

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		形質膜品質管理におけるユビキチンリガーゼの網羅的解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Comprehensive analysis of ubiquitin ligase responsible for the plasma membrane protein quality control			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓)オキヨネダ	名)ツカサ	研究期間 B	2013 ~ 2014 年
	漢字 CB	沖米田	司	報告年度 YR	2015年
	ローマ字 CZ	OKIYONEDA	Tsukasa	研究機関名	関西学院大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		沖米田 司, 関西学院大学・理工学部・准教授			
概要 EA (600字~800字程度にまとめて下さい。)					
<p>本研究の目的は、細胞表面の形質膜タンパク質の発現量および安定性を規定する形質膜品質管理 (Peripheral Quality Control) の分子機構を解明し、その機構原理を疾患の予防や治療法の開発に応用する事である。本申請研究では特に、形質膜タンパク質の膜発現量を規定するユビキチンリガーゼの網羅的解析を行う事により、Peripheral Quality Control に関わるユビキチン化機構の全貌解明を目的とした。</p> <p>我々はユビキチンリガーゼの網羅的解析を行うために、CFTR 形質膜レベルのハイスループット定量法の確立を行った。無標識で細胞表面に存在する CFTR 発現量を直接定量化するために、細胞外領域に horseradish peroxidase (HRP) tag を融合した 正常型 (WT) または変異 ($\Delta F508$) CFTR-HRP を構築し、レンチウイルスベクターを用いて CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE 細胞に導入し、安定高発現株を樹立した。ウエスタンブロット法の結果、WT CFTR-HRP または $\Delta F508$ CFTR-HRP の細胞内発現が確認できた。</p> <p>$\Delta F508$ CFTR-HRP の形質膜発現を定量するために、96 ウェルプレートで培養した CFTR-HRP-CFBE 細胞外液に HRP 基質を加え、その酵素活性を発光プレートリーダーの測定を行った。その結果、37° C 培養条件において WT CFTR-HRP の形質膜発現を定量化できたが、37° C では $\Delta F508$ CFTR-HRP の形質膜発現はほとんど検出できなかった。$\Delta F508$ CFTR の形質膜発現を誘導する低温 (26° C) 培養後では、$\Delta F508$ CFTR-HRP の形質膜発現を S/N 比4倍以上の感度で検出することができた。さらに、$\Delta F508$ CFTR の形質膜発現を改善する化合物 (corrector C3) の効果を 96 well plate フォーマットで評価した結果、S/N 比3倍以上の感度で、その形質膜発現改善効果を検出することができた。さらに、本実験の Z'ファクターは 0.6 以上であり、ハイスループットスクリーニングに耐え得る CFTR 形質膜発現の簡便定量評価系が確立できたと考えられた。</p> <p>次に、$\Delta F508$-CFTR-HRP 発現 CFBE 細胞を用いて、ユビキチンリガーゼ siRNA 網羅的スクリーニングを行うために、siRNA transfection 法の最適化を GAPDH siRNA と KDalert GAPDH assay kit を用いて行った。最適化したプロトコルを用いて、ユビキチンリガーゼ siRNA 網羅的スクリーニング (612 種類) をマギル大学 (カナダ) 生理学部 G. Lukacs 教授との共同研究で実施した。その結果、$\Delta F508$-CFTR-HRP の形質膜発現を制御する数種類の新規ユビキチンリガーゼを同定した。今後、これらの候補分子のバリデーションを行い、基質選択性やユビキチン化制御の詳細な分子機構の解析を進める予定である。</p>					
キーワード FA	タンパク質品質管理	ユビキチン	ユビキチンリガーゼ		

(以下は記入しないで下さい。)

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下さい。）									
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}

In this study, we aimed to identify the ubiquitin (Ub) ligases responsible for the peripheral protein quality control mechanism eliminating unfolded plasma membrane (PM) proteins. We used $\Delta F508$ CFTR, the most common mutant of CFTR chloride channel in cystic fibrosis (CF) patients, as a model of unfolded PM protein. We constructed $\Delta F508$ CFTR fused with horseradish peroxidase (HRP) in the extracellular region to measure the PM level of CFTR directly. We then developed CF bronchial epithelial (CFBE) cells stably expressing $\Delta F508$ CFTR-HRP. Western blotting analysis confirmed the $\Delta F508$ CFTR-HRP expression in the CFBE cells. The PM level of $\Delta F508$ CFTR-HRP in CFBE cells was examined by measuring the HRP activity on the surface of cells. We found that $\Delta F508$ CFTR-HRP was not expressed at the PM of CFBE cells at 37°C, but able to express at 26°C as reported previously. We also confirmed the rescue effect of a small molecule corrector on the PM level of $\Delta F508$ CFTR-HRP of CFBE cells in 96 well plate format with value $Z' > 0.6$. These results suggested that our assay system using CFTR-HRP is useful for the high throughput screening to isolate the Ub ligase.

In order to perform a comprehensive siRNA screen of Ub ligases in CFBE cells, at first we optimized siRNA transfection condition by using GAPDH siRNA. Using the optimized protocol, we performed a comprehensive Ub ligase siRNA screening to isolate the Ub ligase limiting PM level of $\Delta F508$ CFTR in CFBE cells. In collaboration with Dr Gergely Lukacs, McGill University, we tested 612 Ub ligases effect on the PM level of low temperature rescued $\Delta F508$ CFTR in CFBE cells. Finally, we obtained strong candidates of Ub ligases limiting PM expression of $\Delta F508$ CFTR in CFBE cells. Now we are going to validate the effect of these candidates and also investigate the molecular mechanism of how these Ub ligases limit the PM expression of $\Delta F508$ CFTR.