

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32610

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591191

研究課題名（和文） ネフローゼの病態に置ける脱ユビキチン化酵素 USP40 の関与

研究課題名（英文） Role of Ubiquitin specific protease 40 in Glomerulus

研究代表者

西堀 由紀野（NISHIBORI YUKINO）

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：70407021

研究成果の概要（和文）：ユビキチン・プロテアソーム系は細胞機能維持において必須である。今回の我々の研究により、近年新規糸球体発現分子として報告された Ubiquitin specific protease 40 (USP40) は、ユビキチン・プロテアソーム系において、細胞周期に調節する分子 histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) を基質蛋白とした脱ユビキチン化酵素として機能することが考えられた。HINT1 は従来の報告より、p27<sup>kip1</sup> を介し細胞周期を制止すること、腎糸球体ではポドサイトのみで発現することが判明している。このことから USP40 が糸球体形成過程で必須な役割を果たす新規分子であること、その機能は HINT1 の分解抑制により発揮される可能性があることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Unbiased transcriptome profiling and functional genomics approaches identified USP40, a family of deubiquitinating enzyme, as being a transcript highly specific for the glomerulus. But its protein characterization and biologic function is not known at all. USP40 may stabilize HINT1 which is known to up-regulate cellular level of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup>, by its ubiquitinating activity, thereby influencing the glomerular developmental process via modulating cell cycle system of glomerular endothelial cells and podocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学・小児科学

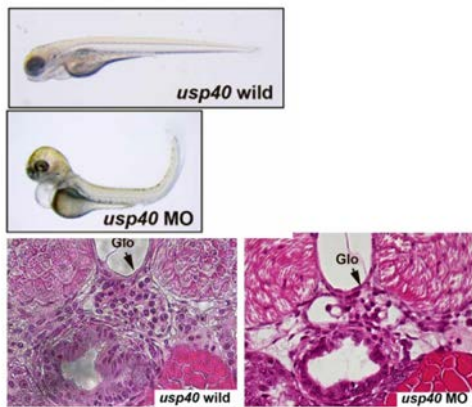
キーワード：小児腎・泌尿器学

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク機能の発現には、小胞体における至適な折りたたみと、ゴルジ体・細胞膜への円滑な輸送が必須である。この合成・輸送の過程において、不良タンパクは常に産生され、細胞内に停滞し、細胞障害すなわち臓器障害を導くことが明らかになっている。特に、不

良タンパクを迅速かつ適切な処理を担う器官、すなわちユビキチン・プロテアソーム系の存在が、細胞機能の維持に必須と考えられる。不良タンパク（変性タンパク）は、多数のユビキチンの結合（ユビキチン化）によりプロテアソームに輸送され、プロテアーゼによる消化後に新たなタンパク合成のリサイ

クル系に入る。このユビキチン化の制御システムは、至適タンパク分解過程の重要な第1関門である。Ubiquitin-specific protease family (USP) は、標的タンパクからユビキチンを離脱させ、そのユビキチンの修復と、新たな標的タンパクとの共結合(ユビキチン化)へのリサイクルを促すとされている。神経変性疾患や癌の病態に、このユビキチン・プロテアソーム系の機能不全が関わることを判明しつつある。Quesada らは、新規クローニング USP family のうち、USP40mRNA が腎臓に有意に発現することを報告した (Quesada V, et al. Biochem Biophys Res Commun 314:54, 2004)。さらに、最近 Karolinska 研究所の Tryggvason らは、網羅的 mRNA 解析を行い、約 300 の新規糸球体特異的転写産物を発表した。その 1 分子として脱ユビキチン化酵素である USP40 が報告された。(Takemoto M, et al. EMBO J 25:1160, 2006)。研究代表者らはこの USP40 について、免疫染色により、タンパク局在は腎糸球体毛細血管の内皮細胞であることを確認した。また USP40 ノックダウンゼブラフィッシュを作製した。ゼブラフィッシュは受精後 4 日目の pronephro において filtration barrier が構築され、タンパク漏出防止機構が機能することが報告されている。USP40 ノックダウンゼブラフィッシュでは pronephro からのタンパク漏出が確認されたことから、その表現形の確認と、pronephro の発生障害が惹起されることを見いだしている。USP40 は糸球体の発生・構築に必須の分子であることが予想される。



