

要約

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

朴錦花

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 (図1)。脱Ub化酵素遺伝子はヒトでは約90種類存在するが (表1)、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。

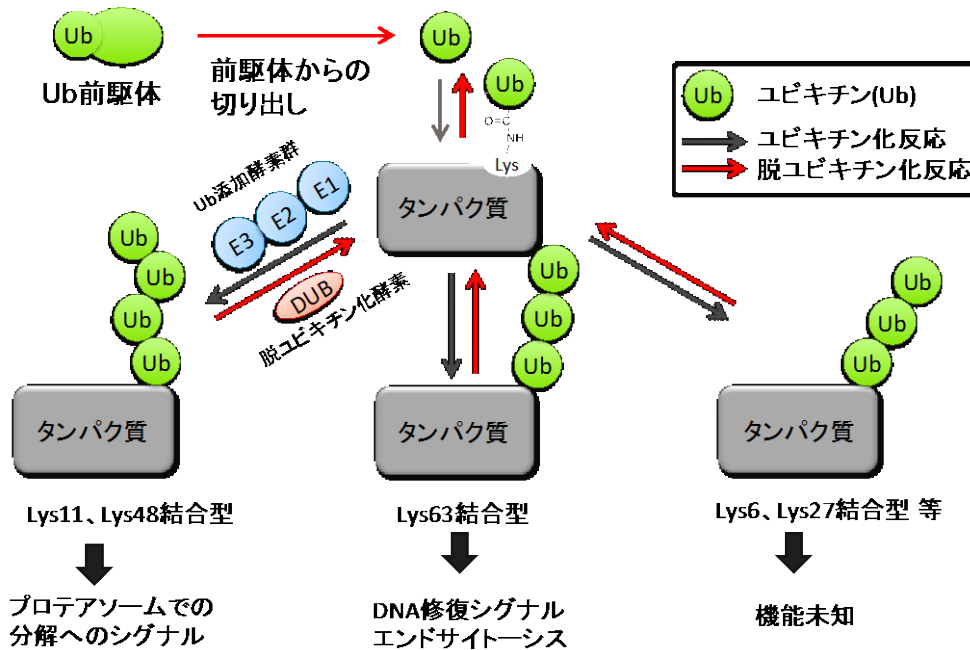


図1 タンパク質の Ub 化修飾とその生理機能

表1 DUB ファミリーの分類

活性中心	ファミリー名	遺伝子数
Cys	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (UCH)	4
	Ubiquitin specific protease (USP)	56
	Ovarian tumor protease (OTU)	15
	Machado-Joseph disease protein domain protease (MJD)	4
Zn	Jab1/MPN domain metalloenzyme (JAMM)	8

【第一章 ヒトUSP47の酵素学的性状の解析】

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。本章では、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。

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N-ethylmaleimide、TPCK、Ub-CHOによって阻害されることが明らかとなった。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。

【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】

第一章の解析の結果、USP47がLys48結合型およびLys63結合型ポリUb鎖消

化能を有することを明らかにした。一方、モノUb基質であるUb-AMCに対するUSP47の消化能は他のDUBに比べて低いことも明らかになった。これらの結果は、USP47にはポリUb鎖を認識する機構が備えている可能性を示唆している。そこで第二章では、USP47のDUB活性発現の機構を明らかにする目的で、その分子内ドメインに焦点を当て、その役割について解析を行った。

USP47分子内のUb様 (Ubl) ドメインをC末端側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、Ubl欠失変異体USP47のUb-AMC分解活性は野生型USP47と同程度であった。また、野生型USP47のUb-AMC分解活性はUSP47のUblドメインの添加によってほとんど影響を受けなかったが、そのDi-Ub分解活性は阻害された。

以上の結果から、触媒ドメインのC末端側に存在する3つのUblドメインはUSP47のポリUb鎖消化活性には重要であること、しかしながら、モノUb遊離活性にはあまり必要ではないことが明らかになった。そして、USP47のUblドメインの作用モデルとして、本領域が基質ポリUb鎖との相互作用を介して、遊離を受けるUb部分を触媒ポケットへと誘導している可能性が考えられた。

【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になっていない。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グ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鎖の消化を担っていること、さらにはその活性発現には分子内Ublドメインが重要であることを明らかにした。これらの知見は、今後、USP47の生理機能を理解する上で重要な知見となり得ると考えられる。また著者はUCH-L3が酸化ストレス感受性DUBであることを見出した。本知見は細胞ストレスなどに

よってDUB活性の変化が酸化ストレスなどの疾患の発症の原因となりうることを示唆するものであり、DUB活性動態と疾患発症との相関解析などを通じて、今後、DUBが疾患標的因子として同定されることを示唆する重要な知見であると考えられる。また本研究を通じて得られた成果は、タンパク質のUb化修飾の多彩な機能に対する理解をさらに深めることに通じる有用な知見となり得ると期待される。