

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310160

研究課題名(和文) 活性動態の理解に基づいた脱ユビキチン化酵素の機能解明

研究課題名(英文) Biochemical and physiological studies on deubiquitinating enzymes based on an analysis of the enzymatic activity dynamics

研究代表者

服部 明 (Hattori, Akira)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50300893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ユビキチン鎖分解酵素である脱ユビキチン化酵素(DUB)の生理機能解明に資する新しい活性測定用基質および活性型酵素検出用プローブを作製した。さらに、作製したツールを用いて、これまでに活性検出が困難であったUSP47の活性測定に成功した。また、酸化ストレス応答性DUBとしてUbiquitin C-terminal hydrolase-L3を同定した。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modification of cellular proteins by ubiquitin (Ub) is involved in various aspects of cell physiology, such as protein degradation via proteasome, DNA repair, and membrane trafficking. Deubiquitinating enzymes liberate a Ub moiety from polyUb chains attached on substrate proteins. In the current study, we investigated novel research tools for the enzymatic characterization of deubiquitinating enzymes. Ub-granzyme B (Ub-GrB), an N-terminal Ub fusion mature granzyme B was expressed in a baculovirus system. By employing Ub-GrB, we showed that human ubiquitin specific protease 47 is active. In addition, we explored oxidative stress-sensitive deubiquitinating enzymes, and found that ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 is susceptible to reactive oxygen species by utilizing a Ub activity-based probe, Ub-vinyl sulfone.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ユビキチン 脱ユビキチン化酵素 activity-based probe 活性制御 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

脱ユビキチン化酵素 (DUB) はシステインプロテアーゼ 4 ファミリーと金属プロテアーゼ 1 ファミリーから構成され、ヒトでは約 100 種類存在する。各 DUB の様々な連結様式から成るユビキチン (Ub) 鎖に対する消化能および選択性などの詳細については未だ理解されていない。その一因として、DUB 活性測定に利用できる市販の基質が Ub に aminomethyl coumarin (AMC) をペプチド結合させた (Ub-AMC) のみであり、検討できる DUB の基質特異性に制限があることが挙げられる。そこで、新しい DUB 活性測定法ならびに検出法の構築が求められている。

2. 研究の目的

多種類存在する DUB のそれぞれの生理的役割の解明は進んでいない。そこで、DUB 活性を検出するための研究ツールの開発・活用を通じて、様々なストレス刺激などに対する細胞応答時の細胞内 DUB 活性の挙動を明らかにする。その後、特徴的な活性強度もしくは動態を示す DUB の分子同定を行い、その生理的意義を目指す。これら解析を通じて、将来、DUB 活性制御を標的とした創薬へと発展させるための分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

Activity-based probe 作製用の Ub タンパク質は、Intein との融合タンパク質として大腸菌発現系にて発現し、Ni²⁺-NTA カラムによって精製した。また、Ub とヒト成熟型 granzyme B との融合タンパク質 (Ub-GrB) およびヒト USP47 はバキュロウイルス発現系にて発現し、Ni²⁺-NTA カラムによって精製した。

DUB 活性の測定は、DUB と基質との反応によって遊離する AMC の量を蛍光プレートリーダーを用いて測定することにより行った。

ストレス刺激した HeLa 細胞は 0.5% Triton-X100 を含む低張バッファーに溶解し、遠心分離後の上清を細胞抽出液とした。HeLa 細胞抽出液を陰イオン交換カラム (MonoQ カラム) による分画を行った後、各画分に含まれる DUB 活性を測定した。

Ub activity-based probe による活性型 DUB の検出は、probe に付加した HA タグに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析により行った。

4. 研究成果

Ub をベースとした DUB に対する activity-based probe の作製を native chemical ligation 法によって行った。DUB の活性中心の Cys 残基と共有結合を形成しうる官能基を有するアミンを数種類合成し、これらをリコンビナントタンパク質技術を利用して別途調製した Ub(1-75 残基をコード) の C 末端へと付加した。種々の検討の結果、probe 調製における適切な条件ならびに

