

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23791591

研究課題名（和文）

細胞分裂因子USP54スプライシングバリエントによるグリオーマ悪性化機構の解明

研究課題名（英文）

Characterization of USP54 and its splicing variant in glioblastoma cells

研究代表者

長谷川 仁紀 (HASEGAWA HITOKI)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：10454381

研究成果の概要（和文）：

脱ユビキチン化酵素である USP54 が細胞分裂期にリン酸化されることを見出した。また、USP54 は CYS 領域を介して、YWHAE タンパク質と結合して細胞間に局在することを明らかにした。また、細胞間における USP54 は ZO-1 の安定的な発現に寄与することで細胞間接着において重要な役割を果たすことを見出した。また、グリオーマ細胞株において新たなバリエントを同定し、それが細胞の形態、分裂に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We found that USP54 was phosphorylated during mitotic phase. USP54 is localized at cell-cell junction, which is dependent on an association with YWHAE protein. USP54 stabilize ZO-1 protein expression and has important role in cell-cell junction. We identified splicing variant of USP54, whose expression induced aberrant cell morphology and mitosis in glioblastoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：グリオーマ、細胞分裂、細胞周期、脱ユビキチン化酵素

1. 研究開始当初の背景

グリオーマはそれが持つ高い浸潤能と増殖能により、それに対する治療は困難を極める。外科的手法による治療が現在多く行われているものの、根治は不可能であり、化学療法を含め、その治療法は未だ確立されていない。新たな治療法開発のために、多くの研究が行われており、悪性化のメカニズムが少しずつ明らかになってきている。たとえば、一部のグリオーマでは細胞外ドメイン欠失変異 EGFRvIII が悪性化を誘導し、高い増殖能と浸潤能をもたらすことが明らかとなってい

る。このような異常なスプライシングバリエントの存在が注目されており、エクソンアレイなどによってその詳細が次々に明らかになりつつある。その中の一つに脱ユビキチン化酵素タンパク質である USP54 がある。USP54 は CYS、QQD、His 領域からなる脱ユビキチン活性領域 (UCH domain) と ESCRT タンパク質である CHMP と結合する MIT 領域から構成されるタンパク質であるが、その詳細は全く明らかとなっていない。当初、我々は発現抑制によって分裂異常を誘導する遺伝子として注目し、解析を進めていた。一方で、グリオーマにおいて USP54 の

異常なバリエーションの存在が明らかとなった。我々は細胞分裂に重要なタンパク質である USP54 がグリオーマの悪性化に何らかの影響を与えている可能性を推測した。そこで、まず未知のタンパク質である USP54 の詳細な機能解析を行い、それに基づいてグリオーマにおける異常なバリエーションの存在とその悪性化に及ぼす影響について解析を進めることとした。

2. 研究の目的

USP54 タンパク質の細胞内における機能を解析する。また、グリオーマにおける USP54 の異常なバリエーションの発現とその悪性化の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

今回、我々はグリオーマ細胞株として、U87、U251MG、U251nu/nu、SKMG1、A02、T98 を用いた。またその他に、ヒト正常乳腺上皮細胞株 MCF10A、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞をそれぞれ用いた。

(2) ウイルスを用いた細胞株の作製

GFP を融合した USP54 蛋白質を発現する細胞株などはレトロウイルスを用いて作製した。GFP タグを付けたレトロウイルスベクターに USP54 遺伝子を導入し、GAG、Pol 遺伝子とともに 293 細胞に一過性に導入して、ウイルスを作製する。ウイルス産生後、ウイルスを含む培養液を細胞にかけて感染させる。その後、各抗生物質により、発現細胞をセレクトし、細胞株として樹立した。

(3) siRNA を用いた実験

USP54 の機能を解析するために、siRNA を用いて USP54 の発現を抑制した。siRNA の設計はライフテクノロジー社、もしくは siDIRECT により特異性の高いものを設計した。siRNA はライフテクノロジー社より購入した Lipofectamine2000 を使用して各細胞内に導入した。細胞に導入後、約 48 時間から 72 時間以内に各実験系に用いた。

