

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20890

研究課題名(和文)非コードRNAによるタンパク質の脱ユビキチン化制御機構の解明

研究課題名(英文)Functional roles of protein deubiquitinase regulated by ncRNAs

研究代表者

長沼 孝雄(Naganuma, Takao)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：40466462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脱ユビキチン化酵素の1つであるUSP10が、数種類のncRNAやmRNAと結合することを明らかにし、またその結合に関与するUSP10の領域を同定した。USP10とHNRNPKとの相互作用を詳細に解析したところ、USP10とHNRNPKとの相互作用にはRNAが介在していることが明らかになった。siRNAによるUSP10のノックダウンから、USP10は細胞内においてHNRNPKを脱ユビキチン化していることが示された。しかし、細胞内におけるUSP10のRNA結合の意義やUSP10によるHNRNPKの脱ユビキチン化の機能的な役割については解明に至っていない。

研究成果の概要(英文)：We found that USP10, which is the one of deubiquitinase, interacts with some ncRNAs and mRNAs, and identified the RNA binding region of USP10. By analyzing the precise interaction between USP10 and HNRNPK, we also found that RNAs mediate the interaction between them. The knockdown of USP10 with siRNA showed that USP10 deubiquitinates HNRNPK within the cell. However, both the significance that USP10 interacts with RNAs and the functional roles that USP10 deubiquitinates HNRNPK within the cell remain to be elucidated.

研究分野：RNA生物学

キーワード：非コードRNA 脱ユビキチン化酵素 RNA結合 脱ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムのトランスクリプトーム解析により哺乳類ゲノムの大部分が、タンパク質をコードしない非コード (nc) RNA として転写されていることが明らかとなった。当初は「ジャンク」と考えられていたこれら ncRNA が、近年様々な生命現象において重要な役割を果たすことが明らかになってきた。ncRNA は、細胞内の様々な構造体や高次複合体の形成の足場として機能することやパートナータンパク質と相互作用し、RNA-タンパク質複合体として機能することで生命現象において重要な役割を担っている。

近年、いくつかの研究グループによってポリ A 鎖付加 RNA に結合するタンパク質の網羅的解析の報告が相次ぎ、その結果から既知の RNA 結合モチーフを保有する RNA 結合タンパク質以外にもこれまで RNA 結合能を持つことが知られていなかった数多くのタンパク質が RNA と結合することが明らかとなってきた。とりわけ興味深い点としては、多くの酵素タンパク質が RNA と結合することが示されてきたことである。しかし、こういった RNA 結合型酵素タンパク質が RNA に結合する機能的意義はまだ明らかではない。

ユビキチン修飾系は、真核生物に高度に保存されたタンパク質であるユビキチンを付加することにより、細胞内でタンパク質の機能を制御する翻訳後修飾系である。ユビキチン修飾系は、タンパク質分解系の一部として発見されてきたが、現在では分解系に限らず広くタンパク質機能を制御する可逆的なタンパク質修飾システムとして、細胞周期・シグナル伝達・転写調節など数多くの生命現象に関与することが知られている。上記のポリ A 鎖付加 RNA に結合するタンパク質の網羅的解析では、いくつかのユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素が RNA と結合することが示されてきた。しかし、ユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素が RNA と結合することがユビキチン修飾系においてどのような意義を持つのかは明らかにはなっていない。おそらく、こういった RNA 結合脱ユビキチン化酵素は、標的タンパク質への効率的なアクセスと円滑な脱ユビキチン化反応を行うための手立てとして、RNA を足場として利用していると考えられる。