USP40 knockdown zebrafish の表現形

## 2. 研究の目的

本研究の対象分子 USP は、脱ユビキチン化の主役としてユビキチンの機能制御を担う分子群であるが、その臓器特異的タンパク機能は殆どが未解明である。60 を超える USP family において、その mRNA レベルの発現パ

ターンの検討から、USP40 が腎臓に特異的に発現することが最近判明している。本研究の目的は、腎・糸球体の発生・機能維持・障害機序に関わる USP40 のタンパク機能を解明することにある。

## 3. 研究の方法

(1) USP40 のタンパク発現を網羅的に解析 (in vivo, in vitro)。

① 抗体の作製: ヒト USP40 (アミノ酸 756-953) の partial cDNA を大腸菌に導入後、リコンビナント USP40 を作製し、これを免疫源としたポリクローナル抗体を作製した。

② ①の抗体を用いて、マウスを用いた各臓器における発現を western blot と蛍光免疫染色で確認した。また発生過程における発現を、胎児マウス (胎生 12、15、18 日) と生後マウスを用いて比較した。

③ ヒト USP40cDNA をサブクローニングし HEK293 細胞に導入、USP40 強制発現 HEK293 細胞株を作製した。細胞レベルでの発現の解析に用いた。

(2) USP40 のタンパク機能解析

① 作製した USP40 発現 HEK293 細胞を用いて、Yeast two-hybrid screening により USP40 の蛋白結合分子・リガンドの探索を行った。

② USP40 ノックアウトマウスを作製し表現形を比較した。

③ 後天性糸球体疾患モデルマウスにおける USP40 の関与を解析した。

## 4. 研究成果

(1) USP40 のタンパク発現の解析

USP40 を強制発現させた HEK293 細胞を用いた免疫染色では、USP40 はびまん性に細胞質発現し、特定の細胞内小器官には属さない局在を示した (図 1)。western blot では約 140kDa の分子であることが判明した。マウス成熟腎においては、RT-PCR と western blot では、より糸球体優位に USP40 が発現してい

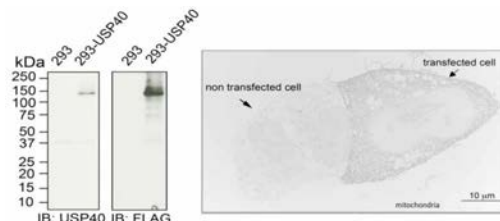


図 1 HEK293細胞におけるUSP40の蛋白発現

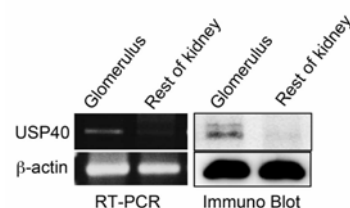


図 2 マウス成熟腎におけるUSP40

ることが確認された(図2)

マウス臓器を用いた免疫染色では、脳・肺・肝臓・腎臓・筋肉・神経血管系において、全ての毛細血管に特異的に発現を認めた。成熟糸球体においてはポドサイトに強く発現し、内皮細胞にも局在することを確認した。一方胎児腎においては capillary-loop stage で内皮細胞に強く発現し、発生過程で局在の変化を来すことが判明した(図3)。

