

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570209

研究課題名(和文) タンパク質分解にはたらくオルガネラ特異的なユビキチン化制御分子の機能解析

研究課題名(英文) Roles of the organelle-specific ubiquitination regulators in protein degradation

研究代表者

中村 信大 (Nakamura, Nobuhiro)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：80361765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の品質管理は細胞機能の維持に必須なシステムであるが、その作用機序は十分に解明されていない。本研究では、小胞体に局在する脱ユビキチン化酵素USP19の機能解析を行い、USP19がタンパク質品質管理に働くユビキチン化酵素MARCH6を脱ユビキチン化して安定化し、その酵素活性が上昇することを明らかにした。従って、USP19が小胞体のタンパク質品質管理の制御に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although protein quality control is essential for maintaining cellular function, its molecular mechanism is not fully understood. In this study, we performed the characterization of the endoplasmic-reticulum (ER) deubiquitinating enzyme USP19 and showed that USP19 stabilizes the ER-associated ubiquitinating enzyme MARCH6 via deubiquitination. It is known that MARCH6 has a role in protein quality control in the ER. In addition, the stabilization of MARCH6 increases its enzymatic activity and thereby promotes degradation of the mutant ABCB11, a substrate of MARCH6. These results suggest that USP19 is involved in the regulation of protein quality control in the ER.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ユビキチン タンパク質分解 小胞体 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

細胞は正常な機能を維持するために、タンパク質の品質(構造)を監視し量を調節している。小胞体では、構造が異常な新生タンパク質はユビキチン化されてプロテアソームによる分解を受ける。この分解機構は小胞体関連分解(ERAD)と呼ばれ、タンパク質の品質管理だけでなく、特定の受容体や酵素の発現量の調節も行なう。最近では、ERADに良く似た分解系がミトコンドリアにもあることが示されている。品質管理機構の破綻による異常タンパク質の蓄積は、細胞の機能障害や死を引き起こし、神経変性疾患の発症との関連が示されている。しかしながら、異常分子の認識、ユビキチン化制御、プロテアソームへの輸送の分子メカニズムは不明な点が多い。私たちは、小胞体やミトコンドリアに局在する脱ユビキチン化酵素(USP19とUSP30)を発見して、後述のように品質管理機構におけるユビキチン化やタンパク質分解の制御に深く関わる可能性を見出した。USP19(小胞体)とUSP30(ミトコンドリア)はいずれもオルガネラ膜にアンカーされて機能することから、両者が異なるオルガネラの分解系のなかで共通の役割を演じている可能性もあり興味深い。

2. 研究の目的

タンパク質の品質管理は細胞機能の維持に必須なシステムであるが、その作用機序は十分に解明されていない。私たちが見つけた膜貫通型の脱ユビキチン化酵素は、小胞体やミトコンドリアに局在してタンパク質分解に関与する新しい制御因子であることが分かった。本研究では、これらの脱ユビキチン化酵素や新規のユビキチン化酵素の機能解析を行い、オルガネラにおけるタンパク質分解の分子メカニズムと細胞生理的な意義を明らかにして、タンパク質品質管理機構の理解に役立てることを目指す。

3. 研究の方法

1) USP19のERADにおける作用機序と活性調節機構の解析
小胞体に局在するユビキチン化酵素群は自己ユビキチン化により分解を受ける不安定分子である場合が多いが、USP19によって脱ユビキチン化されることにより分解を免れている可能性について検討した。小胞体E3酵素であるMARCH6、Hrd1、gp78についてUSP19の基質となり得るかを、293T細胞やHeLa細胞を用いて免疫沈降法により相互作用を確認したのち、USP19の過剰発現およびRNAiによる発現抑制によってこれらE3酵素のユビキチン化や安定性(パルスチェイス法)に影響がないか調べた。USP19のERADへの影響を調べるために、小胞体E3酵素の基質分子の発現量への影響について解析をした。次に、

USP19のN未領域のプロセシングの分子機構を明らかにするために、USP19のC末側切断断片を精製した後、アミノ酸シーケンスを行って切断認識配列の特定を行った。アミノ酸点変異をUSP19に導入して、切断認識配列の機能の確認と、プロセシングが小胞体E3酵素の安定性に与える影響について解析をした。

2) ミトコンドリアタンパク質の分解機構の解析
MARCH5やUSP30のノックダウン細胞株を用いて、ミトコンドリア内膜タンパク質UCPのユビキチン化量がMARCH5やUSP30の酵素活性に依存するか解析し、UCPのプロテアソーム分解との相関について調べた。同様の解析を、外膜タンパク質基質を用いて行い比較検討した。また、ERAD関連分子(VCP/p97などの分子シャペロン)とMARCH5やUSP30との相互作用について免疫沈降法により調べた。

3) 新規膜貫通型E3酵素のクローニングと細胞内局在の決定

約50種類あるヒトの膜貫通型E3酵素のうち、特に解析が進んでいないもの(約25分子)をクローニングした。これらの分子にタグを付加して培養細胞に発現させておおよその細胞内局在や膜結合性について調べた。小胞体などのオルガネラに局在するものに注目して、組織発現をPCR法やin situ hybridizationにより確認した。

4. 研究成果

1) USP19のERADにおける作用機序と活性調節機構の解析
まず、免疫沈降法によりUSP19に相互作用する小胞体E3酵素としてMARCH6とHrd1を同定することができた。Gp78は相互作用が確認できたもののMARCH6とHrd1と比較すると結合が非常に弱いものであることが分かった。内在性のMARCH6とHrd1との相互作用についても確認した。次に、USP19の過剰発現によりMARCH6やHrd1の脱ユビキチン化が促進されて安定性が増すことを認め、この効果はUSP19の脱ユビキチン化酵素活性を消失すると無くなることが分かった。逆に、USP19の発現をRNAiで抑制すると、MARCH6やHrd1のプロテアソーム分解が促進して不安定化することを明らかにした。したがって、USP19は脱ユビキチン化を介して一部の小胞体E3酵素の安定化に寄与することが示された。さらに、USP19によるMARCH6の安定化は、MARCH6の基質分子である変異体ABCB11の不安定化に結びつくことが分かった。USP19の発現抑制では変異体ABCB11の発現量が上昇したことから、USP19は小胞体E3酵素のタンパク質量を調節することでE3酵素活性やERADを制御している可能性が示され

た。

USP19 の N 末領域のプロセシングの認識配列を特定したところ、種間で高く保存された Gly-Gly 配列であることが分かった。この配列はユビキチンの C 末部分にも保存されており、脱ユビキチン化酵素の切断認識配列として知られている。実際に、USP19 自身の酵素活性によってプロセシングが行われることを明らかにした。変異体を用いた解析から、USP19 のプロセシング自体は E3 酵素の安定化や ERAD に大きな影響を与える結果は得られず、USP19 の酵素活性調節に関与していないことが示された。さらに、切断された N 末断片は核内に移行すること、また、熱ショックタンパク質である HSP90 と結合することを認めており、シグナル伝達や転写調節への関与が予想された。

2) ミトコンドリアタンパク質の分解機構の解析
MARCH5 や USP30 のノックダウン細胞株を用いて、ミトコンドリア内膜タンパク質 UCP のユビキチン化量や安定性について調べたが、大きな影響を受けていないことが分かった。しかしながら、他の基質分子の同定を行う過程で USP30 と MARCH5 が相互作用することを免疫沈降法により認めた。この結合により MARCH5 の自己ユビキチン化が負に制御されることを示す結果を得たことから、USP30 が MARCH5 の分解制御を行い E3 活性の調節を行っている可能性が考えられた。

3) 新規膜貫通型 E3 酵素のクローニングと細胞内局在の決定

約 50 種類あるヒトの膜貫通型 E3 酵素のうち、特に解析があまり進んでいないもの(約 25 分子)をクローニングして、培養細胞に発現させて細胞内局在について調べた。幾つかの分子が小胞体に局在することを認め、小胞体関連分解など機能することが予想された。その中の RNF186 は潰瘍性大腸炎との関連が報告されており、発症メカニズムを知る上で RNF186 の機能解析は何らかの知見を与えてくれるものと考えた。PCR 法により RNF186 がマウスの腸や腎臓に多く発現することが認められたので、これらの組織での発現細胞の特定を in situ ハイブリダイゼーション法により行った。RNF186 は大腸や腎尿細管の上皮細胞に強く発現することを確認した。

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 4 件)

1. Zhao B, Ito K, Iyengar PV, Hirose S, Nakamura N.
MARCH7 E3 ubiquitin ligase is highly expressed in developing spermatids of rats

and its possible involvement in head and tail formation.

Histochem. Cell Biol. 139(3), 447-460, 2013 (査読有り)

2. Han SO, Xiao K, Kim J, Wu JH, Wisler JW, Nakamura N, Freedman NJ, Shenoy SK.
MARCH2 promotes endocytosis and lysosomal sorting of carvedilol-bound β 2-adrenergic receptors.
J. Cell Biol. 199(5), 817-830, 2012 (査読有り)
3. Nakamura N.
Ubiquitination regulates the morphogenesis and function of sperm organelles.
Cells 2(4), 732-750, 2013 (査読有り)
4. Nakamura N, Harada K, Kato M, Hirose S.
Ubiquitin-specific protease 19 regulates the stability of the E3 ubiquitin ligase MARCH6.
Exp. Cell Res. 328(1), 207-216, 2014 (査読有り)

[学会発表](計 4 件)

1. Zhao B, Ito K, Iyengar PV, Hirose S, Nakamura N.
Immunohistochemical localization of MARCH7 E3 ubiquitin ligase in developing spermatids of rats.
7th International Symposium on Biomedical Engineering, 2012年11月10日, 桐蔭横浜大学, 神奈川県横浜市
2. Nakamura N.
Control of mitochondrial morphology by ubiquitination and deubiquitination.
8th International Symposium on Biomedical Engineering, 2013年10月26日, 桐蔭横浜大学, 神奈川県横浜市(招待講演)
3. Ebisawa Y., Nakamura N.
Regulation of the activity of USP19 deubiquitination enzyme.
8th International Symposium on Biomedical Engineering, 2013年10月26日, 桐蔭横浜大学, 神奈川県横浜市
4. Harada K., Hirose S, Nakamura N.
The deubiquitination enzyme USP19 regulates the ERAD pathway by stabilizing the E3 ubiquitin ligase.
8th International Symposium on Biomedical Engineering, 2013年10月26

日、桐蔭横浜大学、神奈川県横浜市

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nnakamura.bio.titech.ac.jp/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 信大 (Nakamura, Nobuhiro)
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授
研究者番号：80361765

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：