

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24年 4月19日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770123

研究課題名（和文）新型の小胞体脱ユビキチン化酵素の細胞機能と制御機構

研究課題名（英文） Cellular role and regulatory mechanism for a novel deubiquitinating enzyme in the endoplasmic reticulum

研究代表者

中村 信大（NAKAMURA NOBUHIRO）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：80361765

研究成果の概要（和文）：

本研究では最近同定された小胞体に局在する膜貫通型の脱ユビキチン化酵素 USP19 の機能解析を行った。その結果、① USP19 は脱ユビキチン化酵素反応を介して小胞体関連分解の基質である不安定膜タンパク質および小胞体関連分解に関与するユビキチン化酵素の安定化決定にはたらくことを認めた。② USP19 の酵素活性は USP19 がもつドメイン構造や自己プロセッシングによって影響を受けることが分かった。USP19 が小胞体関連分解における役割およびその酵素活性制御機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

This study has demonstrated that 1) USP19, a transmembrane deubiquitinating enzyme in the endoplasmic reticulum (ER), deubiquitinates not only typical substrates of ER-associated degradation (ERAD), but also ERAD ubiquitinating enzymes, and 2) the enzymatic activity of USP19 is dependent on the domain structures and processing of USP19. These results provide better understand of the molecular mechanism for the regulation of the ERAD pathway as well as the USP19 activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：小胞体，脱ユビキチン化，プロテアソーム分解

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン化は、タンパク質分解・細胞内輸送・シグナル伝達など多様な細胞機能を制御するタンパク質翻訳後修飾であり、リン酸化と同様に脱ユビキチン化によって可逆的に制御されている。この脱ユビキチン化を担うのが

脱ユビキチン化酵素（deubiquitinating enzyme [DUB]）であり、哺乳動物では約 100 種類存在している。ほとんどの DUB 分子は可溶性タンパク質であるが、2 つの DUB 分子（USP19 と USP30）は膜貫通ドメインをもち、それぞれ小胞体とミトコンドリア膜に局在することが分かった。USP19 は小胞体関連分

解によりプロテアソーム分解を受ける膜タンパク質分子の脱ユビキチン化を行い、タンパク質の安定化に働くことが示されている。しかしながら、USP19 の小胞体関連分解における正確な役割やその活性調節のしくみについては明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

USP19 は小胞体関連分解 (ERAD) により分解を受ける膜タンパク質のターンオーバーを調節していることが報告されている。しかしながら、小胞体における USP19 の活性調節や細胞機能の分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では次の3つの目標を立てた。

- (1) USP19 による小胞体関連分解の回避機構の詳細を明らかにする。
- (2) USP19 のもつドメイン構造の役割を解明する。
- (3) USP19 の自己プロセシングのメカニズムと脱ユビキチン化酵素活性への影響について明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) USP19 による ERAD 基質分子の保護作用のメカニズムの詳細を USP19 の過剰発現および発現抑制 (RNA 干渉法) や変異体発現により、パルスチェイス法などを用いて基質分子の安定性を解析することで調べた。

(2) USP19 のドメイン構造に相互作用する分子を免疫沈降法により解析するとともに、これらのドメイン構造が DUB 活性に及ぼす影響について点変異および欠失変異体を作製して検討した。

(3) プロセシングの切断部位をペプチドシーケンス解析により決定し、切断認識配列を点変異導入により明らかにする。また、プロセシングが USP19 の機能への影響について解析した。さらに、切断された N 末断片の局在や機能について細胞染色や DNA マイクロアレイ解析により調べた。

(4) USP19 の新規基質分子や機能制御因子の探索を免疫沈降法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) USP19 の新しい基質分子の同定と小胞体関連分解における役割

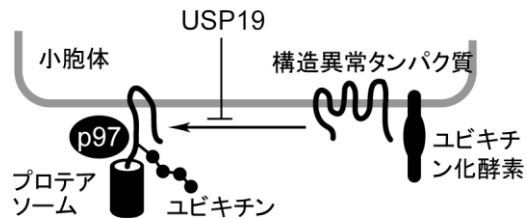
USP19 の新たな基質を同定するため小胞体関連分解に関与する分子との相互作用について免疫沈降法で調べたところ、小胞体ユビ

