

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08340

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素USP10が司る造血幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of HSCs maintenance by deubiquitinating enzyme USP10

研究代表者

樋口 雅也 (HIGUCHI, Masaya)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50334678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脱ユビキチン化酵素USP10は、造血幹細胞(HSC)の維持に必須の分子である。HSCの維持には適切なDNA修復が必須である。そこで本研究ではUSP10のDNA修復における関与を検討した。USP10 KO細胞ではDNA二重鎖切断(DSB)の修復が遅延しており、これはDSB修復機構のうち相同組み換え修復(HR)が適切に行われないことに起因していることを見出した。USP10 KO細胞ではDNA-PKcsの活性が亢進しており、DNA-PKcs活性を抑制するとDSB修復は回復した。以上よりUSP10はDNA-PKcsの活性を制御することでHRによるDSB修復に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

USP10はDNA-PKの活性制御を行い、DSBのHRによる修復を促進しているという新しい知見を得た。USP10はこの作用によりHSCの維持に寄与していることが示唆された。この結果からUSP10は原因不明の貧血の原因遺伝子である可能性も考えられる。さらにUSP10阻害剤はがんに対する抗がん剤や放射線治療の効果を高めることが期待される。

研究成果の概要(英文)：USP10 is an essential deubiquitinase for haematopoietic stem cells (HSCs) maintenance. Since HSCs maintenance relies on proper DNA damage response (DDR), we investigated whether USP10 is involved in DDR. USP10 KO cells showed impaired DNA double strand break (DSB) repair, which is attributed to impaired homologous recombination (HR) repair. In USP10 KO cells, DNA-PKcs is hyperactivated, and inhibition of DNA-PKcs restored the DSB repair. Thus, USP10 properly regulates DNA-PKcs activity after DSB, contributing to HR repair and HSCs maintenance.

研究分野：分子生物学

キーワード：脱ユビキチン化 USP10 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の研究の過程で、HTLV-1 のトランスフォーミング蛋白 Tax に結合する細胞因子として、脱ユビキチン化酵素 USP10 を同定した (文献 1)。脱ユビキチン化酵素はユビキチン化蛋白からユビキチンをはずす酵素であり、ヒトでは約 100 種類の脱ユビキチン化酵素が存在する。これらの酵素は、細胞機能のさまざまな場面で極めて重要な役割を担っていると考えられているが、個々の脱ユビキチン化酵素の機能については、いまだに未知の部分が多い。

そこで我々は USP10 の生体内機能を明らかにするため、USP10 ノックアウト (KO) マウスを作製した (文献 2)。USP10-KO マウスは骨髄不全による重度の貧血に陥り、1 年以内にすべてのマウスが死亡した。8 週齢 USP10-KO マウスの骨髄では、造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell: HSC) を含む分画 (Lineage- Sca-1+ c-Kit+: LSK) がほぼ消失しており、KO マウスでみられた骨髄不全は、HSC の著減が原因であることが明らかとなった。HSC の減少は胎生 14.5 日の段階から始まっており、HSC のアポトーシスがその原因であった。したがって、USP10 は HSC 内で何らかの蛋白を脱ユビキチン化し、その維持に寄与していることが示唆された。しかしながら、USP10 がいかなる蛋白を脱ユビキチン化し、どのようなメカニズムで HSC 維持に寄与しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では HSC における USP10 の標的蛋白を同定し、USP10 による HSC 維持の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

USP10 は HSC 内で複数のパスウェイを制御している可能性もあるため、当初は以下の網羅的解析から得られたデータを統合し、USP10 の細胞内機能の全体像を把握することを計画した。

- USP10-KO HSC のトランスクリプトーム解析
- USP10-KO HSC のメタボローム解析
- USP10 結合蛋白等の網羅的解析
- 上記網羅的解析に基づく USP10 の標的蛋白の同定とその機能解析

しかし、USP10 の DNA damage response (DDR) への関与を示唆する論文がいくつか発表されたこと、また我々が行った USP10 結合蛋白の解析により USP10 と Histone H1 との結合が見出されたことから、USP10 の DDR における機能解析に焦点を絞った。

(1) DNA 二重鎖切断 (DSB) 修復機構の解析

DNA ダメージの中でも最も傷害の程度が強い DSB の修復機能における USP10 の関与を検討した。USP10 WT および KO 細胞をゼオシン、カンプトテシン、エトポシドなどで処理し、DSB の指標である γ H2AX の免疫染色、コメットアッセイ、姉妹染色分体交換 (Sister chromatid exchange: SCE) アッセイなどにより修復の程度を評価した。さらに USP10 がその機能に関与すると考えられる各種蛋白のノックダウンを行い DSB 修復能を検討した。

