

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

2013

朴錦花

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

2013

京都大学大学院薬学研究科

医薬創成情報科学専攻

システムケモセラピー（制御分子学）分野

朴錦花

目次

緒言	1
第一章 ヒト USP47 の酵素学的性状の解析	5
第一節 リコンビナントヒト USP47 の調製および物理化学的性状解析	7
第二節 リコンビナントヒト USP47 の DUB 活性	9
第一項 DUB 活性測定用人工蛍光基質に対する USP47 の DUB 活性	9
第二項 新たな DUB 活性測定系の構築とそれを用いた USP47 の DUB 活性検討	10
第三項 USP47 のポリ Ub 鎖消化能の検討	13
第三節 USP47 のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性プロファイル	16
考察	19
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	21
第一節 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体の DUB 活性	21
第二節 USP47 における Ubl ドメインによるアロステリックな活性化 モデルの検討	27
第三節 USP47 の Ubl ドメインとポリ Ub 鎖との相互作用の検討	32
考察	35
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	39
第一節 酸化ストレス刺激による DUB 活性動態変化	40
第二節 酸化ストレス感受性 DUB の同定	42
第三節 酸化ストレス刺激による UCH-L3 の LRGG-AMC 分解活性低下	47
第一項 HeLa 細胞での酸化ストレスによる UCH-L3 活性の低下	47
第二項 NIH3T3 細胞での酸化ストレスによる UCH-L3 活性の低下	48
考察	50
総括	52
実験項	54
参考文献	62
略語表	71
謝辞	72

緒言

ユビキチン (Ub) は 76 アミノ酸からなる小タンパク質であり、その立体構造は、 α -helix 1 個と β -sheet 4 個から構成される β -grasp と呼ばれる構造をとっている (図 1) [1, 2]。

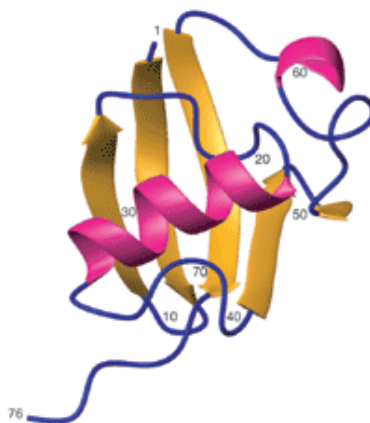


図 1 Ub の立体構造

Ub は 1 つの α -helix (ピンク) と 4 つの β -sheet (オレンジ) から構成される β -grasp 構造をとっている。

Ub は、その C 末端 Gly76 のカルボキシル基がタンパク質の Lys 残基の側鎖 ϵ -アミノ基にイソペプチド結合を形成することで、タンパク質の翻訳後修飾因子として機能する。タンパク質への Ub 付加反応は、Ub 活性化酵素 (E1)、Ub 結合酵素 (E2)、Ub リガーゼ (E3) から構成される Ub 添加酵素群によるカスケード反応を介して進行する (図 2) [3, 4]。すなわち、まず、Ub Gly76 のカルボキシル基は ATP 依存的に E1 の活性中心 Cys 残基とチオエステル結合を形成する。次いで、Ub は E1 から E2 の活性中心 Cys 残基上へと受け渡され、さらにその後、E3 酵素上へと転移される。E3 の基質認識によって、Ub 分子が基質タンパク質の Lys 残基上へと付加される。ヒトゲノム上には、E1 遺伝子が 2 種類、E2 遺伝子が約 50 種類、E3 遺伝子が 1000 種以上存在することが知られており、その多様性がタンパク質の Ub 化修飾を巧妙に制御している[5]。さらに、E3 基質タンパク質に付加された Ub 分子内のアミノ基と別の Ub 分子の C 末端カルボキシル基との間にイソペプチド結合が形成されることでポリ Ub 鎖が形成される。Ub 分子内には 8 つのアミノ基、すなわち Met1 の α -アミノ基あるいは Lys 残基

(Lys6、Lys11、Lys27、Lys29、Lys33、Lys48 および Lys63) の ϵ -アミノ基が存在し、それぞれがポリ Ub 鎖形成に関与している[6]。各 Ub 化修飾タンパク質での Ub の機能は、Ub の重合分子数 (1 分子のみ、あるいは多分子) あるいはポリ Ub 鎖の結合様式 (ポリ Ub 鎖形成に利用される Ub 分子内 Lys 残基の違い) によって規定される。例えば、Lys11 および Lys48 結合型ポリ Ub 鎖が付加したタンパク質はプロテアソームによる分解へと導かれ、モノ Ub 化修飾および Lys 63 結合型ポリ Ub 鎖はエンドサイトーシスや DNA 修復に関与する[7-9]。また最近では、Met1 の α -アミノ基を介して重合する直鎖ポリ Ub 鎖が自然免疫応答や鉄代謝に関与していることも明らかになっている[10-12]。一方、細胞内では Lys6 結合型や Lys27 結合型ポリ Ub 鎖なども生成されるが、それらの生理機能については未だ不明である[13-16]。

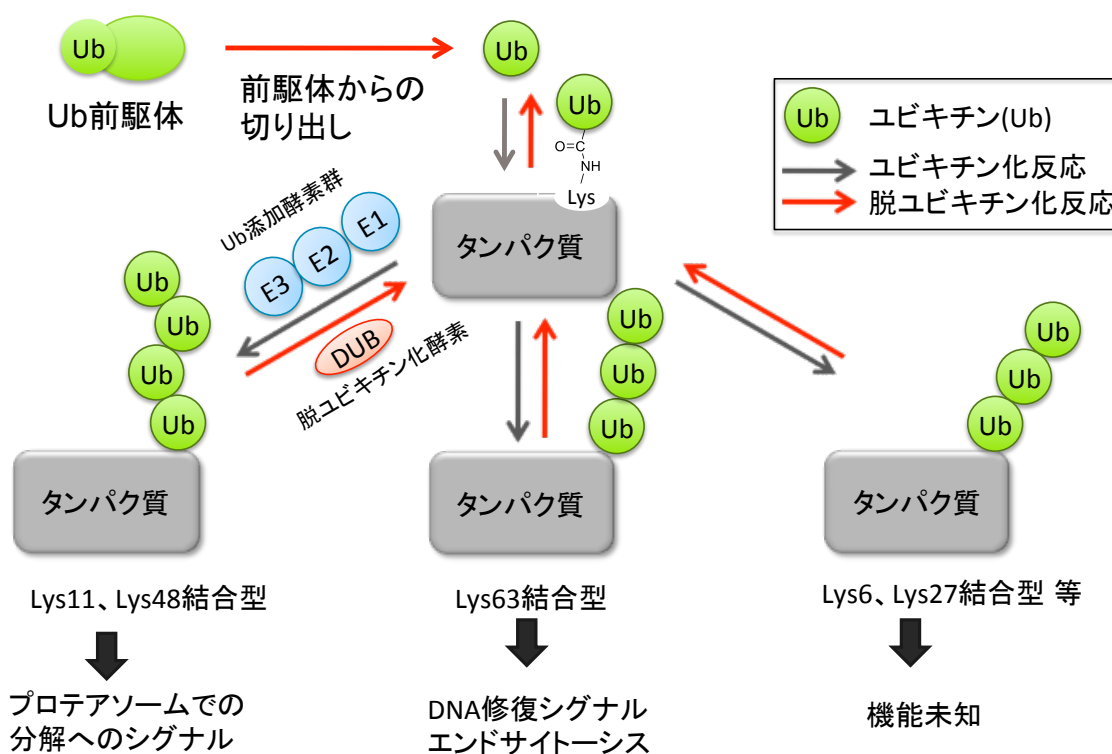


図2 タンパク質の Ub 化修飾とその生理機能

タンパク質の Ub 化修飾は Ub 添加酵素群と DUB の働きによって制御される。タンパク質上に形成されたポリ Ub 鎖は結合型別に生理機能を有している。

また、タンパク質の Ub 化修飾は、Ub 単位での遊離反応である脱 Ub 化反応によって可逆的に制御されている (図 2)。脱 Ub 化酵素 (DUB) 遺伝子はヒトゲノム上に約 90 種類存在し、活性中心構成アミノ酸および相同性によって 5 種類のサブファミリーに分類されている (表 1、図 3)。

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

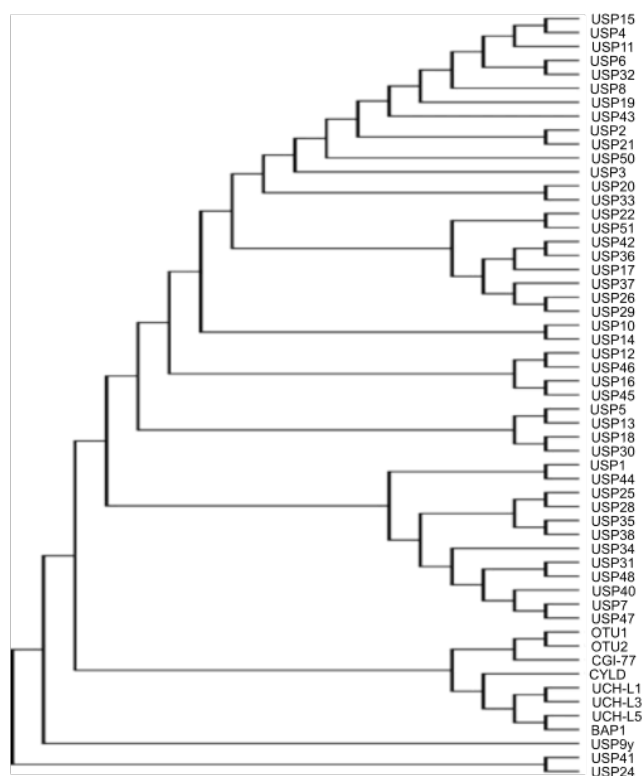


図 3 DUB の分子系統樹

ヒト DUB の触媒ドメインのアミノ酸配列をもとに ClustalW 解析を行った。解析結果から近接接合法により無根系統樹を作製した。

多種類の E3 がそれぞれ独自の Ub 付加反応を触媒することで、Ub の多様な生理機能を生み出しているのと同じく、DUB はそれぞれ異なった基質に対して脱 Ub 化反応を触媒することで、Ub 機能の調節に関与していると考えられる。すなわち複雑な Ub 機能の詳細を理解するためには、DUB の酵素学的性状、基質および生理機能を解明することが必須であるが、その研究は十分に進んでいない[4,17]。そこで本研究では、生体内における脱 Ub 化反応の役割やその制御機構の解明に向けて生化学的、化学生物学的な解析を行った。具体的にはがんとの関連がよく知られている Ubiquitin Specific Protease (USP) 7 と最も相同性が高い DUB であり、未だ酵素学的性状や生理機能が不明な USP47 に焦点を当てて解析を行った[18-22]。その結果、USP47 の DUB 活性を明らかにし、さらには分子内 Ubl ドメインによる活性制御機構の存在の可能性を示すことができた。また、細胞のストレス応答反応としての DUB 活性変動の意義についても解析し、細胞が酸化ストレスを受けた際に Ubiquitin C-terminal Hydrolase (UCH) -L3 が不活性化を受けることを見出した。これらの知見は、今後、DUB の生理機能ならびに Ub 機能の詳細を理解する上で有用になると考えられる。

第一章 ヒト USP47 の酵素学的性状の解析

ヒト USP ファミリーは、約 50 種類の遺伝子から構成されるシステインプロテアーゼファミリーであり、DUB 遺伝子ファミリー中では最も大きなファミリーを形成している[2]。USP ファミリーは 3 残基からなる共通した触媒ユニット (His-Cys-Asp/Asn) を持ち、一部の酵素の立体構造解析の結果から、その酵素活性ドメインはシステインプロテアーゼのパパインと類似した立体構造をとると考えられている[23]。USP ファミリー中には、USP5 や USP14 のように細胞内のタンパク質分解装置であるプロテアソームの機能と関連して Ub のリサイクリングに機能する酵素や、p53 やその E3 である MDM2 に形成されたポリ Ub 鎖の消化を介して細胞増殖に関与する USP7 など、細胞内での役割が詳しく解析されているものもあるが、半数以上の分子についてはその酵素学的性状や生理機能は解明されていない[18, 21, 24, 25]。

ヒト USP47 (EC=3.4.19.12) は全長 1287 アミノ酸からなる DUB である。USP ファミリーメンバーのうちで、USP7 と最も高い相同性を示し、両者間の一次構造上の相同性は活性ドメインで 43%、分子全体では 38% であり、ヒト USP47 の触媒ユニット残基は Cys109-His415-Asn433 であると推定される (図 4、5)。

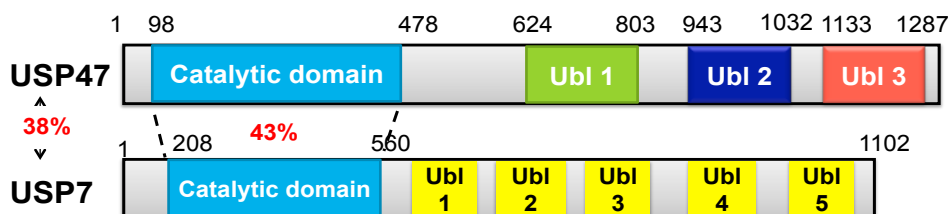


図 4 USP47 の構造スキーム

USP47 と USP7 との一次構造上の相同性は分子全体で 38%、活性中心では 43% である。両酵素の C 末端側には複数の Ubl ドメインが存在する。各酵素の上部に示した数字はアミノ酸残基数を表す。

ヒト USP7	SKKHTGYVGLKNOGATCYMNSLLQTLFFTNQLRKAVYMMPTEG--DDSSKSVPLALORVF	274
ヒト USP8	GGSGPALTLGLRNLGNTCYMNSILOCLCNAPHLADYFNRCYQDDINRSNLLGHKGEVA--	827
ヒト USP47	NKSETGYVGLVNOAMTCYLNLSLLQTLFMTPEFRNALYKWEFESEEDPVTSIPYQLORLF	152
ヒト USP7	YELQHSDEK--PVGTKKLTKSFGW--ETLDSFMQHDVQELCRVLLDNV-----	318
ヒト USP8	KALWLTGQYRYTSPKDFKITIGKINDQFAGYSQDSQELLLFLMDGLHEDLNKAEENNDHL	894
ヒト USP47	VLLQTSKKRAIETTDVTRSFQW--DSSEAWQOHDVQELCRVMFDAL-----	197
ヒト USP7	-----ENKMKGTCEVG--TIPKL-----FRGKMVSYIQCKEV	347
ヒト USP8	DDFKAAEAHWQKHQLNESIIVALFQGGQFKSTVQCLTCHKKSRTFE-----	947
ヒト USP47	-----EQKWKQTEQAD--LINELYQGLKLDYVRCLECGYEGWRIDYQGLKLDYVRCLEC	249
ヒト USP7	DYRSDRRED--YYDIQLSVK--GKNIF----ESFVDYVAVEQLDGDNKYDAGEHGLQ-E	387
ヒト USP8	-----AFMYLSLPL-----ASTSKCTLQDCLRLFSKEEKLTDNNRFYCSHCRARRD	1001
ヒト USP47	GYESWRIDT--YLDIPLVIRPYGSSQAFASVEEALHAFIQPEILDGPNQYFCERCKKCCD	308
ヒト USP7	AEKGVKFLTLFPVHLHLQKRFMYDPQTDQNIKINDRFEP-EQLPLDEFLOKTDPKDPKD	455
ヒト USP8	SLKKIEIWKLPVLLVHLKRFSDY--GRWKQKLTQTSVDPLENLDLSQYVGPK-----NN	1046
ヒト USP47	ARKGLRFLHFPYLLTLQKRFDFDYTTMHRIKLNDRMTFP-EELDMSTFIDVDEKSPKN	367
ヒト USP7	PANYILHAVLVHSGDNHGGHYVYVYLNPKGDGKWKCFDDDVVSRCTKEEALIEHNYGGHDDD	512
ヒト USP8	LKKYNLFSVSNHYGGLDGGHYTAYCKNAARQRWFKFDDHEVSDISVSSV-KSSAAYILFY	1106
ヒト USP47	SLIYELFSVMVHSGSAAGGHYYACIKSFSDEQWYSFNDQHVSRITQED-IKKTHGGSSGS	427
ヒト USP7	L-----SVRHCTNAYMLVY-----IRESKLSVQLQAVTDHDIPOQLVERLQEEKRIEAK	562
ヒト USP8	TSLGPRVTDVAT-----	1118
ヒト USP47	RGYSSAFASSTNAYMLIYRLKDPARNAKFLEV-----DEYPEHIKNLVQKERELEEQE	481
ヒト USP7	RKERQEAHLYMQVQIVAEDQFCGHQGNMDYDEEKVKYTVFKVLKNSSLAELVQSLSQTMG	622
ヒト USP8	-----	
ヒト USP47	KRQREIERNTCKIKL-----FCLHPTKQVMMENKL-----EVHKDKTLKEAVEMAYKMMD	560
ヒト USP7	F----PODQIRL	632
ヒト USP8	-----	
ヒト USP47	LEEVIPLDCCRL	570

図5 ヒト USP7、USP8、USP47 の活性中心付近における一次構造の比較
ヒト USP7、USP8、USP47 の活性中心付近における一次構造上の類似性を ClustalW 解析によって比較した。各酵素の触媒ユニットを形成する Cys を赤、His を紫、Asp/Asn を青で示した。右側には活性中心のアミノ酸番号を示した。USP47 と一致するアミノ酸残基を黄色で示した。USP47 と USP7 は 43% の相同性を、USP47 と USP8 は 25% の相同性を、USP7 と USP8 は 19% の相同性を示した。

また、二次構造予測解析の結果から、USP47 の活性ドメインの C 末端側には、USP7 と同様にユビキチン様構造ドメイン (Ubl ドメイン) が複数存在するという構造上の共通性も認められる[26]。しかしながら、これまでに USP47 の DUB 活性については全く検討されておらず、さらにはその生理機能の理解には至っていない[27]。そこで本研究では、新規の DUB であるヒト USP47 に焦点を当てた生化学的解析を行った。

第一節 リコンビナントヒト USP47 の調製および物理化学的性状

ヒト USP47 の酵素学的性状解析に向け、リコンビナント酵素の発現系構築ならびに調製を行った。リコンビナントヒト USP47 の発現に当たっては、USP7 のリコンビナント酵素の発現で利用されているバキュロウイルス発現系を用いた [20, 28, 29]。ヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞より調製した cDNA を鋳型にして、3'末端に 6xHis タグコード配列を付加したヒト USP47 cDNA を PCR によって増幅し、これをバキュロウイルスベクターへ挿入した。作製ウイルスをヨトウガ培養細胞 Sf9 細胞に感染させて、リコンビナントヒト USP47 の発現を行った。感染 2 日後、 1.08×10^9 個の Sf9 細胞より調製した細胞抽出液から、 Ni^{2+} -chelating sepharose を用いて 400 μg のリコンビナントヒト USP47 を精製した。得られた USP47 の SDS-PAGE 上での見かけの分子量は約 146,000 であり、この結果は構成アミノ酸から推定される USP47 の分子量 148045.64 とほぼ一致していた (図 6)。

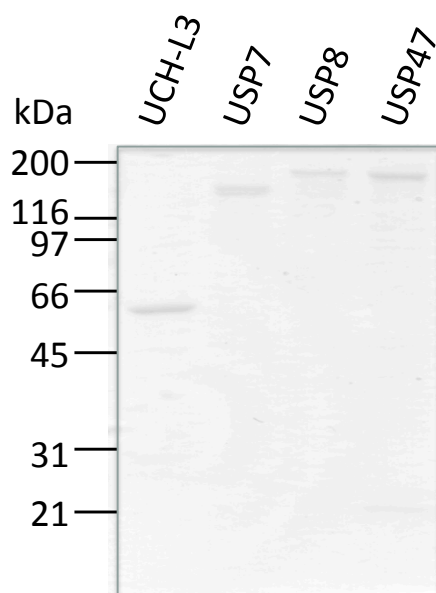


図 6 リコンビナント DUB の発現、調製
精製した各リコンビナント DUB (1 μg) を SDS-PAGE (8%ゲル) で分離した後、CBB 染色を行った。

さらに、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いた解析の結果、リコンビナントヒト USP47 はシングルピークとして検出され、その分子量は約 148,000 と算出された (図 7)。SDS-PAGE での結果と併せると、USP47 は水溶液中では単量体で存在していることが示唆された。

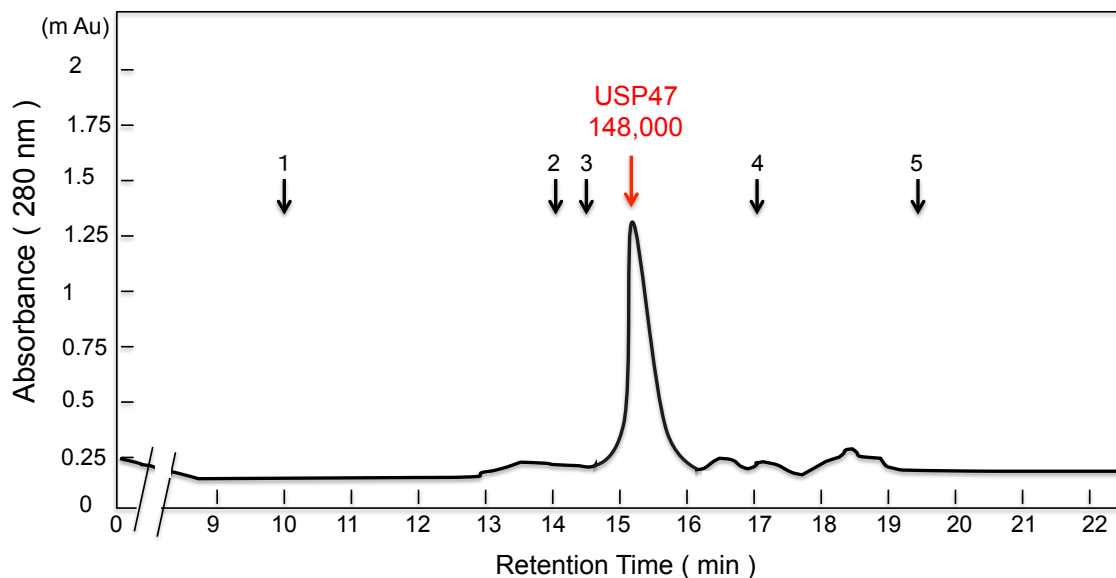


図 7 ゲルろ過クロマトグラフィー解析

USP47 (1 μg) をゲルろ過カラム (TSK G3000SW) を用いた HPLC で分離した。流速は 1 mL/min、バッファーは 100 mM の Na_2SO_4 を含む 50 mM の Tris (pH 7.5) の条件で行い、280 nm での吸光度を測定した。分子量マーカーとして Thyroglobulin (669,000 : 1)、Catalase (235,000 : 2)、Aldolase (158,000 : 3)、Ovabumin (43,000 : 4)、Chymotrypsin (25,000 : 5) を用いた。

