

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04704

研究課題名(和文) ストレス顆粒とオートファジーの蛋白分解クロストークの分子機構

研究課題名(英文) Crosstalk between stress granules and autophagy in protein degradation

研究代表者

藤井 雅寛 (Fujii, Masahiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30183099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：USP10はストレス顆粒の形成に重要な役割を果たす。全身性のUSP10欠損マウスを樹立した。USP10欠損マウスは汎血球減少症を発症した。USP10欠損マウスでは造血幹細胞のアポトーシスが昂進していた。SCF (stem cell factor)が造血幹細胞のアポトーシスを抑制するが、このSCFによる抑制は、USP10を欠損した造血幹細胞では著明に低下した。USP10の変異体は、脱ユビキチン化酵素活性がUSP10による造血幹細胞アポトーシスの抑制に關与することを示した。以上の結果は、USP10およびストレス顆粒が造血幹細胞の維持に關与することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：USP10 plays an important role in the formation of stress granule. I established systemic USP10-knockout (USP10-KO) mice. USP10-KO mice developed pancytopenia, and died within 300 days. This pancytopenia was completely restored by transplantation of normal bone marrows into USP10-KO mice. Furthermore, I found that apoptosis of hematopoietic stem cells is aggravated in USP10-KO mice. SCL (stem cell factor) inhibits the apoptosis of hematopoietic stem cells, but this inhibition was significantly attenuated by USP10 depletion in hematopoietic stem cells. USP10 mutants indicated that deubiquitinase activity of USP10 is critical for inhibition of apoptosis of hematopoietic stem cells. The present study suggests that USP10 and stress granules participate in the maintenance of hematopoietic stem cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ストレス顆粒 USP10 造血幹細胞 アポトーシス SCF

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、異常蛋白の分解において中心的な役割を果たす。一方で、ストレス顆粒は、ストレスによる RNA 代謝、ストレスによって誘導される異常の修復および細胞死の抑制において必須の役割を果たす。申請者は、オートファジーとストレス顆粒が協調して蛋白分解とストレス応答を制御していることを見出し、このクロストークを制御する分子として脱ユビキチン化酵素 USP10 を同定した。

本研究では、ストレス顆粒とオートファジーによる蛋白分解およびその破綻による病的な蛋白凝集体形成の分子機構を明らかにする。さらに、USP10 欠損マウスおよびストレス顆粒形成が低下したマウスを用いて USP10 およびストレス顆粒の生体内機能を明らかにする。

2. 研究の目的

- 1) ストレス顆粒とオートファジーによる蛋白分解およびその破綻による病的な蛋白凝集体形成の分子機構を明らかにする。
- 2) USP10 欠損マウスおよびストレス顆粒形成低下マウス(G3BP1 あるいは G3BP2 の単独欠損マウスおよび G3BP1 と G3BP2 のダブル欠損マウス)を用いて、ストレス顆粒形成の低下によって発症する疾患、特に神経変性疾患の発症病理を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 遺伝子改変技術により、脳特異的 USP10 欠損マウス、G3BP1 ヘテロ欠損マウスおよび G3BP2 ヘテロ欠損マウスを樹立した。これらのマウスの表現系を解析した。

2) 造血幹細胞の細胞表面に発現する蛋白質を、特異的抗体を用いてフローサイトメーターで解析し、造血幹細胞数を定量した。

3) USP10 のノックダウン(ノックアウト)細胞および USP10 の過剰発現細胞を用いて、ストレス顆粒とアグリソームの形成能を免疫染色で定量した。ユビキチン化蛋白の凝集体形成を免疫染色で定量した。細胞にユビキチン化蛋白を発現し、NP40 細胞溶解液(弱い細胞溶解剤)と SDS 溶解液(不溶性蛋白質の溶解剤)により可溶性分画と不溶性分画に分離し、それぞれをウエスタン法で定量した。

4) USP10 はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)の Tax 蛋白に結合する。Tax および USP10 と結合できない Tax 変異体の発現量をウエスタン法で定量した。

5) Tax は T 細胞株 CTLL-2 を IL-2 依存性増殖から IL-2 非依存性増殖へトランスフォームする。USP10 と結合できない Tax 変異体による CTLL-2 のトランスフォーム活性を定量した。