申請者は、これまで細胞内構造体構築というユニークな RNA 機能を持つ *NEAT1* ncRNA とその機能発現に必須なタンパク質である HNRNPK の機能を調節するタンパク質因子の探索を試みてきた。その中で、脱ユビキチン化酵素の 1 つである USP10 が、*NEAT1* の機能により構造体構築されるパラスペックルと部分的に共局在し、また HNRNPK と相互作用することを見出している。そこで、USP10 と *NEAT1* との相互作用を明らかにし、また USP10 による脱ユビキチン化の標的タンパク質を同定し、その標的タンパク質の認識および脱ユビキチン化反応の制御を明らかにしていくことで、RNA 結合が USP10 の脱ユビキチン化機能にどのような意義を持つのかを解明できるのではないかと考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では脱ユビキチン化酵素 USP10 が、RNA と結合することを明らかにする。また、USP10 による脱ユビキチン化の標的タンパク質を同定し、その標的タンパク質の認識や脱ユビキチン化反応の制御の分子機構を明らかにする。これらのことから、RNA 結合脱ユビキチン化酵素の RNA 結合の機能的意義の解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) USP10 が、RNA と相互作用し得るのかを検証するために、FLAG タグ融合 USP10 を発現させた 293T 細胞から、抗 FLAG 抗体による RNA 免疫沈降と RT-PCR を行い、共沈してきた RNA を解析する。また USP10 の RNA 結合ドメインを明らかにするために、FLAG タグを融合した USP10 の各種欠損体を発現させた 293T 細胞から、抗 FLAG 抗体による RNA 免疫沈降と RT-PCR を行い、RNA の共沈を検出する。

(2) USP10 と HNRNPK との相互作用を詳細に解析するために、FLAG タグを融合した USP10 の各種欠損体を発現させた 293T 細胞から、抗 FLAG 抗体による免疫沈降と抗 HNRNPK 抗体を用いたイムノブロットを行い、HNRNPK の共沈を検出する。また、USP10 と HNRNPK との相互作用に RNA が介在する可能性を検討するために、FLAG タグ融合 USP10 を発現する細胞ライセートを RNase A で処理し、その後抗 FLAG 抗体によ

る免疫沈降と抗 HNRNPK 抗体を用いたイムノブロットを行い、RNase A 処理による HNRNPK 共沈への効果を解析する。

(3) USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化を明らかにするために、siRNA により USP10 をノックダウンした 293T 細胞に Myc タグ融合 HNRNPK とヒスチジンタグ融合ユビキチンを発現させ、TALON 金属アフィニティービーズでプルダウンし、抗 Myc タグ抗体でイムノブロットを行い、USP10 ノックダウンによるユビキチン化 HNRNPK 量の変化を解析する。

(4) USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化の機能的意義を明らかにするために、siRNA により USP10 をノックダウンした 293T 細胞における HNRNPK タンパク質の変化を抗 HNRNPK 抗体によるイムノブロットで確認する。また siRNA により USP10 をノックダウンした HeLa 細胞を抗 HNRNPK 抗体による免疫蛍光染色を行い、HNRNPK の局在の変化を観察する。さらに、siRNA により USP10 をノックダウンした HeLa 細胞を細胞分画法により核画分と細胞質画分に分け、それぞれの画分における HNRNPK の変化を抗 HNRNPK 抗体によるイムノブロットで確認する。

4. 研究成果

(1) USP10 の RNA 結合能の検証

これまでの研究から申請者は、USP10 が *NEAT1* の機能により構造体構築されるパラスペックルと部分的に共局在し、また HNRNPK と相互作用することを見出してきている。そこで、まず USP10 が *NEAT1* と相互作用するのかを検討することにした。FLAG タグ融合 USP10 を発現させた 293T 細胞から抗 FLAG 抗体により RNA 免疫沈降を行い、その沈降物中に *NEAT1* が含まれているかを RT-PCR により検証したところ、FLAG タグ融合 USP10 の沈降物中に *NEAT1* の存在を確認することが出来た (図 1A)。これは、既知の *NEAT1* 相互作用タンパク質である HNRNPK と同程度の沈降量であった。この結果から、USP10 は *NEAT1* と相互作用することが明らかとなった。また、その他の ncRNA (*MALAT1*, *LINC-p21*) や mRNA (*GAPDH*) についても RT-PCR により検証したところ、*MALAT1*、*LINC-p21* および

GAPDH mRNA それぞれ存在が確認された (図 1A)。この結果は、USP10 が細胞内で *NEAT1* に限らず、様々な RNA と結合していることを示唆している。