(2) USP10 機能部位の同定と結合蛋白の探索

USP10 は C 末側に酵素活性部位、N 末側に基質などの蛋白結合部位が存在すると考えられている。そこで各種 N 末端欠失変異体を作製し、その DSB 修復における活性を検討した。さらにビオチン化酵素 AirID と融合させ、近接依存性ビオチン化による結合蛋白の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) USP10 は DSB 修復に必須である

USP10 WT および KO mouse embryonic fibroblast (MEF) 細胞におけるゼオシン処理後の DSB 修復を γ H2AX 染色により検討した (図 1)。WT MEF では 9 時間後までに修復が完了するのに対して、KO MEF では修復が遷延化していた。コメットアッセイでも同様の結果が得られた。また DNA 修復に異常がある場合に出現する微小核の数も KO MEF で有意に高かった。以上より USP10 は DSB 修復に必須であることが明らかとなった。

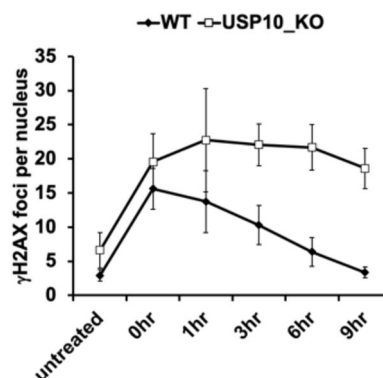


図1 USP10 KO細胞におけるDSB修復の遷延化

(2) DSB 修復には USP10 の脱ユビキチン化活性が必須である
 USP10 KO MEF に WT、N 末 95 アミノ酸欠失変異体 (95)、脱ユビキチン化活性のない変異体 (CA) を戻し、ゼオシン処理後の DSB 修復を検討した (図 2)。その結果 WT および 95 変異体は修復活性が回復するものの、CA 変異体では修復活性が戻らなかった。したがって DSB 修復においては USP10 の脱ユビキチン化活性が必須であることがわかった。一方 G3BP1, 2 および PABP が結合する N 末 95 アミノ酸は必要ではなく、これらの蛋白と USP10 による DSB 修復促進との関連はないことが示唆された。

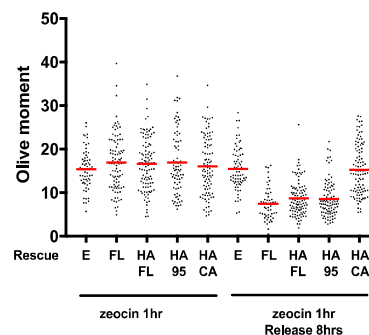


図2 DSB修復における USP10脱ユビキチン化活性の必要性

(3) USP10 は非相同末端結合 (NHEJ)ではなく相同組み換え (HR)による修復に参与する

DSBは主に NHEJ と HR の2つの経路によって修復される。そこで USP10 がどちらの経路に関わっているかを検討した。エトポシドによる DSB は主に NHEJ で修復されることが知られているが、エトポシド処理後の DSB 修復活性は USP10 WT と KO で差はなかった (図 3)。一方カンプトテシンによる DSB は主に HR により修復されるが、KO での修復活性は WT に比べ顕著に低下していた (図 4)。また HR 修復に際に認められる SCE の数も KO で有意に低下していた。以上より USP10 は HR による DSB 修復活性に必須であることが明らかとなった。

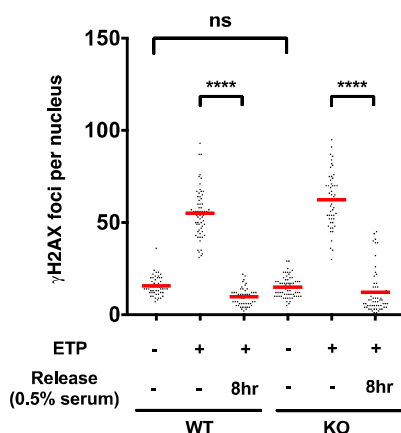


図3 エトポシド処理後のDSB修復活性

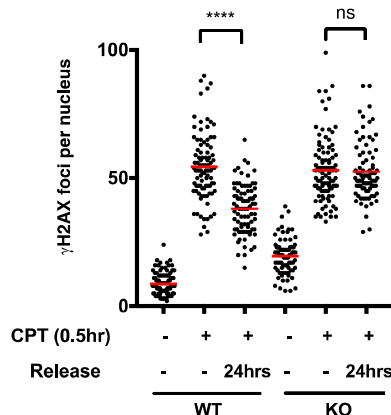


図4 カンプトテシン処理後のDSB修復活性

(4) USP10 の核小体移行シグナル (NoLS) 領域が DSB 修復に必須である

USP10 の N 末端側に NoLS が存在することを見出した。核小体は DDR において重要な役割を持つことが知られている。そこで USP10 の NoLS 欠失変異体と、USP10 の NoLS を SV40 NLS と入れ替えた変異体を作製、それらを USP10 KO 細胞に戻し、DSB 修復活性を検討した。その結果、NoLS 欠失変異体では DSB 修復活性が回復せず、これは SV40 NLS と入れ替えた変異体でも同様であった。以上より USP10 NoLS は DSB 修復活性に必須であることが明らかとなった。

