmitoylated G protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 412-417.

Hulsurkar, M., Li, Z., Zhang, Y., Li, X., Zheng, D. and Li, W. (2017) Beta-adrenergic signaling promotes tumor angiogenesis and prostate cancer progression through HDAC2-mediated suppression of thrombospondin-1. *Oncogene*. **10**, 1-12.

Iiri, T., Backlund, P.S, Jr, Jones, T.L., Wedegaertner, P.B., and Bourne, H.R. (1996). Reciprocal regulation of G_s α by palmitate and the α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 14592-14597.

Ikeda, F. and Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. ‘Protein modifications: beyond the usual suspects’ Review series. *EMBO rep.* **9**, 536-542.

Itoh, H., Gilman, A. G. (1991) Expression and analysis of Gs alpha mutants with decreased ability to activate adenylylcyclase. *J. Biol. Chem.* **266**, 16226–16231.

Jenie, R. I., Nishimura, M., Fujino, M., Nakaya, M., Mizuno, N., Tago, K., Kurose, H. and Itoh, H. (2013). Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal. *Genes Cells*. **18**, 1095-1106.

Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. and Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 349-400.

Kim, H., Frederick, D., Levesque, M., Cooper, Z., Feng, Y., Krepler, C., Brill, L., Samuels, Y., Hayward, N., Perlina, A., Piris, A., Zhang, T., Halaban, R., Herlyn, M., Brown, K., Wargo, J., Dummer, R., Flaherty, K. and Ronai, Z. (2015). Downregulation of the Ubiquitin Ligase RNF125 Underlies Resistance of Melanoma Cells to BRAF Inhibitors via JAK1 Deregulation. *Cell Rep.* **11**, 1458-1473.

Kohen, R., Metcalf, M., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J., Meltzer, H., Sibley, D., Roth, B. and Hamblin, M. (1996). Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Human 5-HT₆ Serotonin Receptor. *J. Neurochem.* **66**, 47-56.

Komander, D., Clague, M. and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 550-563.

Kuo, M.L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev.* **18**, 1862-1874.

Kuo, P., Lin, Y., Teng, Y., Hsu, C., Lin, J. and Lin, Y. (2004). Transcriptional levels of four Y chromosome-linked AZF genes in azoospermic men and their association with successful sperm retrieval. *Urology.* **63**, 131-136.

Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R. and André, B. (2010). The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends. Cell. Biol.* **20**, 196-204.

Lee, E., Lee, M., Camus, S., Ghim, J., Yang, M., Oh, W., Ha, N., Lane, D. and Song, J. (2009). Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO J.* **28**, 2100-2113.

Li, X., Murray, F., Koide, N., Goldstone, J., Dann, S., Chen, J., Bertin, S., Fu, G., Weinstein, L., Chen, M., Corr, M., Eckmann, L., Insel, P. and Raz, E. (2012). Divergent requirement for Gas and cAMP in the differentiation and inflammatory profile of distinct mouse Th subsets. *J. Clin. Invest.* **122**, 963-973.

Liu J, Chung HJ, Vogt M, Jin Y, Malide D, He L, Dundr M, Levens D.(2011). JTV1 co-activates FBP to induce USP29 transcription and stabilize p53 in response to oxidative stress. *EMBO J.* **30**, 846-858.

Madura, K. and Varshavsky, A. (1994). Degradation of G α by the N-end rule pathway. *Science* **265**, 1454-1458.

Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E. and Weissman, A. M. (2014) RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 47–60.

Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D. and Rand, J.B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 12593-12598.

Miller, K.G., and Rand, J.B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (Go α) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* **156**, 1649-1660.

Morita, Y., Kanei-Ishii, C., Nomura, T. and Ishii, S. (2005). TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 5433-5444.

Mosbech A, Lukas C, Bekker-Jensen S, Mailand N. (2013) The deubiquitylating enzyme USP44 counteracts the DNA double-strand break response mediated by the RNF8 and RNF168 ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* **23**, 16579-16587.

Mukhopadhyay, D. and Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* **315**, 201-205.

Nakamura, K., Ohyanagi, M., Shibuya, J., Yamamoto, J. and Iwasaki, T. (1996). The role of guanine nucleotide binding proteins in hamsters with myocardial hypertrophy. *J. Recept. Signal. Transduct.* **16**, 225-242.

Nagai, Y., Nishimura, A., Tago, K., Mizuno, N. and Itoh, H. (2010). Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. *J Biol Chem.* **285**, 11114-11120.

Naviglio, S., Pagano, M., Romano, M., Sorrentino, A., Fusco, A., Illiano, F., Chiosi, E., Spina, A. and Illiano, G. (2004). Adenylate cyclase regulation via proteasome-mediated modulation of Gas levels. *Cell. Signal.* **16**, 1229-1237.

Nijman, S., Luna-Vargas, M., Velds, A., Brummelkamp, T., Dirac, A., Sixma, T. and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell.* **123**, 773-786.

Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J. and Itoh, H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes. Cells.* **11**, 487-498.

Omwancha, J., Zhou, X., Chen, S., Baslan, T., Fisher, C., Zheng, Z., Cai, C. and Shemshedini, L. (2006). Makorin RING Finger Protein 1 (MKRN1) Has Negative and Positive Effects on RNA Polymerase II-Dependent Transcription. *Endocrine.* **29**, 363-374.

Pickart, C. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends. Biochem. Sci.* **25**, 544-548.

Pickart, C. and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 610-616.

Pickart, C. M. and Eddins, M. J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1695**, 55–72.

Plechanovová, A., Jaffray, E. G., Tatham, M. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T. (2012) Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* **489**, 115–120.

Pruneda, J. N. et al. (2012) Structure of an E3:E2~Ub complex reveals an allosteric mechanism shared among RING/U-box ligases. *Mol. Cell.* **47**, 933–942.

Rasmussen, S., DeVree, B., Zou, Y., Kruse, A., Chung, K., Kobilka, T., Thian, F., Chae, P., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J., Shah, S., Lyons, J., Caffrey, M., Gellman, S., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W., Sunahara, R. and Kobilka, B. (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature*. **477**, 549-555.

Regard, J.B., Malhotra, D., Gvozdenovic-Jeremic, J., Josey, M., Chen, M., Weinstein, L.S., Lu, J., Shore, E. M., Kaplan, F. S. and Yang, Y. (2013) Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nat. Med.* **11**, 1505-1512.

Sheren, J. and Kassenbrock, C. (2013). RNF38 encodes a nuclear ubiquitin protein ligase that modifies p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 473-478.

Spence, J., Sadis, S., Haas, A. and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1265-1273.

Stegmeier, F., Rape, M., Draviam, V.M., Nalepa, G., Sowa, M.E., Ang, X.L., McDonald, E.R. 3rd., Li, M.Z., Hannon, G.J., Sorger, P.K., Kirschner, M.W., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2007) Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature*. **446**, 876-881.

Stewart, M. D., Ritterhoff, T., Klevit, R. E. and Brzovic, P. S. (2016) E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Res.* **26**, 423–440.

Tall, G.G., Krumins, A.M., and Gilman, A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 8356-8362.

Tago, K., Funakoshi-Tago, M., Sakinawa, M., Mizuno, N. and Itoh, H. (2010). B-Ras Is a Nuclear-Cytoplasmic Small GTPase That Inhibits NF- κ B Activation through the Suppression of Transcriptional Activation of p65/RelA. *J. Biol. Chem.* **285**, 30622-30633.

