

## 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：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370068

研究課題名（和文） 脱ユビキチン化酵素による細胞機能の制御メカニズム

研究課題名（英文） Regulation of cell functions by deubiquitinating enzymes

研究代表者

駒田 雅之（KOMADA MASAYUKI）

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：10225568

研究成果の概要（和文）：1）脱ユビキチン化酵素USP18が内在性のユビキチン化された変性タンパク質を凝集させアグリソームの形成を誘導したことから、USP18が変性タンパク質の毒性から細胞を守る因子であることが示唆された。2）核小体でリボソーム生合成を制御する脱ユビキチン化酵素USP36の核小体局在化配列に結合する低分子化合物を同定し、それらがUSP36の核小体への局在化と脱ユビキチン化機能を阻害することを培養細胞レベルで見出した。3）脱ユビキチン化酵素USP37が自身のもつユビキチン結合配列UIMを介して基質となるユビキチン鎖に結合し、基質を酵素活性中心近傍につなぎ止めることにより、USP37の酵素活性の上昇に寄与することを見出した。

研究成果の概要（英文）：1) Deubiquitinating enzyme USP18 was implicated in the protection of cells from the toxicity of non-native defective proteins by sequestering them to the aggresome in human cells. 2) Small molecules that bind to the nucleolar localization signal of deubiquitinating enzyme USP36 were identified and were shown to inhibit the nucleolar localization as well as the function of USP36 in human cells. 3) The ubiquitin-interacting motifs (UIMs) in USP37 were shown to play a role in increasing the isopeptidase activity of USP37 toward ubiquitin chains by binding to the ubiquitin chains and stably positioning them in close proximity to the catalytic core of USP37.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			0
年度			0
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン化はプロテアソームでの分解をはじめ、細胞内でタンパク質の運命や機能を様々に調節する翻訳後修飾である。ユビキ

チン化は不可逆的なタンパク質制御機構ではなく、拮抗する脱ユビキチン化反応が存在する。ヒトゲノムには約90種類の脱ユビキチン化酵素がコードされ、これらの酵素によ

ってユビキチン化による多様なタンパク質の制御が負に調節されていること、すなわちタンパク質の制御がユビキチン化と脱ユビキチン化のバランスによって調節されていることが次々と解明され、細胞機能の発現における脱ユビキチン化の重要性が強く認識されてきている。

## 2. 研究の目的

約 90 種類のヒト脱ユビキチン化酵素の中には機能未解明のものもまだ数多く残されている。したがって、脱ユビキチン化による細胞機能の制御機構の全貌を解明するためには、それらの機能を一つ一つ解明していくことが不可欠である。そこで本研究では、解析のなされていない多様な脱ユビキチン化酵素の機能を新たに解明することにより、脱ユビキチン化による細胞機能制御の全貌解明に貢献することを目的とした。

## 3. 研究の方法

機能未解明のヒト脱ユビキチン化酵素 USP18、USP36、USP37 について、以下の方法で解析を行った。

### (1) USP18 によるアグリソーム形成誘導機構の解析

変性タンパク質は細胞毒性を有するため、細胞内に大量の変性タンパク質が生じてそれらのプロテアソーム分解が滞った場合、細胞はそれらのタンパク質からなる凝集体を微小管形成中心に形成誘導することにより、変性タンパク質の毒性を回避する。このタンパク質凝集体はアグリソームと呼ばれている。

本研究では、脱ユビキチン化酵素 USP18 を発現させたヒト培養細胞において細胞質に誘導されるアグリソームの生化学的な性状とその形成誘導機構を解析した。

### (2) USP36 の機能を阻害する低分子化合物の探索とその作用の解析

USP36 は核小体に局在する脱ユビキチン化酵素であり、核小体においてリボソーム生合成に関与するタンパク質群を脱ユビキチン化してそれらのユビキチン化依存的プロテアソーム分解を抑制することにより、リボソーム生合成レベルを上昇させる働きをもっている。

