

中務研究室（代謝生化学・試験管内ユビキチン修飾反応）

真核生物で最も重要なタンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系は、特定のタンパク質を時空間特異的に壊す選択的分解機構として作用し、細胞周期、ガン、免疫応答、シグナル伝達、神経変性疾患、タンパク質輸送、遺伝子発現、タンパク質品質管理など、様々な細胞機能の制御に関わっている。当研究室では、分子生物学、遺伝学、細胞生物学に加えて、生化学的なアプローチを駆使することで、ユビキチン・プロテアソーム分解系による細胞機能の制御メカニズムを研究している。

ユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解経路は、

- (1) E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）、E3（ユビキチンリガーゼ）による標的タンパク質へのユビキチン修飾
- (2) プロテアソームによる分解

の二つに大きく分けられる（下図）。本実習では、大腸菌から精製した組換えタンパク質を用いて、ユビキチン修飾反応を試験管内で再構成することで、ユビキチン修飾の分子メカニズムを考察する。

第1週：大腸菌発現系を用いたリコンビナントタンパク質の精製

Ni-NTA アガロースおよびグルタチオンセファロースを用いた His タグ融合タンパク質および GST 融合タンパク質の精製

第2週：精製したリコンビナントタンパク質の量と純度の解析

精製したリコンビナントタンパク質の SDS-PAGE による展開、クマシー染色・脱色

第3週：ユビキチン修飾反応

ユビキチン修飾反応の継時的変化の解析、各因子のユビキチン修飾反応への必要性の検討、異なるユビキチンを用いたユビキチン修飾反応

第4週：ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE による展開、メンブレンへの転写、抗体とのインキュベート

第5週：結果の解析、ディスカッション

この他、演習問題を通じて、タンパク質分解に関する実験手法や最新のトピックを議論する。生化学では、細胞内の反応を素過程に分割して、そのメカニズムを詳細に理解するのが目的の一つである。このとき、細胞から分離・精製した複数の生体分子を混合して反応を再構成することで、関与する因子とメカニズムを明らかにすることが重要である。実際、DNA 複製、RNA 転写、タンパク質の合成・輸送・分解など、様々な生命現象のメカニズムは、精製タンパク質を用いた再構成実験によって解析されてきた。本実習を通じて、再構成実験のパワーを感じ取って欲しい。

ユビキチンは E1（ユビキチン活性化酵素）により活性化された後、E2（ユビキチン結合酵素）に受け渡され、さらに E3（ユビキチンリガーゼ）により、標的タンパク質のリジン残基に付加される。ユビキチンが付加された標的タンパク質は 26S プロテアソームにより分解される。プロテアソームの図は PNAS (2012) 109 (37) p.14870 から引用。

