

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	朴 錦花
論文題目	脱ユビキチン化酵素の酵素学的性状の解析ならびに活性調節機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>タンパク質のユビキチン(Ub)化修飾は、タンパク質分解やDNA修復などのシグナルとして機能し、多くの生理現象で重要な役割を果たしている。タンパク質のUb化修飾は可逆的な反応であり、Ub添加酵素と脱Ub化酵素によって司られている。脱Ub化酵素遺伝子はヒトでは約90種類存在するが、ほとんどの分子の酵素学的性状、活性制御機構や生理機能は解明されていない。本研究では、生体内における脱Ub化酵素反応の役割やその制御機構の解明に向けて、ヒトUbiquitin specific protease(USP)47に着目し、その酵素学的性状の解析ならびに触媒活性発現における分子内ドメインの機能解析を行った。また、ストレス刺激した細胞における脱Ub化酵素活性の動態を検討し、活性変化を受ける分子を同定することで、細胞のストレス応答反応としての脱Ub化酵素活性の意義について解析した。</p>			
【第一章 ヒトUSP47の酵素学的性状の解析】			
<p>USPファミリーは、脱Ub化酵素中で最も大きな遺伝子ファミリーを形成している。本研究では、まず、その脱Ub化酵素活性が見出されていないヒトUSP47の酵素学的性状をリコンビナントタンパク質を用いて解析した。</p> <p>ヒトUSP47のリコンビナントタンパク質はバキュロウイルス発現系を用いて作製した。リコンビナントUSP47のSDS-PAGEゲル上での見かけの分子量は、約145,000であった。また、ゲルろ過解析の結果、USP47は単量体で存在していることが明らかになった。USP47の脱Ub化酵素活性を検討した結果、USP47は、UbのC末端側のテトラペプチドであるLRGGペプチドにaminomethylcoumarin(AMC)が結合したLRGG-AMCに対しては全く分解活性を示さず、またUb分子にAMCが結合したUb-AMCに対しては弱いUb遊離活性(DUB活性)しか示さなかった。一方、USP47は、Ubと成熟型ヒトグランザイムBの融合タンパク質(Ub-GrB)、Ub分子内のLys48あるいはLys63を介してUb分子が結合したポリUb鎖に対して高いUb遊離活性を示した。これらの結果から、USP47が脱Ub化反応を触媒する酵素であることが明らかになった。USP47の各種プロテアーゼ阻害剤の感受性を検討した結果、本酵素は<i>N</i>-ethylmaleimide、TPCK、Ub-CHOによって阻害されることが明らかになった。USP47の基質特異性ならびに阻害剤感受性プロファイルを最も相同性の高いUSP7と比較した結果、著しい差異が認められたことから、USP47はUSP7とは異なった基質に作用し、固有の役割を担っていることが示唆された。</p>			
【第二章 USP47の活性発現における分子内ユビキチン様ドメインの役割の解明】			
<p>二次構造モチーフ解析の結果、USP47の触媒ドメインのC末端側にUb様構造であるUblドメインが3つの存在していた。そこでUSP47の脱Ub化酵素活性の発現におけるUblドメインの役割の解明を、欠失変異体などを用いた生化学的解析によって行った。</p>			

USP47分子内のUblドメインをC末端から順次欠失させた変異体を作製し、それらの脱Ub化酵素活性を検討した。Ub二量体型基質Di-UbおよびポリUb鎖を基質として用いた検討の結果、Ubl欠失変異体のDi-UbおよびポリUb鎖切断活性は野生型酵素に比べて著しく低下していた。一方、Ub-AMC分解活性は、Ubl欠失変異体USP47の方が野生型酵素よりも高値を示した。また、野生型USP47とDi-Ub基質との反応液中に別途作成したUSP47のUblドメインのリコンビナントタンパク質を添加するとUSP47によるDi-Ubの分解が阻害されるものの、Ub-AMCを用いて同様の解析を行った際にはUb-AMC分解活性はUblタンパク質添加による影響は受けないことを見出した。

以上の結果から、USP47がポリUb鎖に対して高い切断活性を示す分子基盤として以下のモデルが考えられた。すなわち、Ublドメインは活性ポケット入口近傍で単量体Ub基質の進入に対して阻害的に作用している。一方、2分子以上のUbからなる基質の消化の場合には、1分子のUbがUblドメインと相互作用することで一部構造変化を引き起こし、遊離を受けるUb部分が活性ポケットに入りやすくなると考えられる。

【第三章 酸化ストレス応答に関わる脱ユビキチン化酵素の同定】

Ub付加反応が様々な細胞応答に伴って巧みに制御されているのに対して、脱Ub化反応の活性調節についてはほとんど明らかとなっていない。そこで、ストレス刺激時のDUB活性動態変化を解析し、活性制御を受けるDUBの同定を行った。

酸化ストレス刺激時のHeLa細胞の細胞抽出液をイオン交換クロマトグラフィーによって分画し、各画分に含まれる脱Ub化酵素活性をLRGG-AMCとUb-GrBを用いて測定し、無刺激細胞の場合と比較解析した。その結果、過酸化水素を添加した細胞では、LRGG-AMC分解活性の低下が認められた。本画分に含まれる酸化ストレス感受性脱Ub化酵素をUb activity-based probeを用いて探索したところ、Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH)-3が同定された。これらの知見より、UCH-L3が酸化ストレス刺激によって生じた活性酸素種の良い標的であることが明らかとなり、その不活性化は網膜症などの酸化ストレス疾患の一因となり得ることが示唆された。

