

ID No.	253
研究課題名	NFκ-B 活性化経路における TRAF6 刺激依存的新規 Lys63 型ポリユビキチン化タンパク質の網羅的解析
研究代表者	小嶋 絢 (立命館大学薬学部・助教)
研究組織 受入教員 研究分担者	井上 純一郎 (東京大学医科学研究所・教授)
研究報告書	
<p>本研究では、Lys63 型ポリユビキチン鎖(Lys63-Ub)に特異的に結合するとされる NZF 領域由来フラグメントペプチド(NZF-F)を合成して化学的に固定化したレジンを用いた TRAF6 過剰発現細胞からの新規 Lys63 型ポリユビキチン化タンパク質の単離・精製と同定を試みた。まず、ペプチドを用いた水晶振動子マイクロバランス法 (QCM 法)とレジンをを用いた pull down assay によりリコンビナント Lys63-Ub との結合に対する至適条件と特異性の検討を行った。ペプチドは野生型 NZF-F の他に NZF に含まれる 4 つの Cys 残基のうち 2 つずつを含む N 末端側 (NZF-N) と C 末端側 (NZF-C)、Lys63-Ub との結合に関与するとされるアミノ酸を Ala に置換した NZF-M 、そのアミノ酸を含む C 末端側 (NZF-MS) を合成した。また、pull down assay では対照としてレジンの活性基を不活化した Blocking を調製した。その結果、両検討ともに野生型 NZF-F が Lys63-Ub と最も高い親和性を示し、Lys48-Ub など他の結合型ユビキチン鎖には結合しないことを明らかとした。また NZF に含まれる 4 つの Cys 残基が亜鉛イオンと錯体を形成することが Lys63-Ub との結合に重要であることが分かった。このため、細胞抽出液中に存在する脱ユビキチン酵素の阻害剤として汎用されている N-ethylmaleimide も Cys 残基を標的とするため使用できないことから前処理には SDS 存在下での加熱処理により酵素の影響を回避することとした。また、Blocking への非特異的な結合は見られなかったことからこのレジンを用いた細胞抽出液からの精製の有効性も確認できた。CHS は、アフィニティークロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを組み合わせ構築した。アフィニティークロマトグラフィーにおいて、細胞抽出液中の脂質等をできるだけ除くことを目的として Blocking も NZF-F と同様に液体クロマトグラム用カラムに充填し、NZF-F カラムの前に直列に連結した。分取した試料は、抗 Lys63-Ub 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより多数のバンドが</p>	

確認されたことから、この試料を用いて銀染色後ゲル内消化による LC-MS 解析を行ったところ数種類の候補タンパク質を検出した。また、ユビキチンの断片と考えられるスペクトルも検出されたことから候補タンパク質にはユビキチン化タンパク質が含まれる可能性が高いと考えられる。今後、より精度の高い疾患プロテオミクスラボラトリーでの LC-MS 解析を進め詳細に同定を行う。