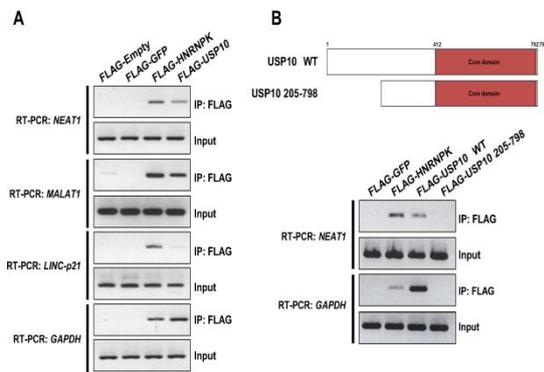


図 1. USP10 の RNA 結合能の検証および USP10 の RNA 結合領域の同定

(2) USP10 内の RNA 結合に関わる領域の同定

(1)の結果より USP10 が RNA と結合することは明らかになったが、USP10 には典型的な RNA 結合に関わるモチーフは存在しておらず、RNA 結合に関わる領域は不明である。そこで、USP10 の RNA 結合領域を検討することにした。FLAG タグを融合した USP10 の各種欠損体を作製し、293T 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体により RNA 免疫沈降を行い、*NEAT1* との共沈降を RT-PCR で確認したところ、USP10 の N 末端 205 アミノ酸を欠損させると *NEAT1* の共沈が確認されなくなった (図 1B)。また、同様に USP10 の N 末端 205 アミノ酸の欠損により *GAPDH* mRNA との共沈も確認されなくなった (図 1B)。これらの結果から、USP10 の N 末端 205 アミノ酸部位が RNA と結合に関わる領域であることが明らかになった。上記のように、USP10 には典型的な RNA 結合モチーフは存在していないことから、おそらくこの領域は新規の RNA 結合モチーフを保有している可能性が示唆される。さらに、USP10 の N 末端 205 アミノ酸部位だけで、RNA 結合に必要な十分かを明らかにしようとしたが、欠損タンパク質の発現が出来なかったため、現在のところ明らかになっていない。

(3) USP10 と HNRNPK との相互作用の詳細解析

これまでの研究から USP10 と HNRNPK

が相互作用することが明らかになっている。USP10 と HNRNPK の相互作用をより詳細に明らかにするために、USP10 内における HNRNPK 結合部位を検討することにした。FLAG タグを融合した USP10 の各種欠損体を発現させた 293T 細胞から抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行い、HNRNPK との共沈降を HNRNPK に対する特異抗体によるイムノブロットで確認したところ、USP10 の N 末端 205 アミノ酸を欠損させると HNRNPK との共沈が確認されなくなった。この結果から、USP10 の N 末端 205 アミノ酸部位は、HNRNPK との結合に関わる領域であることが明らかになった。また USP10 の N 末端 205 アミノ酸部位だけで、HNRNPK との結合に必要な十分かを明らかにしようとしたが、欠損タンパク質の発現が出来なかったため、現在のところ明らかになっていない。

USP10 の N 末端 205 アミノ酸部位が、RNA との結合および HNRNPK との結合にそれぞれ必要であることから、USP10 と HNRNPK との相互作用には RNA が介在している可能性が考えられた。そこで、その可能性を検討するために、FLAG タグ融合 USP10 を発現する細胞ライセートを RNase A 処理し、その後抗 FLAG 抗体による免疫沈降と抗 HNRNPK 抗体を用いたイムノブロットを行ったところ、RNase A 処理により USP10 と HNRNPK の共沈が著しく減少した (図 2)。この結果から、細胞内での USP10 と HNRNPK との相互作用には RNA が介在していることを示唆している。