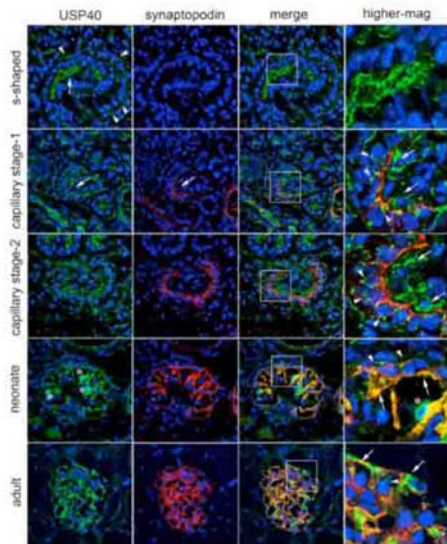


図3 マウス腎の発生段階におけるUSP40の発現

(2) タンパク機能解析として、リガンドの探索を、USP40 発現HEK293 細胞ライセートを USP40 抗体で免疫沈降したサンプルを用いて、Yeast two-hybrid screening を行った。リガンド蛋白としてHINT1 が同定された。HINT1 はサイクリン依存性キナーゼ阻害分子p27<sup>kip1</sup>の分解抑制により細胞周期を制すること、一方p27<sup>kip1</sup>は胎生期を通して糸球体ではポドサイトに発現し、内皮細胞には発現しないことが判明している。蛍光免疫染色にて胎児腎におけるHINT1 とUSP40 の局在は同様であり、USP40 導入下のHEK293 細胞ではHINT1 の発現が増強し、33°Cの培養条件下(未熟)と比較し、増殖停止条件下(37°C:成熟)の細胞では両蛋白ともHINT1 が 1.4 倍、USP40 が 2.8 倍の発現が増強していた(図4 b)。また細胞ライセートからHINT1 とUSP40 が共沈降されたことから(図4 a)、蛋白結合していることが判明した。これらの結果からHINT1 のユビキチン化にUSP40 が脱ユビキチン化酵素として関与することが示唆された。

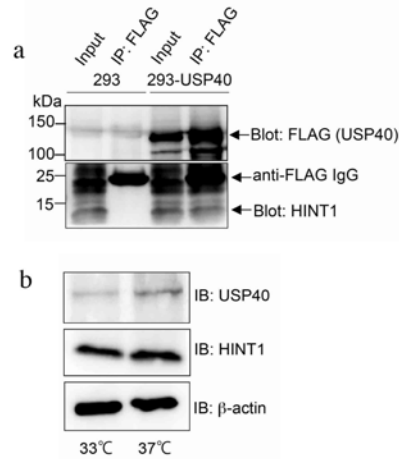


図4 USP40 とHINT1の蛋白結合

(3) USP40 conditional ノックアウトマウスの作製。

血管内皮に発現する VE cadherin をプロモーターとしたノックアウトマウスを作製した。その表現形は、生下時の尿タンパクは陰性であったが、光顕像において wild-type に比して腎糸球体径の縮小とメサンギウム細胞・基質の増殖が観察された。今後の表現形の変化を追視する。さらに全身 Cre-ER をプロモーターとしたノックアウトマウスを作製したが生下時に有意な表現形の変化はなかった。このノックアウトマウスも同様に今後の変化を追視する。また、誘導を必要としない Cre マウスを用いたノックアウトマウスの作製し解析を進める方針である。

(4) 後天性糸球体疾患モデルとして、ラットを用いた PAN 腎症を作製。その USP40 発現の比較では、尿タンパク出現に伴い、腎糸球体上皮細胞における USP40 の発現が増強していることが観察された。更なる解析を進める方針である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

① Takagi H<sup>1</sup>, Nishibori Y<sup>1</sup>, Kiuchi Z<sup>1</sup>, Ito Y<sup>1</sup>, Kudo A<sup>2</sup>, Akimoto Y<sup>2</sup>, Kimura T<sup>3</sup>, Takematsu H<sup>4</sup>, Yan K<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>Department of Pediatrics, <sup>2</sup>Anatomy, <sup>3</sup> Pharmacology, <sup>4</sup> Lab Membrane Biochemistry and Biophysics Graduate School of Biostudies, Kyoto University): Role of ubiquitin specific protease 40 (USP40) in glomerular development. The 4<sup>th</sup> EMBO meeting 2012, Nice, 22-25 September 2012

②高木永 1, 西堀由紀野<sup>1</sup>, 木村徹 2, 宮東昭彦 3, 楊國昌<sup>1</sup> (1 杏林大・医・小児科・<sup>2</sup> 薬理学・<sup>3</sup> 解剖) : 糸球体の発生に置けるユビキチン特異的プロテアーゼ 40 (USP40) の役割. 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会、東京、2012 年 6 月 29 日-30 日

③Takagi H: Role of Ubiquitin Specific Protease40. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Philadelphia, Nov. 9, 2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西堀 由紀野 (NISHIBORI YUKINO)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号 : 70407021

### (2) 研究分担者

楊 國昌 (YAN KUNIMASA)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号 : 70255389

秋元 義弘 (AKIMOTO YOSIHIRO)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 60184115

### (3) 連携研究者

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUHITO)  
金沢医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 20232275