

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14623

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素USP8によるグルココルチコイド受容体活性化の新規制御機構

研究課題名(英文) A deubiquitylating enzyme USP8 is required for glucocorticoid receptor activation

研究代表者

遠藤 彬則 (ENDO, Akinori)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：50796844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：USP8は、既知のグルココルチコイド受容体制御機構である細胞質における複合体形成、核内移行、核内でのホモ二量体形成に影響は与えず、未知のメカニズムにより、グルココルチコイド受容体の活性を制御していることが示唆された。

予期せぬ発展として、機能不全エンドソームへのユビキチンの蓄積、エンドソームストレスが、二つの異なるユビキチン結合タンパク質、TAB2/3とp62を介して、それぞれ転写因子NF- κ BとNrf2を活性化し、RANTESなど免疫関連因子の遺伝子発現を増加させることを明らかにした。今後、本研究により新たに提唱されたエンドソームストレスの生理的意義に迫りたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルココルチコイドは、受容体を介して生体の恒常性を維持する重要なステロイドホルモンである。グルココルチコイド制御機構の破綻は、USP8の遺伝子変異により引き起こされるクッシング病をはじめ、多くの疾患と密接に関わっているため、未知の分子機構を明らかにしていくことはこれらの疾患治療に繋がると期待される。

一方、USP8の機能障害が引き起こすエンドソームへのユビキチンの蓄積、エンドソームストレスがグルココルチコイド受容体の標的遺伝子のみならず、多数の遺伝子の発現制御に関わっていることを見出した。今後、エンドソームストレスが個体に及ぼすや疾患との関わりを明らかにすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We showed that USP8 does not affect the known glucocorticoid receptor regulatory mechanism, such as complex formation in the cytoplasm, translocation into the nucleus, and homodimer formation in the nucleus. These results suggest that USP8 regulates the activation of the glucocorticoid receptor by an unknown mechanism.

Unexpectedly, we found that aberrant accumulation of K63 ubiquitin chains on endosomes, to which we referred as endosome stress, recruits, two different decoders, TAB2/3, and p62 to the endosome and activate the TAK1-NF- κ B immune response pathway, and the Keap1-Nrf2 stress response pathway, respectively. In the future, we would like to focus on the biological significance of endosome stress.

研究分野：細胞生物学

キーワード：USP8 ユビキチン エンドソーム 炎症シグナル プロテオミクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストレスや概日リズムに応じて、副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドは、ステロイドホルモンの1つであり、ほぼすべての組織に発現するグルココルチコイド受容体を介して、血糖値の上昇、抗炎症作用、抗免疫作用など生体の恒常性維持に必要な生理活性を発現する。グルココルチコイド受容体は、グルココルチコイド非存在下において、不活性型として細胞質に局在し、HSP (heat shock protein)、FKBP (FK506-binding protein)、Co-chaperone と複合体を形成している (成熟型グルココルチコイド受容体)。成熟型グルココルチコイド受容体は、グルココルチコイドとの結合に応じて速やかに活性化され、複合体から解離し、核内移行後に様々な標的遺伝子の転写を制御する。グルココルチコイド刺激に応じたグルココルチコイド受容体の活性化、およびその標的遺伝子の発現制御を介し、必要とされるタイミングに組織特異的な応答をすることが生体の恒常性維持に非常に重要であり、各組織におけるグルココルチコイド応答性の低下 (グルココルチコイド抵抗性) は、厚生労働省の指定難病、クッシング病をはじめとした疾患を引き起こす。

タンパク質のコピキチン化は、標的タンパク質の分解をはじめ、多種多様な細胞内機能を制御する。脱コピキチン化酵素は、標的タンパク質からコピキチンを外すことにより、これらコピキチン化による作用を負に調節している。研究代表者らは、脱コピキチン化酵素 USP8 の遺伝子変異 (アミノ酸置換) がクッシング病を引き起こすことを発見していた (Reincke et al., Nat. Genet. 2015)。クッシング病は、脳下垂体腫瘍でのグルココルチコイド抵抗性を起因とした、満月様顔貌、中心性肥満、糖尿病、高血圧など様々な症状を引き起こす内分泌疾患であるが、なぜ USP8 の遺伝子変異により脳下垂体腫瘍がグルココルチコイド抵抗性を獲得するのか、その分子機構は不明であった。