精製方法を確立した。すなわち、強アルカリ性で水分子の混入を最小限に抑えることで、目的の反応が定量的に進行することを見出した。

市販の DUB 基質 (Ub-AMC および LRGG-AMC) に加えて、我々が独自に作製した Ub-GrB を用いて、酸化ストレスや低酸素状態に曝した培養細胞株中の DUB 活性変化を解析した。その結果、3 基質に対する各分解活性は細胞ストレスの種類に応じて異なった感受性を示した。酸化ストレス刺激した際には、用いたすべての基質に対する分解活性が著しく低下することを見出した。そこで、まず、HeLa 細胞中の LRGG-AMC 分解活性が酸化ストレス刺激によって著しく低下することに着目し、酸化ストレス感受性 DUB の分子同定を行った。過酸化水素処理前および後の HeLa 細胞抽出液を MonoQ カラムで分画し、各画分に含まれる LRGG-AMC 分解活性を測定した。その結果、MonoQ カラムクロマトグラフィーの低塩濃度溶出画分に酸化ストレス感受性 DUB が含まれることが明らかとなった。次に、前年度作製した Ub activity based probe を用いて酸化ストレス感受性 DUB の分子同定を試みた結果、Western Blot 解析において probe との共有結合複合体と考えられるバンドが分子量約 37,000 に認められた。酸化ストレス処理後の細胞抽出液の MonoQ 溶出画分には、同じ分子量のバンドは存在しなかった。probe の分子量が約 10,000 であることから、本分子が UCH-L3 であることが強く示唆された。さらに、FLAG タグを付加した UCH-L3 を発現させた HeLa 細胞の細胞抽出液から免疫沈降によって回収した UCH-L3-FLAG の LRGG-AMC 分解活性を検討したところ、酸化ストレス刺激後の細胞から抽出した UCH-L3-FLAG には LRGG-AMC 分解活性が全く認められなかった。以上の結果から、UCH-L3 が酸化ストレス感受性 DUB であることが明らかとなり、老化などによる本酵素の活性低下が様々な疾患発症の原因になりうることを示唆された。

新規の DUB である Ubiquitin specific protease (USP) 47 の酵素学的性状解析を行った。その結果、本酵素は市販の DUB 基質に対しては弱い消化能を示したのみであったが、Ub-GrB に対しては高い Ub 遊離活性を示した。また、USP47 は Lys48 結合型および Lys63 結合型 Ub 鎖に対して高い Ub 遊離活性を示すことも見出した。USP47 の分子内には Ub 様 (Ubl) ドメインが 3 個存在する。USP7 などでは、分子内 Ubl ドメインが DUB 活性制御に重要な役割を担っていることが報告されていることから、USP47 の Ubl ドメインの酵素活性発現における役割について解析を行った。その結果、Ubl ドメインは USP47 の Ub 鎖消化能の発現に必要であることを見出した。

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 14 件)

1. Goto Y, Ogawa K, Nakamura TJ, Hattori A, Tsujimoto M. (2014) TLR-Mediated Secretion of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 from Macrophages. **J Immunol.** 192: 4443-4452 (査読有) 10.4049/jimmunol.1300935.
2. Ogawa Y, Ohnishi A, Goto Y, Sakuma Y, Watanabe J, Hattori A, Tsujimoto M. (2014) Role of glutamine-169 in the substrate recognition of human aminopeptidase B. **Biochim Biophys Acta** 1840: 1872-1881 (査読有) 10.1016/j.bbagen.2014.01.002
3. Hattori A, & Tsujimoto M. (2013) Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry, physiology and pathology. **J Biochem** 154: 219-228 (査読有) 10.1093/jb/mvt066
4. Ohno Y, Hattori A, Yoshiki T, & Takeya H. (2013) Association of epigenetic alterations in the human C7orf24 gene with the aberrant gene expression in malignant cells. **J Biochem** 154: 355-362 (査読有) 10.1093/jb/mvt063
5. Mizutani S, Tsunemi T, Mizutani E, Hattori A, Tsujimoto M, & Kobayashi H (2013) New insights into the role of aminopeptidases in the treatment for both preeclampsia and preterm labor. **Expert Opin Investig Drugs** 22:1425-1436 (査読有) 10.1517/13543784.2013.825248
6. Nagamoto Y, Hattori A, Takeya H, Takemoto Y, & Takasu K (2013) pH-sensitive DNA cleaving agents: in situ activation by ring contraction of benzo-fused cyclobutanol. **Chem Commun** 49: 262-264 (査読有) 10.1039/c3cc39246e.
7. Otsuki S, Nishimura S, Takabatake H, Nakajima K, Takasu Y, Yagura T, Sakai Y, Hattori A, & Takeya H (2013) Chemical tagging of a drug target using 5-sulfonyl tetrazole. **Bioorg Med Chem Lett** 23:1608-1611 (査読有) 10.1016/j.bmcl.2013.01.092.
8. Hattori A, Goto Y & Tsujimoto M (2012) Exon 10 coding sequence is important for endoplasmic reticulum retention of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. **Biol Pharm Bull** 35:601-605 (査読有) 10.1248/bpb.35.601
9. Ohno Y, Hattori A, & Takeya H (2012) C7orf24/gamma-glutamyl cyclotransferase as a molecular target for cancer chemotherapy. **Nihon Rinsho**, 70:723-727 (査読有)
10. Horie A, Fujiwara H, Sato Y, Suginami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I, & Hattori A (2012) Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. **Hum Reprod** 27: 1267-1276 (査読有) 10.1093/humrep/des068
11. Kishimoto S, Tsunematsu Y, Nishimura S, Hayashi Y, Hattori A, & Takeya H (2012) Tumescenamide C, an antimicrobial cyclic lipodepsipeptide from *Streptomyces* sp. **Tetrahedron** 68: 5572-5578 (査読有) 10.1016/j.tet.2012.04.075
12. Ohno Y, Hattori A, Ueda M, Kageyama S, Yoshiki T, & Takeya H (2011) Multiple NF-Y-binding CCAAT boxes are essential for transcriptional regulation of the human C7orf24 gene, a novel tumor-associated gene. **FEBS J** 278: 4088-4099 (査読有) 10.1111/j.1742-4658.2011.08314.x.
13. Goto Y, Ogawa K, Hattori A, & Tsujimoto M (2011) Secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 is involved in the activation of macrophages induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma. **J Biol Chem** 286: 21906-21914 (査読有) 10.1074/jbc.M111.239111.
14. Goto Y, Yoshioka R, Arisaka N, Hattori A, & Tsujimoto M (2011) Involvement of glutamine-238 in the substrate specificity of human laeverin/aminopeptidase Q. **Biol Pharm Bull** 34: 24-27 (査読有) 10.1248/bpb.34.24