がん細胞は正常細胞よりも旺盛に分裂増殖を行っているため、高いタンパク質合成能、すなわちリボソーム生合成能が必要となると考えられる。したがって、がん細胞において USP36 の機能を阻害してリボソーム生合成能を低下させることにより、その細胞増殖を抑えることが期待できる。事実、ヒトがん細胞株において RNA 干渉法で USP36 の発現

を阻害すると、その増殖が著しく抑制されることがわかっている。

そこで本研究では、細胞増殖の阻害剤の新規開拓を目的とし、化合物アレイを用いて USP36 の核小体局在化配列に結合する低分子化合物のスクリーニングを行った。そして同定された化合物を細胞培養液に添加することにより、それらの化合物が USP36 の機能に及ぼす効果を細胞レベルで解析した。

### (3) USP37 におけるユビキチン結合配列の意義の解析

ヒトゲノムには脱ユビキチン化酵素が約 90 種類コードされている。その中で、3 つの酵素 (USP25, USP28, USP37) だけがユビキチン結合配列 UIM (ubiquitin-interacting motif) をもつが、それらの役割は不明であった。

そこで本研究では、USP37 に存在する UIM が USP37 の機能に果たす役割の解析を行った。そのために、USP37 に存在する 3 つの UIM のそれぞれ ( $\Delta$ UIM1、 $\Delta$ UIM2、 $\Delta$ UIM3)、あるいはすべて ( $\Delta$ UIM1+2+3) に変異を導入し、それら変異体のユビキチン結合能、細胞内局在、脱ユビキチン化酵素活性などを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) USP18 によるアグリソーム形成誘導機構の解析

脱ユビキチン化酵素 USP18 をヒト培養細胞に発現させると、正常細胞には見られない構造体が核近傍に形成した (図 1A-A')。この構造体はビメンチン中間系フィラメントに覆われた直径~100 nm の粒子状構造の凝集体で (図 1B)、微小管形成中心に局在したことからアグリソームであることが明らかとなった。

この USP18 誘導性のアグリソームは、1) 内在性のユビキチン化タンパク質を多く含むこと、2) 細胞内の変性タンパク質の量を増加させる高温処理やプロテアソーム阻害によりその数が増加すること、3) 凝集性のモデルタンパク質を含むこと、などから、確かに変性タンパク質からなる構造体であることが示された。

また、USP18 誘導性アグリソームは USP18 の酵素活性欠失体によっても誘導されたことから、その脱ユビキチン化酵素活性には依存しないと考えられた。一方、USP18 の N 末端欠失体、C 末端欠失体はそれぞれ異なるアグリソーム形成異常を呈した。

以上の結果から、USP18 がアグリソームの形成を誘導することにより変性タンパク質の毒性から細胞を守る因子であること、そしてそのために USP18 の異なる領域がそれぞれ固有の働きを担っていることが示唆された (Kozawa *et al.*, submitted)。

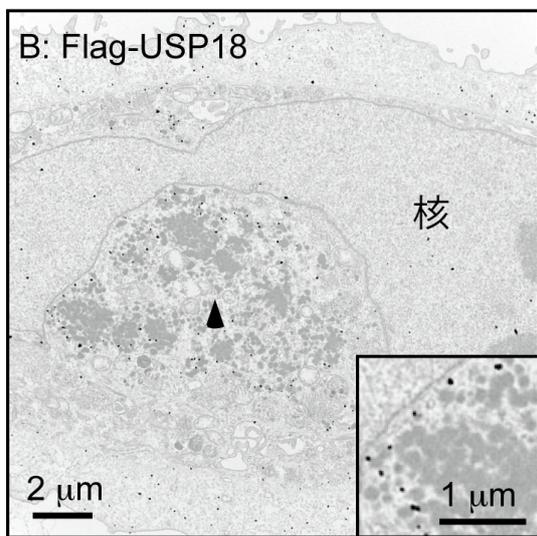
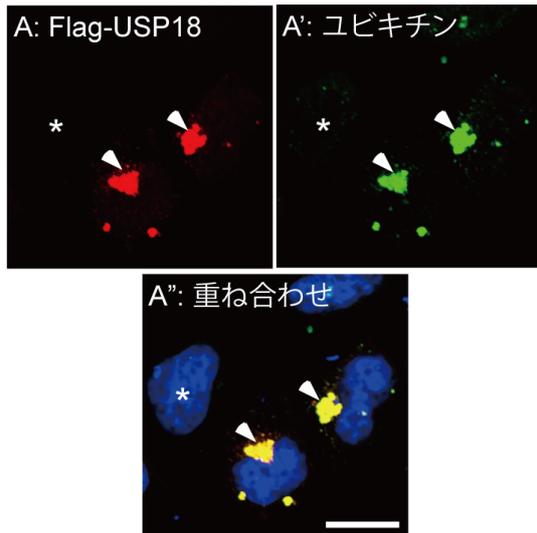