キチン化酵素である TEB4/MARCH6 が同定された。TEB4 は自己ユビキチン化を介したプロテアソーム分解をうける ERAD 基質である。USP19 の過剰発現によってこの TEB4 のタンパク質発現量が増加し、USP19 の酵素活性を失わせるとこの効果が認められないことが分かった。この発現量の増加は TEB4 のプロテアソーム分解速度の減少によることをパルスチェイス法により確認した。逆に、USP19 の発現を RNA 干渉法により抑制した場合、TEB4 の発現量が低下することを認めた。さらに USP19 の過剰発現によって TEB4 のユビキチン化レベルが著しく低下し、酵素活性を失わせた場合にはユビキチン化量に変動がないことが分かった。このことから USP19 の脱ユビキチン化によって TEB4 の分解が抑制され、その結果、タンパク質発現量が上昇することが分かった。

さらに、p97 の変異体の過剰発現により逆輸送を不完全にさせその時の TEB4 のユビキチン化量が USP19 の発現によって影響を受けるか調べたところ、TEB4 の脱ユビキチン化は p97/VCP による細胞質への逆向輸送 (dislocation) が起こる前で行われることを示唆する結果を得た。以上から、USP19 は TEB4 の脱ユビキチン化を介して小胞体関連分解から回避させ、TEB4 の発現量および活性の調節に働くことが考えられた。

次に、TEB4 以外の小胞体ユビキチン化酵素についても同様の結果が得られるか検討したところ、小胞体関連分解のユビキチン化酵素として知られる HRD1 が TEB4 と同様に安定化されることを認めた。また、GP78 や RNF170 についてはやや安定化が見られたもののその効果は非常に小さいことが認められたことから、USP19 が特定の小胞体ユビキチン化酵素の発現量調節に関与することが示唆された。

本解析により、USP19 による小胞体ユビキチン化酵素の発現量や活性の調節によって小胞体品質管理機構が制御されることを示すことができた (図 1)。



【図 1】小胞体関連分解における USP19 の作業モデル。USP19 は構造異常タンパク質に代表される小胞体関連分解基質のみならず小胞体関連分解に関与するユビキチン化酵素の脱ユビキチン化を介してタンパク質番会から保護して発現量を調節することで、タンパク質品質管理機構の制御に働いている可

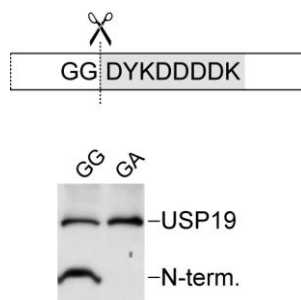
能性が考えられる。

(2) USP19 のドメイン構造および自己プロセシングの USP19 の機能に与える影響

先行研究により、USP19 が熱ショックタンパク質 HSP90 と結合すること、USP19 の N 末領域が自己プロセシングにより切断されることを見出していたので、これらの特性が USP19 の機能にどのような影響を及ぼすかについて解析を行った。USP19 と HSP90 との相互作用は USP19 の N 末領域に存在する CS ドメインを介して行われる。この N 末領域を欠失させた場合、TEB4 の分解抑制効果が弱まることを認めた。この場合、TEB4 の脱ユビキチン化にはほぼ影響がないことが分かった。

USP19 の自己プロセシングは自身の酵素活性に依存し、CS ドメインより少し C 末側に位置する保存された Gly-Gly 配列を認識して切断することを点変異体解析および切断断片のペプチドシーケンス解析により明らかにした(図 2)。また、切断認識配列である Gly-Gly は脱ユビキチン化反応におけるユビキチン鎖の切断の認識配列と同様であることから、酵素活性依存的なプロセシングの理由も説明できた。この認識配列に点変異を導入してプロセシングを抑えたところ、TEB4 の分解抑制効果に変化は見られなかった。しかし、この条件ではプロセシングを受けていない USP19 も存在している為に、たとえ分解に影響があってもその効果を検出するのが難しいことも考えられ、実験系を立て直して再解析する必要があると思われる。