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 脱ユビキチン化酵素(USP)47 の分子内ドメインの機能解析
青木 豊, 朴 錦花, 小林万祐子, 服部明, 掛谷秀昭
日本薬学会 134 年会 平成 26 年 3 月 27 日~30 日 熊本大学(熊本県)
2. 脱 Urm1 化活性の検出および分子同定
小林万祐子, 服部明, 青木 豊, 掛谷秀昭
日本薬学会 134 年会 平成 26 年 3 月 27 日~30 日 熊本大学(熊本県)
3. 脱ユビキチン化酵素(USP)47 の活性発現機構の解析
朴 錦花, 服部明, 青木 豊, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
日本薬学会第 133 年会 平成 25 年 3 月 27 日~30 日 パシフィコ横浜(神奈川県)
4. 脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 は酸化ストレスの標的タンパク質である
服部明, 西川未来子, 朴 錦花, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
第 85 回日本生化学会 平成 24 年 12 月 14 日~16 日 福岡国際会議場(福岡県)
5. 脱ユビキチン化酵素(USP)47 の活性発現における分子内ユビキチン様ドメインの役割
朴 錦花, 服部明, 青木 豊, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
第 85 回日本生化学会 平成 24 年 12 月 14 日~16 日 福岡国際会議場(福岡県)
6. Activity-based Profiling による酸化ストレス感受性脱ユビキチン化酵素の同定
服部明, 西川未来子, 朴 錦花, 小林万祐子, 森吉英子, 掛谷秀昭
日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会 平成 24 年 6 月 7 日~9 日 京都大学(京都府)
7. Enzymatic properties of recombinant human ubiquitin specific protease 47
朴 錦花, 田代亜衣香, 西川未来子, 森吉英子, 服部明, 掛谷秀昭
Organization for Oncology and Translational Research (OOTR) 8th Annual Meeting 平成 24 年 4 月 20・21 日 ウェスティン都ホテル(京都府)
8. 脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 は酸化ストレス下で不活性化される
西川未来子, 小林万祐子, 朴 錦花, 森吉英子, 服部明, 掛谷秀昭.

日本薬学会第 132 年会 平成 24 年 3 月 30 日 北海道大学(北海道)

9. ヒト USP47 の脱ユビキチン化酵素活性の解析
朴 錦花, 田代亜衣香, 西川未来子, 森吉英子, 服部明, 掛谷秀昭
日本薬学会第 132 年会 平成 24 年 3 月 30 日 北海道大学(北海道)
10. Characterization of enzymatic properties of recombinant human specific protease 47
Hattori, A., Tashiro, A., Piao, J.-H., Moriyoshi, E., Kakeya, H.
7th General Meeting of the International Proteolysis Society 平成 23 年 10 月 18 日 San Diego, USA
11. ヒト C7orf24 の遺伝子発現は、転写開始点近傍の 3ヶ所の CCAAT 配列に制御される
大野裕司, 服部明, 上田正道, 影山進, 吉貴達寛, 掛谷秀昭
第 84 回日本生化学会大 平成 23 年 9 月 23 日 国立京都国際会館(京都府)
12. グランザイム B をレポーターに用いた脱ユビキチン化酵素活性測定法の構築
服部明, 朴 錦花, 田代亜衣香, 森吉英子, 掛谷秀昭
第 84 回日本生化学会大 平成 23 年 9 月 23 日 国立京都国際会館(京都府)

〔図書〕(計 1 件)

1. Hattori A, Maruyama M, Fujiwara H, & Tsujimoto M (2013) Aminopeptidase Q/Laeberin. **in Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed** 442-444 (査読有)
10.1016.B978-0-12.382219-2-00089-2

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部明 (HATTORI AKIRA)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号: 50300893

(2)研究分担者

大石真也 (OISHI SHINYA)
京都大学・薬学研究科・講師
研究者番号: 80381739

藤原 浩 (FUJIWARA HIROSHI)
金沢大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30252456

井上英史 (INOUE HIDESHI)
東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：20184765

丸山正人 (MARUYAMA MASATO)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：00399445

(3)連携研究者

西村慎一 (NISHIMURA SHINICHI)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号：30415260