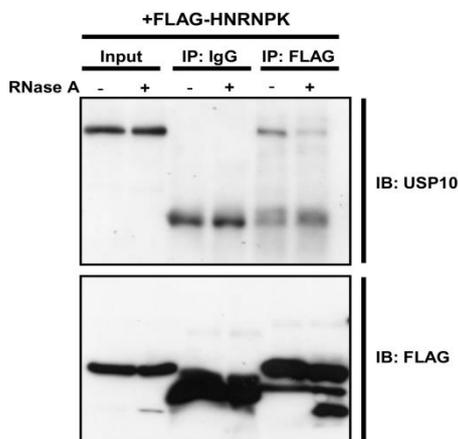


図 2. USP10 と HNRNPK との相互作用における RNA 介在性の検証

(4) USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化の解析

HNRNPK は、細胞内においてユビキチン化修飾を受けていることが知られているが、その制御や機能的意義についてはほとんど明らかになっていない。また、HNRNPK に対する脱ユビキチン化酵素についても不明である。これまでの研究から、USP10 は HNRNPK に対する脱ユビキチン化酵素であると考えられた。そこで、USP10 が HNRNPK を脱ユビキチン化するのかを検討した。siRNA により USP10 をノックダウンしたときの細胞内のユビキチン化 HNRNPK の量を調査したところ、USP10 のノックダウンにより細胞内のユビキチン化 HNRNPK の量の増加が観察された。この結果から、USP10 が HNRNPK を脱ユビキチン化していることが明らかになった。現在、USP10 をノックダウンした細胞に USP10 を入れ戻すことで、増加した細胞内のユビキチン化 HNRNPK の量を減少させることが出来るかを検討している。

(5) USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化の機能的意義の解明

ユビキチン修飾系は、タンパク質分解系の一部として良く知られており、中でも脱ユビキチン化酵素は標的タンパク質からユビキチン化修飾を取ることでその安定化に関与している。USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化が、HNRNPK の安定化に関与しているのではないかと考えた。そこで、USP10 をノックダウンしたときの細胞内の HNRNPK の量をイムノブロットで検討したところ、特に HNRNPK の量に変化は見られなかった (図 3A)。この結果から、USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化は、HNRNPK の安定化には関与していないことが示唆された。

ユビキチン修飾系は、タンパク質分解に限らず、広くタンパク質機能を制御することが知られる。そこで、次に USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化が、HNRNPK の細胞内局在に関与しているのではないかと考えた。そこで、USP10 をノックダウンした HeLa 細胞を抗 HNRNPK 抗体による免疫蛍光染色を行い、HNRNPK の局在の変化を観察したが、USP10 の有無で顕著な

HNRNPK の局在の変化は確認されなかった (図 3B)。また、USP10 をノックダウンした HeLa 細胞を細胞分画法により核画分と細胞質画分に分け、それぞれの画分における HNRNPK の変化を検討したが、USP10 の有無で顕著な変化の差は見られなかった (図 3C)。これらの結果から、USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化が、HNRNPK の細胞内局在には関与していないことが示唆された。

タンパク質修飾に関するデータベースを利用した *in silico* 解析から、HNRNPK に対するユビキチン化修飾が、HNRNPK の核酸結合ドメインに集中していることが予測された。この予測から、USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化が、HNRNPK の核酸結合能を変化させるのではないかと考えている。現在、USP10 をノックダウンした細胞における HNRNPK の核酸結合能の変化を RNA 免疫沈降またはクロマチン免疫沈降などで検討している。

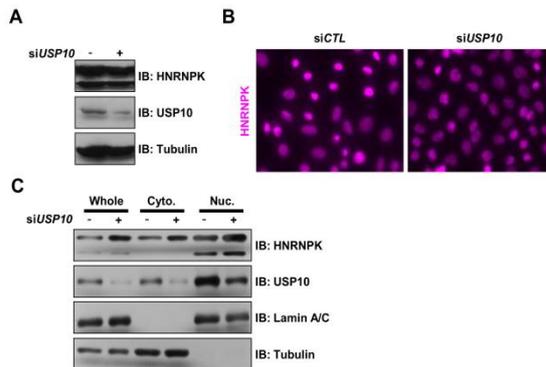


図 3. USP10 による HNRNPK の脱ユビキチン化の機能的意義の解明

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 2 件)

①Fukuda T, Kigoshi-Tansho Y, Naganuma T, Kazaana A, Okajima T, Tsuruta F, Chiba T. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 482(4) pp. 863-869. CACUL1/CAC1 attenuates p53 activity through PML post-translational modification. 2017
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.125.

②Kawaguchi T, Tanigawa A, Naganuma T, Ohkawa Y, Souquere S, Pierron G, Hirose T. “SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies.” Proc Natl Acad Sci U S A, Vol.112(14) pp. 4304-4309, 2015
doi: 10.1073/pnas.1423819112.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長沼 孝雄 (NAGANUMA, TAKAO)

国立国際医療研究センター研究所・糖尿病研究センター・上級研究員

研究者番号：40466462