

研究 成 果 報 告 書
(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		改変ユビキチン分子を用いたイオンチャンネルのユビキチン修飾部位の同定と機能解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Identification and characterization of multi-ubiquitination sites in ion channels using a modified ubiquitin probe			
研究氏 代 表 名 者	カカナ CC	姓)イチムラ	名)トオル	研究期間 B	2008 ~ 2009 年
	漢字 CB	市村	徹	報告年度 YR	2010年
	ローマ字 CZ	Ichimura	Tohru	研究機関名	防衛大学校
研究代表者 CD 所属機関・職名		防衛大学校・教授			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)					
<p>ユビキチン (Ub) がタンパク質分解に果たす役割は、生命科学のさまざまな領域で解明されている。我々はこれまでに、LC を微流速化させることで、試料中に極微量しか含まれないタンパク質でも正確に同定することができる LC-MS/MS システムを開発した。また、細胞刺激に応じて形成されるシグナル伝達複合体などのタンパク質複合体を、効率よく回収するための多段階精製用アフィニティータグ (MEF タグ) を開発し、ウイルスからヒトに至るさまざまなタンパク質複合体の機能解析に適用してきた。本研究では、Ub 分子内に His タグを組み込んだ改変 Ub 分子を作成し、上記 LC-MS システムと組み合わせることで、基質タンパク質中の Ub 修飾部位を簡便に決定できる方法論の開発を試みた。PCR 法を用いて His タグを Ub の C 末端近傍の異なる部位に導入した様々な改変分子を作成し、免疫沈降法を用いて基質タンパク質への Ub の取り込みを比較した。その結果、72-73 番目の位置に His タグを挿入した改変体が、作製したすべての分子中最良のものであり、今後の解析に有効な分子プローブになりえることを見出した。また、Trim32 の主要 Ub 化部位として coiled-coil 領域内の Lys 残基を推定し、この Ub 化反応が cAMP 依存性タンパク質キナーゼ A による NHL ドメイン内の Ser 残基のリン酸化と、これにともなう 14-3-3 タンパク質の相互作用によって制御されていることを明らかにした。この成果は、TRIM ファミリーの活性調節機構に関する初めてのものとなった (投稿準備中)。</p>					
キーワード FA	ユビキチン	タンパク質分解	プロテオミクス		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC					シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

The biological significance of the ubiquitin (Ub)-proteasome system is clarified in a variety of cellular processes. We have previously developed the MS-based proteomic technology combined with a multi-step immunoaffinity purification tag, called MEF tag, to identify functional signaling complexes in large scale from complex cell extracts. Here we use this procedure and newly designed Ub molecules to effectively identify ubiquitination sites of signaling proteins. Biochemical and biological studies demonstrate that the Ub derivative carrying a His tag located between positions 72 and 73 most effectively binds substrate proteins. In vivo ubiquitination assay suggests that the major ubiquitination site of Trim32 is the Lys residue in the coiled-coil domain. Furthermore, we find that this ubiquitination is regulated by cAMP-dependent phosphorylation and subsequent binding with 14-3-3 adaptor proteins. The present findings constitute the first evidence about the regulatory mechanism of TRIM family proteins (manuscript in preparation).