

## ユビキチン様タンパク質 NEDD8 を制御する骨髄腫関連因子の解析

加藤 恵美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

### 背景・目的

NEDD8 ( **N**eural Precursor Cell Expressed **D**evelopmentally **D**own-regulated **8**) は、ユビキチン様タンパク質であり、ユビキチンと同様に標的タンパク質に共有結合する。また、ユビキチンと 60%の同一性および 80%の相同性を持ち、他のユビキチン様タンパク質の中で、構造的にも最もユビキチンと似ている。これまでの研究で、NEDD8 は標的タンパク質に結合することで、そのタンパク質の活性化や安定化、または局在などを制御することが報告されているが、その詳細な修飾機構については解明されていない。

シロイヌナズナにおいて、タンパク質の NEDD8 化は正常なオーキシン応答に必須である。近年の報告で、SMAP (**S**mall **A**cidic **P**rotein) というタンパク質の変異により、植物が異常なオーキシン応答を示すことがわかった。そのため、SMAP の哺乳類ホモログである MYEOV2 (**M**yeloma **O**verexpressed **2**) が標的タンパク質の NEDD8 化に関わっているのではないかと考えた。MYEOV2 は、ヒトの骨髄腫で高発現していることはわかっているが、その機能については詳しくわかっていない。

そこで、本研究では、MYEOV2 が NEDD8 化活性や脱 NEDD8 化活性に及ぼす可能性を検証するために、MYEOV2 と NEDD8 化に関わるタンパク質の相互作用、および MYEOV2 がタンパク質の NEDD8 化に及ぼす影響を解析し、MYEOV2 によるタンパク質の NEDD8 化の制御がどのような機構で行われているのか解明することを目的とした。

### 方法

- 共免疫沈降アッセイによる MYEOV2 と

#### NEDD8 化に関わるタンパク質の相互作用の解析

HEK293T 細胞に MYEOV2 および NEDD8 化に関わるタンパク質のタグ付き発現ベクターをそれぞれトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収した。得られた細胞粗抽出液中の目的タンパク質をタグ抗体融合ビーズで免疫沈降し、他方のタンパク質との相互作用をウエスタンブロットにより解析した。

- プルダウンアッセイによる MYEOV2 が

#### タンパク質の NEDD8 化に及ぼす影響の解析

HEK293T 細胞に His-NEDD8、MYEOV2 および NEDD8 化に関わるタンパク質のタグ付き発現ベクターをそれぞれトランスフェクションし、24 時間後にグアニジン塩酸変性条件下で細胞を回収した。得られた細胞粗抽出液中の NEDD8 化タンパク質を His タグ融合ビーズで沈降し、MYEOV2 がタンパク質の NEDD8 化に及ぼす影響をウエスタンブロットにより解析した。

### 結果

共免疫沈降アッセイにより、MYEOV2 と NEDD8 化に関わるタンパク質が相互作用することが判明した。また、プルダウンアッセイにより、MYEOV2 がタンパク質の NEDD8 化に影響を及ぼすことがわかった。詳細は発表会にて報告する。