(5) USP10 による DNA-PKcs 活性の制御

USP10 KO マウスの表現型と酷似するマウスとして DNA-PKcs 5A 変異マウスが存在する。これは DNA PKcs のリン酸化クラスター部位である ABCDE 領域のリン酸化部位をアラニンに置換した変異をもつマウスである。このリン酸化は自己リン酸化によるものとされており、DNA-PKcs 活性制御に関与すると考えられている。そこで USP10 WT および KO 細胞における DNA-PKcs 活性を検討したところ、USP10 KO 細胞では DNA-PKcs 活性が WT に比べ亢進していることを見出した。したがって USP10 KO 細胞での DSB 修復の異常は、過剰な DNA-PKcs 活性に起因する可能性が示唆された。そこで USP10 KO 細胞において DNA-PKcs をノックダウンしたところ USP10 KO 細胞における DSB 修復活性が回復した (図 5)。さらに ABCDE クラスターを脱リン酸化し、DNA-PKcs 活性化に必須とされる protein phosphatase 6 (PP6) をノックダウンしても同様の結果が得られた。以上より USP10 は DNA-PKcs の活性を制御することで DSB の HR による修復を促進していることが明らかとなった。

(6) USP10 は SAPS1 と結合する

PP6 は SAPS1~3 と複合体を形成し機能していると考えられている。そこで USP10 にビオチン化酵素 AirID を付加し近接依存性ビオチン化法により SAPS との結合を検討した。その結果 USP10 と SAPS1 の結合が認められた。さらに USP10 N 末欠失変異体を用いた解析により、USP10 のアミノ酸 197-257 部位が SAPS1 との結合に必須であり、この変異体は DSB 修復促進活性がないことが明らかとなった。したがって USP10 は SAPS1 もしくは PP6 複合体中の他の蛋白を脱ユビキチン

ン化することで PP6 の活性を制御し、その結果 DNA-PKcs 活性を制御しているモデルが考えられた。

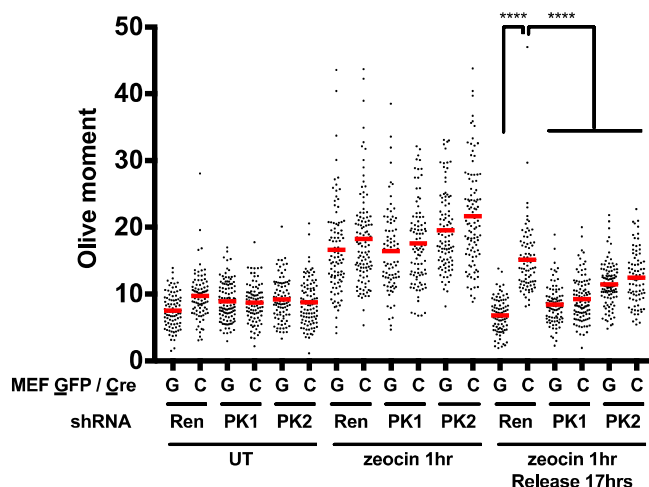


図5 DNA-PKcsノックダウンはUSP10 KOをレスキューする。

本研究により USP10 が DNA-PKcs 活性を制御することで DSB 修復を促進していることが明らかとなった。したがって USP KO マウスに見られる HSC の消失は、DNA-PKcs の活性亢進に起因する可能性が高い。DSB 修復機構の異常はファンconi貧血など HSC 維持の破綻につながる事が知られており、USP10 は原因不明の貧血の責任遺伝子である可能性がある。また USP10 を阻害することで、各種がんに対する抗がん剤や放射線治療の効果を上げるような臨床応用も期待できる。

<引用文献>

Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Matsuki H, Yoshita M, Tanaka Y, Fujii M. HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood* 122: 715-725 (2013)

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: 1116-1129 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takahashi Masahiko, Kitaura Hiroki, Kakita Akiyoshi, Kakahana Taichi, Katsuragi Yoshinori, Nameta Masaaki, Zhang Lu, Iwakura Yuriiko, Nawa Hiroyuki, Higuchi Masaya, Komatsu Masaaki, Fujii Masahiro | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 USP10 Is a Driver of Ubiquitinated Protein Aggregation and Aggresome Formation to Inhibit Apoptosis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 433 ~ 450 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.11.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 宇谷公一、逆井良、岩淵邦芳、樋口雅也 |
| 2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP10によるDNA損傷応答制御 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宇谷公一、逆井良、岩淵邦芳、樋口雅也 |
| 2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP10によるDNA損傷修復経路の制御 |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|