研究代表者は、質量分析法などによる予備実験から、USP8 がグルココルチコイド受容体複合体の新規構成因子であること、USP8 の機能阻害がグルココルチコイド刺激時のグルココルチコイド受容体の転写活性を強く抑制することを見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、質量分析法によるグルココルチコイド受容体複合体構成タンパク質の網羅的な解析を出発点に、USP8 によるグルココルチコイド受容体活性化の新規制御機構を解き明かし、変異型 USP8 による細胞のグルココルチコイド抵抗性獲得機構の解明に繋げることを当初の目的としていた。ところが、予期せず USP8 の機能阻害がグルココルチコイド受容体だけではなく、炎症シグナル制御因子 NF- κ B や抗酸化因子 Nrf2 を活性化することを発見した。そのため、研究期間の後半では、これら USP8 による新規細胞機能制御機構の解明を目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

[USP8 によるグルココルチコイド受容体制御機構の解析]

RNAi 法により USP8 を機能阻害した細胞、およびコントロール細胞に FLAG-グルココルチコイド受容体を発現させ、それぞれの細胞から、FLAG-グルココルチコイド受容体複合体を精製した。質量分析法により、これらのタンパク質を網羅的に同定、定量し、USP8 の機能阻害がグルココルチコイド受容体複合体の構成へ及ぼす影響を解析した。

USP8 機能阻害細胞におけるグルココルチコイド受容体のリガンド依存的な核内移行とホモ二量体形成をそれぞれ共焦点顕微鏡および共免疫沈降法により解析した。

[USP8 によるエンドソームストレス制御機構の解析]

TMT-6plex/FAIMS/MS² 解析により、USP8 の機能阻害が細胞プロテオームへ及ぼす影響を調べ、8,000 種以上のタンパク質を比較定量した。その中で最も顕著に発現量が増加していた RANTES について、qRT-PCR 法やルシフェラーゼアッセイなどにより、遺伝子発現の変化やプロモーター解析を行い、上流の転写因子の同定を行った。

RANTES の責任転写因子候補であった NF- κ B や Nrf2 などの共阻害が USP8 機能阻害による RANTES 遺伝子発現へ及ぼす影響を解析した。

エンドソーム上に蓄積したコピキチンから炎症応答を伝達する候補であった TAB2/3-TAK1 や p62-Keap1 経路について、細胞内局在変化を共焦点顕微鏡により解析した。またこれらの因子の共阻害が RANTES の遺伝子発現へ及ぼす影響を qRT-PCR 法やルシフェラーゼアッセイなどにより解析した。

4. 研究成果

1) USP8 によるグルココルチコイド受容体制御機構

当初の研究目的に沿って、USP8 がグルココルチコイド受容体の「細胞質における複合体形成」、「核内移行」、「核内でのホモ二量体形成」に関与しないことを明らかにした (未発表)。これらのことは、USP8 がこれまで未発見の分子機構によりグルココルチコイド受容体の活性化を制御していることを示唆しているが、なぜ USP8 の機能阻害がグルココルチコイド受容体の活性化を抑制するのか、その詳細な分子機構の解明には至っ

