

令和元年6月21日現在

機関番号：13101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K15502
 研究課題名(和文) ストレス顆粒による新規の活性酸素制御機構の解明

研究課題名(英文) ROS production regulation by stress granule

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：1) USP10はアグリソームの形成を促進し、ユビキチン化蛋白質オリゴマーの細胞毒性を抑制する。2) p62は様々な蛋白質に結合し、蛋白質の凝集体形成を誘導する。USP10はp62と結合し、p62による凝集体形成を促進する。3) USP10はアルツハイマー病の病原蛋白Tauの凝集体形成をストレス顆粒の形成を介して誘導する。4) USP10は、パーキンソン病において、レビー小体(α-シヌクレインの凝集体)の形成に関与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異常な蛋白質凝集体は、神経変性疾患、腫瘍性疾患を含む様々な疾患の発症に関与する。例えば、アルツハイマー病およびパーキンソン病などである。生理的あるいは病的蛋白質凝集体の形成にストレス顆粒およびアグレソームが関与する。本研究は、USP10が、ストレス顆粒およびアグレソームの形成を通して、生理的および病的な蛋白質凝集体の形成に関与することを明らかにした。USP10とストレス顆粒は活性酸素の産生を抑制する。従って、USP10は蛋白質凝集体の形成と活性酸素の制御を繋ぐキー因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：USP10 promotes the conversion of ubiquitinated protein oligomers into aggresomes, and suppresses the cytotoxicity of ubiquitinated protein oligomers. 2) p62 binds to various ubiquitinated proteins and induces protein aggregate formation. USP10 binds to p62 and augments p62-induced protein aggregation. 3) Tau is a pathogenic protein of Alzheimer's disease (AD). USP10 induces Tau-positive stress granule formation, which initiates Tau aggregation in AD. 4) USP10 is a factor for initiating the formation of Lewy bodies (α-synuclein aggregates) in Parkinson's disease.

Protein aggregates are involved in the onset of various diseases including neurodegenerative and neoplastic diseases. The present study suggested that USP10 is involved in the formation of protein aggregates through the formation of stress granules and aggresomes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ストレス顆粒 アグリソーム 活性酸素 蛋白質凝集体 アルツハイマー タウ パーキンソン病 シヌクレイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞は正常細胞よりも活性酸素を多量に産生する。活性酸素の高産生は、腫瘍細胞の異常増殖、遺伝子変異の蓄積および悪性形質の獲得などに寄与する。ストレス顆粒はストレスによって一過性に誘導される細胞質内の複合体であり、ストレスからの回復において必須の役割を果たす。研究代表者は、ストレス顆粒がストレスによる活性酸素の産生と細胞死を抑制すること、この抑制に USP10 蛋白が必須であることを報告した。さらに、この抑制に關与する細胞因子として G3BP1 および G3BP2 を同定した。一方で、白血病ウイルスの発がん蛋白 Tax が USP10 に結合し、活性酸素の産生を誘導し、遺伝子変異を促進することを報告した。本研究では、ストレス顆粒という、全く新しいタイプの活性酸素制御装置の作用の分子機構およびこの機能不全が白血病を含む様々な疾患の病態にどのように關与するのかを明らかにする。

2. 研究の目的

USP10、G3BP1、G3BP2 およびストレス顆粒による活性酸素制御の分子機構およびこれらの機能不全がどのようにして、白血病を含む疾患の病態に關与するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

条件付きで USP10 をノックアウトできるマウス(conditional USP10 欠損マウス)を樹立した。さらに、生殖細胞系列で USP10 をノックアウトし、USP10 を全身で欠損したマウス (USP10 欠損マウス) を樹立した。