本研究では、ヒトUSP47の酵素学的性状の解析を通じて、本酵素がポリUb鎖の切断を得意とする酵素であることを見出し、さらにその活性発現における分子内Ublドメインの作用モデルを提示することができた。これらの知見は、USP47の生理機能を解明する上で重要な知見となり得ると考えられる。また、筆者はUCH-L3が酸化ストレス応答に関わる脱Ub化酵素であることを見出した。本知見は、脱Ub化酵素の活性変化が様々な疾患と関わっていることを示唆するものであり、脱Ub化酵素活性動態と疾患発症との相関解析などの解析を通じて、脱Ub化酵素が疾患標的分子として同定され得ることを期待させる重要な知見である。

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質のユビキチン(Ub)化修飾は、タンパク質分解やDNA修復などのシグナルとして機能し、多くの生理現象で重要な役割を果たしている。タンパク質のUb化修飾は可逆的な反応であり、Ub添加酵素と脱Ub化酵素によって司られている。脱Ub化酵素遺伝子はヒトでは約90種類存在するが、ほとんどの分子の酵素学的性状、活性制御機構や生理機能は解明されていない。著者は、本研究において、生体内における脱Ub化酵素反応の役割やその制御機構の解明に向けて、ヒトUbiquitin specific protease(USP)47に着目し、その酵素学的性状の解析ならびに触媒活性発現における分子内ドメインの機能解析を行った。また、ストレス刺激した細胞における脱Ub化酵素活性の動態を検討し、活性変化を受ける分子を同定することで、細胞のストレス応答反応としての脱Ub化酵素活性の意義について解析した。

著者は、はじめに、脱Ub化酵素活性が見出されていないヒトUSP47の酵素学的性状をリコンビナントタンパク質を用いて解析した。すなわち著者は、USP47は分子量約145kDaで単量体で存在していること、UbのC末端側を模倣した基質LRGG-AMCに対しては分解活性を示さないこと、基質Ub-AMCに対しては弱いUb遊離活性しか示さないことを明らかにした。また著者は、USP47は、Ubと成熟型ヒトグランザイムBの融合タンパク質(Ub-GrB)、Ub分子内のLys48あるいはLys63を介してUb分子が結合したポリUb鎖に対して高いUb遊離活性を示すことなどから、USP47が脱Ub化反応を触媒する酵素であることを明らかにした。さらに著者は、USP47の基質特異性ならびに阻害剤感受性プロファイルを最も相同性の高いUSP7と比較した結果、USP47はUSP7とは異なった基質に作用し、固有の役割を担っている可能性を示した。

著者は、次に、ヒトUSP47の二次構造モチーフを解析した結果、USP47の触媒ドメインのC末端側にUb様構造であるUblドメインが3つ存在していることから、USP47の脱Ub化酵素活性の発現におけるUblドメインの役割の解明を、欠失変異体などを用いた生化学的解析によって行った。すなわち、著者は、USP47分子内のUblドメインをC末端から順次欠失させた変異体を作製し、それらの脱Ub化酵素活性を検討した。Ub二量体型基質Di-UbおよびポリUb鎖を基質として用いた検討の結果、Ubl欠失変異体のDi-UbおよびポリUb鎖切断活性は野生型酵素に比べて著しく低下しており、一方、Ub-AMC分解活性は、Ubl欠失変異体USP47の方が野生型酵素よりも高値を示すことを示した。また、野生型USP47とDi-Ub基質との反応液中に別途作成したUSP47のUblドメインのリコンビナントタンパク質を添加するとUSP47によるDi-Ubの分解が阻害されるものの、Ub-AMCを用いて同様の解析を行った際にはUb-AMC分解活性はUblタンパク質添加による影響は受けないことを見出した。これらの結果から、著者は、USP47がポリUb鎖に対して高い切断活性を示す分子基盤として、a) Ublドメインは活性ポケット入口近傍で単量体Ub基質の進入に対して阻害的に作用する機構、b) 2分子以上のUbからなる基質の消化の場合には、1分子のUbがUblドメインと相互作用することで一部構造変化を引き起こし、遊離を受けるUb部分が活性ポケットに入りやすくなる機構、の2つのモデルを提案した。

著者は、続いて、ストレス刺激時のDUB活性動態変化を解析し、活性制御を受けるDUBの同定を行った。すなわち、酸化ストレス刺激時のHeLa細胞の細胞抽出液をイオン交換クロマトグラフィーによって分画し、各画分に含まれる脱Ub化酵素活性をLRGG-AMCとUb-GrBを用いて測定し、無刺激細胞

の場合と比較解析した。その結果、著者は、過酸化水素を添加した細胞では、LRGG-AMC分解活性の低下が認められることを明らかにし、さらに、本画分に含まれる酸化ストレス感受性脱Ub化酵素をUb activity-based probeを用いて探索した結果、Ubiquitin C-terminal hydrolase(UCH)-3を同定した。これらの知見より、著者は、UCH-L3が酸化ストレス刺激によって生じた活性酸素種の良い標的であることを明らかにし、その不活性化は網膜症などの酸化ストレス疾患の一因となり得ることが示唆された。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成25年8月28日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、（平成27年9月23日までの間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 25 年 12 月 23 日以降