また、以後の USP47 の酵素学的性状解析の比較対照として、ヒト USP7、ヒト USP8 およびヒト UCH-L3 のリコンビナント酵素も調製した[30,31]。USP7 はバキュロウイルス発現系、UCH-L3 および USP8 は大腸菌発現系を用いて発現させ、 Ni^{2+} -chelating sepharose によって精製した。その結果、USP7 を 2.6 mg (5.4×10^8 細胞)、USP8 を 76 μg (培養液 1L)、UCH-L3 を 3.6 mg (培養液 250 mL) 得た。

第二節 リコンビナントヒト USP47 の DUB 活性

第一項 DUB 活性測定用人工蛍光基質に対する USP47 の DUB 活性

DUB の Ub 遊離活性は市販の人工蛍光基質を利用して測定することが可能である。人工蛍光基質 LRGG-AMC は、Ub の C 末端 4 アミノ酸である Leu-Arg-Gly-Gly に蛍光物質 aminomethylcoumarin (AMC) がペプチド結合している。また、Ub 分子の C 末端に AMC が付加した Ub-AMC も汎用される[32]。そこで、前節にて作製したリコンビナントヒト USP47 の DUB 活性をこれら基質を用いて検討した。

その結果、UCH-L3 が最も高い LRGG-AMC 分解活性を示し、次いで USP8 にも同活性が認められた。一方、USP47 および USP7 には LRGG-AMC 分解活性は認められなかった。また、Ub-AMC を基質に用いた際には、検討したすべての酵素において Ub 遊離活性が認められ、それは UCH-L3>USP7>USP8>USP47 の順であった (図 8)。

以上の解析の結果、USP47 が DUB 活性を持つことが確認された。しかしながら、その Ub-AMC 分解活性は他の酵素に比べて極めて低いことが明らかになった。

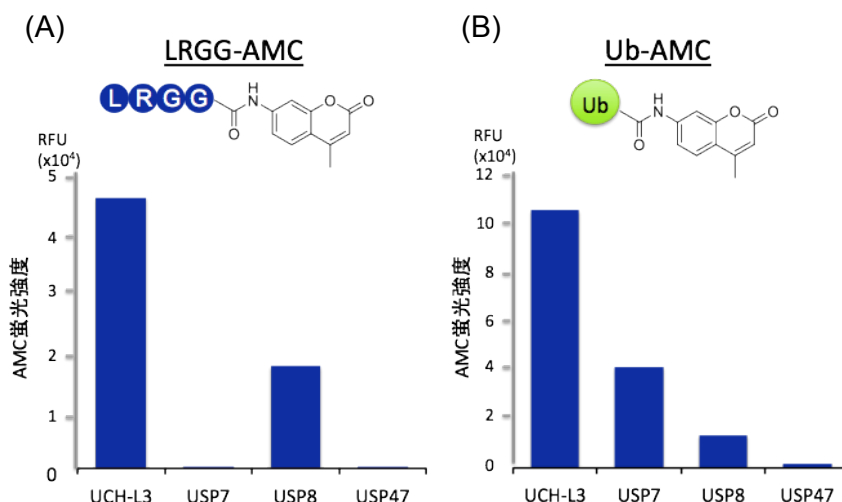


図 8 人工蛍光基質に対する USP47 の DUB 活性

バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中、各 DUB (10 µg/mL) と人工蛍光基質 [(A) 50 µM LRGG-AMC (B) 2 µM Ub-AMC] を 37 °C、1 時間反応させた。反応によって遊離された AMC の蛍光強度を測定した。

第二項 新たな DUB 活性測定系の構築とそれを用いた USP47 の DUB 活性検討

前項の解析では、USP47 の DUB 活性が明らかになったものの、他酵素に比べて著しく低いものであった。そこで、USP47 が他の酵素よりも高い DUB 活性を示すような基質が存在する可能性を考えて、新しい Ub 融合タンパク質を作製した。セリンプロテアーゼ Granzyme B (GrB) は、酵素前駆体の N 末端側に存在する 2 アミノ酸 (Gly-Glu) が除去されると成熟型酵素へと変換され、タンパク質分解活性を得る[33]。本性質を利用して GrB をレポーターとして用いる新しい DUB 基質、すなわち Ub と成熟型 GrB の融合タンパク質 (Ub-GrB) を作製した (図 9)。

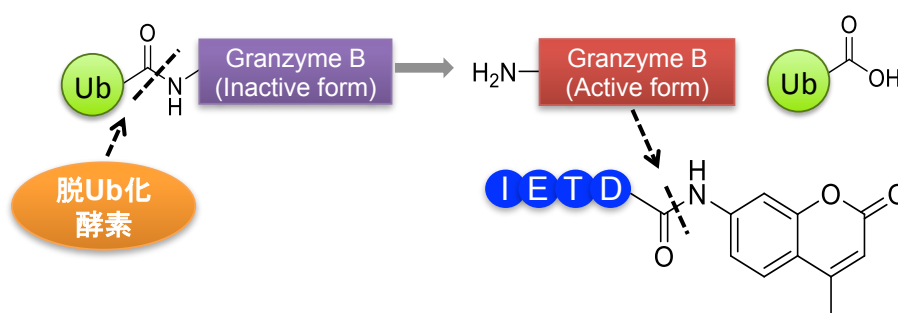


図 9 Ub 融合型 GrB を利用した DUB 活性測定

DUB による Ub-GrB の消化によって生じる成熟型 GrB の IETD-AMC 分解活性を測定することで DUB 活性が測定可能である。

DUB と Ub-GrB を 37 °C、1 時間反応後、SDS-PAGE によって各酵素の Ub 遊離活性を検討した。その結果、USP47 をはじめとして 4 種類すべての DUB が Ub-GrB から Ub を遊離し、成熟型 GrB を生成した (図 10A)。デンストメトリー解析によって成熟型 GrB の生成量を比較解析した結果、USP47 が Ub-GrB に対して最も高い DUB 活性を有することが明らかになった (図 10B)。さらに、DUB との反応によって生じた成熟型 GrB のセリンプロテアーゼ活性をその特異的人工蛍光基質である IETD-AMC を用いて測定したところ、上述の結果と同じように USP47 に最も高い DUB 活性が認められた (図 10C)。

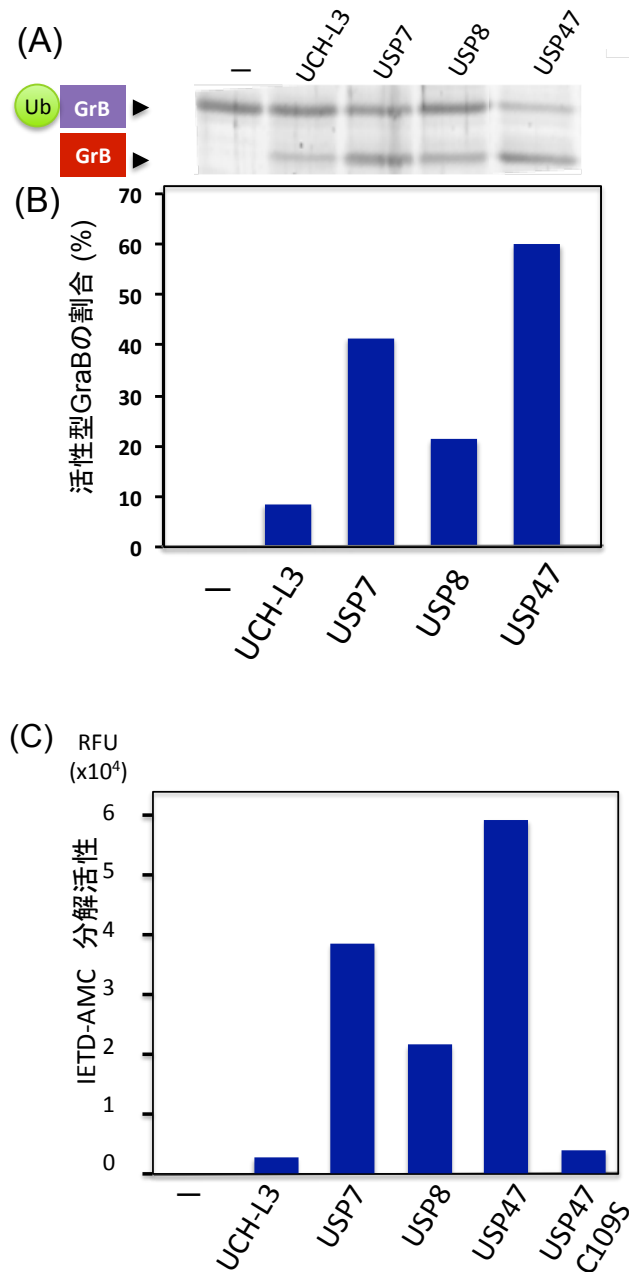


図 10 Ub 融合型 GrB に対する USP47 の DUB 活性

(A) バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中で DUB (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と Ub-GrB (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させ、反応後のサンプルを SDS-PAGE によって分離した。泳動後のゲルを Lumitein によって染色した。(B) (A) で各 DUB によって生じた GrB 量をデンストメトリーによって定量解析し、活性型 GrB の割合を数値化した。(C) (A) と同様の反応を行った後、反応液中に IETD-AMC (50 μM) のを加えて、さらに 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分反応させ、生じた AMC の蛍光強度を測定した。

次に、USP47 の Ub-AMC および Ub-GrB 分解活性の程度を比較するために、酵素反応測定時の USP47 の濃度依存性を検討した。その結果、Ub-AMC を基質として用いる場合、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の USP47 が必要であった。一方、Ub-GrB 測定系を利用した場合は、わずか 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の USP47 で十分な DUB 活性が検出できることが明らかとなった (図 11)。これらの結果から、USP47 は Ub-GrB を良い基質とすることが明らかとなった。次に、USP47 の触媒ユニットを構成すると考えられる Cys109 を Ser へと点変異させた C109S USP47 をバキュロウイルス発現系にて調製し、その Ub-GrB 分解活性についても検討した。その結果、C109S USP47 には有意な DUB 活性は認められず、このことから、確かに USP47 はシステインプロテアーゼ型の DUB であることが確認された (図 10C)。

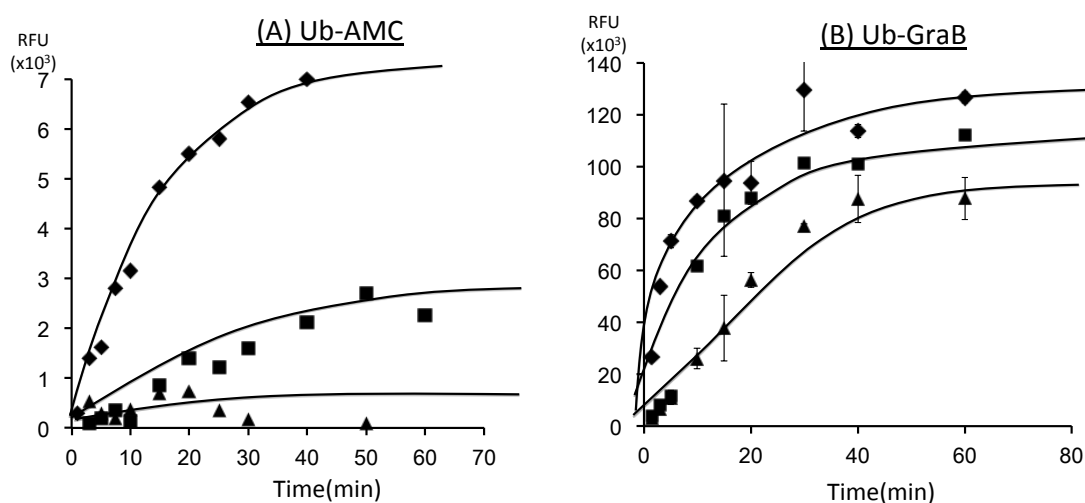


図 11 Ub-AMC 及び Ub-GrB の加水分解における USP47 の濃度依存性
 バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中 1 μM の Ub-AMC (A) あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Ub-GrB と 50 μM の IETD-AMC (B) を USP47 の各濃度で 37°C で反応させ、その分解活性の経時的变化を解析した。(A) で用いた USP47 の濃度、◆ : 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ■ : 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ▲ : 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。(B) で用いた USP47 の濃度、◆ : 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ■ : 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ▲ : 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

第三項 USP47 のポリ Ub 鎖消化能の検討

E3 による基質タンパク質の Lys 残基への Ub 付加に続いて、付加 Ub 分子内の Lys 残基へ新たな Ub 分子がイソペプチド結合によって連結されることでポリ Ub 鎖が形成される。タンパク質上に付加される主要なポリ Ub 鎖である Ub Lys48 および Lys63 を介したポリ Ub 鎖 (Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖) の機能は良く解析されており、それぞれタンパク質をプロテアソームによる分解へと導くシグナルや DNA 修復酵素群を DNA 修復部位へとリクルートする際のスキヤフォールドとして機能することが知られている[12,13,18]。

そこでこれまでの解析において DUB 活性が見出された USP47 のポリ Ub 鎖消化能を検討した。Ub Lys48 あるいは Lys63 を介して Ub が 7 分子結合したポリ Ub 鎖を基質として用い、USP47 と USP7 による Ub 分子の遊離の経時的変化を SDS-PAGE によって解析した。その結果、USP47 は Lys48 結合型ポリ Ub 鎖から Ub を経時的に遊離した (図 12)。USP7 も同様に Lys48 結合型ポリ Ub 鎖消化能を示したが、そのタイムコースは USP47 による消化の方が若干早いことが明らかとなった。

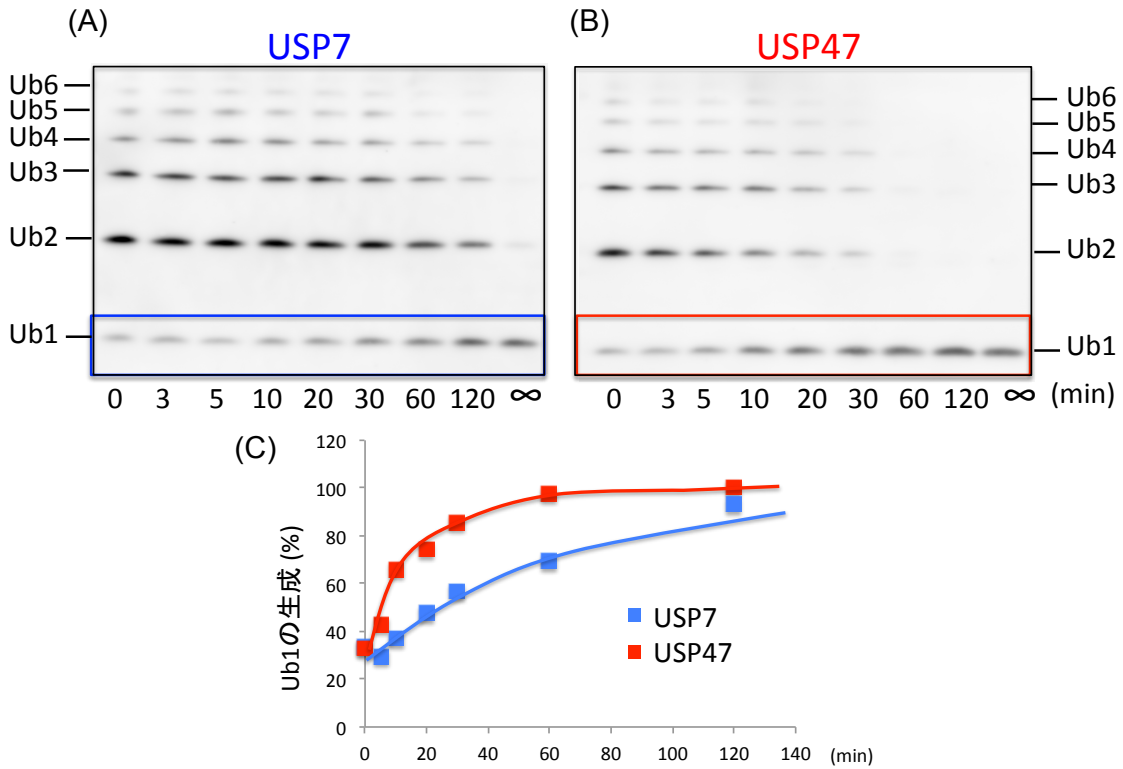


図 12 USP47 の Lys48 結合型ポリ Ub 鎖に対する消化能
 バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のポリ Ub 鎖と 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の USP7 (A) あるいは 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の USP47 (B) を経時的に反応させた。反応後のサンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 Ub 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。(C) 反応によって生成したモノ Ub をデンストメトリーによって定量解析した。

また、Lys63 結合型ポリ Ub 鎖に対しても、USP47 は Lys48 結合型ポリ Ub 鎖消化の場合とほぼ同様のタイムコースで DUB 活性を示した。一方、USP7 による Lys63 結合型ポリ Ub 鎖の消化は反応 2 時間後まではほとんど認められず、非常に遅い反応であることが明らかになった (図 13)。

以上の結果から、USP47 は Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖に対して DUB 活性を示すことが明らかになった。また、USP47 と USP7 の間にはポリ Ub 鎖に対する消化能に差異があることが明らかになった。

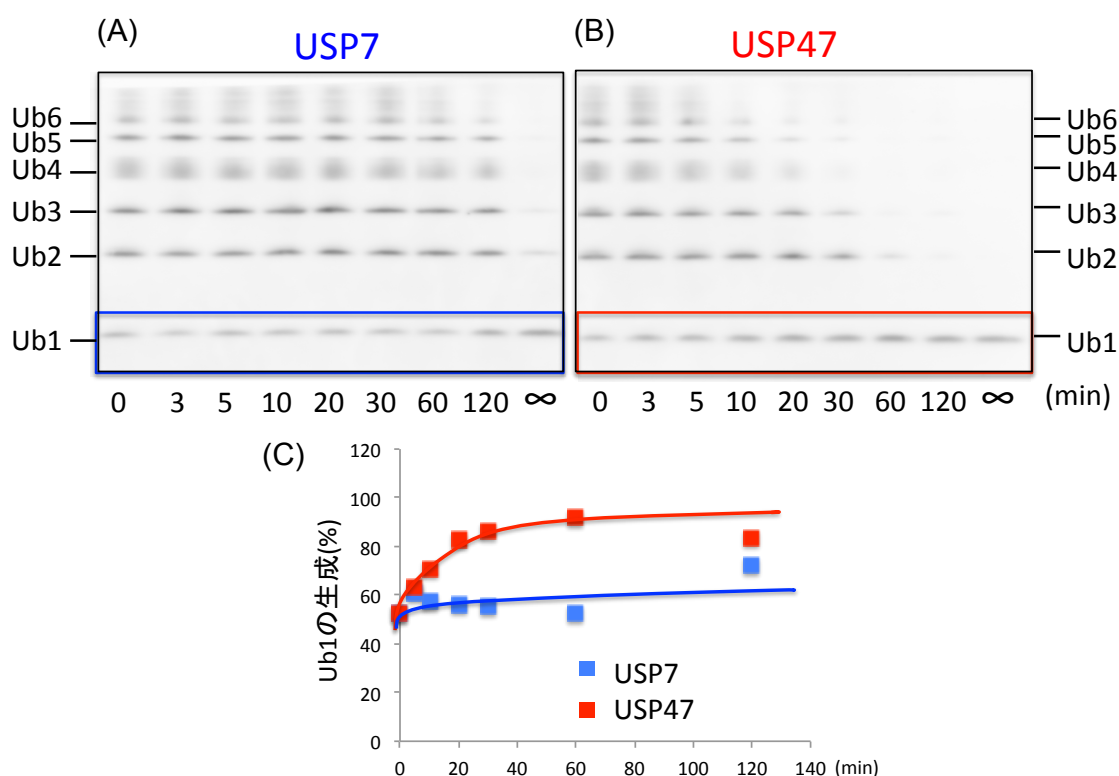


図 13 USP47 の Lys63 結合型ポリ Ub 鎖に対する消化能

バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中、4 $\mu\text{g/mL}$ のポリ Ub 鎖と 60 $\mu\text{g/mL}$ の USP7 (A) あるいは 60 $\mu\text{g/mL}$ の USP47 (B) を経時的に反応させた。反応後のサンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 Ub 抗体を用いたウェスタンプロット解析を行った。(C) 反応によって生成したモノ Ub をデンシトメトリーによって定量解析した。

第三節 USP47 のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性プロファイル

USP47 の各種プロテアーゼ阻害剤に対する感受性プロファイルを、USP7 のそれと比較解析した。USP47 の Ub-GrB 分解活性に及ぼす各種阻害剤の影響を検討した。その結果、thiol 基をアルキル化することで広範なシステインプロテアーゼに対して阻害活性を示す *N*-エチルマレイミドは、USP47 の DUB 活性も阻害し、その阻害活性は 1 mM 以上の濃度において認められ、10 mM では約 85%の阻害効果が認められた。一方、USP7 では *N*-エチルマレイミドに対してより高い感受性が認められ、100 μ M では約 80%、1 mM では 100%の阻害活性を示した。ところが、パパイン様システインプロテアーゼ阻害剤 E64 は、検討した濃度では USP47 および USP7 に対して阻害活性を示さなかった。また、金属キレート剤である EDTA および 1,10-phenanthroline は、USP47 の DUB 活性を全く阻害しなかったが、USP7 に対しては高濃度域において弱い阻害活性を示した。また、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンは USP47 および USP7 に対して全く阻害活性を示さなかった (図 14)。