4. 研究成果

(1) USP10 は蛋白質凝集体の形成を促進する。

HeLa 細胞を MG-132(プロテアソーム阻害剤)で処理すると、蛋白質凝集体が細胞質に形成された。この凝集体には、HDAC6、p62、ユビキチンおよび USP10 が共局在した。ユビキチン、HDAC6 と p62 はアグリソームのマーカー蛋白質であることから、この凝集体がアグリソームであることが示された。USP10 の発現を低下させた細胞(USP10-KD 細胞)を、RNA 干渉法を用いて樹立した。USP10-KD 細胞では、MG-132 処理によるアグリソーム形成が著しく低下した。USP10 は細胞内で p62 と結合していることが免疫沈降実験で示された。P62 はユビキチン化蛋白質の結合蛋白質であり、ユビキチン化蛋白質を凝集させる作用を持つ。USP10-KD 細胞では、複数の p62 の凝集体が、アグリソームの代わりに、細胞質に観察された。以上の結果は、USP10 が、細胞質内のユビキチン化蛋白質と p62 の凝集体を、アグリソームの形成部位に移行させ、大きな凝集体(アグリソーム)を形成させることを示唆した。

(2) USP10 はユビキチン化蛋白質オリゴマーの細胞毒性を低下させる。

細胞をプロテアソームの阻害剤(MG-132)で処理すると、ユビキチン化蛋白質のオリゴマーが形成される。このユビキチン化蛋白質のオリゴマーは細胞毒性を示す。しかしながら、この細胞毒性は、アグリソームの形成によって低下する。USP10-KD 細胞では、MG-132 処理によるアグリソームの形成が低下すると共に、細胞死が昂進した。これらの結果は、USP10 がアグリソームの形成を介して、ユビキチン化蛋白質オリゴマーの細胞毒性を抑制することを示唆した。MG-132 処理による細胞死は P62-KD 細胞でも昂進した。これらの結果は、p62 と USP10 の複合体が協動的に細胞死を抑制することを示唆した。

(3) USP10 は α -シヌクレイン蛋白質の凝集体形成を促進する。

パーキンソン病は、円滑な運動に關与する神経細胞が死滅することを特徴とする神経変性疾患である。パーキンソン病の原因蛋白質の1つとして、 α -シヌクレインが知られている。 α -シヌクレインは、パーキンソン病の脳病変(黒質など)にユビキチン/ α -シヌクレイン陽性の凝集体を形成する。このユビキチン陽性の蛋白質凝集体はレビー小体と呼ばれている。 α -シヌクレインを発現した培養細胞をプロテアソーム阻害剤(MG-132)で処理すると、 α -シヌクレインとユビキチン陽性の凝集体(アグリソーム)が形成される。レビー小体は、アグリソームと類似のメカニズムで形成されると考えられている。USP10 と α -シヌクレインを HeLa 細胞に共発現すると α -シヌクレイン陽性/USP10 陽性のアグリソーム様の凝集体が形成された。これらの結果は、USP10 がレビー小体の形成に關与することを示唆した。

(4) USP10 はパーキンソン病患者のレビー小体に局在する。

免疫染色法を用いて、パーキンソン病患者の脳病変における USP10 の発現様式を調べた。パーキンソン病患者の脳病変部位(扁桃体)において、 α -シヌクレイン陽性のレビー小体が検出された。USP10 は、このレビー小体に共同在した。これらの結果は、USP10 が α -シヌクレインの凝集体形成とアグリソーム形成とを促進し、レビー小体の形成に關与することを示唆している。

(5) USP10 は多系統萎縮症患者の α -シヌクレイン陽性蛋白質凝集体(GCI)に局在しない。多系統萎縮症は、進行性の神経変性疾患であり、小脳失調、パーキンソン様症状、自律神経不全などの症状を示す。多系統萎縮症の脳病変においても、 α -シヌクレインの凝集体が観察され、 α -シヌクレインが多系統萎縮症の発症に關与すると考えられている。多系統萎縮症における α -シヌクレインの凝集体はオリゴデンドログリア細胞に観察され、グリア細胞質内封入体(glial cytoplasmic inclusion, GCI)と呼ばれている。免疫染色を用いて、多系統萎縮症の脳病変における USP10 の発現を調べた。USP10 は GCI には検出されなかった。興味深いことに、USP10 は神経細胞には検出されたが、オリゴデンドログリア細胞には検出されなかった。これらの結果