4. 研究成果

1) USP10 欠損マウスは造血不全を発症する。USP10 はストレス顆粒の形成に重要な役割を果たす。USP10 およびストレス顆粒の生体内機能を明らかにするために、全身性 USP10 欠損マウスを樹立した。USP10 欠損マウスは汎血球減少症(骨髓不全)を発症し、全頭 30 日以内に死亡した。この USP10 欠損マウスに正常マウスの骨髓を移植すると、正常な造血が再構築された。この結果は、USP10 欠損マウスでは、造血細胞自身、おそらくは造血幹細胞に異常があることが示唆された。生後 1 週の USP10 欠損マウスにおいて、骨髓の造血幹細胞の数が著明に低下していた。さらに、E17.5 の胎児肝臓においても造血幹細胞の数が減少していたが、E14.5 では造血幹細胞数は低下していなかった。E17.5 の USP10 欠損マウスの肝臓では造血幹細胞のアポトーシスが昂進していた。USP10 欠損マウスの肝臓から調整した細胞を、造血幹細胞に対するサイトカインを含む培地で培養した。造血幹細胞用のサイトカインとしては、SCF (stem cell factor)、IL-6、FLT3 ligand、thrombopoietin および IL-3 を用いた。USP10 欠損マウスから調整した造血幹細胞は、造血幹細胞用の増殖因子を含む培地中では野生型細胞と同等に増殖した。しかしながら、造血幹細胞用サイトカインを除去すると、USP10 を欠損した造血幹細胞では野生型細胞よりもアポトーシスが強く誘導された。USP10 の変異体は、USP10 による造血幹細胞のアポトーシスの抑制に脱ユビキチン化酵素活性が関与することを示した。以上の結果は、USP10 が造血幹細胞の維持に深く関与することを示した。今後、造血幹細胞の生存維持にストレス顆粒がどのように関与するのかを明らかにする予定である。

2) 脳特異的 USP10 欠損マウスを樹立した。脳特異的 USP10 欠損マウスを樹立した。脳特異的 USP10 欠損マウスは出生数が低下した。全身性の USP10 欠損マウスも出生直後に多くのマウスが死亡する。これらの結果は、USP10 が脳機能を介して、生存に関与することを示唆した。

3) G3BP1 および G3BP2 欠損マウスの病態を解析した。G3BP1 と G3BP2 のヘテロ欠損マウスを樹立した。これまでのところ、これらのヘテロ欠損マウスに異常は認められなかった。今後、それぞれのホモ欠損マウスおよびストレス顆粒欠損(G3BP1 と G3BP2 のダブル欠損マウス)マウスを樹立し、それらの病態を明らかにする。

4) 我々は、USP10 を HTLV-1 の Tax 蛋白の結合蛋白として同定した。Tax はユビキチン化蛋白質である。USP10 と結合できない Tax 変

異体は野生型よりも発現量が低下した。USP10はTaxの安定性に関与することが示唆された。

5) TaxによるT細胞のトランスフォーメーションに対するUSP10の作用を解析した。TaxはT細胞株CTLL-2をIL-2依存性増殖からIL-2非依存性増殖へトランスフォームする。USP10と結合できないTax変異体もCTLL-2をトランスフォームし、この活性は野生型Taxと同レベルであった。この結果は、USP10との結合はTaxによるCTLL-2のトランスフォーメーションに必須ではないことを示唆した。

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 16件)

Kozakai T, Takahashi M, Higuchi M, Hara T, Saito K, Tanaka Y, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Fujii M. MAGI-1 expression is decreased in several types of human T-cell leukemia cell lines, including adult T-cell leukemia. *Int J Hematol.* 107(3):337-344, (2018).
Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Konno T, Ishihara T, Onodera O. Robustness and Vulnerability of the Autoregulatory System That Maintains Nuclear TDP-43 Levels: A Trade-off Hypothesis for ALS Pathology Based on in Silico Data. *Front Neurosci.* 12:28, (2018).
Tohnai G, Nakamura R, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, Watanabe H, Watanabe H, Ito M, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Onodera O, Naruse H, Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Ishiura H, Morishita S, Yoshimura J, Doi K, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Atsuta N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 64:158.e15-158.e19, (2018).
Takeuchi R, Tada M, Shiga A,

Toyoshima Y, Konno T, Sato T, Nozaki H, Kato T, Horie M, Shimizu H, Takebayashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Heterogeneity of cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for clinico-pathologic subtypes. *Acta Neuropathol Commun.* 2016 4(1):61, (2018).

Yamawaki K, Ishiguro T, Mori Y, Yoshihara K, Suda K, Tamura R, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Higuchi M, Fujii M, Okamoto K, Enomoto T. Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer. *Cancer Sci.* 108(4):632-640, (2017).

Higuchi M, Kawamura H, Matsuki H, Hara T, Takahashi M, Saito S, Saito K, Jiang S, Naito M, Kiyonari H, Fujii M. USP10 Is an Essential Deubiquitinase for Hematopoiesis and Inhibits Apoptosis of Long-Term Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports,* 7(6):1116-1129, (2016).

Mizuguchi M, Sasaki Y, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Funato N, Tanaka N, Fujii M, Nakamura M. Induction of Cell Death in Growing Human T-Cells and Cell Survival in Resting Cells in Response to the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax. *PLoS One,* 11(2):e0148217, (2016).