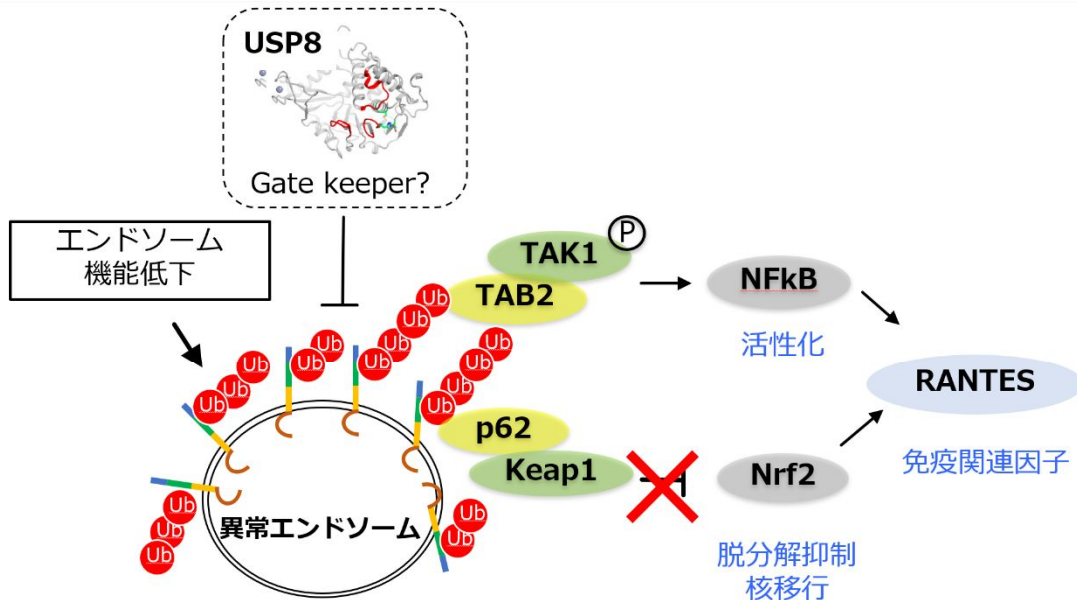
ておらず、今後の課題として残っている。

2) USP8 によるエンドソームストレス制御機構

プロテオーム解析などから USP8 の機能阻害が多数の遺伝子発現に大きな影響を及ぼすことを見出した。すなわち、USP8 の細胞内機能の下流では、グルココルチコイド受容体のような特定の転写因子だけではなく、広範囲の遺伝子発現が制御されることを示唆している。興味深いことに、大分部の標的遺伝子は免疫関連因子であり、分子生物学的、生化学的解析から、USP8 の機能阻害により機能不全に陥ったエンドソームを起因として、TAB2/3-TAK1-NF-kB 経路と p62-Keap1-Nrf2 経路がそれぞれ活性化することを明らかにした。エンドソームに蓄積したユビキチンにユビキチン結合タンパク質 TAB2/3 がリクルートされ、下流のリン酸化酵素 TAK1 の自己リン酸化、活性化を介して、標的転写因子の NF-kB の転写因子としての機能発現が誘導される。また、同様にユビキチン E3 リガーゼ Keap1 をエンドソームにリクルートすることで、恒常的な Nrf2 の分解作用が解除され、Nrf2 の安定化、核内移行、転写因子としての活性が増加する。そして、このように二つの異なるシグナル伝達経路を介して、標的遺伝子の発現が誘導される。

このようなエンドソームへのユビキチンの蓄積が炎症シグナルの開始点となる現象は、これまでに報告されていない。エンドソームは細胞レベル、個体レベルで必要不可欠なオルガネラであるが、一過的なエンドソームの機能低下が細胞にどのような影響を与えるのか、これまでに解析されていなかった。本研究成果は、エンドソーム機能における USP8 の真の役割に迫るものである。USP8 機能低下細胞では、本来リソソームへ輸送、分解されるべき細胞膜タンパク質がユビキチン化されたままエンドソーム上に蓄積する。今回、このような機能不全エンドソームへのユビキチンの蓄積を”エンドソームストレス”と新たに位置づけ、エンドソームストレスが、二つの異なるユビキチン結合タンパク質、TAB2/3 と p62 を介して、それぞれ転写因子 NF-kB と Nrf2 を活性化し、RANTES など免疫関連因子の遺伝子発現を増加させる新たなモデルを提唱した(下図)。つまり、一過的かつ可逆的なエンドソームの機能低下がトリガーとなり、エンドサイトーシスなど膜輸送に使われていたユビキチンシグナルが細胞内シグナル伝達へ変換されることを示唆している。本研究成果は現在論文投稿中である。

今回は培養細胞系での解析に限られていたが、今後エンドソームストレスが個体においてどのような生物学的意義を有するのか、また疾患にどのように関与するのかを明らかにしたい。



“エンドソームストレス”

膜輸送からシグナル伝達へのユビキチンシグナルの変換

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤 彬則
2. 発表標題 脱コビキチン化酵素USP8によるエンドソームストレス制御
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 彬則
2. 発表標題 脱コビキチン化酵素USP8によるエンドソーム機能性維持を介した新規細胞間シグナル伝達制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----