は、GCI が USP10 あるいはアグリソームとは異なるメカニズムで形成されることを示唆した。

(6) USP10 はアルツハイマー病の病原蛋白 Tau の凝集体形成を誘導する。

HT22 細胞は海馬由来の神経細胞株である。HT22 をプロテアソーム阻害剤(MG-132)で処理すると、Tau と TIA1 が陽性のストレス顆粒の形成が誘導された。TIA1 はストレス顆粒のマーカー蛋白である。このストレス顆粒の形成は、USP10 の発現を低下させると、著明に低下した。HT22 細胞に USP10 を過剰発現すると、TIA1/Tau 陽性のストレス顆粒の形成が誘導された。Tau はアルツハイマーの原因蛋白であり、脳病変に Tau 陽性の凝集体を形成する。ストレス顆粒は Tau の凝集体形成に関与することが報告されている。以上の結果は、USP10 が Tau の凝集体形成を介してアルツハイマー病の発症に関与することを示唆した。

(7) USP10 のノックアウトマウスは造血不全を発症する。

樹立した USP10 欠損マウスは、貧血を発症し、全頭が 300 日以内に死亡した。フローサイトメトリー法および病理解析により、USP10 欠損マウスでは、白血球、赤血球、血小板の数がいずれも著明に減少し、造血不全を発症していることが示された。この骨髄不全は造血幹細胞数の減少によることが示された。USP10 欠損マウスの胎児から肝臓を調製し、造血幹細胞を定量した。胎児期 17.5 日 (E17.5) の胎児肝臓において、USP10 欠損マウスにおける造血幹細胞数の減少が観察された。造血幹細胞に対する増殖因子カクテル { SCF(stem cell factor), TPO, FLT3-ligand, interleukin (IL)-3, and IL-6 } の存在下で、USP10 欠損マウスから調製した造血幹細胞を培養すると、USP10 欠損細胞は野生型細胞と同等に増殖した。しかしながら、SCF のみを造血幹細胞増殖因子の中から除去した培地で、USP10 欠損造血幹細胞を培養すると、野生型細胞よりも強い細胞死が誘導された。USP10 欠損造血幹細胞に野生型 USP10 遺伝子を導入した細胞株を樹立して、同様の実験を実施したところ、USP10 欠損造血幹細胞の細胞死は、野生型 USP10 によってされたが、脱ユビキチン化酵素活性を欠損した USP10 では抑制されなかった。これらの結果は、1) USP10 が造血幹細胞の細胞死を特異的に抑制すること、2) この抑制に USP10 の脱ユビキチン化酵素活性が関与すること、3) USP10 が、造血幹細胞の維持に必須の役割を果たすことを示した。

(8) 今後の展望

USP10 がユビキチン化蛋白質の凝集体形成に関与することが示された。ユビキチン化蛋白質の異常な凝集体は、神経変成疾患を含む様々な疾患の発症に関与する。例えば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、アルツハイマー病、パーキンソン病などである。従って、本研究は、USP10 が、これらの神経変性疾患の発症に関与することを示唆する。

活性酸素の産生異常が神経変性疾患に関与することが知られている。USP10 は蛋白質凝集体の形成を誘導すると共に、活性酸素の産生を抑制する。従って、USP10 は蛋白質凝集体形成と活性酸素の産生異常とを繋ぐキー因子であると考えられる。USP10 の機能を解明することにより、神経変性疾患の分子機構の解明の進展が期待できる。さらに、USP10 を標的とした、新たな神経変性疾患の治療薬の開発が期待される。