Motai Y, Takahashi M, Takachi T, Higuchi M, Hara T, Aoyagi Y, Terai S, Tanaka Y, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB. *Virus Genes,* 52(1):4-13.(2016)

Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno, T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res.* 2016

44(12):5820-36, (2016).

Hayashi K, Mochizuki Y, Takeuchi R, Shimizu T, Nagao M, Watabe K, Arai N, Oyanagi K, Onodera O, Hayashi M, Takahashi H, Kakita A, Isozaki E. Clinicopathological characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis resulting in a totally locked-in state (communication Stage V). *Acta Neuropathol Commun.* 4(1):107, (2016).

Maeda N, Ohashi T, Chagan-Yasutan H, Hattori T, Takahashi Y, Harigae H, Hasegawa H, Yamada Y, Fujii M, Maenaka K, Uede T. Osteopontin-integrin interaction as a novel molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia. *Retrovirology*, 12:99, (2015)

Ichikawa T, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Morishita K. Loss of NDRG2 enhanced activation of the NF- κ B pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATL and other cancer development. *Sci Rep*, 5:12841, (2015)

Shigemura T, Shiohara M, Kato M, Furuta S, Kaneda K, Morishita K, Hasegawa H, Fujii M, Gorlach A, Koike K, Kamata T. Superoxide-Generating Nox5 α Is Functionally Required for the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Induced Cell Transformation Phenotype. *J Virol*, 89(17):9080-9089, (2015)

Hara T, Mizuguchi M, Fujii M, Nakamura M. Kruppel-like factor 2 represses transcription of the telomerase catalytic subunit hTERT in human T cells. *J Biol Chem*, 290(14):8758-8763, (2015).

Saito S, Kawamura T, Higuchi M, Kobayashi T, Yoshita-Takahashi M, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Kanda Y, Kawamura H, Jiang S, Naito M, Yoshizaki T, Takahashi M, Fujii M. RASAL3, a novel hematopoietic RasGAP protein, regulates the number and functions of NKT cells. *Eur J Immunol*, 45(5):1512-1523, (2015).

Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green PL, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. *Cancer Sci*, 106(4):461-465, (2015).

[学会発表](計 8件)

藤井雅寛、高橋雅彦、樋口雅也, Signal transduction of reactive oxygen species in HAM and ATL. 日本 HTLV-1 学会学術集会, 2017年8月18-20日. 関西医科大学(大阪府)

Fujii M, Hara T, Higuchi M, Onodera O, Takahashi M. Stress granules and autophagy control degradation of neuropathogenic RNA-binding proteins, 日本神経科学学会, 2017年7月20-23日. 幕張メッセ(千葉県)

藤井雅寛, 原敏文、樋口雅也、高橋雅彦、ストレス顆粒とオートファジーによる酸化ストレスの制御機構. 日本抗加齢医学会, 2017年6月2-4日. 東京国際フォーラム(東京都)

川村宏樹、樋口雅也、藤井雅寛, 脱ユビキチン化酵素 USP10 は Hematopoietic stem cell の恒常性維持に必須である. 日本生体防御学会, 2016年7月7-9日. 九州大学(福岡県)

Fujii M, Motai Y, Higuchi M, Hara T, Takahashi M. HTLV-1 Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015年11月22-24日. 福岡国際会議場(福岡県)

Higuchi M, Kawamura H, Hara T, Takahashi M, Fujii M. Ubiquitin Specific Protease 10 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. 第77回日本血液学会学術集会, 2015年10月16-18日. ホテル日航金沢(石川県)

Ichikawa T, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Morishita K. Loss of NDRG2 enhanced activation of the NF- κ B pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATLL development. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月8-10日. 名古屋国際会議場(愛知県)

藤井雅寛、罇陽介、原敏文、高橋雅彦。HTLV-1のTax1はHTLV-2のTax2とは異

なる細胞遺伝子の発現を NF- κ B を介して誘導する. 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2015 年 8 月 22-23 日. 東京大学医科学研究所 (東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 雅寛 (FUJII, Masahiro)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30183099

(2) 研究分担者

小野寺 理 (Onodera Osamu)
新潟大学・脳研究所教授
研究者番号：20303167

(3) 連携研究者

小松雅明 (Komatsu Masaaki)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：90356254

(4) 研究協力者

高橋雅彦 (Takahashi Masahiko)
蔭山俊 (Kageyama Shun)
原敏文 (Hara Toshifumi)
樋口雅也 (Higuchi Masaya)
齋藤孔良 (Saito Kousuke)
小山哲秀 (Koyama Akihide)
葛城美德 (Katsuragi Yoshinori)
垣花太一 (Kakihana Taichi)