(4) 浸潤能の解析

癌細胞の浸潤能を解析するために、マトリゲルコートしたフィルターを装着したボイデンチャンバーを用いた。チャンバーに装着されたポアを有するフィルターに一定濃度のマトリゲルをコートし、24 穴の細胞培養用プレートにセットして用いる。チャンバー上室に癌細胞を重層し、チャンバー下室にファイブロネクチンなどの ECM 成分や自己分泌型運動因子などのケモアトラクタントを含む

培養液を入れる。一定時間培養し、マトリゲルを浸潤し、フィルター下面に移動した癌細胞の数を計測することで浸潤能を定量化する。

(5) 結合実験

USP54 タンパク質との結合を明らかにするために、さまざまな deletion mutant を作成し、それらのタンパク質を細胞内で発現させて、免疫沈降を行った。その後、ウェスタンブロットにより、各タンパク質との結合を明らかにした。

(6) 免疫染色、タイムラプスによる細胞内局在の観察

USP54 の機能を解析するために、GFP と融合した USP54 タンパク質を恒常的に発現する細胞株を作製した。その細胞株を用いて、免疫染色、タイムラプス実験に用いた。オリンパス蛍光顕微鏡 IX81 に培養装置を取り付け、生細胞における GFP-USP54 タンパク質の局在を観察した。さらに、USP54 タンパク質の機能を解析するために、局在に必要な領域の特定を行った。USP54 の deletion mutant を発現する細胞株を作製し、タイムラプスによりその局在の変化を観察した。また細胞をパラホルムアルデヒドにより固定し、他のタンパク質を抗原とする抗体により細胞を免疫染色した。これにより GFP-USP54 タンパク質と共局在するタンパク質の同定を行った。

(7) 細胞分裂期におけるリン酸化レベルの解析

細胞分裂における USP54 の解析は HeLa 細胞を主に用いた。各分裂期の解析のために、HeLa 細胞をノコダゾールにより 12 時間処理してプロメタフェーズにアレストする。その後、マイトティックシェイクオフにより分裂期にある細胞だけを回収してノコダゾールを除去する。その後、各細胞分裂期ごとに細胞を回収し、解析を行う。また分裂期におけるタンパク質の局在を解析する場合も同様に、ノコダゾール処理した細胞をマイトティックシェイクオフし、それをポリリジンコートしたガラス上にまく。各分裂期ごとにガラス上の細胞を固定し、免疫染色により各タンパク質の局在を解析する。

(8) RT-PCR 実験

各臨床サンプル、各細胞株における USP54 遺伝子の発現を確認するために RT-PCR を用いた。まず各サンプルより、RNA を抽出し、逆転写により cDNA を作製する。その一方で、目的とする遺伝子に対するプライマーを作製し、各サンプルの cDNA をテンプレートとして PCR を行う。cDNA に含まれる標的遺伝子の量により、PCR で増幅される遺伝子も相対

的に増加することから、PCR産物をゲルにより確認し、バンドの強度から定量化を行う。

(9) ヒト悪性グリオーマ臨床サンプルの解析

各サンプルより抽出したRNAをもとに、逆転写によってcDNAを作製する。各cDNAをテンプレートにしてPCR法により、目的とする遺伝子を増幅する。定量化は、PCRにより増幅した遺伝子の量をゲルに流して、得られたバンドの強度から測定する。

4. 研究成果

(1) USP54の機能解析

USP54の細胞内における機能を解析するために、siRNAによる発現抑制とそれによる表現形の観察を行った。siRNAを細胞に導入し、そのタンパク質の発現をウェスタンブロットによって調べた結果、設計したsiRNAすべてにおいて発現の抑制が見られた。次に発現抑制した細胞における表現形を観察するために、siRNAを導入した細胞の免疫染色を行った。それにより見られた表現形として、多核を形成する細胞が多くみられるようになった。また、細胞間接着が消失した等が見受けられた。この表現形を参考に、USP54の細胞内機能を推測すると、細胞分裂と細胞間接着において何らかの制御を行っているのではと推測された。