USP10 は様々な腫瘍性疾患 (腎臓癌、肺がんなど) の発症にも関与することが報告されている。腫瘍性疾患における USP10 の機能の一部は、USP10 が様々な蛋白質の凝集体形成を誘導することによる可能性がある。今後、それぞれの腫瘍性に疾患における USP10 の標的分子を同定することが重要な課題である。

造血幹細胞の異常は、造血不全症候群、免疫不全症および白血病などの疾患の発症に関与する。また、これらの一部の原因は特定されていない。造血幹細胞は、活性酸素の産生量が低く、この低い活性酸素状態が造血幹細胞の維持に深く関与している。造血幹細胞における USP10 の機能、特に、活性酸素の制御機構を明らかにすることは、造血幹細胞の異常によって引き起こされる疾患の解明に繋げることが期待できる。また、治療薬の開発に対しても基礎的な情報を提供する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Degradation of p47 by autophagy contributes to CADM1 overexpression in ATLL cells through the activation of NF- κ B. Sarkar B, Nishikata I, Nakahata S, Ichikawa T, Shiraga T, Saha HR, Fujii M, Tanaka Y, Shimoda K, Morishita K. *Sci Rep*. 2019 9(1):3491.

doi: 10.1038/s41598-019-39424-7.

USP10 Is a Driver of Ubiquitinated Protein Aggregation and Aggresome Formation to Inhibit Apoptosis. Takahashi M, Kitaura H, Kakita A, Kakihana T, Katsuragi Y, Nameta M, Zhang L, Iwakura Y, Nawa H, Higuchi M, Komatsu M, Fujii M. *iScience*. 2018 Nov 30;9:433-450.

doi: 10.1016/j.isci.2018.11.006.

Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP. Naito T, Yasunaga JI, Mitobe Y, Shirai K, Sejima H, Ushirogawa H, Tanaka Y, Nakamura T, Hanada K, Fujii M,

Matsuoka M, Saito M. *Retrovirology*. 2018 Nov 6;15(1):72.

doi: 10.1186/s12977-018-0454-x.

MAGI-1 expression is decreased in several types of human T-cell leukemia cell lines, including adult T-cell leukemia. Kozakai T, Takahashi M, Higuchi M, Hara T, Saito K, Tanaka Y, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Fujii M. *Int J Hematol*. 2018 Mar;107(3):337-344.

doi: 10.1007/s12185-017-2359-1.

Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer. 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. *Cancer Sci*. 2017 Apr;108(4):632-640.

doi: 10.1111/cas.13196.

USP10 Is an Essential Deubiquitinase for Hematopoiesis and Inhibits Apoptosis of Long-Term Hematopoietic Stem Cells. Higuchi M, Kawamura H, Matsuki H, Hara T, Takahashi M, Saito S, Saito K, Jiang S, Naito M, Kiyonari H, Fujii M. *Stem Cell Reports*. 2016 Dec 13;7(6):1116-1129.

doi: 10.1016/j.stemcr.2016.11.003.

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. Mizuguchi M, Sasaki Y, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Funato N, Tanaka N, Fujii M, Nakamura M. *PLoS One*. 2016 Feb 1;11(2):e0148217.

doi: 10.1371/journal.pone.0148217.

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. Motai Y, Takahashi M, Takachi T, Higuchi M, Hara T, Mizuguchi M, Aoyagi Y, Terai S, Tanaka Y, Fujii M. *Virus Genes*. 2016 Feb;52(1):4-13.

doi: 10.1007/s11262-015-1277-7.

[学会発表](計 5件)

藤井雅寛、Role of ROS in pathogenesis of HTLV-1-associated diseases. *Frontiers in Retrovirology Conference 2018*, 2018年.

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.

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.

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.

川村宏樹、樋口雅也、藤井雅寛、脱コピキチン化酵素 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.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:高橋 雅彦

ローマ字氏名:(TAKAHASHI, masahiko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。