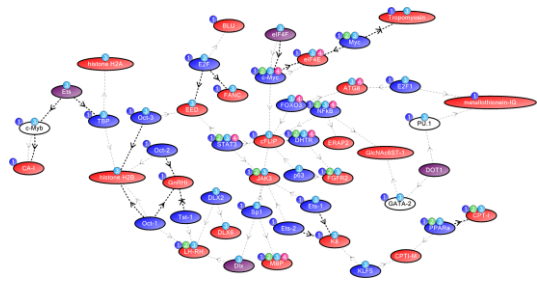
以上の結果から、USP19 が TEB4 のユビキチン化を負に調節して小胞体分解から回避させている機能は、HSP90 との結合や自己プロセシングによって制御されている可能性が強く示唆された。



【図 2】 USP19 の自己プロセシング部位周辺のアミノ酸配列。切断部位 (ハサミ) は Gly-Gly 配列の直後に位置している (上)。この配列に変異を入れた場合、プロセシングは生じないことをウエスタン解析により明らかにした (下)。

(3) マイクロアレイ法を用いた USP19 によって発現に影響を受ける遺伝子の探索

自己プロセシングにより USP19 の N 末断片が切り離されるが、この断片は細胞質および核に局在していることを細胞染色により認めた。核局在によって遺伝子発現を調節している可能性が十分に考えられたので、USP19 および N 末端断片を過剰発現した細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、各細胞においてコントロール細胞と比較して発現量に差がある遺伝子を探索した。その結果、シグナル伝達分子やタンパク質分解制御因子の遺伝子の発現量に変動が生じるものがあった(図 3)。現在、これらの遺伝子が USP19 の機能やタンパク質品質管理機構に影響がないか解析中である。



【図 3】 アレイ解析の結果から作製した遺伝子ネットワークのイメージ。これを手掛かりに USP19 の細胞機能の解明に迫る。

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 4 件)

- ① Yogo, K., Tojima, H., Ohno, J.Y., Ogawa, T., Nakamura, N., Hirose, S., Takeya, T., & Kohsaka, T. (2012) Identification of SAMT family proteins as substrates of MARCH11 in mouse spermatids. *Histochem. Cell Biol.* 137, 53-65 査読あり
- ② Iyengar, P.V., Hirota, T., Hirose, S., & Nakamura, N. (2011) Membrane-associated RING-CH 10 (MARCH10) is a microtubule-associated E3 ubiquitin ligase of the spermatid flagella. *J. Biol. Chem.* 286, 39082-39090 査読あり
- ③ Nakamura, N. (2011) The role of the transmembrane RING finger proteins in cellular and organelle function. *Membranes* 1, 354-393 (総説) 査読あり
- ④ Saito, K., Nakamura, N., Ito, Y.,

Hoshijima, K., Esaki, M. Zhao, B., & Hirose, S. (2010) Identification of zebrafish FXYD11a protein that is highly expressed in ion-transporting epithelium of the gill and skin and its possible role in ion homeostasis. *Front. Physio.* 1, 129 査読あり

〔学会発表〕 (計 2 件)

① Nakamura, N. & Hirose, S. Regulation of expression of TEB4 (MARCH6) ubiquitin ligase by USP19 deubiquitinating enzyme. **第 63 回日本細胞生物学会大会** (札幌, 27 June, 2011) [口頭発表]

② Nakamura, N. Regulation of mitochondrial morphology by ubiquitination. *5th Conference of Korean Society for Mitochondrial Research and Medicine* (Daegu, Korea, 18 June, 2011) [招待講演]

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hirose.bio.titech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 信大 (NAKAMURA NOBUHIRO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授
研究者番号 : 80361765

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :