

奨励金No.1600

タンパク質の細胞内再利用の絶対定量による新規細胞診断技術の開発

森本 大智
京都大学 助教

Development of a novel diagnostic technique for cells based on absolute quantification of intracellular protein recycling

Daichi Morimoto
Kyoto University, Assistant Professor



細胞内タンパク質の多くは使い捨てだが、ユビキチンは例外的に何度も再利用される。再利用の過不足は疾患に直結するため、再利用頻度は適切に制御される必要がある。しかし、既存の手法では再利用を追跡することが困難であるため、詳細はよくわかっていない。本研究では、独自に開発した酸素の安定同位体による再利用の直接観測法を応用し、ヒト細胞内のユビキチンの再利用頻度を非侵襲的に定量する手法を開発した。

While most intracellular proteins are disposable, ubiquitin is exceptionally reused multiple times. Since both excessive and insufficient reuse are directly linked to disease, the frequency of reuse must be tightly regulated. However, the details remain poorly understood because existing methods cannot effectively track reused ubiquitin. In this study, we applied our originally developed method for directly monitoring reuse using stable oxygen isotopes and developed a non-invasive technique to quantify the frequency of ubiquitin reuse in human cells.

1. 研究内容

1-1. 研究背景

ヒトの体内では、毎日200グラムのタンパク質が合成されると同時に、同量の200グラムが分解されている。数分から数週間と、合成と分解の頻度はタンパク質によって千差万別であり、各々のターンオーバーは細胞の恒常性維持のため、厳密に管理されている。だが、細胞内タンパク質であるユビキチンのターンオーバーは合成と分解だけではない。

ユビキチンは、基質となるタンパク質に共有結合し、基質の分解や活性を制御する。ユビキチン化酵素群（E1酵素、E2酵素、E3リガーゼ）の一連の酵素反応により、ユビキチンは基質に共有結合する。一方、基質からユビキチンを脱離させる

脱ユビキチン化酵素（DUB）も細胞内に存在するため、役目を終えたユビキチンは切断され、再び利用される。

細胞内エネルギー源のATPを使う生合成よりも、ATPを必要としない酵素反応である再利用は圧倒的にコストパフォーマンスが良い（図1）。し

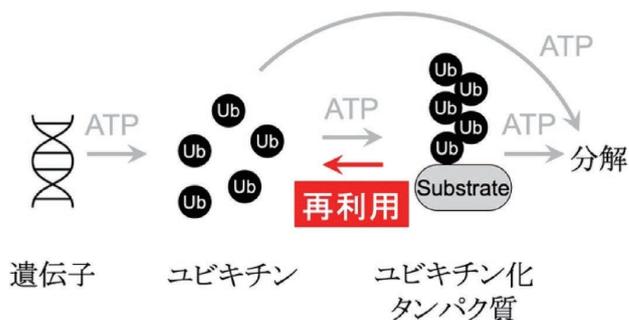


図1. ユビキチンの細胞内代謝の概略図。

かし、再利用しすぎてもしなすぎても良くない。事実、再利用を担う DUB の異常は、がんや心疾患、神経変性疾患の発症を招く (Park et al. BMB Rep 2014, 47, 9, 475-482)。再利用の制御は生命維持に重要であるが、未だ再利用の頻度や機構は不明である。なぜなら、化学的にも物理的にも完全に同じ状態に戻る再利用過程は、現在、如何なる手法でも追跡困難であるためである。

このような背景のもと、本研究は、再利用が加水分解反応であることに着目し、酸素の安定同位体を用いた、再利用の直接観測法「 ^{18}O 標識法」を考案した (図2)。すでに試験管内において、酸素同位体の取り込んだユビキチン分子の量を定量し、再利用に関わる酵素反応を速度論的に求めることで、再利用頻度を定量することに成功している (Tanaka, Morimoto, et al. BBRC 2020, 529, 2, 418-424)。本研究では、独自に開発した ^{18}O 標識法をヒト細胞に適用し、細胞内の再利用頻度を定量することを目的とする。

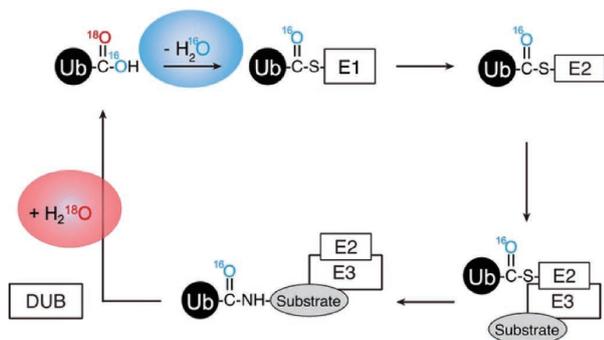


図2. ユビキチンの再利用による酸素原子取込。ユビキチンが再利用される際、脱水反応により E1 酵素に結合し、E2 酵素および E3 リガーゼに受け渡され基質タンパク質に結合する。その後、DUB による加水分解反応により溶媒由来の酸素原子が分子内に取り込まれる。

1-2. 研究手法

本研究で用いる ^{18}O 標識法は、加水分解反応に伴う溶媒由来の酸素原子の分子内への取り込みを定量できる手法である。ユビキチンの再利用において、基質タンパク質からユビキチンを脱離する反応は加水分解反応であるため、ユビキチンは再

利用される度に溶媒の水由来の酸素原子を分子内に取り込む。したがって、酸素の安定同位体で標識した水を用いれば、再利用によってユビキチン分子内に最大2つまで同位体を取り込むことができる (図3上)。同位体を取り込んだ分子数は、再利用の頻度によって経時的に変化し、理論的には逐次反応式に従う (図3下)。同位体を1つあるいは2つ取り込んだ分子は、定量的質量分析によって正確に分離して定量できるため、本研究では本手法を用いてヒト細胞内および懸濁液内のユビキチンの再利用の頻度を定量した。

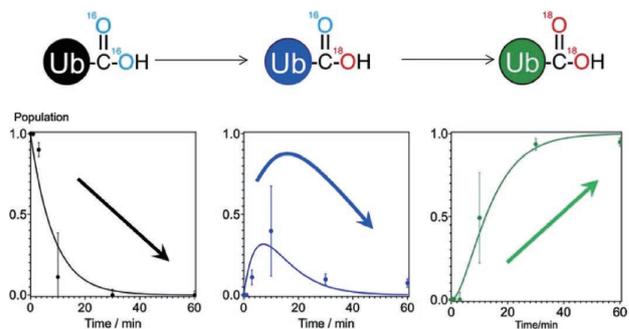


図3. 試験管内におけるユビキチンの再利用の速度論解析。 ^{18}O 標識水中での再利用反応によりユビキチン分子は ^{18}O 原子を不可逆的に取り込む。Tanaka, Morimoto, et al. BBRC 2020, 529, 2, 418-424 を改変。

1-3. 研究結果

まず、 ^{18}O 標識した細胞培養培地中で、ヒト子宮頸がん由来細胞である HeLa 細胞を培養し、内在性ユビキチンを抽出および精製し、 ^{18}O 原子を分子内に取り込んだユビキチンを定量的質量分析により解析した (図4)。理論上、再利用では ^{18}O 原子は最大2つまで分子内に取り込まれるが、培養時間が長くなれば長くなるほど、2つ以上 ^{18}O 原子を取り込んだユビキチン分子が検出された (図4 灰色囲み部分のピーク)。この結果は、再利用のみならず細胞内で新たにユビキチンが生合成されることにより、ユビキチン分子内に ^{18}O 原子が取り込まれたことを示している。

そこで、再利用による取り込みと生合成による取り込みを区別するため、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識培地で細

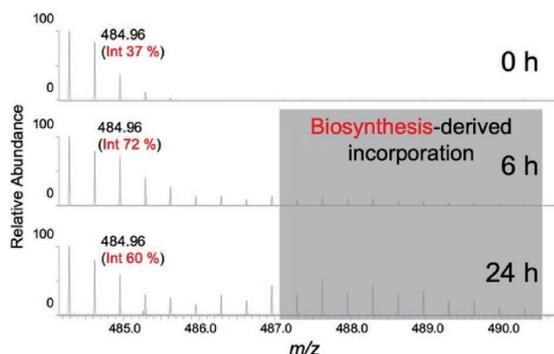


図4. 生合成による分子内¹⁸O原子取込。異なる培養時間における内在性ユビキチン由来のペプチドのESIスペクトル。

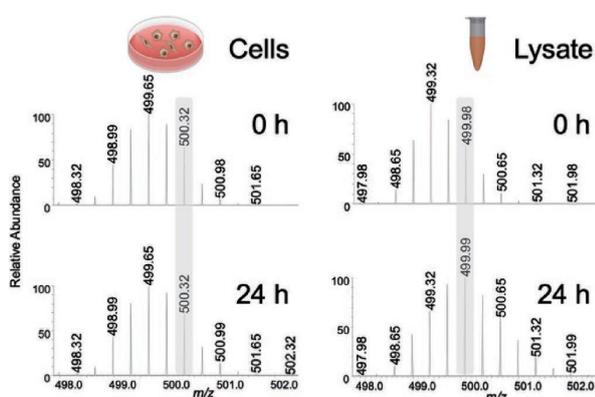


図5. 細胞内の再利用による分子内¹⁸O原子取込。

胞を一過的に培養し、その後、¹⁸O標識培地で培養する段階的培養法を考案した。この培養方法により、細胞内ユビキチンの生合成と完全に区別して、再利用による¹⁸O原子の取り込みを定量できる。

段階的培養法により、24時間培養後のHeLa細胞内のユビキチンの¹⁸O原子取り込みを調べたところ、限られた割合（約7%）しか取り込まれていないことがわかった（図5左）。一方、同じ細胞を用いて細胞抽出液を作製し、その中で24時間反応をさせると、半分以上（約53%）のユビキチン分子に¹⁸O原子が取り込まれていることがわかった。つまり、細胞内では厳格に再利用が制御されていることがわかった。

1-4. 考察および展望

本研究により、試験管内で確立したユビキチン再利用の直接観測法¹⁸O標識法をヒト細胞に適用することができ、実際ヒト細胞内の再利用を定量することに成功した。再利用頻度は再利用を媒介するDUBの発現量によって大きく異なることが予想される。今後は、今回用いたモデル細胞だけではなく、脱ユビキチン化酵素が細胞の生存や機能制御に重要な役割を果たしている神経細胞や肝細胞などの正常細胞内の再利用頻度を定量的に解析し比較することにより、細胞内のユビキチン再利用制御の理解に繋げたい。

また、細胞内のユビキチンの再利用量は、生合成量や分解量と均衡を保つように調整されていると考えられる。そのため、がんや神経変性疾患を模擬した細胞内環境下でユビキチンの再利用頻度を定量することにより、生合成や分解機構の破綻が招く疾患の発症機構の解明にもつなげたい。

2. 発表（研究成果の発表）

なし