次にUSP54タンパク質の細胞内における局在を明らかにした。GFP融合タンパク質としてUSP54を発現する細胞株を作製し、その細胞内における局在をタイムラプスにより観察した。その結果、USP54は細胞間に点状に局在し、細胞の動きに合わせて、細胞同士が接着すると点状に集積し、細胞同士が離れると局在が消失することが分かった。さらに解析を進めるため、この局在に重要なUSP54タンパク質の領域を特定することを試みた。deletion mutantを作成し、その局在をそれぞれ確認した結果、CYS領域がこの局在に重要であることを明らかにした。また、免疫染色により他の細胞間接着因子との共局在を確認した。その結果、USP54はZO-1タンパク質と共局在することが明らかとなった。一方で細胞分裂期におけるUSP54の局在を確認したが、顕著な局在は見られなかった。

(2) USP54結合タンパク質の解析

USP54の結合蛋白質を同定するためにイーストツーハイブリッド法を用いた。その結果、YWHAEタンパク質が結合タンパク質であることを同定した。この結合はGSTプルダウン法や293細胞を使った強制発現系においても同様に確認された。また、YWHAEタンパク質との結合に重要なUSP54の領域を特定するため

にdeletion mutantによる結合実験を行った。その結果、USP54のCYS領域が重要であることを明らかにした。これはUSP54が細胞間に局在するために重要な領域であることから、USP54はYWHAEを介して、細胞間に接着するものと考えられる。また、YWHAEタンパク質の細胞内における発現を調べた結果、USP54と共局在することも明らかにした。

(3) 細胞間接着におけるUSP54タンパク質の働き

USP54の細胞内における局在を調べた結果、細胞間に点状に局在することが分かった。さらなる解析の結果、これは多くの細胞間接着分子の中でもZO-1とはっきり共局在することが分かった。そこで、USP54とZO-1の細胞内における詳細な関係を明らかにしようと試みた。まず、両者が直接結合するかどうかを免疫沈降法により確認したが、結合している事実は得られなかった。一方で、USP54を発現抑制した場合、細胞間接着が著しく減少することから、ZO-1の発現に影響があるのではないかと推測した。そこで、MCF10A細胞を用いて、USP54を発現抑制した場合におけるZO-1ならびに他の細胞間接着因子の発現レベルをウェスタンブロッティング法により確認した。その結果、ZO-1のみがUSP54の発現抑制と共に発現が減少することが分かった。また、USP54の発現を抑制した細胞におけるZO-1の局在を免疫染色により明らかにした。その結果、細胞間に均一に局在していたZO-1が不均一に局在するようになった。これはZO-1の発現の減少により強固な細胞間接着が崩壊し、細胞間の境が乱れたためによるものと考えられる。

以上より、USP54がZO-1の発現の安定化に重要な役割を担っているのではないかと推測される。細胞間接着、特に強固な結合を担うタイトジャンクションの主要構成因子であるZO-1の恒常的な発現は組織を守る上でも非常に重要である。それらのタンパク質が容易に分解されないためにUSP54が機能しているのではないだろうか推測される。

(4) 分裂期におけるUSP54タンパク質のリン酸化

細胞分裂期における脱ユビキチン化酵素の機能の重要性は既に明らかとなっている。たとえば、USP16はヒストンH2Aの脱ユビキチン化に、またUSP39はスピンドルチェックポイントの活性化に必要であるということがすでに報告されている。

そこで、発現抑制によって細胞分裂異常が誘導されるUSP54も同様に分裂期における機能があるのではないかと推測された。まず分裂期における内在性USP54タンパク質の発現を調べた。その結果、発現そのものには変化

が見られないものの、分裂期特異的にバンドがシフトすることが明らかとなった。このバンドシフトはフォスファターゼ処理により消失することから、USP54 が分裂期特異的にリン酸化されることが明らかとなった。

現在まで数多くの細胞分裂制御因子が報告されており、これらに共通することは分裂期特異的にリン酸化され、それによって分裂期に重要な役割を果たしているということである。よって、USP54 も同様に分裂期特異的な機能を持つものと考えられるが、現在さらなる解析を進めているところである。

(5) USP54 バリエーションの特定

USP54 抗体を作製し、内在性 USP54 タンパク質の同定を行った。その結果、USP54 はほとんどの細胞株において発現が認められた。一方で、各細胞株によって本来認められる内在性 USP54 タンパク質のバンドの上にさらにバンドが認められた。各細胞株によって、発現が認められるものの、それぞれの発現量は異なっていた。このバンドが USP54 のバリエーションであることを証明するために、USP54 遺伝子の 3' UTR を標的とする siRNA を作製して、細胞に導入した。その結果、両方のバンドが消失することから、USP54 のバリエーションであると推測された。約 220kD に存在するバリエーション 1 と 250kD に存在するバリエーション 2 タンパク質を調べると、250kD のバリエーション 2 にはエクソン 7 と 8 の間にさらにエクソンが挿入されていることが分かった。各細胞株とこのバリエーションの発現を調べた結果、相対的にバリエーション 2 を多く発現する細胞株において細胞の形態が広がっており、また細胞間接着が見られない傾向が観察された。また発現とともに、核形の異常が見られることも同様に観察された。このことは、バリエーション 2 の発現が少なからず細胞内における USP54 の機能に影響を与えているのではないかと推測された。

さらにバリエーションの機能を明確にするために、各バリエーションを強制発現した細胞株の作製を行った。その結果、バリエーション 1 でははっきりとした表現形は全く見られなかったものの、バリエーション 2 では細胞の形態が若干変化し、細胞間接着の減少が見られた。また重要な点として、継代を繰り返すうちに核形に異常を持つ細胞が見受けられるようになった。これは分裂時に何らかの異常が生じたものと推測される。

さらに各タンパク質を強制発現させた細胞株において、浸潤能や増殖能に大きな影響があるかどうかを検討した。その結果、著しい変化は見受けられなかった。

以上より、異常なバリエーションの発現により、細胞形態、細胞間接着やその細胞分裂に影響は出るものの、悪性度に大きな影響を与える

ものではないと推測される。ただ、過去に報告があるように、分裂による異常によって染色体の不安定化が引き起こされ、悪性化することが知られている。よって、長期的にみると悪性化の進展に影響を与える可能性は十分にあると推測している。

(6) 臨床サンプルにおけるバリエーションの発現レベルの解析

以上の結果を受けて、USP54 の発現を各臨床サンプルにおいて解析を行った。各バリエーションの発現レベルを RT-PCR によりそれぞれ確認したところ、バリエーションの発現と悪性度のレベルにおいて、強い因果関係は認められなかった。

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 3 件)

(1) Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Yoshikawa N, Hyodo T, Asano E, Hasegawa H, Maeda M, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Senga T. ALX1 induces snail expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2013 Mar 1;73(5):1581-90. 査読あり

(2) Takaoka Y, Shimizu Y, Hasegawa H, Ouchi Y, Qiao S, Nagahara M, Ichihara M, Lee JD, Adachi K, Hamaguchi M, Iwamoto T. Forced expression of miR-143 represses ERK5/c-Myc and p68/p72 signaling in concert with miR-145 in gut tumors of Apc (Min) mice. *PLoS One.* 2012;7(8):e42137. 査読あり

(3) Hyodo T, Ito S, Hasegawa H, Asano E, Maeda M, Urano T, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. Misshapen-like kinase 1 (MINK1) is a novel component of striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) and is required for the completion of cytokinesis. *J Biol Chem.* 2012 Jul 20;287(30):25019-29. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

(1) 発表者 長谷川仁紀、千賀威
発表題名 PLK1 controls cytokinetic furrowing through phosphorylation of an actin/myosin binding protein, supervillin
学会名 分子生物学会
発表年月日 2012年12月11日
発表場所 神戸

(2) 発表者 兵頭寿典、長谷川仁紀、千賀威

発表題名 Misshapen-like kinase 1 (MINK1) is a novel component of striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) and is required for the completion of cytokinesis.

学会名 分子生物学会

発表年月日 2012年12月11日

発表場所 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 仁紀 (HASEGAWA HITOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員

研究者番号：10454381