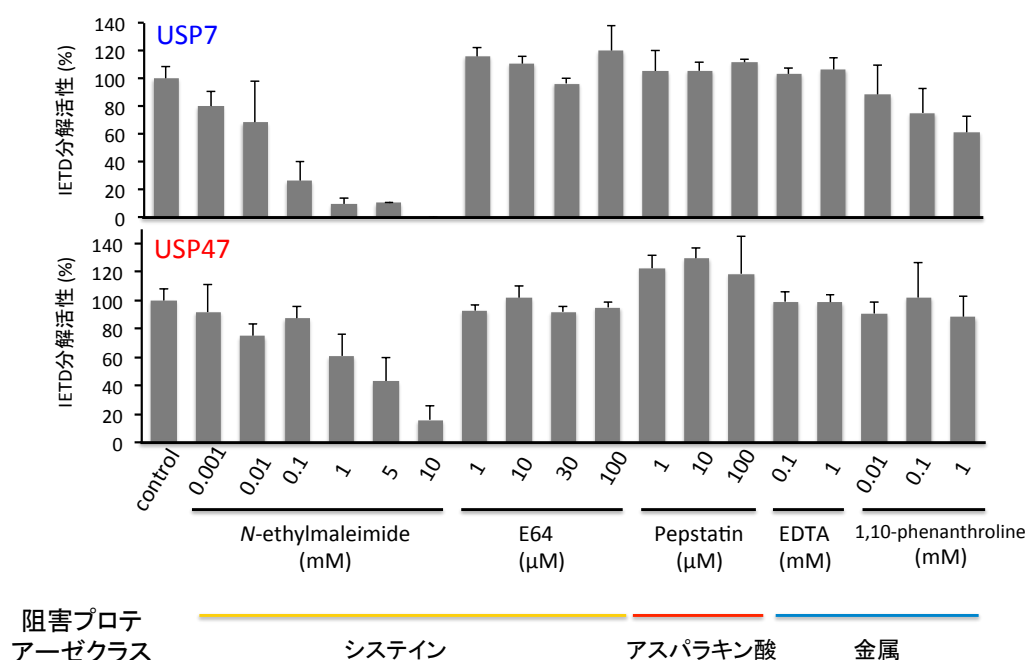


図 14 各種プロテアーゼ阻害剤が USP47 の DUB 活性に与える影響 (1)

バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中、各種プロテアーゼ阻害剤と USP47 を氷上で 30 分予め反応させた。その後、Ub-GrB を用いた活性測定を行った。システインプロテアーゼ阻害剤：*N*-エチルマレイミド、E64；アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤：pepstatin；金属プロテアーゼ阻害剤：EDTA、1,10-phenanthroline。

セリンプロテアーゼ阻害剤の及ぼす影響については、DUB の作用によって Ub-GrB から生成する成熟型 GrB 量を指標に評価した結果、ロイペプチン、phenylmethylsulfonyl fluoride にはいずれも有意な USP47 および USP7 阻害活性は認められなかった (図 15A)。また、触媒ユニットを形成する His 残基のイミダゾール基をアルキル化することでセリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼに対して阻害活性を示す tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone は USP47 および USP7 の DUB 活性を全く阻害しなかった。さらに Ub 誘導体阻害剤である Ub aldehyde (Ub-CHO) および Ub vinyl sulfone (Ub-VS) の USP47 に対する阻害活性を検討した。その結果、Ub-CHO は USP47 に対して 100 nM から阻害活性を示し、500 nM では約 85%の阻害活性を示した。一方、USP7 に対しては Ub-CHO は 10 nM から阻害活性を示し、500 nM では完全に阻害した。また共有結合型阻害剤として機能しうる Ub-VS は、USP47 に対しては検討した濃度では阻害活性を示さなかったが、USP7 に対しては 500 nM で約 40%の阻害活性を示した (図 15B)。

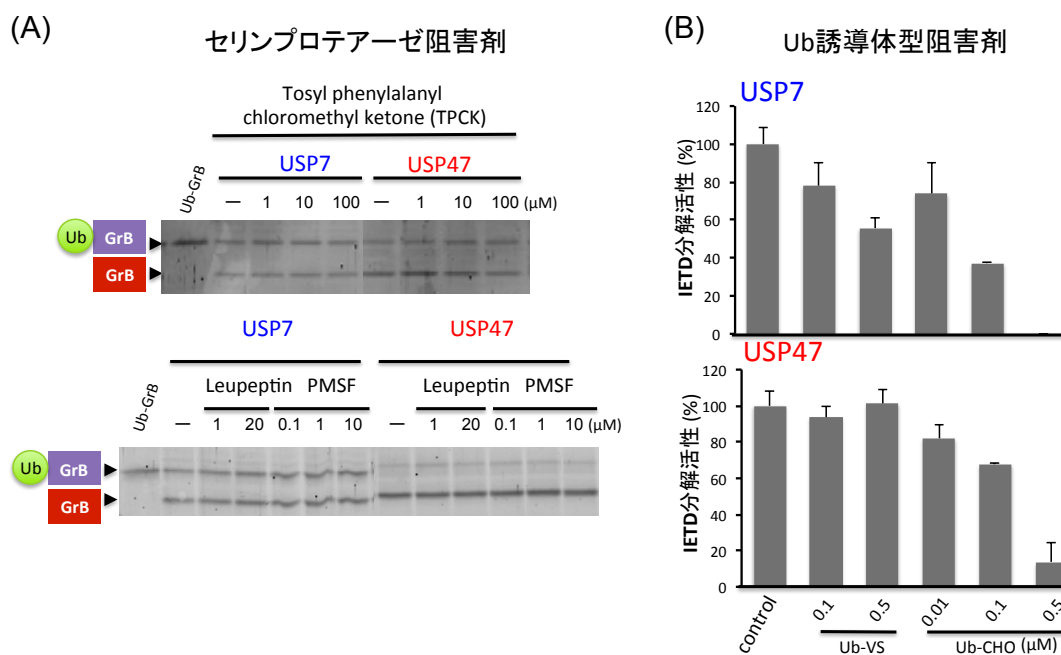


図 15 各種プロテアーゼ阻害剤が USP47 の DUB 活性に与える影響 (2)
 バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中、各種プロテアーゼ阻害剤と USP47 を氷上で 30 分予め反応させた。その後、Ub-GrB を用いた活性測定を行った。(A) SDS-PAGE による GrB 生成量の定量。セリンプロテアーゼ阻害剤: phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、Leupeptin、TPCK。(B) IETD-AMC を用いた DUB 活性測定。Ub 誘導体型阻害剤: Ub-CHO、Ub-VS。

さらに、各種二価金属イオンの USP47 の DUB 活性に対する影響を検討した結果、検討した二価金属イオンのうちシステインプロテアーゼの活性中心 Cys と相互作用しうる Zn^{2+} は濃度依存的に USP47 の活性を阻害したが、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} は全く影響を及ぼさなかった (図 16)。

以上の結果から、USP47 と USP7 のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性プロファイルは大きく異なっていることが明らかとなった。

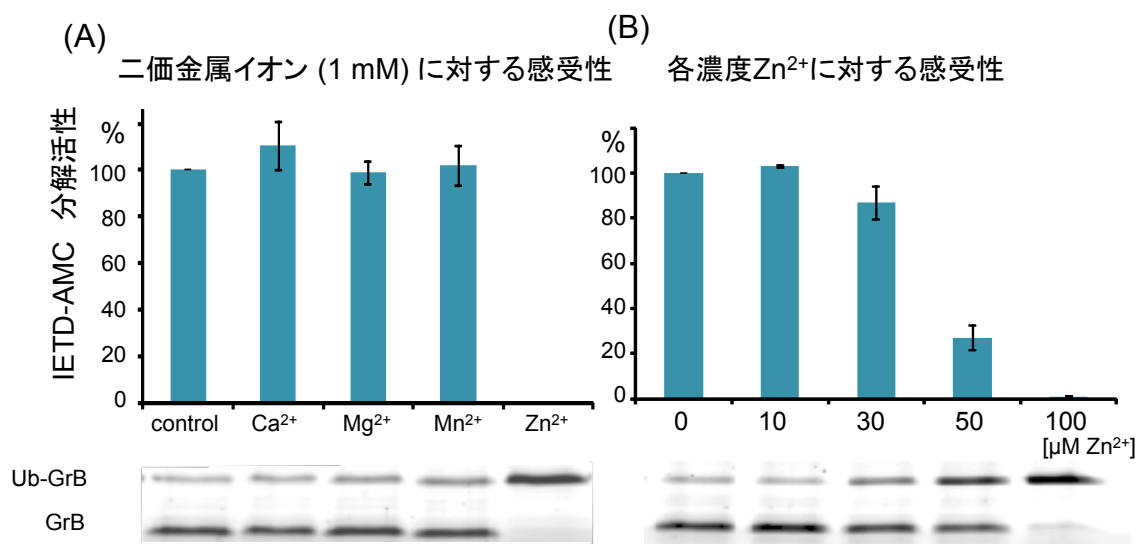


図 16 二価金属イオンの USP47 活性への影響

(A) 1 mM の二価金属イオンと USP47 を氷上で 30 分予め反応させた。その後 Ub-GrB を用いた活性測定を行った。(B) Zn^{2+} の濃度依存性を検討した。上パネル：IETD-AMC を用いた DUB 活性測定。下パネル：SDS-PAGE による GrB 生成量の定量。

考察

第一章では、ヒト USP47 のリコンビナント酵素をバキュロウイルス発現系を用いて調製し、その酵素学的性状の解明を行った。Ub-GrB 融合タンパク質を基質として用いた解析の結果、USP47 が確かに Ub 遊離活性を持つことが明らかになった。また、USP47 は Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖に対して高い Ub 遊離活性を示すことも明らかになった。

著者は、USP47 の酵素学的性状解析をその類縁酵素である USP7 と比較しながら進めた。USP47 と USP7 との間には、一次構造上の高い相同性（分子全体で約 38%、活性ポケット近傍での約 43%）のみならず、複数の Ubl ドメインを持つなど構造上の共通点が観察されることから、その酵素学的性状についても類似している可能性が考えられた。しかしながら、比較解析の結果、USP47 の基質特異性や阻害剤に対する感受性プロファイルなどは USP7 のそれとは異なっていることが明らかになった。

USP7 は Lys48 結合型ポリ Ub 鎖修飾タンパク質から Ub を遊離することで、p53、MDM2、H2B などプロテアソームによって分解されるタンパク質の代謝に関与している[18-21,34]。一方、USP7 は Lys63 結合型ポリ Ub 化タンパク質の機能制御への関与の可能性は報告されておらず、今回著者らの *in vitro* でのポリ Ub 鎖消化能の解析結果とよく一致している。また、USP7 は Ub-AMC を良い基質とすることも本研究で示したが、これは本酵素が細胞内において FOXO4 などのモノ Ub 化タンパク質を基質とすることを反映していると考えられる[22]。これらの USP7 の *in vitro* での解析結果と細胞内での働きの相関を踏まえると、USP47 は、モノ Ub 化タンパク質というよりは Lys48 および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖修飾タンパク質の代謝あるいは活性制御に関わっているのではないかと類推される。

ごく最近、USP47 が E3 である β -TrCP や DNA polymerase β と相互作用をすることが報告され、その機能の一端が明らかになりつつある[35, 36]。本研究結果を踏まえると、これらタンパク質上に形成された Lys48 結合型ポリ Ub 鎖を USP47 が消化している可能性も十分に考えられる。しかしながら、著者が FLAG タグを付加した USP47 (USP47-FLAG) 用いて USP47 の細胞内局在を検討した結果、USP47-FLAG は小胞体の細胞質側に存在することが明らかになり、上述の 2 タンパク質の細胞内局在とは大きく異なっていた。そのため、これらタンパク質への USP47 の作用メカニズムについては、今後詳細に検討する必要があると考えられる。一方、小胞体膜近傍における Ub 化修飾反応については、ミス

フォールディングした小胞体内腔タンパク質の分解や T 細胞の無応答化（アレルギー）に関わっていることが知られている[37-39]。そこで、今後、酵素学的性状に加えて細胞内局在も踏まえた解析を進めることで、USP47 の生理的役割の解明が期待される。

第一章の解析では、USP47 のプロテアーゼ阻害剤プロファイルについても解析を行った。その結果、USP47 は、広範なシステインプロテアーゼ阻害剤である *N*-エチルマレイミドによる阻害が観察されたものの、その感受性は USP7 よりも低く、またこれまでの報告のある USP2 および USP8 のそれよりも低かった[40]。また、USP ファミリーメンバーはパパイン様の活性ドメイン構造をとっていると考えられているが[29, 40]、パパイン様プロテアーゼ阻害剤である E64 による阻害効果は USP47 も含めて認められていない。これらの結果は、USP47 特異的阻害剤の創製の可能性を強く示唆している。実際ごく最近、USP47 の阻害剤となり得る化合物が報告されている[41]。また、著者は USP47 活性を簡便かつ高感度に検出可能な Ub-GrB 基質を本研究にて開発した。Ub-GrB を活用することで USP47 特異的阻害剤の探索研究を展開することが可能であり、今後、本系を用いた開発研究を取り組んでいく予定である。そして、得られた USP47 特異的阻害剤を活用したケミカルバイオロジー研究を行うことで、USP47 の生理機能の発見へとつなげたいと考えている。

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、USP47のモノUb基質であるUb-AMCに対する消化能は他のDUBに比べて低いことも明らかになった。これらの結果は、ポリUb鎖消化のための何らかの機構がUSP47に存在す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。

第一節 Ub1ドメイン欠失USP47変異体のDUB活性

USPファミリーは、各分子内に多様なドメイン構造を持っていることが知られている。例えば、各ファミリー酵素には図17に示すように、Ub結合ドメインとして機能することが知られているUb associated domain (UBA) ドメインやUb interacting motif (UIM) ドメイン、亜鉛結合モチーフであるZinc fingerモチーフあるいはUSPファミリーに特異的に存在する機能未知ドメインであるDomain Present in USP family (DUSP) ドメインなどの様々なドメインの存在が知られている[42-44]。これらのドメインは各DUBの固有の機能発現に何らかの重要な役割を果たしていると考えられるが、その機能の作用が解明されているものは一部の酵素についてのみである[45-47]。

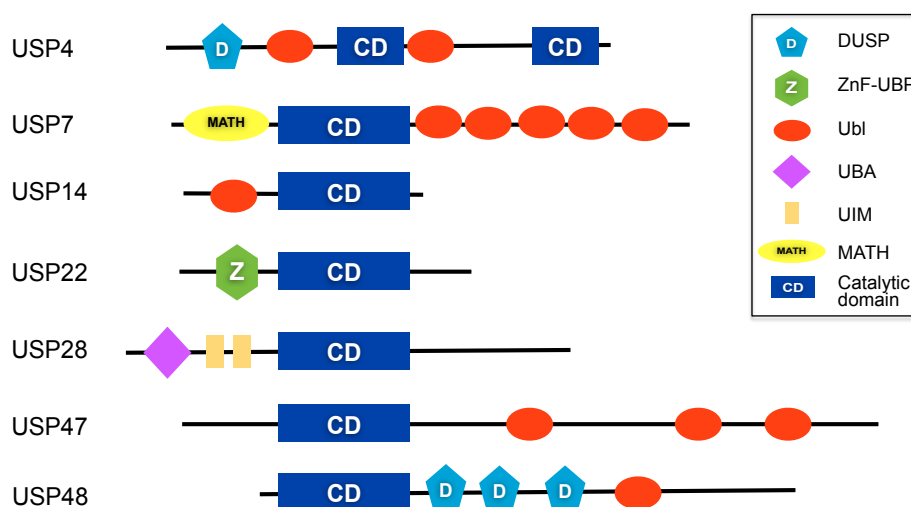


図17 脱Ub酵素のドメインの多様性

また、Ubl ドメインと呼ばれる Ub との一次構造上の類似性は乏しいものの β -grasp 構造を取っている領域をもつ分子が USP ファミリーには多く存在し、ヒト DUB 全体では図 18 に示した 18 分子に認められる[2]。そのほとんどは Ubl ドメインを 1 つもしくは 2 つ持つが、USP7 と USP47 では他分子よりも多く Ubl ドメインを持っており、それぞれ 5 個および 3 個存在する[26, 48]。両酵素分子内に存在する各 Ubl ドメインの一次構造上の相同性は低く、例えば、USP47 のもつ 3 個の Ubl ドメイン間の相同性は表 2 に示すように乏しい。

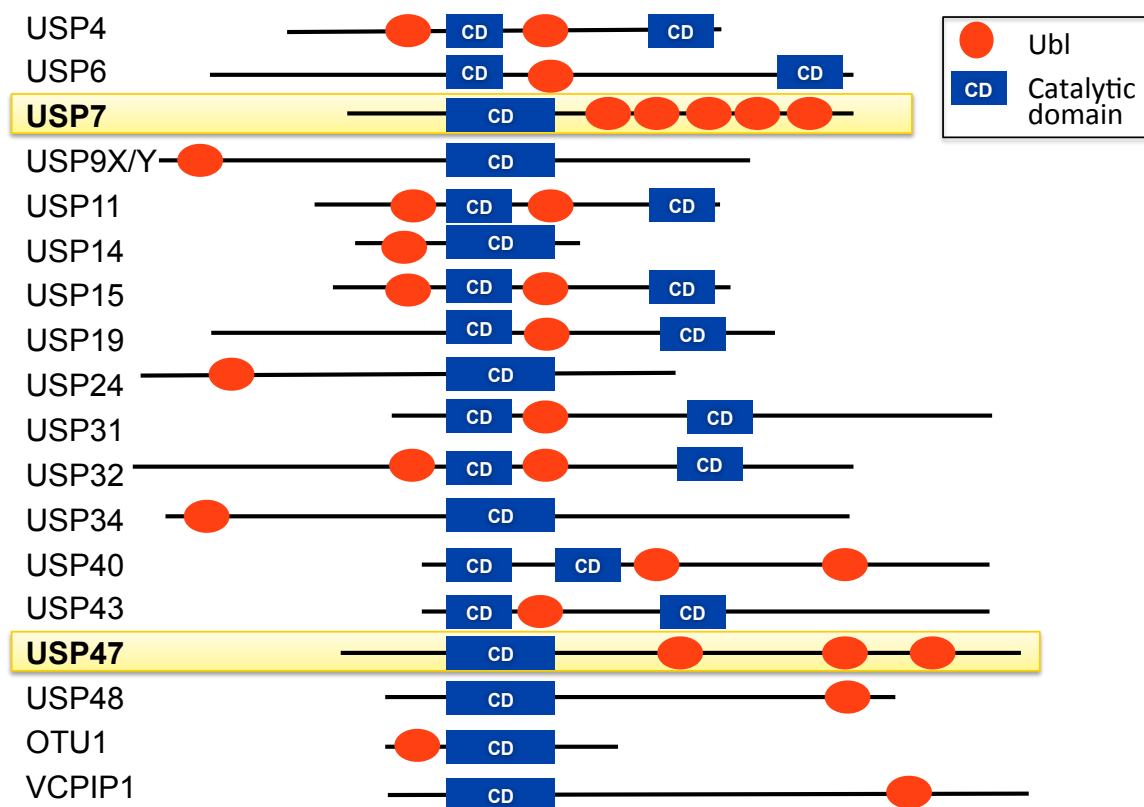


図 18 Ubl ドメインを持つ DUB

ごく最近、USP4、USP7、USP14 での Ubl ドメインの機能が明らかになった [25, 48, 49]。USP47 と構造上の類似性の高い USP7 では、C 末端側の Ubl ドメインがアロステリックに作用して活性中心の触媒ユニットの各アミノ酸残基の配置がより近接する結果、Cys 残基の thiol 基の求核性が高くなり活性化型へと変換される。また、USP7 の N 末端側の Ubl ドメインには GMP シンターゼが結合して、上述の C 末端 Ubl ドメインによるアロステリック効果を高めている。従って、Ubl ドメインを欠失させた USP7 の触媒ドメインのみでは、全長酵素に比べて Ub-AMC 分解活性の著しい低下が認められる [48]。

そこで USP47 についても、酵素活性発現における Ubl ドメインの役割について解析することで、USP47 の活性制御機構の詳細を明らかにすることを目指した。

表 2 USP47 の Ubl ドメイン間の一次構造上の相同性
各 Ubl ドメイン一次構造を基に ClustalW 解析によって相同性を求めた。

	Ubl ₁	Ubl ₂	Ubl ₃
Ubl ₁		14.0 %	15.7 %
Ubl ₂			11.0 %
Ubl ₃			

USP47 の DUB 活性における Ubl ドメインの意義を解析するため、Ubl 欠失させた Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体をバキュロウイルス発現系を用いて調製した (図 19)。各 Ubl 欠失変異体の DUB を Ub-AMC ならびに Lys48 結合型あるいは Lys63 結合型ポリ Ub 鎖消化能を簡便に検出可能な人工蛍光基質 Di-Ub を用いて測定した (図 20)。解析の結果、各欠失変異体の Ub-AMC に対する Ub 遊離活性は、全長 USP47 とほぼ同程度であった。一方、Lys48 結合型 および Lys63 結合型 Di-Ub に対する各欠失変異体の Ub 遊離活性には全長 USP47 と比較して低下が認められた。このことから、USP47 の Ub-AMC 分解活性発現においては分子内 Ubl ドメインの貢献は少ないと考えられる。一方、ポリ Ub 鎖を模倣した Di-Ub の消化は Ubl ドメインの欠失により大幅に低下したことから、Ubl ドメインが USP47 のポリ Ub 鎖消化に重要であることが強く示唆された。



図 19 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体の構造スキーム

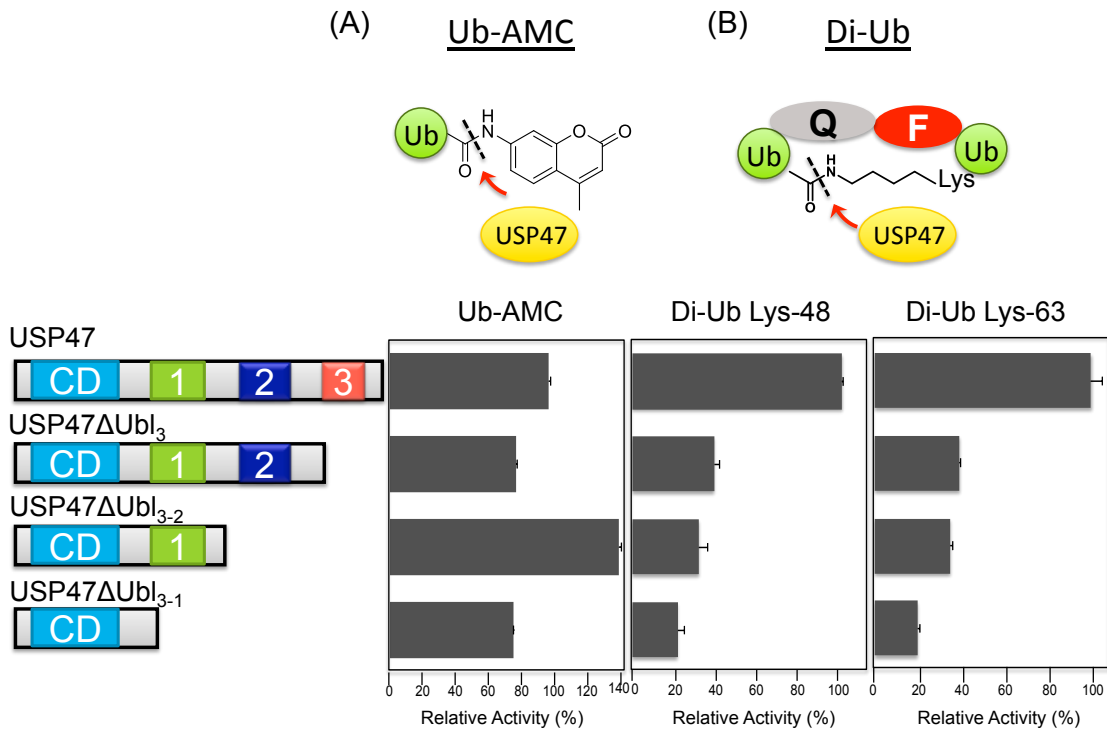


図 20 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体の Ub-AMC 分解活性および Di-Ub 分解活性

バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中、10 μg/mL の各 USP47 と 1 μM の Ub-AMC (A) 200 nM の Di-Ub (B) を 37°C で 1 時間 反応させた。Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体の DUB 活性を各基質に対する 全長 USP47 の分解活性を 100% として表した。

そこで次に、各 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体の Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖に対する消化能を全長 USP47 と比較検討した (図 21)。その結果、全長 USP47 は反応 30 分以内に Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖をほとんどすべてモノ Ub へと消化するが、作製した 3 つの Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体はいずれも各ポリ Ub 鎖消化能が低下しており、反応 120 分後においてもほとんど消化が進行しなかった。すなわち、Lys48 結合型および Lys63 結合型 Di-Ub を用いた解析結果から予測された通り、USP47 のポリ Ub 鎖消化活性には Ubl ドメインが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

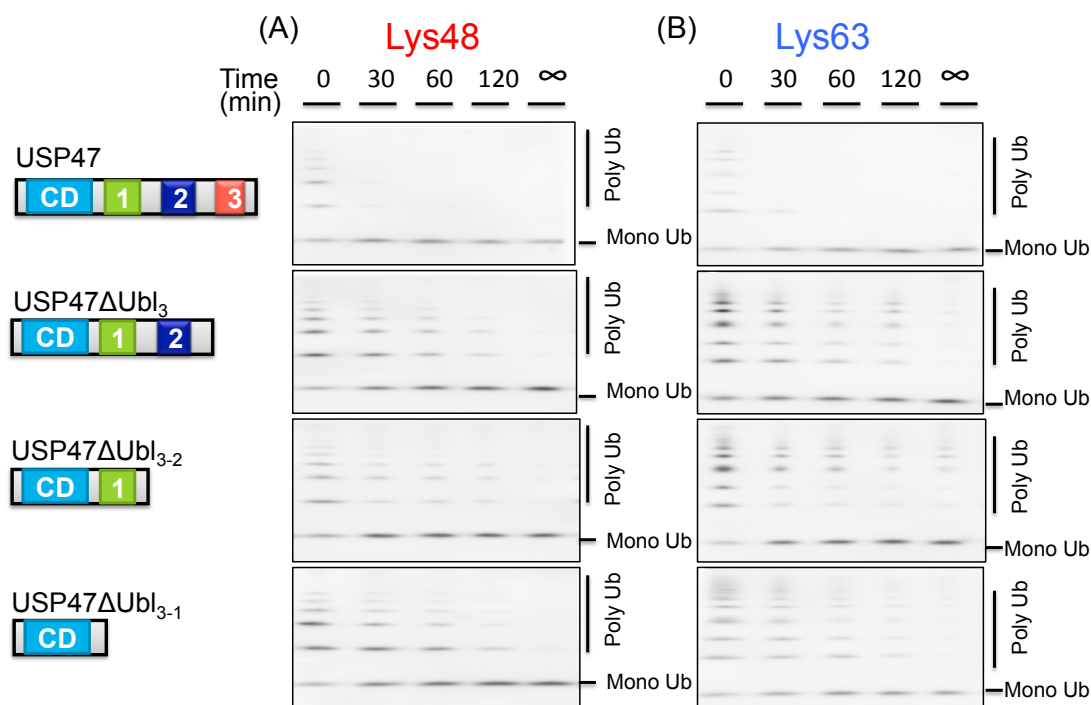


図 21 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体のポリ Ub 鎖消化能
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各 USP47 と 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Lys48 結合型 (A) あるいは Lys63 結合型ポリ Ub 鎖を 37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。反応後のサンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 Ub 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

第二節 USP47 における Ubl ドメインによるアロステリックな活性化モデルの検討

前節で明らかになった Ubl ドメイン依存的な USP47 のポリ Ub 鎖消化のメカニズムを明らかにするため、まず、USP7 と同様の C 末端 Ubl ドメインによるアロステリックな活性化機構が USP47 にも保存されているかどうかを検討した[48]。

図 22 に示すように、GST と USP47 の全 Ubl ドメインを含む C 末端フラグメント、Ubl ドメインを 1 つ欠いたフラグメント、および各 Ubl のみからなるフラグメント、Ubl 以後の C 末端の 54 アミノ酸との融合タンパク質、合計 7 種のタンパク質を大腸菌発現系を用いて調製した。

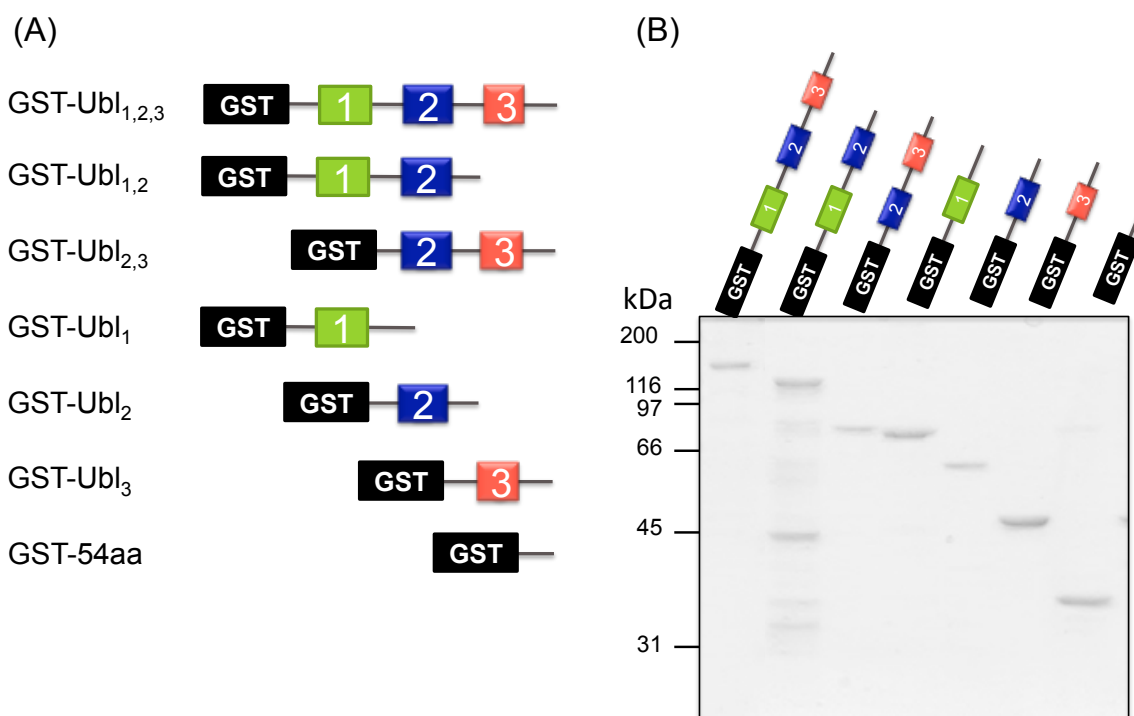


図 22 GST-Ubl の構造スキームおよび調製

(A) GST-Ubl の構造スキーム。USP47 の 3 つの Ubl ドメインを緑、青、赤で示した。(B) 精製後の GST-Ubl (1 μ g) を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色を行った。

USP47 活性中心ドメイン (USP47 Δ Ubl₃₋₁) と上述の GST-Ubl ドメインフラグメントを同時に添加した際の DUB 活性について検討を行った。その結果、Ub-AMC および Lys63 結合型 Di-Ub に対する USP47 Δ Ubl₃₋₁ の DUB 活性は GST 融合タンパク質の添加による影響をほとんど受けなかった (図 23)。また、GST 融合タンパク質の量を増加させた場合でも USP47 Δ Ubl₃₋₁ の DUB 活性への影響は認められなかった (data not shown)。これらの結果から、USP47 では、USP7 で認められるような Ubl ドメインによるアロステリックに活性化される可能性は低いと考えられた。

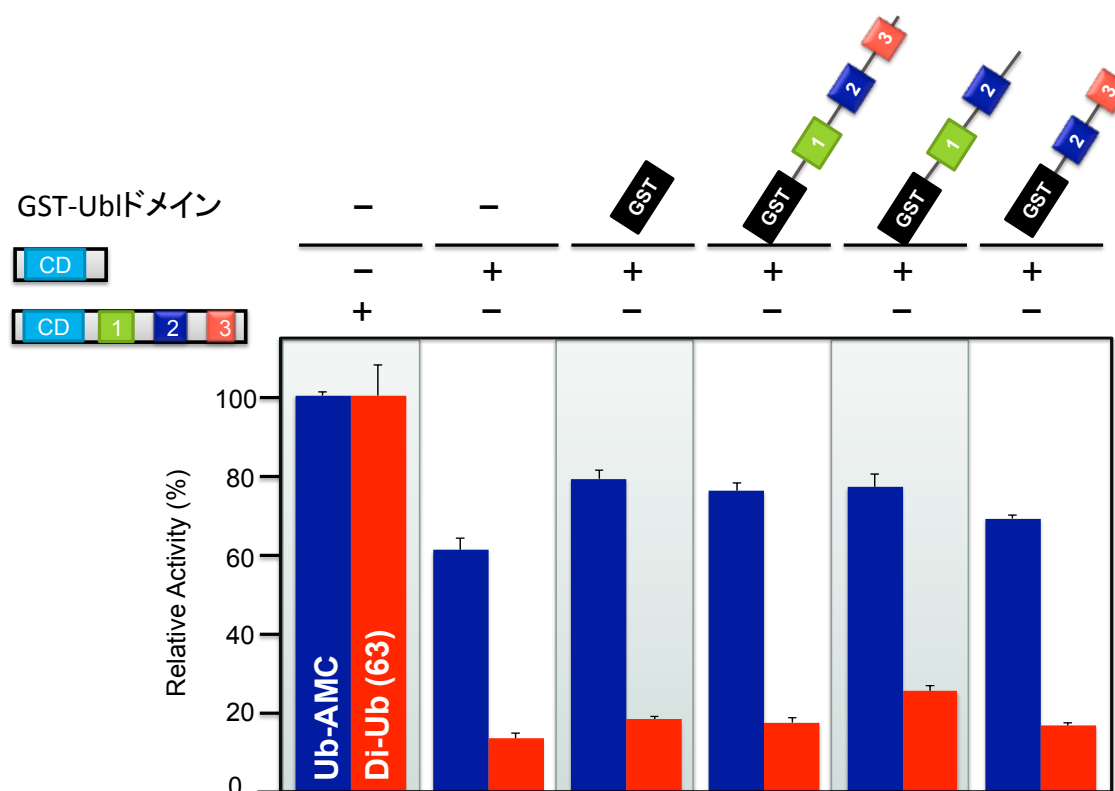


図 23 GST-Ubl 添加が USP47 Δ Ubl₃₋₁ の DUB 活性へ及ぼす影響

USP47 Δ Ubl₃₋₁ と各 GST-Ubl を氷上で 30 分予め反応させた。その後 1 μ M Ub-AMC (青) あるいは 200 nM の Lys63 結合型 Di-Ub (赤) を用いてバッファー A (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中で 37 $^{\circ}$ C、1 時間消化反応を行った。各基質に対する全長 USP47 の DUB 活性を 100%として、USP47 Δ Ubl₃₋₁ の活性を表した。

また、USP7 の Ubl ドメインによるアロステリックな活性化機構には、Switching loop と呼ばれる酵素の活性中心近傍に存在する 6 アミノ酸からなる領域ならびに Activation peptide と呼ばれる C 末端に位置する 12 アミノ酸からなる領域の相互作用が重要であることも報告されている (図 24、25) [48]。

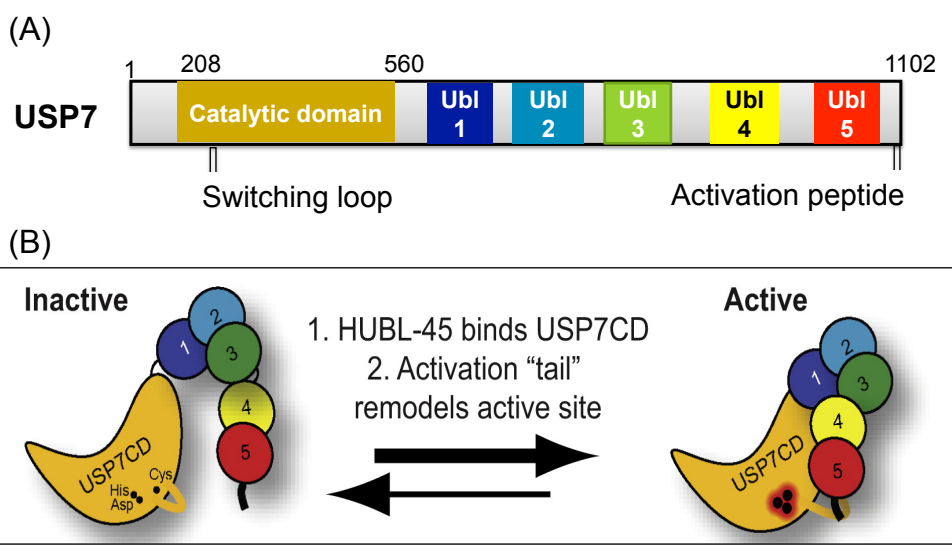


図 24 USP7 の活性制御モデル

(A) USP7 の構造スキーム。Switching loop は触媒ドメイン中に、Activation peptide は C 末端に存在する。(B) USP7 の C 末端の Ubl ドメインはアロステリックに作用することで USP7 の活性化に関与する。その際、Switching loop と Activation peptide 間の相互作用も重要である。文献 [48]より引用。

<u>Switching loop</u>	<u>Activation peptide</u>
USP7 : ²⁸⁵ WETLDSF ²⁹¹	USP7 : ¹⁰⁸⁹ SRYTYLEKAIKI ¹¹⁰⁰
USP47 : ¹⁷⁴ WDSSEAW ¹⁸⁸	USP47 : ¹²⁶³ TYSRKEKALKI ¹²⁷⁴

図 25 Switching loop および Activation peptide 領域における USP47 と USP7 の一次構造の比較

USP7 の解析において重要性が示されているアミノ酸残基を赤で示した。

そこで、両領域間の相互作用に重要な Activation peptide 領域の欠失や領域中の Ile1274 残基に点変異を導入した変異体を作製し、その DUB 活性を検討した (図 26)。その結果、Activation peptide 領域を欠く C 末端 27 アミノ酸欠失変異体 (USP47 Δ C₂₇) は全長 USP47 と同程度の Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖消化能を示し、欠失による影響は認められなかった。また、USP47 I1274A においても、各ポリ Ub 鎖消化能には点変異導入の影響は認められなかった (図 27)。

以上の結果からも、USP47 では、USP7 のような Ubl ドメイン依存的なアロステリックな活性化機構は存在しない可能性が強く示唆された。すなわち、USP47 と USP7 とでは活性制御のメカニズムが異なっている可能性が示唆された。

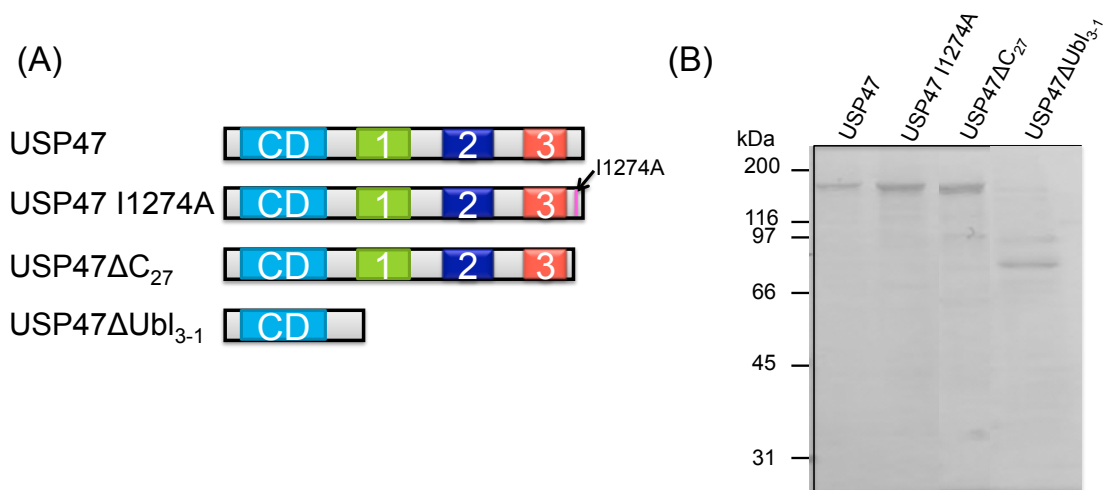


図 26 Activation peptide 機能欠失 USP47 変異体の構造スキームおよび調製
 (A) Activation peptide 機能欠失 USP47 変異体の構造スキーム。(B) 精製後の Activation peptide 機能欠失 USP47 変異体 (1 μ g) を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色を行った。

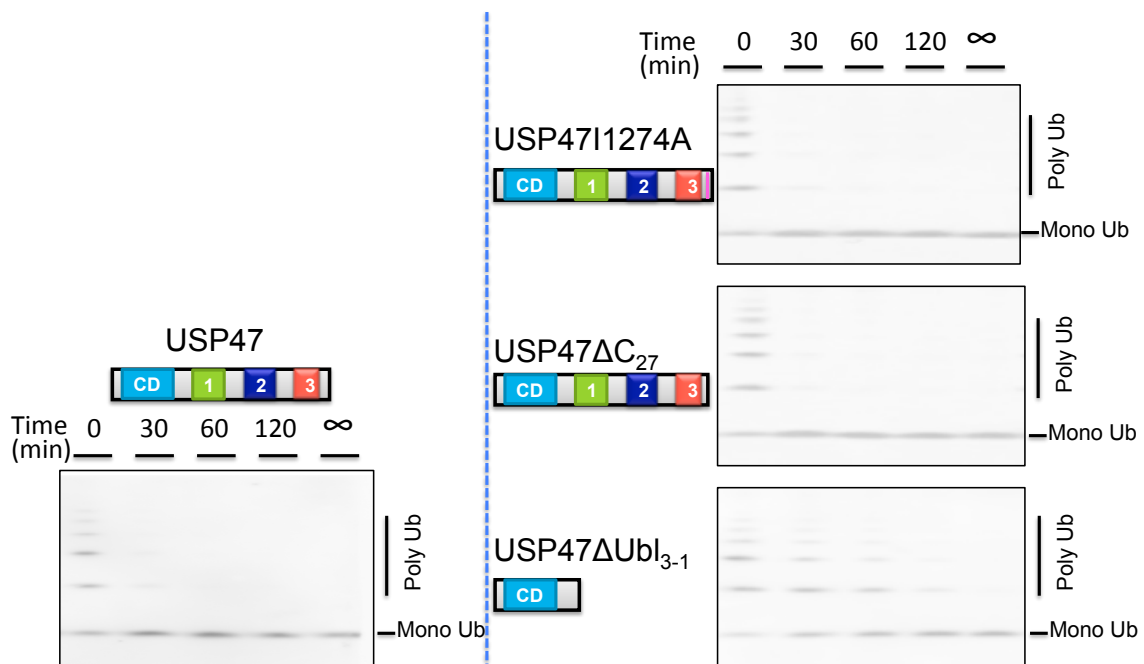


図 27 Activation peptide 機能欠失 USP47 変異体の DUB 活性
 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各 USP47 と 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Lys48 結合型ポリ Ub 鎖を 37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。反応後のサンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 Ub 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

第三節 USP47 の Ubl ドメインとポリ Ub 鎖との相互作用の検討

第一節の結果を踏まえると、USP47 の Ubl ドメインの機能として、Ubl ドメインが基質ポリ Ub 鎖と直接相互作用することで、基質を酵素触媒ポケットへと誘導する役割を担っている可能性も考えられる。そこで、前節で作製した GST-Ubl ドメイン融合タンパク質を USP47 の DUB 活性測定反応系に添加した際の影響を検討することで本モデルの検証を行った (図 28)。その結果、全長 USP47 の Ub-AMC 分解活性は、GST-Ubl タンパク質の添加では低下せず、一部の GST-Ubl ではむしろ若干上昇した。一方、USP47 のポリ Ub 鎖消化能すなわち Lys48 結合型および Lys63 結合型 Di-Ub 消化能に対しては、1 個以上の Ubl を含む GST 融合タンパク質が USP47 の DUB 活性に対する阻害効果を示した。特に、Ubl₃ を含むフラグメントは顕著な活性低下を引き起こした。同時に、GST-Ubl と USP47 を反応させることで、USP47 による Ubl ドメインの遊離について検討したところ、いずれの Ubl ドメインも USP47 の基質とはならず、消化を受けなかった (図 29)。これらの結果から、USP47 の Ubl ドメインが 2 分子以上の Ub から構成される基質 Ub 鎖と直接相互作用することで、触媒ポケットへと基質を誘導するなどして、USP47 のポリ Ub 鎖消化が進行すると考えられる。

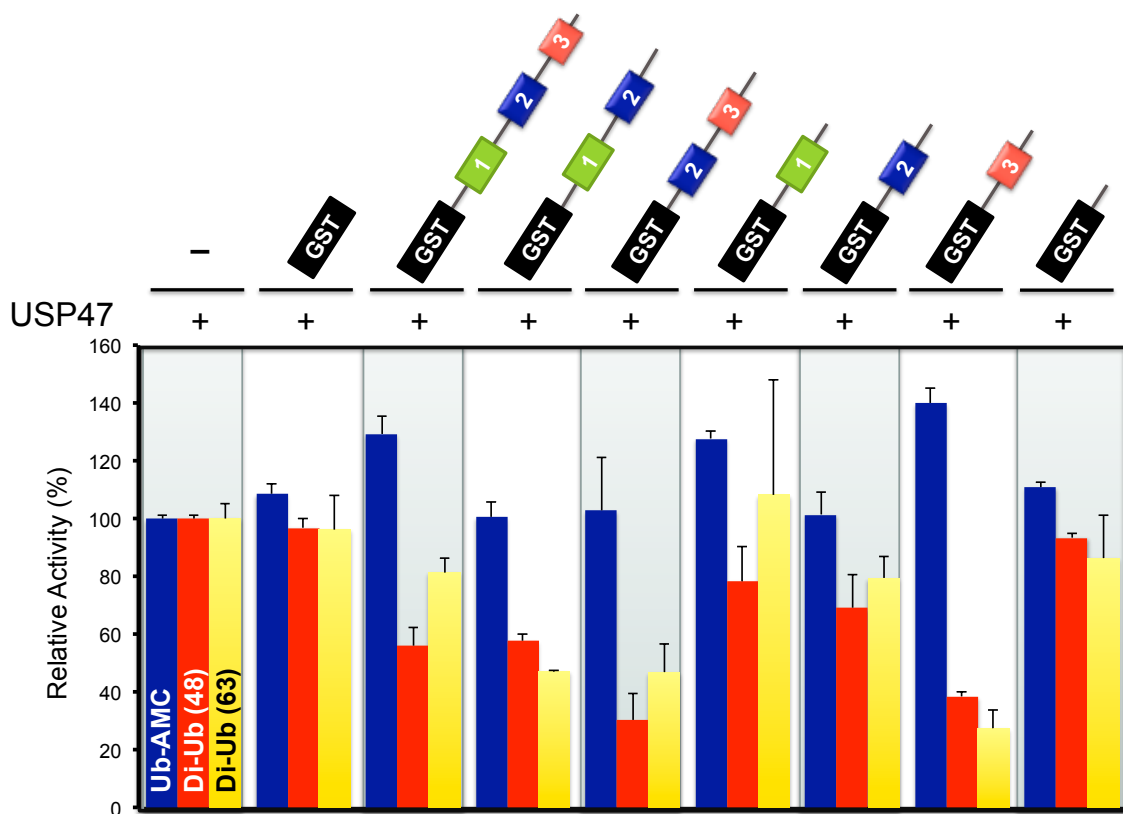


図 28 Ubl ドメインの添加が USP47 の DUB 活性に及ぼす影響

各 GST-Ubl を USP47 と氷上で 30 分予め反応させた。その後 1 μ M Ub-AMC (青)、200 nM Lys48 結合型 Di-Ub (赤) および 200 nM Lys63 結合型 Di-Ub (黄) を用いて、バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中で 37 $^{\circ}$ C、1 時間反応を行った。各基質に対する USP47 の DUB 活性を 100%として、GST-Ubl を添加した際の DUB 活性を表した。

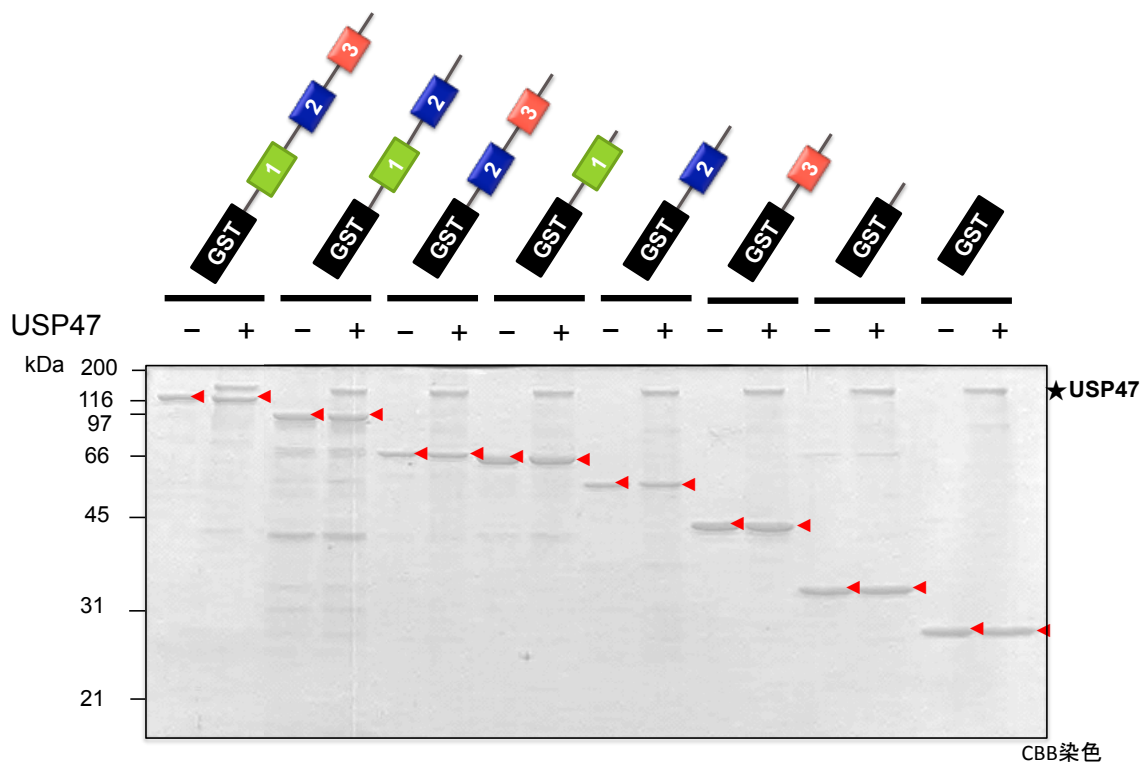


図 29 USP47 の GST-Ubl ドメインに対する消化能の検討

バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の USP47 と 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Ubl ドメインフラグメントを、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた。反応後のサンプルを SDS-PAGE によって分離後、CBB 染色した。★：添加した USP47。◀：GST-Ubl タンパク質。

考察

第一章では USP47 が DUB として作用すること、特にポリ Ub 鎖に対して高い切断活性を持つことを明らかにした。そこで、第二章では USP47 のポリ Ub 消化能発現の分子メカニズムの解明に向けた研究を行った。

USP47 の欠失変異体を作製し、それらの DUB 活性を検討した結果、USP47 のポリ Ub 鎖消化能の発現には Ubl ドメインの重要性が示唆された。最も C 末端側に位置する Ubl₃ の欠失が大幅なポリ Ub 鎖消化能の低下を引き起こした。また、USP47 によるポリ Ub 鎖消化時における Ubl ドメインの添加の影響を検討した際には、GST-Ubl₃ の添加は GST-Ubl₁ および GST-Ubl₂ に比べて強い DUB 活性の阻害を引き起こし、さらに GST-Ubl_{2,3} が最も強い阻害効果を示した。これら結果を踏まえると、USP47 のポリ Ub 鎖消化能の発現に Ubl₃ が主要な役割を果たしていることが考えられる。しかしながら、すべての Ubl ドメインを欠失した USP47 ΔUbl_{3,1} 変異体が最も低いポリ Ub 鎖消化能を示したことや USP47 の DUB 活性測定時に Ubl₃ を含んでいない GST 融合タンパク質を添加した際にも大幅なポリ Ub 鎖消化能の低下が認められたことから、N 末端側の Ubl ドメイン (Ubl₁ および Ubl₂) の USP47 活性発現への寄与も少なくないと考えられる。

最近、USP4、USP7 および USP14 における分子内 Ubl ドメインの機能が明らかとなった (図 30)。USP4 では、不活性時に自身の Ubl ドメインが基質ポケットにはまってポケット構造を保っており、基質である Ub 分子が接近すると競合的に外れる[49]。また、USP14 では Ubl ドメインが 26S プロテアソームの Lid 部分を構成するサブユニットと相互作用することで、20S プロテアソームの活性ポケット入り口での基質タンパク質からの Lys48 結合型 Ub 鎖の消化を可能にしている[50]。USP7 では、N 末端側の Ubl ドメインへと活性調節タンパク質である GMP シンターゼが結合し、その後、C 末端側の 2 つの Ubl ドメインがアロステリックに作用することで触媒ユニット残基の配置が変化して USP7 が活性化することが報告された[48]。

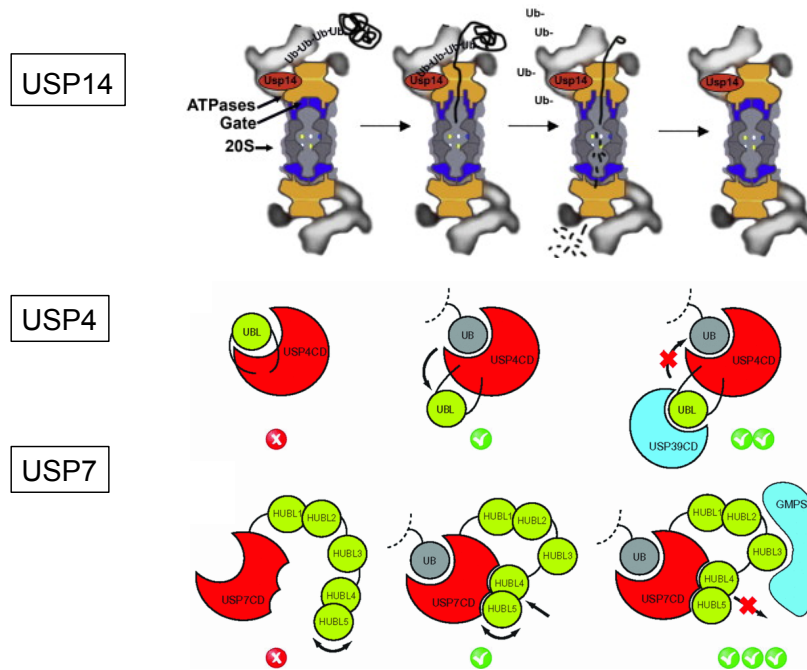


図 30 USP の活性制御における Ubl ドメイン機能
文献 [48-50]より引用

本研究で得られた結果を踏まえると USP47 における Ubl ドメインの役割について図 31 のようなモデルが考えられる。すなわち、2 分子以上の Ub からなる基質の消化の場合には、Ub 鎖が Ub_3 あるいは複数の 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ことでポリ Ub 鎖の消化を促進していると考えられる。一方、モノ Ub 基質に対しては、Ubl ドメインとの十分な相互作用が得られないため、USP47 による消化が起こりにくいのではないかと考えられる。今後、表面プラズモン共鳴法などを用いて、ポリ Ub 鎖と USP47 Ubl ドメインとの相互作用解析や相互作用部位の絞り込みを行っていくことが必要である。

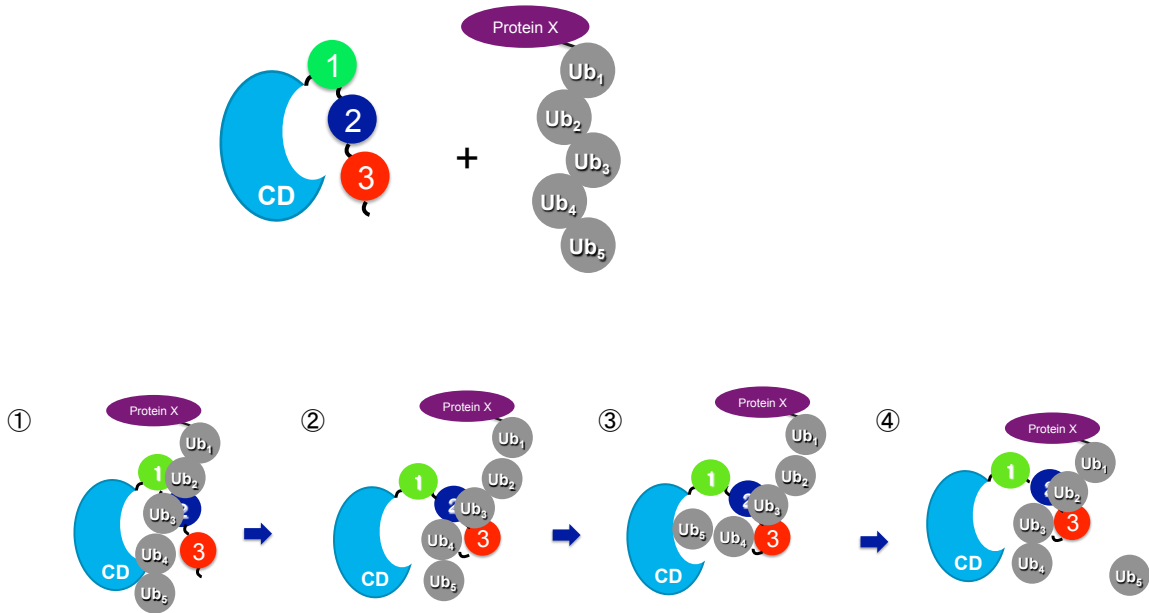
本解析の結果から予想される USP7 と USP47 活性制御機構の差異は、両酵素の高い相同性から考えると意外な結果であった。USP7 のアロステリックな活性制御に必要な Switching loop と Activation peptide との類似配列が USP47 および USP22 にも存在する[48, 51]。しかしながら、本研究によって USP47 では Ubl ドメインを介したアロステリック調節機構は存在していないことが明らかになった。USP22 については相互作用タンパク質による活性化機構は存在するものの、本領域の寄与はないことが示されており、共通した構造ドメインを含むもののその活性調節機構は個々の酵素ごとに異なっていると考えられる。

また、USP7 と USP47 ではポリ Ub 鎖の基質特異性が異なっていることが明らかになった。各酵素の生理機能発現には、ポリ Ub 鎖の結合型に加えて、Ub 化修飾されているタンパク質部分との相互作用も重要である。USP7 は MATH ドメインを介して p53 や MDM2 と相互作用することが知られており、本ドメインを欠く USP47 は Lys48 結合型ポリ Ub 鎖が付加していたとしてもこれら基質に対して作用できないと推察される[52-54]。これらの機構によって、タンパク質の Ub 化修飾反応と同様に脱 Ub 化反応も様々な DUB によって巧妙かつ複雑に制御されていると考えられる。

Ub 相互作用ドメインとしては、UBA や UIM が知られており、例えば、プロテアソームサブユニット S5a 中の UIM は Ub との相互作用を介して E3 による S5a の Lys48 ポリ Ub 鎖付加に関与し、RAP80 の UIM は DNA 修復部位にリクルートされ Lys63 結合型 Ub 鎖付加を受けた H2A と相互作用に関与していることが知られている[47, 55, 56]。しかしながら、本研究で著者が提唱した Ubl がポリ Ub 鎖と相互作用するという報告はこれまでに全くなく、Ubl ドメインの新しい機能となりうると考えられる。また、Ubl によるポリ Ub 鎖認識が USP47 の Ubl ドメインに特異的なものであるかどうかを今後の解析にて明らかにしていきたい。

(A)

ポリユビキチン基質



(B)

モノユビキチン基質

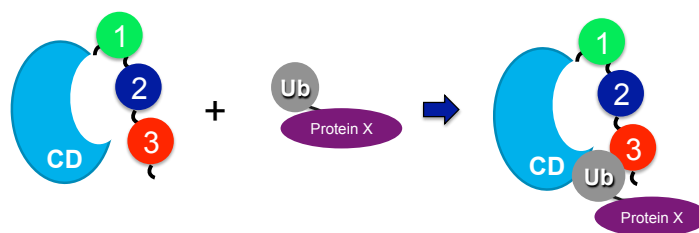


図 31 Ubl ドメインによる USP47 の活性制御モデル

(A) USP47 のポリ Ub 鎖消化時の反応モデル。(B) USP47 のモノ Ub 化基質の消化時の反応モデル。

第三章 酸化ストレス応答に関する脱ユビキチン化酵素の同定

様々なストレスに対する細胞の応答反応において、タンパク質の Ub 化修飾が重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、DNA 損傷時には、損傷部位へとリクルートされた H2A に Lys63 ポリ Ub 鎖が付加され、それをスキヤフォールドとして修復因子が集合して修復反応が進行する[56]。また、抗酸化ストレス応答遺伝子の転写を促進する転写因子 Nrf2 は、通常時には Keap1 との相互作用を介して Lys48 結合型ポリ Ub 鎖の付加を受けるため、プロテアソームによって分解されているが、酸化ストレス刺激時には Keap1 の構造変化が引き起こされた結果、Nrf2 による転写が活性化される[57-59]。また、低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor-1 は、常酸素環境下では分子内の 2 つの Pro 残基が水酸化されており、それを認識する E3 である pVHL によって Lys48 結合型ポリ Ub 鎖修飾を受けるが、Pro 残基の水酸化が起こらない低酸素環境下ではプロテアソームでの分解から逃れ、低酸素応答遺伝子の転写を促進する[60]。このようにストレス応答反応における Ub 添加反応については比較的よく解析されているものの、脱 Ub 化反応の関与については全く明らかになっていない。また酸化ストレス刺激時にはタンパク質リン酸化酵素やタンパク質分解酵素など多くの酵素の活性が修飾を受けることが知られている。そこで、酸化ストレス刺激時の DUB 活性動態変化を解析し、DUB の酸化ストレス応答反応における役割について解析を行った。

第一節 酸化ストレス刺激による DUB 活性動態変化

HeLa 細胞を用いて、酸化ストレスの DUB 活性に及ぼす影響を検討した (図 32)。その結果、HeLa 細胞の Ub-GrB、LRGG-AMC および Ub-AMC 分解活性はいずれもコントロール細胞の約 50%にまで低下していた。

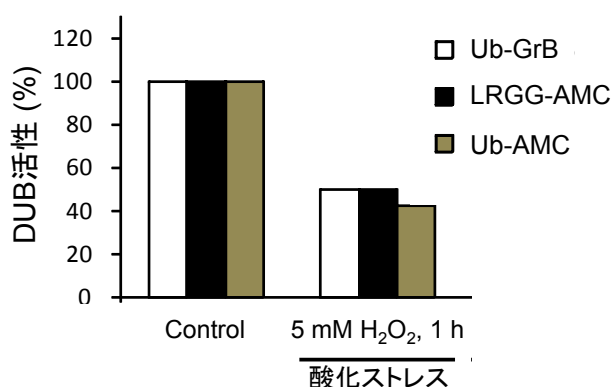


図 32 酸化ストレスの細胞内 DUB 活性に及ぼす影響

H₂O₂ 処理 (5 mM、1 時間) した HeLa 細胞中の Ub-GrB、LRGG-AMC、Ub-AMC 分解活性を測定した。細胞抽出液 (100 μg/mL) と Ub-GrB 分解活性は 1 時間後、LRGG-AMC 分解活性は 5 時間後、Ub-AMC 分解活性は 3 時間後に AMC の蛍光強度を測定した。

次に、酸化ストレス刺激により影響を受ける DUB の同定を試みた。DUB 活性動態を詳細に解析するため、陰イオン交換カラム MonoQ によって HeLa 細胞抽出液を分画後、酸化ストレス刺激による各画分の DUB 活性を解析した (図 33)。その結果、Ub-GrB 分解活性は画分 20 を頂点とするなだらかな 1 ピークとして検出された。しかしながら、活性プロファイルは酸化ストレス処理の前後でパターンおよび強度ともほぼ一致し、前項の全細胞抽出液を用いた解析で認められた酸化ストレス刺激による著しい Ub-GrB 分解活性の低下は見られなかった。LRGG-AMC 分解活性は、画分 15 および 20 を頂点とする 2 つのピークとして検出された。画分 20 を頂点とする高塩濃度溶出側ピークでは分解活性に差異が認められなかったが、画分 15 を頂点とする低塩濃度溶出側ピークの LRGG-AMC 分解活性は酸化ストレス刺激によって大幅に低下していた。また、Ub-AMC 分

解活性は画分 16 を頂点とする幅広いピークとして検出され、酸化ストレス刺激により画分 17、18 の DUB 活性に低下が認められた。

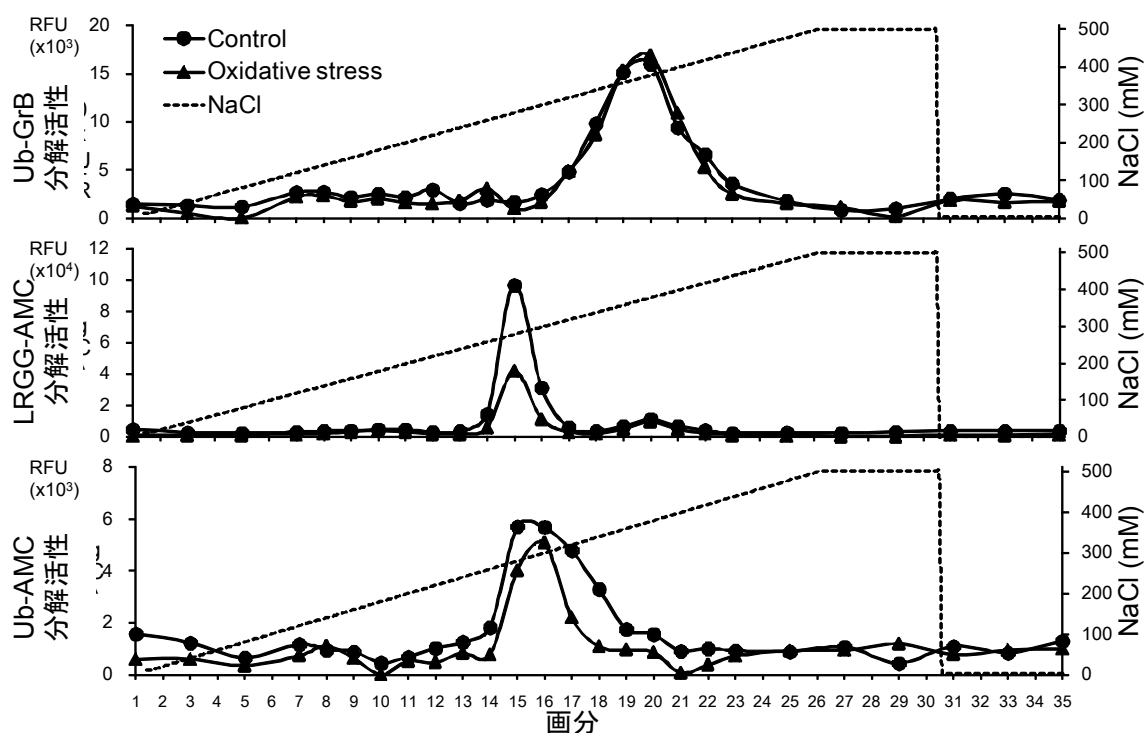


図 33 MonoQ 分画後の DUB 活性プロファイル解析

HeLa 細胞の細胞抽出液を陰イオン交換カラムで分画後、各画分と基質とを反応させた。Ub-GrB 分解活性は 1 時間後、LRGG-AMC 分解活性は 5 時間後、Ub-AMC 分解活性は 2 時間後に AMC の蛍光強度を測定した。

以上の結果から、酸化ストレス刺激による LRGG-AMC および Ub-AMC 分解活性の低下は、MonoQ 分画後の DUB 活性プロファイル解析においても再現良く認められることが明らかとなり、酸化ストレス感受性 DUB が活性変化の認められる画分に存在していることが示唆された。

第二節 酸化ストレス感受性 DUB の同定

LRGG-AMC 分解活性画分中に見いだされた酸化ストレス感受性 DUB の分子同定を行うため、DUB 活性中心の Cys 残基と共有結合形成が可能な activity-based probe HA-Ub-VS を用いた解析を行った (図 34)。MonoQ カラム分画後の LRGG-AMC 分解活性を示した画分と HA-Ub-VS とを反応させ、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、低塩濃度溶出側および高塩濃度溶出側いずれの LRGG-AMC 分解活性画分においても複数の HA-Ub-VS 反応性バンドが検出された。そのほとんどでは、酸化ストレス刺激の有無による強度変化が認められなかったが、画分 15、16 に含まれる分子量約 37 kDa のバンド (バンド A) は、酸化ストレス刺激後の細胞抽出液からは検出されなかった。

HA-Ub-VS の分子量約 10 kDa であることから、この酸化ストレス感受性の HA-Ub-VS 反応性タンパク質の分子量は 27 kDa 程度であると推察された。この推定分子量と DUB のうち Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (UCH) ファミリーに属する分子が LRGG-AMC を良い基質とすることを考え合わせると、バンド A は UCH-L1 (分子量 25 kDa) あるいは L3 (分子量 26 kDa) である可能性が強く示唆された。しかしながら、HeLa 細胞における両候補 DUB の発現を RT-PCR によって検討したところ、UCH-L1 の発現は認められず、UCH-L3 のみが発現していることが明らかになった (data not shown) [61]。

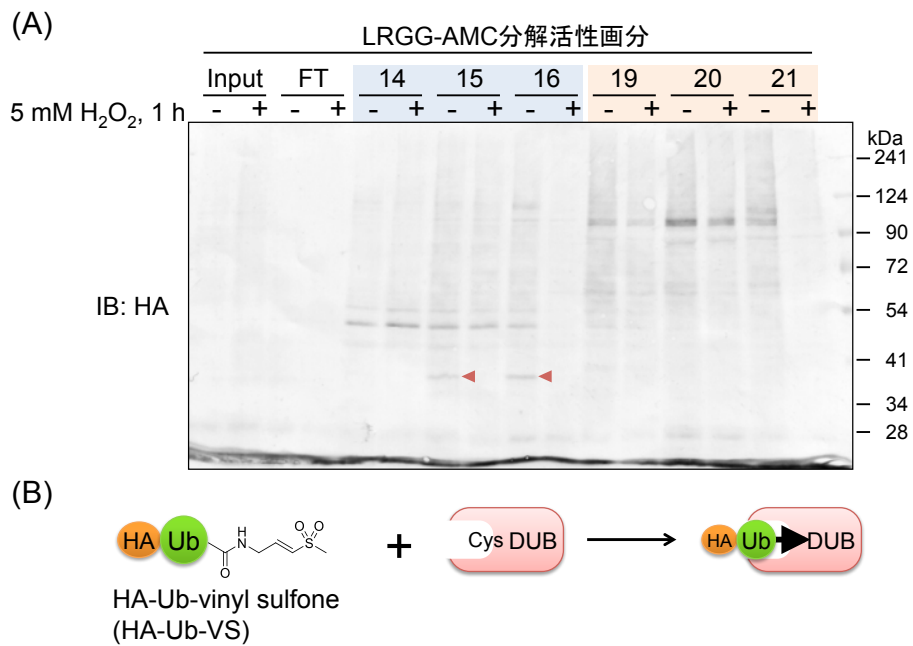


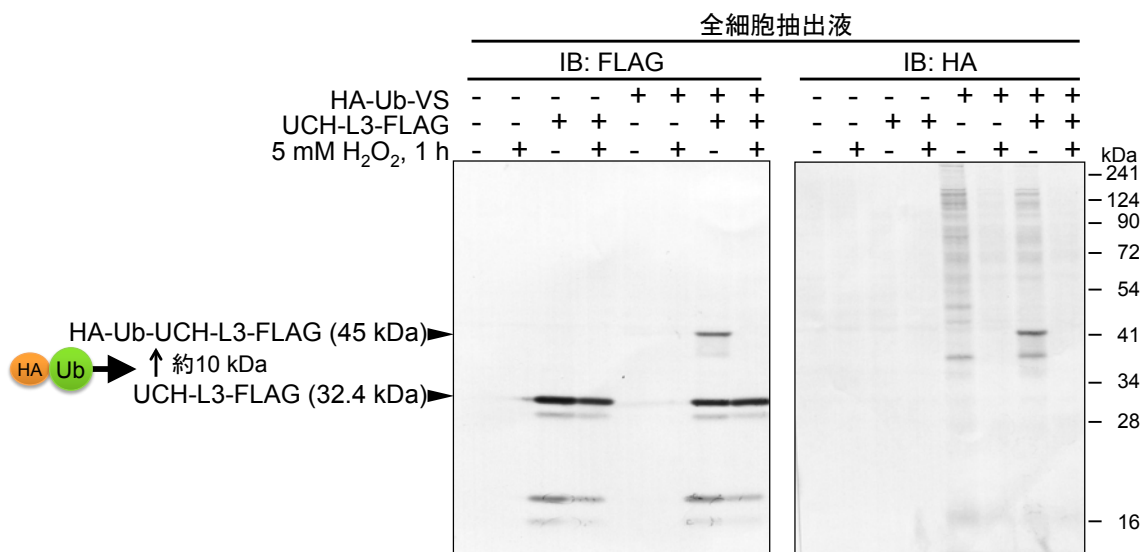
図 34 HA-Ub-VS を利用した酸化ストレス感受性 DUB の同定

(A) 陰イオン交換カラムで分画後の HeLa 細胞の LRGG-AMC 分解活性画分 (50 μ L) と HA-Ub-VS (200 ng) とを反応させ、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析により probe 複合体を検出した。(B) HA-Ub-VS の反応様式。

そこで UCH-L3 の酸化ストレス感受性について検討を行った。UCH-L3 の C 末端に FLAG 配列を付加したタンパク質 UCH-L3-FLAG を用いて、その発現量および HA-Ub-VS 反応性に対する酸化ストレス刺激の影響を検討した (図 35A)。HeLa 細胞に UCH-L3-FLAG を一過性発現させたところ、UCH-L3-FLAG は約 32 kDa の位置に検出され、その発現レベルは酸化ストレス刺激によって影響を受けないことが明らかになった。続いて、全細胞抽出液を用いて UCH-L3-FLAG の HA-Ub-VS との反応性を検討したところ、酸化ストレス刺激前の細胞抽出液からは、UCH-L3-FLAG を示す 32 kDa のバンドに加えて、45 kDa の新たなバンドが抗 FLAG 抗体によって検出され、このバンドは酸化ストレス刺激後では認められなかった。さらに抗 HA 抗体によっても酸化ストレス刺激前の試料のみから 45 kDa のバンドが検出された。これらの結果から、45 kDa のバンドが UCH-L3-FLAG と HA-Ub-VS との複合体であると考えられ、UCH-L3 が酸化ストレス感受性の DUB であることが明らかになった。

さらに、UCH-L3 が酸化ストレス感受性の DUB であることを証明するため、抗 UCH-L3 抗体を用いて内在性 UCH-L3 の HA-Ub-VS 反応性に対する酸化ストレス刺激の影響を検討した。バンド A が検出された MonoQ カラム分画後の LRGG-AMC 分解活性画分を用いて解析した結果、UCH-L3-FLAG の場合と同様に、内在性 UCH-L3 の発現レベルに対する酸化ストレス刺激の影響は認められなかった。また、抗 UCH-L3 抗体および抗 HA 抗体を用いて UCH-L3 と HA-Ub-VS との複合体形成について検討したところ、酸化ストレス刺激前の細胞抽出液からのみ、複合体の形成を示す 37 kDa のバンドがいずれの抗体によっても検出された (図 35B)。以上の結果から、UCH-L3 が酸化ストレス刺激によって活性の低下を受ける DUB であることが明らかになった。

(A)



(B)

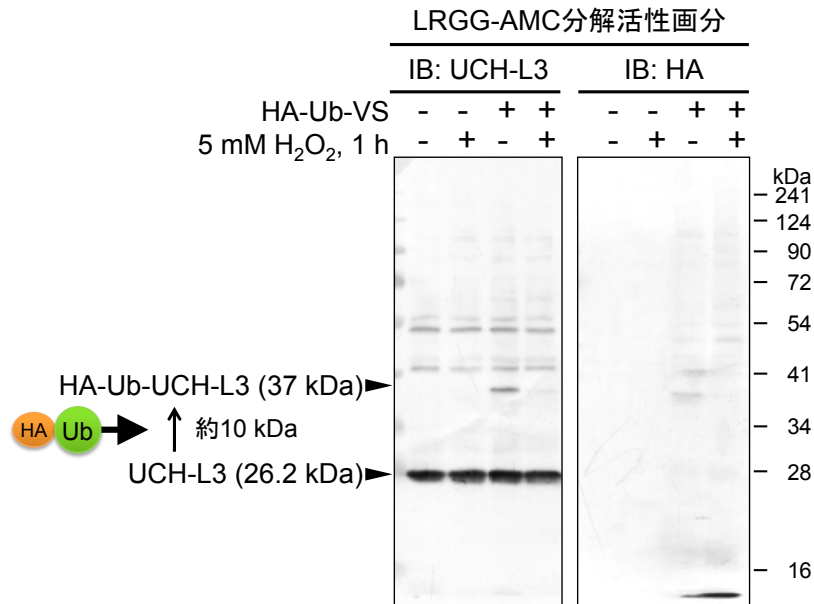


図 35 UCH-L3 は酸化ストレス感受性 DUB である

(A) UCH-L3-FLAG を一過性に発現させた HeLa 細胞を酸化ストレスで刺激し、その細胞抽出液 (10 μ g) と HA-Ub-VS (200 ng) とを反応させ、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。(B) バンド A が検出された HeLa 細胞の LRGG-AMC 分解活性画分 (50 μ L) と HA-Ub-VS とを反応させ、抗 UCH-L3 抗体 (Santa Cruz 社製、ZE-17) および抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

また、MonoQ カラム分画後の HeLa 細胞抽出液の各画分に対して抗 UCH-L3 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、UCH-L3 の存在は低塩濃度溶出側の LRGG-AMC 分解活性画分である画分 15、16 のみで認められ、さらにそれは酸化ストレス刺激によって変化しないことも明らかになった (図 36)。したがって、画分 15、16 における酸化ストレス刺激による LRGG-AMC 分解活性の低下は、UCH-L3 の発現レベルや溶出プロファイルの変化によって生じているのではなく、UCH-L3 の DUB 活性の低下に起因していることが明らかになった。

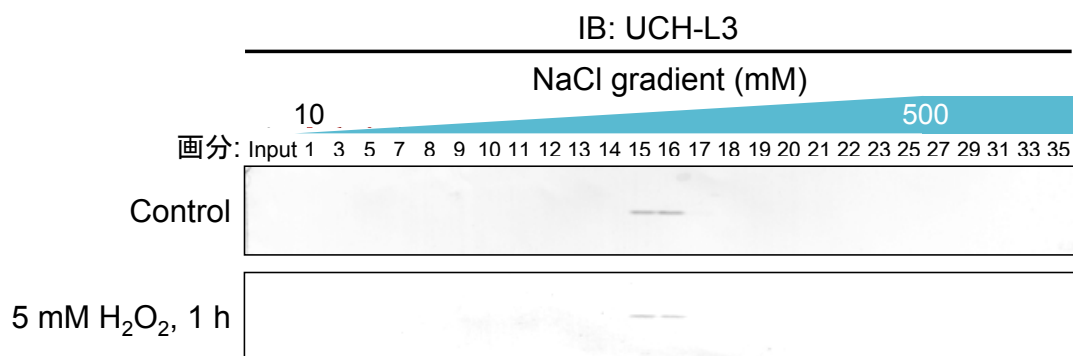


図 36 陰イオン交換カラムでの UCH-L3 溶出プロファイル

陰イオン交換カラムで分画後の HeLa 細胞抽出液の各画分に対し、抗 UCH-L3 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

第三節 酸化ストレス刺激による UCH-L3 の LRGG-AMC 分解活性低下

第一項 HeLa 細胞での酸化ストレスによる UCH-L3 活性の低下

次に、UCH-L3 の HA-Ub-VS 反応性だけでなく、その LRGG-AMC 分解活性も酸化ストレス刺激によって低下を受けるかどうかを検討した。UCH-L3-FLAG を一過性に発現させた HeLa 細胞の細胞抽出液から、抗 FLAG 抗体を用いて UCH-L3-FLAG を免疫沈降し、その LRGG-AMC 分解活性を測定したところ、酸化ストレス刺激した HeLa 細胞中から精製した UCH-L3-FLAG の LRGG-AMC 分解活性は、刺激前の細胞から精製した UCH-L3-FLAG の LRGG-AMC 分解活性の 20%程度しか認められず、確かに酸化ストレス刺激を受けた細胞内で UCH-L3 の DUB 活性が低下することが明らかになった (図 37)。

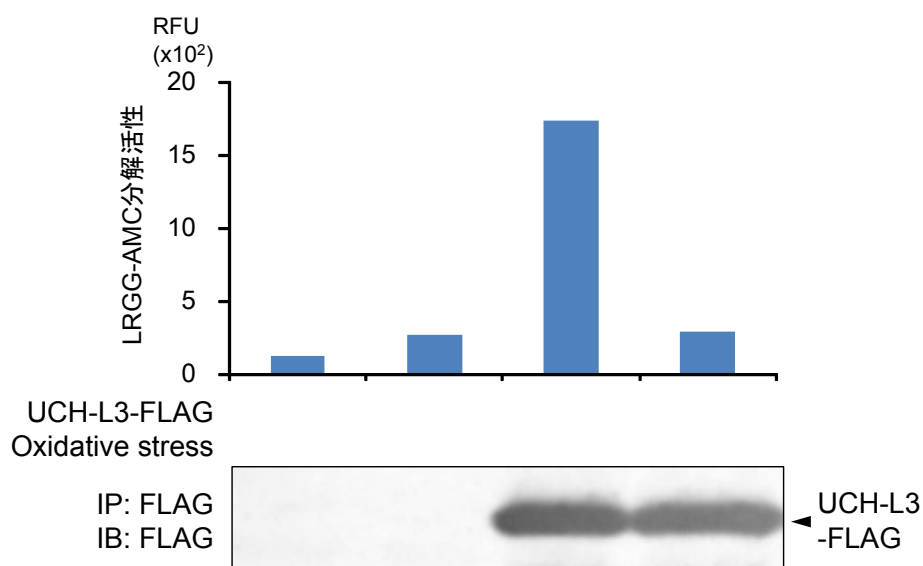


図 37 酸化ストレス刺激による UCH-L3 の LRGG-AMC 分解活性の低下

UCH-L3-FLAG を一過性に発現させた HeLa 細胞を酸化ストレスで刺激し、その細胞抽出液 (200 μ g) から抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降により精製した UCH-L3-FLAG の LRGG-AMC 分解活性を測定した。

第二項 NIH3T3 細胞での酸化ストレスによる UCH-L3 活性の低下

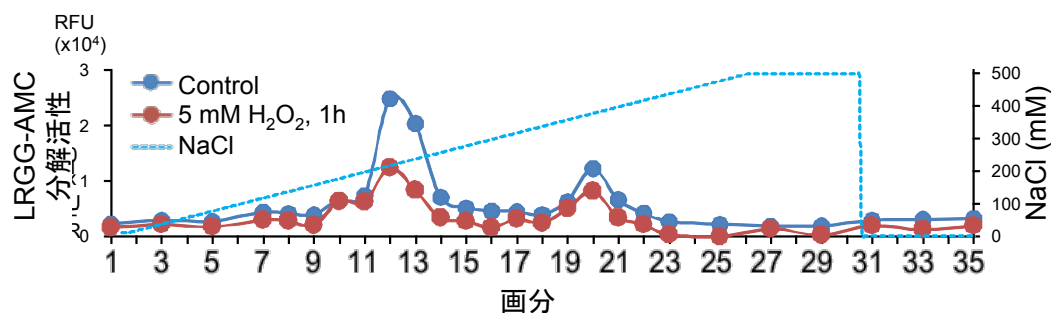


図 38 MonoQ 分画後の DUB 活性プロファイル解析—NIH3T3 細胞を用いた解析

NIH3T3 細胞の細胞抽出液を陰イオン交換カラムで分画後、各画分と LRGG-AMC を 5 時間反応させ、AMC の蛍光強度を測定した。

最後に、酸化ストレス刺激による UCH-L3 の DUB 活性低下が HeLa 細胞のみで認められる現象ではないことを明らかにするため、マウス胚線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いた解析を行った。HeLa 細胞の場合と同様に細胞抽出液を MonoQ カラムで分画し、酸化ストレス刺激による各画分の LRGG-AMC 分解活性動態の変化や活性画分における HA-Ub-VS 反応性を検討した。その結果、LRGG-AMC 分解活性プロファイル、酸化ストレス刺激した細胞での低塩濃度溶出画分側での活性レベルの低下、そこに含まれる UCH-L3 の HA-Ub-VS 反応性のいずれも HeLa 細胞と同様の結果が得られた (図 38、39)。このことから、酸化ストレス刺激による UCH-L3 の活性低下は HeLa 細胞以外の細胞でも認められる現象であることが示唆された。

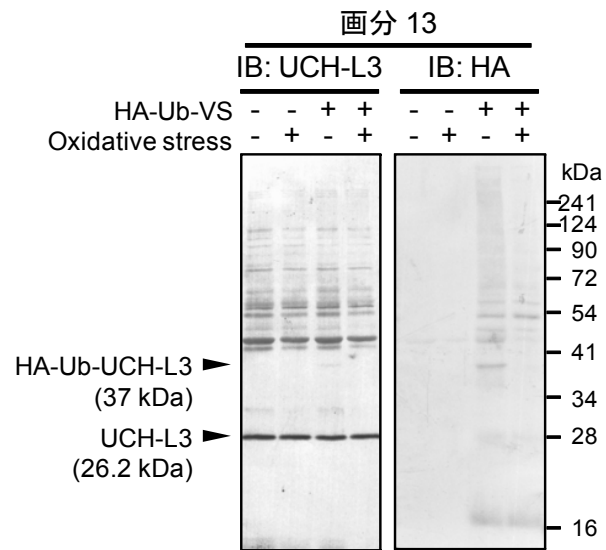


図 39 酸化ストレス刺激が UCH-L3 の DUB 活性に及ぼす影響
陰イオン交換カラムで分画後の NIH3T3 細胞の画分 13 (50 μ L) と HA-Ub-VS (200 ng) とを反応させ、抗 UCH-L3 抗体および抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

考察

ミトコンドリアでの ATP 産生の際に生じる活性酸素種は膜脂質、タンパク質、核酸を酸化し、様々な細胞応答を引き起こす[62, 63]。活性酸素種は生体にとって高い毒性を持つことから、グルタチオンやチオレドキシンといった抗酸化タンパク質によって消去されているが、その過剰な生成や老化などによる除去能の低下は酸化ストレスをもたらし、多くの疾患の原因となっている[64-67]。活性酸素種はタンパク質の Cys や Met 残基の酸化を介して、タンパク質の機能を制御しており、pyruvate kinase M2 や calcium/ calmodulin-dependent protein kinase などのタンパク質リン酸化酵素、Ub 添加酵素群 (E1 および E2)、caspase-3 など様々な酵素や NF- κ B などの転写因子が酸化ストレス刺激によって活性化/不活性化を受ける[68-73]。本研究において、著者は、酸化ストレス刺激により UCH-L3 活性が低下することを見出し、UCH-L3 が新しい酸化ストレスエフェクタータンパク質であることを見出した。

UCH ファミリーに属する DUB であるヒト UCH-L3 は 230 アミノ酸から構成され、その触媒ユニット残基は Cys95、His169 および Asp184 である。X 線結晶構造解析の結果、基質 Ub と結合していない場合でも本酵素の触媒ユニット残基はパパイン様と同様の空間配置をとり、Cys95 と His169 の側鎖間の距離は 3.8Å と近接していることが明らかになっている[74, 75]。このことは Cys95 と His169 の生理的条件下で thiolate-imidazolium イオン対を形成していることを示唆し、そしてこの thiolate イオンが H₂O₂ 刺激などによって生じた活性酸素種によって酸化を受け、UCH-L3 が不活性化されると考えられる。一方、USP7 などでは、Ub との結合前の触媒ユニット残基間の距離が約 8 Å 離れており、活性中心 Cys 側鎖が thiolate イオンを生じていないと考えられ、このような DUB は活性酸素種の標的とはなりにくいと考えられる[34]。

UCH-L3 は人工基質などを用いた解析から Ub の C 末端側に比較的小さなペプチドが結合したものを良い基質とし、タンパク質に付加したポリ Ub 鎖の分解よりも Ub 前駆体からの Ub 生成や Ub 再利用経路へと深くかかわっていることが示唆されている[31, 76]。活性酸素種による UCH-L3 の活性低下は、利用可能な細胞内 Ub 量の低下を引き起こし、さらにタンパク質代謝に大きな影響を与えると考えられ、さらには UCH-L3 機能の低下が何らかの酸化ストレス疾患の一因になりうることも考えられる。実際、UCH-L3 ノックアウトマウスの解析の結果、UCH-L3 遺伝子欠損によって視細胞のアポトーシスによる網膜症が発症すること

が報告されている[77]。マウス網膜視細胞ではミトコンドリアが内節部位に豊富に存在しており、UCH-L3 の細胞内局在も同部位であることが知られている[78]。これらの知見と本研究の結果を考え合わせると、UCH-L3 はマウス網膜視細胞内で活性酸素種の比較的早期の標的であり、酸化を受けることでその活性が消失すると考えられる。そして、UCH-L3 による活性酸素種の除去がうまくいかないことが、網膜症などを引き起こす原因となりうるのではないかと考えられる (図)。また、アルツハイマー病など老年性の疾患の患者の脳内で、UCH-L1 が恐らく活性酸素種によって様々な酸化修飾を受け、その DUB 活性を失っていることも報告されており[79, 80]、UCH-L1 および L3 が酸化ストレスのエフェクタータンパク質となり、神経変性やがん、心血管病などの酸化ストレス疾患を引き起こす原因となりうると思われる[81-85]。

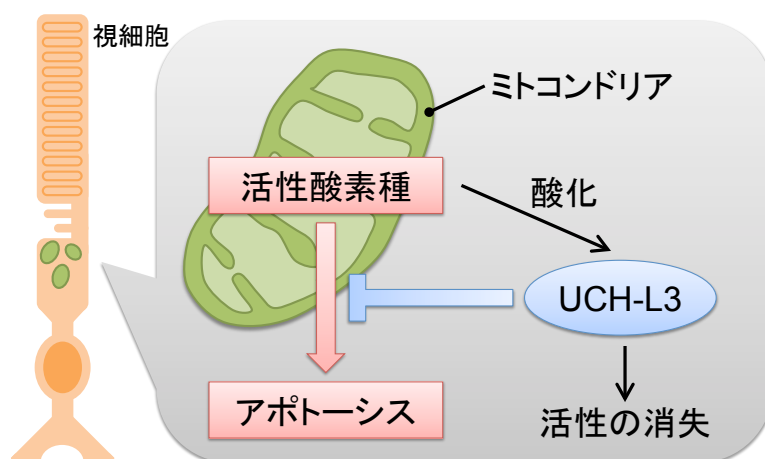


図 40 UCH-L3 の網膜視細胞内での酸化ストレスエフェクタータンパク質としての機能

総括

タンパク質の Ub 化修飾は細胞周期、シグナル伝達、転写調節など多くの細胞内のイベントに関与している。タンパク質の Ub 化修飾は、Ub 添加酵素群による Ub 付加反応と DUB による脱 Ub 化反応のバランスによって制御されている。著者は本研究において、巧妙かつ複雑な Ub 化修飾の機能を理解することを目指して、未だ解明の進んでいない脱 Ub 化反応に焦点を当てた生化学・化学生物学的な解析を行った。

第一章では、これまでに DUB 活性が明らかになっていなかったヒト USP47 の酵素学的性状について、バキュロウイルス発現系にて調製したリコンビナント酵素を用いた詳細な解析を行った。その結果、USP47 が Ub-GrB や Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖から Ub 分子を遊離し、確かに DUB 活性を有することを明らかにした。また、本酵素が、類縁酵素である USP7 と比べて高い Lys48 結合型および Lys63 結合型ポリ Ub 鎖消化活性を有することを見出した。これら知見に加えてプロテアーゼ阻害剤に対する感受性プロファイル解析の結果も併せると、USP47 と USP7 の酵素学的性状にははっきりとした差異が認められ、各酵素は異なった生理機能を担っている可能性が示唆された。

第二章では、ヒト USP47 のポリ Ub 鎖消化能発現の分子メカニズムを明らかにするため、分子内に存在する Ubl ドメインに焦点を当てた解析を行った。その結果、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。一方で、USP7 の分子内 Ubl ドメインのように、アロステリックに触媒部位へと働きかけて活性化を行う様なモデルは、USP47 では起こっていないと考えられ、活性制御機能においても、USP47 と USP7 では異なっていることが明らかになった。

第三章では、主要な細胞ストレスである酸化ストレスに対する応答時の DUB 活性の動態変化を解析し、活性酸素種によって活性制御を受ける DUB の同定を行った。陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて HeLa 細胞の細胞抽出液を分画し、酸化ストレス刺激時によって DUB 活性の低下する画分を同定し、そこに含まれる酸化ストレス感受性 DUB を Ub activity-based probe を用いて探索

した結果、UCH-L3 が同定された。これらの結果などから、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示唆され、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。

実験項

試薬

人工蛍光基質 LRGG-AMC、Ub-AMC はペプチド研究所から、Di-Ub は Life sensor から購入した。ペプスタチンや EDTA、N-エチルマレイミドはペプチド研究所より購入した。1,10-phenanthroline、PMSF、TPCK、ロイペプチン、E64 は Sigma 社から購入した。抗生物質および IPTG、X-Gal はナカライテスク社製品を使用した。

細胞培養・細胞抽出液の調製

Sf9 細胞は Sf-900 III 培地を用いて、27 °C で培養した。ヒト子宮頸癌細胞 HeLa 細胞およびマウス胚線維芽細胞 NIH3T3 細胞の培養は 10% の牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地中、37 °C、5% CO₂ 下で行った。酸化ストレス (5 mM H₂O₂, 1 時間) で刺激した細胞を可溶化バッファー [10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5% Triton X-100] で可溶化し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 分) 後の上清を細胞抽出液として用いた。

組み換え型 USP47 発現バクミドの調製

USP47 の cDNA は HeLa 細胞の mRNA を鋳型にした逆転写 PCR 法によって得た。また、その 3' 末端には C 末端 6×His タグコード配列を付加した。次に、USP47 cDNA に BP ClonaseTM による相同組み換えに必要な ATTB1 および ATTB2 配列を付加するため、ATTB1 プライマー (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') および ATTB2 プライマー (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3') を用いて USP47 cDNA をさらに増幅した。PCR は 30 μL の反応系で行い、2 mM MgCl₂ を含む 1 倍濃度の Pyrobest Buffer に、プライマー各 0.5 μM (表 3)、Pyrobest DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社) 0.05 U/μL となるように加えた。また、反応は、TRIO-Thermo Block (Biometra 社) を用いて、94 °C で 3 分 30 秒間の加熱後、熱変性 (98 °C、10 秒) からアニーリング (55 °C、15 秒)、伸長 (72 °C、3 分) に至る反応を 1 サイクルとして計 30 サイクル行った。得られた PCR 産物を BP Clonase

(Invitrogen 社) を用いて pDONR201 ベクター(Invitrogen 社)へと挿入し、大腸菌 DH5 α (タカラバイオ) へ導入した。USP47 cDNA が挿入されたベクター (pUSP47/pDONR201) を持つ DH5 α を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含む LB 寒天培地で選択した。USP47 の cDNA の塩基配列は ABI 377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社) で確認した。次に、LR ClonaseTM (Invitrogen 社) によって、USP47/pDONR201 上の USP47 cDNA を pDEST8 (Invitrogen 社) へと組み換え、USP47 の cDNA が挿入された pDEST8 ベクター (pUSP47/pDEST8) を持つ DH5 α を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む LB 寒天培地で選択した。

次に、トランスポゾンを持つ大腸菌 DH10Bac に USP47/pDEST8 を導入し、その後、トランスファーベクター-pDEST8 から USP47 cDNA をバクミドへと組み込み、USP47 発現バクミド (USP47/Bacmid) を得た。USP47/Bacmid を有する DH10Bac の選択は、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリン、7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の X-Gal および 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPTG を含む LB 寒天培地上で行った。USP47/Bacmid はアルカリ/SDS 法によって精製した。USP7/Bacmid も USP47 と同様な方法で得た。

バキュロウイルス発現系を用いた組み換え型 USP47, USP7 の発現

USP47/Bacmid 10 μg と Cellfectin reagent (Invitrogen 社) 6 μL を 200 μL の Sf-900 III 培地中で混合し、室温で 45 分インキュベーションすることで USP47/Bacmid-Lipid 複合体を形成させた。本複合体を 800 μL の Sf-900 III 培地で希釈後、ヨトウガ細胞 Sf9 (1.0×10^6 細胞) に添加することで USP47/Bacmid を導入した。5 時間培養後、培地を新たな Sf-900 III 培地 2 mL へと交換した。さらに 27 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間培養後、上清を回収し、第一世代の USP47 発現バキュロウイルス (P1S ウイルス) を得た。次で、2 mL の P1S ウイルスを Sf9 細胞 (1.0×10^7 細胞) に感染させて、72 時間培養後、第二世代の USP47 発現バキュロウイルス (P2S ウイルス) を得た。続いて、P2S ウイルスを M. O. I (Multiplicity of infection) = $\sim 0.01-0.1$ となるように Sf9 細胞 (1.0×10^7 細胞) に感染させてウイルス増幅を行い、第三世代のウイルス (P3S ウイルス) を得た。組み換え型 USP47 の発現は、P3S ウイルスを M. O. I = $\sim 1-3$ となるように Sf9 細胞 (10.8×10^8 細胞) に感染させて行き、48 時間後の細胞を回収した。USP7 も同様な方法で発現させた。

カラムクロマトグラフィー法を用いた組み換え型ヒト USP47 の精製

ウイルス感染 48 時間後の細胞を 0.5% Nonidet P-40 を含む PBS を用いて可溶化した。その細胞抽出液を Ni-NTA (Qiagen 社) カラムにアプライし、20 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含む 30 mL の緩衝液で洗浄した後、200 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含む緩衝液 20 mL で溶出した。溶出液を 5 倍希釈し、これを Ni²⁺ chelating Sepharose カラム (GE Healthcare 社) にアプライし、40 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含む 30 mL の緩衝液で洗浄した後、200 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含む緩衝液 20 mL で溶出した。流速は 2 mL/分、分画は 1 mL ずつ行った。その後、サンプルを HiTrap phenyl カラム (GE Healthcare 社) にアプライし、20% (NH₄)₂SO₄ を含む 50 mM Tris (7.5) 緩衝液 10 mL で洗浄した後、50 mM Tris (7.5) 緩衝液 20 mL で溶出した。流速は 0.5 mL/分、分画は 0.25 mL ずつ行った。その後、Ub-GrB および SDS-PAGE 後の CBB 染色により活性および純度を確認した。精製後の試料は限外濾過にて濃縮後、終濃度が 10% となるようにグリセロールを添加し、-80 °C で保存した。USP7 の精製も同様の方法で行った。

表 3 DUB 遺伝子作製に使用したプライマーの配列

増幅 遺伝子名	センス鎖	アンチセンス鎖
UCH-L3	5'- CCGGAATTCGAGGGTCAACG CTGGCTGCCG-3'	5'- GTGATGGTGATGGTGATGTGC TGCAGAAAGAGCAATCGC-3'
USP7	5'- AAAAAGCAGGCTATGAACCA CCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AGAAAG-3'	5'- GTGATGGTGATGGTGGTTATG GATTTAATGGCC-3'
USP8	5'- CGGGATCCCCTGCTGTGGCTT CAGTTC-3'	5'- ATGGTGATGGTGTGTGGCTAC ATCAGTTAC-3'
USP47	5'- AAAAAGCAGGCTATGGTGCCC GGCGAGGAGAACCAACTG-3'	5'- GTGATGGTGATGGTGGTCTTG AGTCAGATCTTTATTTG-3'

組み換え型 USP8 及び UCH-L3 の調製

USP8 の cDNA は WI-38 細胞の mRNA を、UCH-L3 の cDNA は HeLa 細胞の

mRNA を鋳型にした逆転写 PCR 法によって得た。次いで PCR 法にて 3'末端に 6×His タグコード配列を付加した USP8 及び UCH-L3 遺伝子を増幅後、それを大腸菌発現用ベクター pGEX6P1 に挿入した。PCR は 30 μ L の反応系で行い、2 mM MgCl₂ を含む 1 倍濃度の Pyrobest Buffer に、プライマー各 0.5 μ M (表 3)、Pyrobest DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社) 0.05 U/ μ L となるように加えた。作製した USP8 および UCH-L3 発現ベクターを大腸菌 Rosetta-gami B (DE3) に導入した。組み換え型 USP8 及び UCH-L3 の発現は、37 °C で OD600=0.6 まで培養した大腸菌を、15 °C で 1 時間静置した後、100 μ M IPTG にて誘導した。15 °C で 12 時間培養を続けた後に大腸菌を回収し、0.5% Triton X-100 および 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris (7.5) 緩衝液 40 mL で溶出した。

その抽出液を Ni²⁺ chelating Sepharose にアプライし、十分な洗浄後、イミダゾールを含むバッファーでグラジエント溶出 (イミダゾール, 40-200 mM) を行った。次いで、溶出画分を GSTrap Sepharose (GE Healthcare 社) にアプライし、十分な洗浄後、還元型グルタチオン (GSH) を含むバッファーでグラジエント溶出 (0-25 mM) を行った。

組み換え型 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体調製

各変異体の cDNA の PCR は 30 μ L の反応系で行い、2 mM MgCl₂ を含む 1 倍濃度の Pyrobest Buffer に、プライマー各 0.5 μ M (表 4)、Pyrobest DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社) 0.05 U/ μ L となるように加えた。反応は、TRIO-Thermo Block (Biometra 社) を用いて、94 °C で 3 分 30 秒間の加熱後、熱変性 (98 °C、10 秒) からアニーリング (55 °C、15 秒)、伸長 (72 °C、3 分) に至る反応を 1 サイクルとして計 30 サイクル行った。3'末端に 6×His タグ配列を付加した USP47 変異体遺伝子を増幅後、それらをトランスファーベクター pDEST8 に挿入した。それを、大腸菌 DH10Bac (Invitrogen 社) に導入し、cDNA を挿入した Bacmid を作製した。

組み換え型 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体は USP47 の発現と同様の方法にて行った。次いで、P1S ウイルスを用いて P2S ウイルスを、P2S ウイルスを用いて P3S ウイルスを順次調製した。組み換え型 Ubl ドメイン欠失 USP47 変異体の発現は、P3S ウイルスを M. O. I = ~1-3 となるように Sf9 細胞 (6.5×10⁸ 細胞) に感染させて行き、48 時間後の細胞を回収した。

表 4 USP47 変異体遺伝子の作製に使用したプライマーの配列

増幅する変異体遺伝子	センス鎖	アンチセンス鎖
USP47 C109S	5'- CCAAGCAATGACTTCCTATT TGAATAGCC-3'	5'- GGCTATTCAAATAGGAAGT CATTGCTTGG-3'
USP47 I1274A	5'- CGTAAAGAGAAAGCACTAA AAGCATATCTGGATGGAGCA CC-3'	5'- GGTGCTCCATCCAGATATG CTTTTAGTGCTTTCTCTTTA CG-3'
USP47 Δ C ₂₇	5'- AAAAAGCAGGCTATGGTGC CCGGCGAGGAGAACCAACT G-3'	5'- ATGGTGATGGTGATGGTGA TGTCAGTCTTCTGGAGTC- 3'
USP47 Δ Ubl ₃	5'- AAAAAGCAGGCTATGGTGC CCGGCGAGGAGAACCAACT G-3'	5'- ATGGTGATGGTGATGGTGT TCTTCATAAATATGATAAT C-3'
USP47 Δ Ubl ₃₋₂	5'- AAAAAGCAGGCTATGGTGC CCGGCGAGGAGAACCAACT G-3'	5'- ATGGTGATGGTGATGGTGA AAATTTTCTGGATCAGAAG -3'
USP47 Δ Ubl ₃₋₁	5'- AAAAAGCAGGCTATGGTGC CCGGCGAGGAGAACCAACT G-3'	5'- ATGGTGATGGTGATGGTGA GATTGGAAAACCTGATCAG G-3'

Ubl ドメインフラグメントの調製

USP47 cDNA を鋳型にして PCR 法にて 3'末端に 6×His タグ配列を付加した USP47 Ubl ドメイン 遺伝子を増幅し、大腸菌発現用ベクター pGEX6P1 に挿入した。作製した GST-Ubl 発現ベクターを大腸菌 Rosetta-gami B (DE3) に導入した。PCR は 30 μ L の反応系で行い、2 mM MgCl₂ を含む 1 倍濃度の Pyrobest Buffer に、プライマー各 0.5 μ M (表 5)、Pyrobest DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社) 0.05 U/ μ L となるように加えた。Ubl ドメインフラグメントは、USP8 及び UCH-L3 と同様な方法で発現させ、Ni²⁺ chelating Sepharose および GSTrap Sepharose を用いて精製した。

表5 Ubl ドメインフラグメントの作製に使用したプライマーの配列

GST-Ubl 遺伝子名	センス鎖	アンチセンス鎖
GST-Ubl _{1,2,3}	5'- CCGCTCGAGCTAGAAGTGGAT GAATACCCAGAAC-3'	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTA ATGGTGATGGTGATGGTG-3'
GST-Ubl _{1,2}	5'- CCGCTCGAGCTAGAAGTGGAT GAATACCCAGAAC-3'	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTA ATGGTGATGGTGATGGTG-3'
GST-Ubl _{2,3}	5'- CCGCTCGAGCAGTCTGAAGA ACGATCAGACTCAGATGTG-3'	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTA ATGGTGATGGTGATGGTG-3'
GST-Ubl ₁	5'- CCGCTCGAGCTAGAAGTGGAT GAATACCCAGAAC-3'	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTA ATGGTGATGGTGATGGTG-3'
GST-Ubl ₂	5'- CCGCTCGAGCAGTCTGAAGA ACGATCAGACTCAGATGTG-3'	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTA ATGGTGATGGTGATGGTG-3'
GST-Ubl ₃	5'- CCGCTCGAGGATATTAATATT TCCAGCAACTGGG-3'	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTA ATGGTGATGGTGATGGTG-3'
GST-54aa	5'- CCGCTCGAGACAGAAGAATT AATGGAATTGACAG-3'	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTA ATGGTGATGGTGATGGTG-3'

人工蛍光基質 LRGG-AMC 及び Ub-AMC を利用した DUB 活性の測定

酵素反応は、反応バッファーA (50 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、10 mM DTT) 中で行った。DUB 活性測定用基質として 50 μM の LRGG-AMC あるいは 1 μM の Ub-AMC を使用した。各人工蛍光基質から遊離した AMC の蛍光強度は、プレートリーダーを用いて測定した。(励起波長: 380 nm、検出波長: 460 nm)

GrB をレポーターとした DUB 活性測定法

酵素反応は DUB 基質である Ub-GrB (10 μg/mL) と GrB の基質である 50 μM の IETD-AMC (ペプチド研究所) を含む反応バッファーA 中で行った。反応液中の IETD-AMC の分解によって生成した AMC の蛍光強度を測定した。成熟型

GrB の生成は、反応後の試料を SDS-PAGE で分離した後、蛍光試薬 Lumitein で染色することで可視化し、各バンドの強度をデンシトメトリーで定量した。

Lys48 結合型及び Lys63 結合型ポリ Ub 鎖に対する DUB 活性の測定

USP47 (60 µg/mL) と Lys48 結合型あるいは Lys63 結合型ポリ Ub 鎖 (4 µg/mL) (Boston Biochem 社) をバッファーA 中で反応させた。反応後の試料を SDS-PAGE で分離し、抗 Ub 抗体 (P4D1, Santa Cruz 社) を用いたウェスタンブロット解析によってモノ Ub への消化を可視化した。

イオン交換クロマトグラフィーによる細胞抽出液の分画

各細胞抽出液 (1 mg) を陰イオン交換カラム Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare 社) にアプライし、十分な洗浄後、NaCl のグラジエント (10 mM-500 mM) で溶出した。流速は 0.75 mL/分、分画は 0.5 mL ずつ行った。

activity-based probe を利用した DUB 活性の検出・ウェスタンブロット解析

分画前もしくは分画後の細胞抽出液 50 µL と HA-Ub-VS (Boston Biochem 社) 200 ng とを 37 °C で 1 時間反応させた。反応後の試料を、SDS-PAGE により分離した後、PVDF 膜に転写した。ブロッキング後の PVDF 膜を抗 HA 抗体 (BABC0 社製, HA.11) あるいは各種特異抗体と反応させ、次いでアルカリホスファターゼ標識した二次抗体と反応させた。その後、NBT/BCIP を用いて目的タンパク質を可視化した。

UCH-L3-FLAG の発現・免疫沈降・活性測定

ヒト UCH-L3 遺伝子を挿入した発現ベクター pUCH-L3/p3xFLAG-CMV-14 (Sigma-Aldrich 社) を HeLa 細胞へ一過性に導入し、酸化ストレス刺激後、細胞抽出液を調製した。結合バッファー [50 mM Tris/HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100) 中で細胞抽出液 (200 µg) と protein G Sepharose (GE healthcare 社製) 20 mL、抗 FLAG 抗体 (和光純薬工業社製, 1E6) 1.5 µg とを 4 °C で一晩混和し、免疫沈降を行った。遠心分離後の残渣を結合バッファーで 3

回、反応バッファーで2回順次洗浄した後、50 μ M の LRGG-AMC を含む反応バッファーを加えて 37 $^{\circ}$ C でインキュベートすることで、免疫沈降産物中に含まれる UCH-L3 の DUB 活性を測定した。

参考文献

- [1] Vijay-kumar, S, Bugg, CE & Cook, WJ (1987) Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **194**, 531-544.
- [2] Komander, D, Clague, MJ & Urbe, S (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 550-563.
- [3] Hershko, A & Ciechanover, A (1998) The ubiquitin system *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- [4] Balakirev, MY, Tcherniuk, SO, Jaquinod, M & Chroboczek, J (2003) Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway *EMBO Rep* **4**, 517-522.
- [5] Deshaies, RJ & Joazeiro, CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434.
- [6] Kulathu, Y & Komander, D (2012) Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 508-523.
- [7] Bedford, L, Layfield, R, Mayer, RJ, Peng, J & Xu, P (2011) Diverse polyubiquitin chains accumulate following 26S proteasomal dysfunction in mammalian neurones *Neurosci Lett* **491**, 44-47.
- [8] Bremm, A & Komander, D (2011) Emerging roles for Lys11-linked polyubiquitin in cellular regulation *Trends Biochem Sci* **36**, 355-363.
- [9] Trempe, JF (2011) Reading the ubiquitin postal code *Curr Opin Struct Biol* **21**, 792-801.
- [10] Gerlach, B, Cordier, SM, Schmukle, AC, Emmerich, CH, Rieser, E, Haas, TL, Webb, AI, Rickard, JA, Anderton, H, Wong, WW, Nachbur, U, Gangoda, L, Warnken, U, Purcell, AW, Silke, J & Walczak, H (2011) Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling *Nature* **471**, 591-596.
- [11] Iwai, K (2010) Functions of Linear Ubiquitin Chains in the NF-kappaB Pathway : Linear Polyubiquitin in NF-kappaB Signaling *Subcell Biochem* **54**, 100-106.

- [12] Iwai, K & Tokunaga, F (2009) Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation *EMBO Rep* **10**, 706-713.
- [13] Ashida, H, Kim, M, Schmidt-Supprian, M, Ma, A, Ogawa, M & Sasakawa, C (2010) A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response *Nat Cell Biol* **12**, 66-73.
- [14] Kim, W, Bennett, EJ, Huttlin, EL, Guo, A, Li, J, Possemato, A, Sowa, ME, Rad, R, Rush, J, Comb, MJ, Harper, JW & Gygi, SP (2011) Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome *Mol Cell* **44**, 325-340.
- [15] Wagner, SA, Beli, P, Weinert, BT, Nielsen, ML, Cox, J, Mann, M & Choudhary, C (2011) A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles *Mol Cell Proteomics* **10**, M111.013284.
- [16] Arimoto, K, Funami, K, Saeki, Y, Tanaka, K, Okawa, K, Takeuchi, O, Akira, S, Murakami, Y & Shimotohno, K (2010) Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15856-15861.
- [17] Atanassov, BS, Evrard, YA, Multani, AS, Zhang, Z, Tora, L, Devys, D, Chang, S & Dent, SY (2009) Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol Cell* **35**, 352-364.
- [18] Brooks, CL, Li, M, Hu, M, Shi, Y & Gu, W (2007) The p53--Mdm2--HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP *Oncogene* **26**, 7262-7266.
- [19] Fernandez-Montalvan, A, Bouwmeester, T, Joberty, G, Mader, R, Mahnke, M, Pierrat, B, Schlaeppli, JM, Worpenberg, S & Gerhartz, B (2007) Biochemical characterization of USP7 reveals post-translational modification sites and structural requirements for substrate processing and subcellular localization *FEBS J* **274**, 4256-4270.
- [20] Wrigley, JD, Eckersley, K, Hardern, IM, Millard, L, Walters, M, Peters, SW, Mott, R, Nowak, T, Ward, RA, Simpson, PB & Hudson, K (2011) Enzymatic Characterisation of USP7 Deubiquitinating activity and Inhibition *Cell Biochem Biophys* **60**, 99-111.

- [21] Thalappilly, S, Feng, X, Pastyrjeva, S, Suzuki, K, Muruve, D, Larocque, D, Richard, S, Truss, M, von Deimling, A, Riabowol, K & Tallen, G (2011) The p53 Tumor Suppressor Is Stabilized by Inhibitor of Growth 1 (ING1) by Blocking Polyubiquitination *PLoS One* **6**, e21065.
- [22] van der Horst, A, de Vries-Smits, AM, Brenkman, AB, van Triest, MH, van den Broek, N, Colland, F, Maurice, MM & Burgering, BM (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP *Nat Cell Biol* **8**, 1064-1073.
- [23] Lindner, HA, Fotouhi-Ardakani, N, Lytvyn, V, Lachance, P, Sulea, T & Menard, R (2005) The papain-like protease from the severe acute respiratory syndrome coronavirus is a deubiquitinating enzyme *J Virol* **79**, 15199-15208.
- [24] Amerik, AY, Swaminathan, S, Krantz, BA, Wilkinson, KD & Hochstrasser, M (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome *EMBO J* **16**, 4826-4838.
- [25] Hanna, J, Hathaway, NA, Tone, Y, Crosas, B, Elsasser, S, Kirkpatrick, DS, Leggett, DS, Gygi, SP, King, RW & Finley, D (2006) Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation *Cell* **127**, 99-111.
- [26] Zhu, X, Menard, R & Sulea, T (2007) High incidence of ubiquitin-like domains in human ubiquitin-specific proteases *Proteins* **69**, 1-7.
- [27] Ramakrishna, S, Suresh, B & Baek, KH (2011) The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis *Cell Mol Life Sci* **68**, 15-26.
- [28] Hu, M, Li, P, Song, L, Jeffrey, PD, Chenova, TA, Wilkinson, KD, Cohen, RE & Shi, Y (2005) Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14 *EMBO J* **24**, 3747-3756.
- [29] Quesada, V, Diaz-Perales, A, Gutierrez-Fernandez, A, Garabaya, C, Cal, S & Lopez-Otin, C (2004) Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 54-62.
- [30] Avvakumov, GV, Walker, JR, Xue, S, Finerty, PJ, Jr, Mackenzie, F, Newman, EM

- & Dhe-Paganon, S (2006) Amino-terminal dimerization, NRDP1-rhodanese interaction, and inhibited catalytic domain conformation of the ubiquitin-specific protease 8 (USP8) *J Biol Chem* **281**, 38061-38070.
- [31] Misaghi, S, Galardy, PJ, Meester, WJ, Ovaa, H, Ploegh, HL & Gaudet, R (2005) Structure of the ubiquitin hydrolase UCH-L3 complexed with a suicide substrate *J Biol Chem* **280**, 1512-1520.
- [32] Dang, LC, Melandri, FD & Stein, RL (1998) Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis of ubiquitin C-terminal 7-amido-4-methylcoumarin by deubiquitinating enzymes *Biochemistry* **37**, 1868-1879.
- [33] Rousalova, I & Krepela, E (2010) Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review) *Int J Oncol* **37**, 1361-1378.
- [34] Khoronenkova, SV, Dianova, II, Parsons, JL & Dianov, GL (2011) USP7/HAUSP stimulates repair of oxidative DNA lesions *Nucleic Acids Res* **39**, 2604-2609.
- [35] Peschiaroli, A, Skaar, JR, Pagano, M & Melino, G (2010) The ubiquitin-specific protease USP47 is a novel beta-TRCP interactor regulating cell survival. *Oncogene* **29**, 1384-1393.
- [36] Parsons, JL, Dianova, II, Khoronenkova, SV, Edelmann, MJ, Kessler, BM & Dianov, GL (2011) USP47 is a deubiquitylating enzyme that regulates base excision repair by controlling steady-state levels of DNA polymerase beta. *Mol Cell* **41**, 609-615.
- [37] Hassink, GC, Zhao, B, Sompallae, R, Altun, M, Gastaldello, S, Zinin, NV, Masucci, MG & Lindsten, K (2009) The ER-resident ubiquitin-specific protease 19 participates in the UPR and rescues ERAD substrates. *EMBO Rep* **10**, 755-761.
- [38] Rubenstein, EM, Kreft, SG, Greenblatt, W, Swanson, R & Hochstrasser, M (2012) Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase *J Cell Biol* **197**, 761-773.
- [39] Mueller, DL (2004) E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors *Nat Immunol* **5**, 883-890.

- [40] Loch, CM, Cuccherini, CL, Leach, CA & Strickler, JE (2011) Deubiquitylase, deSUMOylase, and deISGylase activity microarrays for assay of substrate preference and functional modifiers *Mol Cell Proteomics* **10**, M110.002402.
- [41] Weinstock, J, Wu, J, Cao, P, Kingsbury, WD, McDermott, JL, Kodrasov, MP, McKelvey, DM, Suresh Kumar, KG, Goldenberg, SJ, Mattern, MR & Nicholson, B (2012) Selective Dual Inhibitors of the Cancer-Related Deubiquitylating Proteases USP7 and USP47 *ACS Medicinal Chemistry Letters* **3**, 789-792.
- [42] Fisher, RD, Wang, B, Alam, SL, Higginson, DS, Robinson, H, Sundquist, WI & Hill, CP (2003) Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif *J Biol Chem* **278**, 28976-28984.
- [43] Elliott, PR, Liu, H, Pastok, MW, Grossmann, GJ, Rigden, DJ, Clague, MJ, Urbe, S & Barsukov, IL (2011) Structural variability of the ubiquitin specific protease DUSP-UBL double domains *FEBS Lett* **585**, 3385-3390.
- [44] Bonnet, J, Romier, C, Tora, L & Devys, D (2008) Zinc-finger UBPs: regulators of deubiquitylation *Trends Biochem Sci* **33**, 369-375.
- [45] Samara, NL, Datta, AB, Berndsen, CE, Zhang, X, Yao, T, Cohen, RE & Wolberger, C (2010) Structural Insights into the Assembly and Function of the SAGA Deubiquitinating Module *Science* **328**, 1025-1029.
- [46] Elsasser, S, Gali, RR, Schwickart, M, Larsen, CN, Leggett, DS, Muller, B, Feng, MT, Tubing, F, Dittmar, GA & Finley, D (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains *Nat Cell Biol* **4**, 725-730.
- [47] Song, AX, Zhou, CJ, Peng, Y, Gao, XC, Zhou, ZR, Fu, QS, Hong, J, Lin, DH & Hu, HY (2010) Structural transformation of the tandem ubiquitin-interacting motifs in ataxin-3 and their cooperative interactions with ubiquitin chains *PLoS One* **5**, e13202.
- [48] Faesen, AC, Dirac, AM, Shanmugham, A, Ovaas, H, Perrakis, A & Sixma, TK (2011) Mechanism of USP7/HAUSP Activation by Its C-Terminal Ubiquitin-like Domain and Allosteric Regulation by GMP-Synthetase *Mol Cell* **44**, 147-159.
- [49] Luna-Vargas, MP, Faesen, AC, van Dijk, WJ, Rape, M, Fish, A & Sixma, TK

- (2011) Ubiquitin-specific protease 4 is inhibited by its ubiquitin-like domain *EMBO Rep* **12**, 365-372.
- [50] Peth, A, Besche, HC & Goldberg, AL (2009) Ubiquitinated Proteins Activate the Proteasome by Binding to Usp14/Ubp6, which Causes 20S Gate Opening *Mol Cell* **36**, 794-804.
- [51] Kohler, A, Zimmerman, E, Schneider, M, Hurt, E & Zheng, N (2010) Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module *Cell* **141**, 606-617.
- [52] Saridakis, V, Sheng, Y, Sarkari, F, Holowaty, MN, Shire, K, Nguyen, T, Zhang, RG, Liao, J, Lee, W, Edwards, AM, Arrowsmith, CH & Frappier, L (2005) Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization *Mol Cell* **18**, 25-36.
- [53] Sheng, Y, Saridakis, V, Sarkari, F, Duan, S, Wu, T, Arrowsmith, CH & Frappier, L (2006) Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP *Nat Struct Mol Biol* **13**, 285-291.
- [54] Hu, M, Gu, L, Li, M, Jeffrey, PD, Gu, W & Shi, Y (2006) Structural basis of competitive recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: implications for the regulation of the p53-MDM2 pathway *PLoS Biol* **4**, e27.
- [55] Uchiki, T, Kim, HT, Zhai, B, Gygi, SP, Johnston, JA, O'Bryan, JP & Goldberg, AL (2009) The ubiquitin-interacting motif protein, S5a, is ubiquitinated by all types of ubiquitin ligases by a mechanism different from typical substrate recognition *J Biol Chem* **284**, 12622-12632.
- [56] Yan, J & Jetten, AM (2008) RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites *Cancer Lett* **271**, 179-190.
- [57] Itoh, K, Tong, KI & Yamamoto, M (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles *Free Radic Biol Med* **36**, 1208-1213.
- [58] Taguchi, K, Motohashi, H & Yamamoto, M (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **16**, 123-140.

- [59] Wang, XJ, Hayes, JD, Higgins, LG, Wolf, CR & Dinkova-Kostova, AT (2010) Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chem Biol* **17**, 75-85.
- [60] Min, JH, Yang, H, Ivan, M, Gertler, F, Kaelin, WG, Jr & Pavletich, NP (2002) Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling *Science* **296**, 1886-1889.
- [61] Miyoshi, Y, Nakayama, S, Torikoshi, Y, Tanaka, S, Ishihara, H, Taguchi, T, Tamaki, Y & Noguchi, S (2006) High expression of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 and -L3 mRNA predicts early recurrence in patients with invasive breast cancer *Cancer Sci* **97**, 523-529.
- [62] Ueda, S, Nakamura, H, Masutani, H, Sasada, T, Yonehara, S, Takabayashi, A, Yamaoka, Y & Yodoi, J (1998) Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c *J Immunol* **161**, 6689-6695.
- [63] Brennan, LA & Kantorow, M (2009) Mitochondrial function and redox control in the aging eye: role of MsrA and other repair systems in cataract and macular degenerations *Exp Eye Res* **88**, 195-203.
- [64] Acharya, A, Das, I, Chandhok, D & Saha, T (2010) Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential *Oxid Med Cell Longev* **3**, 23-34.
- [65] Aon, MA, Cortassa, S & O'Rourke, B (2010) Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis *Biochim Biophys Acta* **1797**, 865-877.
- [66] Giles, GI (2006) The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer *Curr Pharm Des* **12**, 4427-4443.
- [67] Garcia-Ruiz, C & Fernandez-Checa, JC (2006) Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch *J Gastroenterol Hepatol* **21 Suppl 3**, S3-6.
- [68] Anastasiou, D, Pouligiannis, G, Asara, JM, Boxer, MB, Jiang, JK, Shen, M, Bellinger, G, Sasaki, AT, Locasale, JW, Auld, DS, Thomas, CJ, Vander Heiden, MG & Cantley, LC (2011) Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen

species contributes to cellular antioxidant responses *Science* **334**, 1278-1283.

- [69] Carmody, RJ & Cotter, TG (2000) Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro *Cell Death Differ* **7**, 282-291.
- [70] Duda, DM, Borg, LA, Scott, DC, Hunt, HW, Hammel, M & Schulman, BA (2008) Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation *Cell* **134**, 995-1006.
- [71] Tsuchiya, Y, Asano, T, Nakayama, K, Kato, T, Jr, Karin, M & Kamata, H (2010) Nuclear IKKbeta is an adaptor protein for Ikapalpha ubiquitination and degradation in UV-induced NF-kappaB activation *Mol Cell* **39**, 570-582.
- [72] Erickson, JR, Joiner, ML, Guan, X, Kutschke, W, Yang, J, Oddis, CV, Bartlett, RK, Lowe, JS, O'Donnell, SE, Aykin-Burns, N, Zimmerman, MC, Zimmerman, K, Ham, AJ, Weiss, RM, Spitz, DR, Shea, MA, Colbran, RJ, Mohler, PJ & Anderson, ME (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation *Cell* **133**, 462-474.
- [73] Jahngen-Hodge, J, Obin, MS, Gong, X, Shang, F, Nowell, TR, Jr, Gong, J, Abasi, H, Blumberg, J & Taylor, A (1997) Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress *J Biol Chem* **272**, 28218-28226.
- [74] Johnston, SC, Larsen, CN, Cook, WJ, Wilkinson, KD & Hill, CP (1997) Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 A resolution *EMBO J* **16**, 3787-3796.
- [75] Johnston, SC, Riddle, SM, Cohen, RE & Hill, CP (1999) Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases *EMBO J* **18**, 3877-3887.
- [76] Larsen, CN, Krantz, BA & Wilkinson, KD (1998) Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases *Biochemistry* **37**, 3358-3368.
- [77] Setsuie, R, Suzuki, M, Kabuta, T, Fujita, H, Miura, S, Ichihara, N, Yamada, D, Wang, YL, Ezaki, O, Suzuki, Y & Wada, K (2009) Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3-knockout mice are resistant to diet-induced obesity and show increased activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle *FASEB J*

23, 4148-4157.

- [78] Sano, Y, Furuta, A, Setsuie, R, Kikuchi, H, Wang, YL, Sakurai, M, Kwon, J, Noda, M & Wada, K (2006) Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3-deficient mice *Am J Pathol* **169**, 132-141.
- [79] Choi, J, Levey, AI, Weintraub, ST, Rees, HD, Gearing, M, Chin, LS & Li, L (2004) Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases *J Biol Chem* **279**, 13256-13264.
- [80] Das, C, Hoang, QQ, Kreinbring, CA, Luchansky, SJ, Meray, RK, Ray, SS, Lansbury, PT, Ringe, D & Petsko, GA (2006) Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1 *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4675-4680.
- [81] Suzuki, M, Setsuie, R & Wada, K (2009) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L3 promotes insulin signaling and adipogenesis *Endocrinology* **150**, 5230-5239.
- [82] Mtango, NR, Sutovsky, M, Susor, A, Zhong, Z, Latham, KE & Sutovsky, P (2011) Essential role of maternal UCHL1 and UCHL3 in fertilization and preimplantation embryo development *Journal of Cellular Physiology* **226**, 1592-1603.
- [83] Wood, MA, Kaplan, MP, Brensinger, CM, Guo, W & Abel, T (2005; 2005) Ubiquitin C-terminal hydrolase L3 (Uchl3) is involved in working memory *Hippocampus* **15**, 610-621.
- [84] Kwon, J, Wang, YL, Setsuie, R, Sekiguchi, S, Sato, Y, Sakurai, M, Noda, M, Aoki, S, Yoshikawa, Y & Wada, K (2004) Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis *Am J Pathol* **165**, 1367-1374.
- [85] Fang, Y, Fu, D & Shen, XZ (2010) The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis *Biochim Biophys Acta* **1806**, 1-6.

略語表

AMC	:	7-amino-4-methylcoumarin
DUSP	:	domain present in ubiquitin-specific proteases
DTT	:	dithiothreitol
DUB	:	deubiquitinating enzyme
EDTA	:	ethylenedinitrilo-tetraacetic acid
E64	:	(L-3-trans-carboxyirane-2-carbonyl)-L-leucyl-agmatine
GST	:	glutathione S-transferase
GrB	:	granzyme B
HPLC	:	high performance liquid chromatography
IPTG	:	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	:	phosphate buffered saline
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
Tris	:	tris (hydroxymethyl) aminomethane
X-Gal	:	5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside
ZIN-UBP	:	zinc finger ubiquitin-specific protease domain
Ub	:	ubiquitin
Ubl	:	ubiquitin like
UIM	:	ubiquitin-interacting motif
UBA	:	ubiquitin associated domain
UBD	:	ubiquitin binding domain
UCH-L3	:	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L3
USP	:	ubiquitin-specific protease

謝辞

本研究の遂行に際し、長年の御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授掛谷秀昭先生に厚く御礼申し上げます。

論文を査読して頂き多くの御教示を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授竹島浩先生ならびに中山和久先生に深甚なる感謝の意を表します。

研究全般に関して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科准教授 服部明先生に心より御礼申し上げます。

また、本研究に多大なる御助言、御指導を頂いた京都大学大学院薬学研究科助教 西村慎一先生、特定助教 石川文洋先生に深く感謝致します。さらに、実験系の構築や試薬の調製など常日頃から研究を支えて頂いた森吉英子氏、嶋田清香氏に心より感謝します。

4年間在籍した京都大学大学院薬学研究科システムケモセラピー（制御分子学）分野の先輩、後輩には楽しく有意義な研究室生活を支えて頂きました。深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、多方面に渡りご援助頂きました文部科学省に感謝致します。

最後に、長年に渡りあらゆる面で支えて下さった家族や親族、友人に深く感謝致します。

4年という短い研究期間でしたが、様々なご指導とご協力、応援して下さいました全ての方々に支えられて博士論文の完成に至りました。本当に有り難うございました。

2013年8月

朴 錦花