図1. FlagタグをつけたUSP18を発現させたヒト培養細胞の抗Flag抗体(A)+抗ユビキチン抗体(A')による免疫蛍光染色(A-A')と、抗ユビキチン抗体による免疫電子顕微鏡観察(B)。矢じり:USP18誘導性アグリソーム。

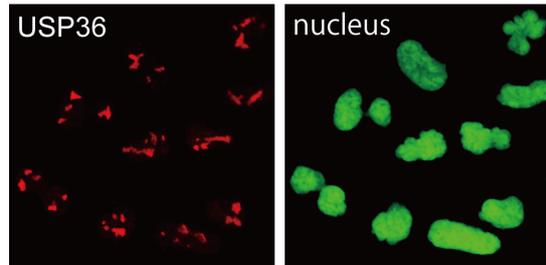
(2) USP36の機能を阻害する低分子化合物の探索とその作用の解析

USP36の核小体局在化配列(16アミノ酸からなる、塩基性アミノ酸に富んだ配列)を化学合成し、6,912種類の低分子化合物を固定化した基板(化合物アレイ)とインキュベートすることにより、USP36の核小体局在化配列に結合する化合物のスクリーニングを行った(理化学研究所・ケミカルバイオロジー研究基盤施設との共同研究)。その結果、33種類の化合物が同定された。

そこで、それぞれの化合物をヒト培養細胞の培養液に添加し、USP36の核小体局在に及ぼす効果を検討した。その結果、3種類の化合物の添加によりUSP36の核小体局在レベルが低下することがわかった(図2はその1つの例)。さらにそのうちの1つの化合物 #1

の添加により、1)核小体におけるタンパク質ユビキチン化レベルの著しい上昇、および2)細胞増殖の著しい抑制が観察された。以上の結果は、化合物 #1 が核小体におけるUSP36の脱ユビキチン化酵素活性を阻害してリボソーム生合成を抑制することにより、細胞増殖の阻害剤として働き得ることを示唆している。

無添加



化合物 #1 添加

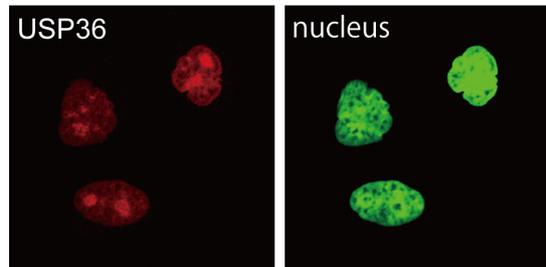


図2. 化合物 #1の添加により、USP36が核小体から核質に漏出する

(3) USP37におけるユビキチン結合配列の役割の解析

USP37の $\Delta$ UIM1変異体は野生型USP37と同レベルにユビキチンと結合したが、C末端側の2つのUIMそれぞれの変異体( $\Delta$ UIM2、 $\Delta$ UIM3)ではいずれもユビキチン結合能が著しく低下していた。したがって、UIM2とUIM3がUSP37のユビキチン結合に重要な役割を果たすことが明らかとなった。UIM2とUIM3はまた、USP37自身のユビキチン化にもじゅうようであることが明らかとなった。一方で、3つのUIMすべてに変異を導入した $\Delta$ UIM1+2+3でも野生型USP37と同様の核局在を示したことから、UIMはUSP37の核局在には必要でないことが示された。最後に、 $\Delta$ UIM2、 $\Delta$ UIM3変異体では野生型USP37よりユビキチン鎖切断活性が低下し、 $\Delta$ UIM1+2+3においてその低下レベルは最大となった。

