

ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットとしての TLE1 の機能解析

池田 秀徳 (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】

TLE1 は遺伝子発現のコリプレッサーや NF- κ B シグナル伝達のリプレッサーとして機能することが知られている[1, 2]。その一方で、TLE1 は E3 ユビキチンリガーゼの基質認識に寄与する WD40 ドメインを有し、CUL4-DDB1 複合体と相互作用することも示されている[3]。しかし、CUL4-DDB1-TLE1 複合体が実際にユビキチンリガーゼとしていつ、どの組織で、何を標的とするかに関してはよく分かっていない。

CUL4-DDB1-TLE1 複合体のユビキチンリガーゼとしての機能を調べるにあたって、まずは、TLE1 を過剰発現させただけで CUL4 および DDB1 と複合体を形成するか否か調べることにした。そこで、DDB1 と相互作用することが既に知られている L2DTL を比較対象として、培養細胞内で TLE1 ないしは L2DTL を DDB1 と同時に過剰発現させた場合の相互作用の違いを調べた。

【材料・方法】

HA-DDB1 プラスミド、FLAG-L2DTL プラスミド、および FLAG-TLE1 プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションして過剰発現させた。その後、細胞を回収しタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質溶液のうち一部を lysate のサンプルとして回収した。また、残りの溶液から anti-FLAG mouse 抗体ビーズを用いて FLAG-L2DTL ないしは FLAG-TLE1 と相互作用するタンパク質を免疫沈降した。

回収した lysate および免疫沈降後のサンプルについてウエスタンブロットを行い、HA タグもしくは FLAG タグを抗体標識してシグナルを観察した。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【展望】

TLE1 はリン酸化および過剰リン酸化修飾を受けて、他のタンパク質との相互作用の強さを変えること、さらにはそのような変化が発生時の神経の分化に影響を与えることが示されている[4]。今後はこの性質に着目して、TLE1 のリン酸化状態が CUL4-DDB1 複合体との相互作用の強さにどのような影響をもたらすかを調べる。

そのために全長の TLE1、各ドメインの欠損タンパク質、ならびにアミノ酸置換タンパク質を用意し、それぞれについて DDB1 との相互作用の強さを比較する。DDB1 との相互作用に寄与するようなドメインやリン酸化サイトを絞れたら、そのサイトに作用するキナーゼあるいはホスファターゼの有無により TLE1-DDB1 間の相互作用の強さが変化するか調べる。なお、その際にはウエスタンブロットによる定性的な解析だけでなく、熱力学的な手法を組み合わせて定量的に解析することを目指す。

一方、TLE1 が認識する基質として Tbx6 という転写因子に注

目している。哺乳動物の発生時には Tbx6 の分解が Ripply2 というリプレッサーによって促進される[5, 6]。そして、Ripply2 には TLE1 と相互作用するドメインと Tbx6 と相互作用するドメインがそれぞれある[6]。これらの性質から TLE1 が Ripply2 依存的に Tbx6 を基質として認識する可能性が考えられる。そこで、TLE1 が実際に Ripply2 および Tbx6 と一つの複合体を形成するか否か明らかにするために、Ripply2、Tbx6、および TLE1 の組換えタンパク質を調製してそれらを混合し、複合体形成が起こるか調べる。

【参考文献】

- [1] Barbara H. Jennings & David Ish-Horowicz; *Genome Biology* 9 (1); 205 (2008)
- [2] Elaine R. Nimmo, Craig Stevens, Anne M. Phillips, Amanda Smith, Hazel E. Drummond, Colin L. Noble, Michael Quail, Gail Davies, Marian C. Aldhous, David C. Wilson, & Jack Satsangi; *Gastroenterology* 141 (3); 972-981.e1-2 (2011)
- [3] Leigh Ann Higa, Min Wu, Tao Ye, Ryuji Kobayashi, Hong Sun, & Hui Zhang; *Nature Cell Biology* 8 (11); 1277-1283 (2006)
- [4] Hugh N. Nuthall, Kerline Joachim, & Stefano Stifani; *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 24 (19); 8395-8407 (2004)
- [5] Wei Zhao, Rieko Ajima, Youichirou Ninomiya, Yumiko Saga; *Developmental Biology* 400; 105-117 (2015)
- [6] Wei Zhao, Masayuki Oginuma, Rieko Ajima, Makoto Kiso, Akemi Okubo, Yumiko Saga; *eLife* 7; e33068 (2018)