- Tang, T., Gao, M., Miyanohara, A. and Hammond, H. (2008). Gαq reduces cAMP production by decreasing Gαs protein abundance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 679-684.
- Tsikitis M, Acosta-Alvear D, Blais A, Campos EI, Lane WS, Sánchez I, Dynlacht BD. (2010) Traf7, a MyoD1 transcriptional target, regulates nuclear factor-κB activity during myogenesis. *EMBO Rep.* **11**, 969-976.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1068.
- Wagner, S., Beli, P., Weinert, B., Nielsen, M., Cox, J., Mann, M. and Choudhary, C. (2011). A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol. Cell. Proteomics.* **10**, M111.013284-M111.013284.
- Wang, H., Ng, K.H., Qian, H., Siderovski, D.P., Chia, W., and Yu, F. (2005). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1091-1098.
- Wang, Y., Marotti, L.A. Jr, Lee, M.J., and Dohlman, H.G. (2005). Differential regulation of G protein α subunit trafficking by mono- and polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* **280**, 284-291.
- Wedegaertner, P.B., Chu, D.H., Wilson, P.T., Levis, M.J., and Bourne, H.R. (1993). Palmitoylation is required for signaling functions and membrane attachment of Gq and Gs. *J. Biol. Chem.* **268**, 25001-25008.
- Weissman A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169-178.

Yao, C., Hirata, T., Soontrapa, K., Ma, X., Takemori, H. and Narumiya, S. (2013). Prostaglandin E2 promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. *Nature Communications*. **4**, 1685.

Yu, S., Yu, D., Lee, E., Eckhaus, M., Lee, R., Corria, Z., Accili, D., Westphal, H. and Weinstein, L. (1998). Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein subunit (Gs) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the Gs gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 8715-8720.

Zhao, H., Li, C., Pardo, J., Chu, P., Liao, C., Huang, J., Dong, J., Zhou, X., Huang, Q., Huang, B., Bennett, M., Molineaux, S., Lu, H., Daniel-Issakani, S., Payan, D. and Masuda, E. (2005). A Novel E3 Ubiquitin Ligase TRAC-1 Positively Regulates T Cell Activation. *J. Immunol*. **174**, 5288-5297.

Zotti, T., Vito, P. and Stilo R. (2012) The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J Cell Physiol*. **227**, 1280-1284.

西村 基喜 (2010) 本学修士論文

謝辞

本研究成果は、私が奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 分子情報薬理学研究室に配属され、博士課程中の研究成果について纏めたものである。

同研究室の教授である伊東広先生には指導教官として本研究の機会を与えていただきました。研究の遂行にあたり5年間、実験手法、研究の進め方、論文の書き方に至るまできめ細やかなご指導、ご助言を賜りました。また、国内外問わず学会発表の機会を数多く与えて頂きました。ここに厚く感謝の意を申し上げます。また小林哲夫先生には、実験手法、研究の方向性や着眼点、学術的な文章の書き方、論文の書き方に至るまで多くのご指導、ご鞭撻賜りましたこと、万謝申し上げます。日頃の研究全般において様々な視点からご助言、ご指導頂きました水野憲一先生(青森大学 薬学部)、梶紀子先生には心より感謝致します。先輩である高見健太氏、野島悠佑氏には研究室生活における諸般の作法等についてご指導頂きました。厚く御礼申し上げます。博士課程の後輩にあたる Nur Ayunie Zulkepli 氏、伊達山泉氏、堀部修平氏、Endah Puji Septisetyani 氏、Sarmoko 氏には、貴重な助言とご指導を賜り、熱心に研究に打ち込む姿に励まされました。皆さんのおかげで、楽しい研究生生活となり、真摯に研究に打ち込む事ができましたこと、深謝致します。杉原嘉洋氏、鈴木智之氏、遠野高大氏、仲山康治氏、馬島友氏、渡辺岳氏、池田達哉氏、大島拓也氏、小林勇貴氏、斉藤智香氏、庄田彩乃氏、Chiam Nyet Cheng 氏は、修士課程の後輩として活発に研究される姿に励まされ、楽しく研究活動を送ることが出来ました。秘書の瀬川裕美子氏、谷本早苗氏、平野育子氏には事務手続きなどにおいて大変お世話になりました。すべての面で恵まれた環境にて研究生生活を送れたことを、お世話になったすべての方々に拝謝致します。最後に、私のこれまでの研究活動を経済的に支え、そして精神的にも支えてくれた両親と家族の皆様に深く感謝の意を申し上げます。