以上の結果から、USP37においてUIM2とUIM3が基質となるユビキチン鎖を酵素活性中心の近傍につなぎ止めることにより、酵素活性を上昇させる働きをもつことが示唆された(図3、Tanno *et al.*, manuscript in preparation)

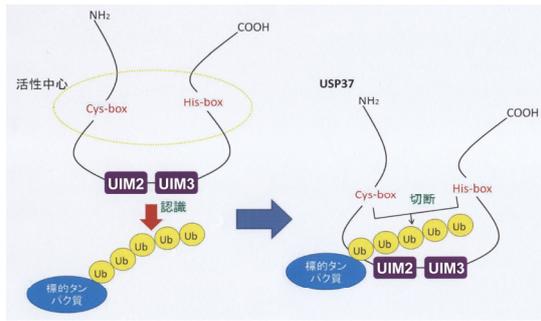


図3. UIMがUSP37の脱ユビキチン化酵素活性を上昇させるメカニズム(モデル)

## 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 18 件)

1. Li, X, Mr. Bian, Y., Takizawa, Y., Hashimoto, T., Ikoma, T., Dr. Tanaka, J., Kitamura, N., Inagaki, Y., Komada, M., and Tanaka, T. (2013) ERK-dependent down-regulation of Skp2 reduces Myc activity with HGF, leading to inhibition of cell proliferation through a decrease in Id1 expression. **Mol. Cancer Res.**, in press. (査読有)
2. Le Bras, B., Fréal, A., Czarnecki, A., Legendre, P., Bullier, E., Komada, M., Brophy, P.J., Davenne, M., and Couraud, F. (2013) In vivo assembly of the axon initial segment in motor neurons. **Brain Struct. Funct.**, doi:10.1007/s00429-013-0578-7. (査読有)
3. Tanno, H. and Komada, M. (2013) The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway. **J. Biochem.** 153, 497-504. (査読有)
4. Terada, N., Saitoh, Y., Ohno, N., Komada, M., Yamauchi, J., and Ohno, S. (2013) Involvement of Src in the membrane skeletal complex, MPP6-4.1G, in Schmidt-Lanterman incisures of mouse myelinated nerve fibers in PNS. **Histochem. Cell Biol.**, doi:10.1007/s00418-012-1073-6. (査読有)
5. Daocharad Burana, 後藤聡, 駒田雅之 (2013) ユビキチン化によるFrizzledのリソソーム分解を介したWntシグナル強度の制御. **細胞工学 特集「Wnt協奏曲」** 32, 396-400. (査読無)
6. Mukai, A., Yamamoto-Hino, M., Komada, M., Okano, H., and Goto, S. (2012) Balanced ubiquitination determines cellular responsiveness to extracellular stimuli. **Cell. Mol. Life Sci.** 69, 4007-4016. (査読有)
7. Tanno, H., Yamaguchi, T., Goto, E., Ishido, S., and Komada, M. (2012) The Ankrd 13 family of UIM-bearing proteins regulates EGF receptor endocytosis from the plasma membrane. **Mol. Biol. Cell** 23, 1343-1353. (査読有)
8. Terada, N., Saitoh, Y., Ohno, N., Komada, M., Saitoh, S., Peles, E., and Ohno, S. (2012) Essential function of protein 4.1G in targeting of MPP6 into Schmidt-Lanterman incisures in myelinated nerves. **Mol. Cell. Biol.** 32, 199-205. (査読有)
9. Denda, K., Nakao-Wakabayashi, K., Okamoto, N., Kitamura, N., Ryu, J.-Y., Tagawa, Y., Ichisaka, T., Yamanaka, S., and Komada, M. (2011) Nr1, an X-linked protein kinase in the germinal center kinase family, is required for placental development and fetoplacental induction of labor. **J. Biol. Chem.** 286, 28802-28810. (査読有)
10. Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A., and Matsumoto, K. (2011) Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. **Nature Commun.** 2, 158. (査読有)
11. 駒田雅之 (2011) ユビキチン化による核小体の構造と機能の制御. **生体の科学 特集「細胞核 - 構造と機能」** 62, 422-423. (査読無)
12. Mukai, A., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Watanabe, W., Komada, M., and Goto, S. (\*co-correspondence) (2010) Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wg/Wnt. **EMBO J.** 29, 2114-2125. (査読有)
13. Saito, H., Tohyama, J., Kumada, T., Egawa, K., Hamada, K., Okada, I., Mizuguchi, T., Osaka, H., Miyata, R., Furukawa, T., Haginoya, K., Hoshino, H., Goto, T., Hachiya, Y., Yamagata, T., Saitoh, S., Nagai, T., Nishiyama, K., Nishimura, A., Miyake, N., Komada, M., Hayashi, K., Hirai, S., Ogata, K., Kato, M., Fukuda, A., and Matsumoto, N. (2010) Dominant-negative mutations in  $\alpha$ -II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. **Am. J. Hum. Genet.** 86, 881-891. (査読有)
14. Howell, O.W., Rundle, J.L., Garg, A., Komada, M., Brophy, P.J., and Reynolds, R. (2010) Activated microglia mediate axo-glial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 69, 1017-1033. (査読有)
15. Terada, N., Ohno, N., Saitoh, S., Saitoh, Y., Komada, M., Kubota, H., and Ohno, S. (2010) Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell

interaction. **Reproduction** 139, 883-892. (査読有)

16. 駒田雅之、後藤聡 (2010) 受容体のユビキチン化と脱ユビキチン化を介した細胞のWnt応答性の制御. **細胞工学** 特集「拡大するユビキチンバイオロジー」 29, 1237-1243. (査読無)
17. 駒田雅之、遠藤彬則 (2010) 脱ユビキチン化酵素群の細胞機能. **生化学** (総説), 82, 378-387. (査読有)
18. 駒田雅之 (2010) 軸索に特異的なスペクトリン細胞膜骨格の機能. **生体の科学** 特集「シナプスをめぐるシグナリング」 61, 498-499. (査読無)

[学会発表] (計 16 件)

1. 駒田雅之「タイトル未定」第 36 回 日本分子生物学会大会・ワークショップ - ER・Post-ER における膜プロテオスタシスネットワーク研究の新展開 2013 年 12 月 3-6 日 (神戸国際会議場、神戸) (発表確定)
2. 駒田雅之「Roles of the Ankrd13 family of ubiquitin-binding proteins in the endocytic pathway」第 86 回 日本生化学会大会・インターナショナルセッション - リゾソーム生物学のフロンティア 2013 年 9 月 11 日 (パシフィコ横浜、横浜) (発表確定)
3. 駒田雅之「ユビキチン化と脱ユビキチン化によるストレス顆粒の制御」第 65 回 日本細胞生物学会大会・シンポジウム - タンパク質分解システムによる細胞制御 2013 年 6 月 21 日 (ウイング愛知、名古屋) (発表確定)
4. 駒田雅之「脱ユビキチン化酵素による細胞のストレス応答の制御」第 85 回 日本生化学会大会・シンポジウム - ベールを脱いだユビキチン系の新機能 2012 年 12 月 16 日 (福岡国際会議場、福岡)
5. 丹野秀崇、山口鉄平、後藤栄治、石戸聡、駒田雅之「新規ユビキチン結合因子 Ankrd13 によるエンドサイトーシス制御」第 84 回 日本生化学会大会・シンポジウム - 拡大するユビキチンバイオロジー 2011 年 9 月 23 日 (国立京都国際会館、京都)

[図書] (計 1 件)

1. 駒田雅之 (2011) 「エンドサイトーシス」, 「FYVE ドメイン」. **生化学事典**

[その他]

ホームページ等

<http://www.komada-lab.bio.titech.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

駒田 雅之 (KOMADA MASAYUKI)  
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：10225568

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし