

脱ユビキチン化酵素群の細胞機能

駒田 雅之, 遠藤 彬 則

ユビキチン化は、プロテアソームでの分解をはじめとして、タンパク質の運命や機能を様々に調節する翻訳後修飾である。しかしそれは不可逆的なものではなく、拮抗する脱ユビキチン化反応が存在する。ヒトゲノムには約90種類もの脱ユビキチン化酵素がコードされており、それぞれが様々な細胞内部位で固有の基質タンパク質を脱ユビキチン化することにより、ユビキチン化によるタンパク質の機能調節を負に制御していることが解明されてきている。本総説では、まず多様な脱ユビキチン化酵素群の構造と機能について概説し、その後、筆者らが解析を行ってきた脱ユビキチン化酵素を取り上げ、脱ユビキチン化による細胞機能の調節機構の例を紹介する。

1. はじめに

ユビキチン (Ub) は、酵母からヒトまで高度に保存された76アミノ酸からなるタンパク質であり、そのC末端カルボキシル基を介して細胞内タンパク質のLys残基にイソペプチド結合により付加される (モノUb化)。Ubには7個のLys残基 (Lys6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) が存在し、これらのLysにさらにUbが付加されることにより、標的タンパク質上でUb鎖が伸長する (ポリUb化)。細胞内にはUbのどのLysを介して形成したポリUb化も存在し、各々が異なる機能を担うと考えられている¹⁾。プロテアソームでのタンパク質分解シグナルとして働くのは、Ubの48番目のLys (Lys48) を介して連結したポリUb化である²⁾。Lys63を介したポリUb化は、NF- κ BシグナリングやDNA修復などのプロセスに参与する他³⁾、リソソーム (酵母の場合は液胞) への膜タンパク質の選別輸送シグナルとしても働く^{4,5)}。モノUb化もまた、リソソーム/液胞への選別輸送シグナルとして働いている⁶⁾。また最近、Lys11連結型Ub化もプロテアソームでの分解に重要であること⁷⁾、N末端の遊離のアミノ基を介してペプチド結合

(イソペプチド結合ではない) でつながった直鎖型ポリUb化がNF- κ Bのシグナル伝達経路で働いていることも報告され^{8,9)}、多様なタイプのUb化が実に様々な細胞機能を担っていることが解明されてきている。

脱Ub化酵素はプロテアーゼファミリーに属し、Ubとその標的タンパク質間、あるいはUb鎖中のUb間のイソペプチド結合を切断する加水分解酵素である。そして近年、Ub化による細胞機能制御における脱Ub化酵素の重要性が次々と解明され、脚光を浴びている。

2. 脱Ub化酵素の構造

これまでに見つかっている脱Ub化酵素のアミノ酸配列から、脱Ub化酵素は構造的にUb C-terminal hydrolase (UCH)ファミリー、Ub-specific protease (USP)ファミリー、ovarian tumor protease (OTU)ファミリー、Josephinファミリー、そしてJAMMファミリーの五つのサブファミリーに分類される^{10,11)} (図1A)。これらのうち、JAMMファミリー以外はすべてCysプロテアーゼであり、それらの活性中心は、イソペプチド結合のカルボニル炭素を求核攻撃するCysとそれに先立ってそのCysを脱プロトン化するHis、さらに多くの場合、そのHisを極性化するAsp/Asnが触媒triadを形成している。これらのCys、His残基周辺のアミノ酸配列は各サブファミリーごとに保存されており、USPファミリーの場合は特にCysボックス、Hisボックスと呼ばれている¹⁰⁾。一方、JAMMファミリーはZn²⁺依存性のメタロプロテアーゼであり、活性中心の

東京工業大学大学院生命理工学研究科生体システム専攻
(〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259-B16)

Cellular functions of the deubiquitylating enzyme family
Masayuki Komada and Akinori Endo (Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology, 4259-B16 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan)

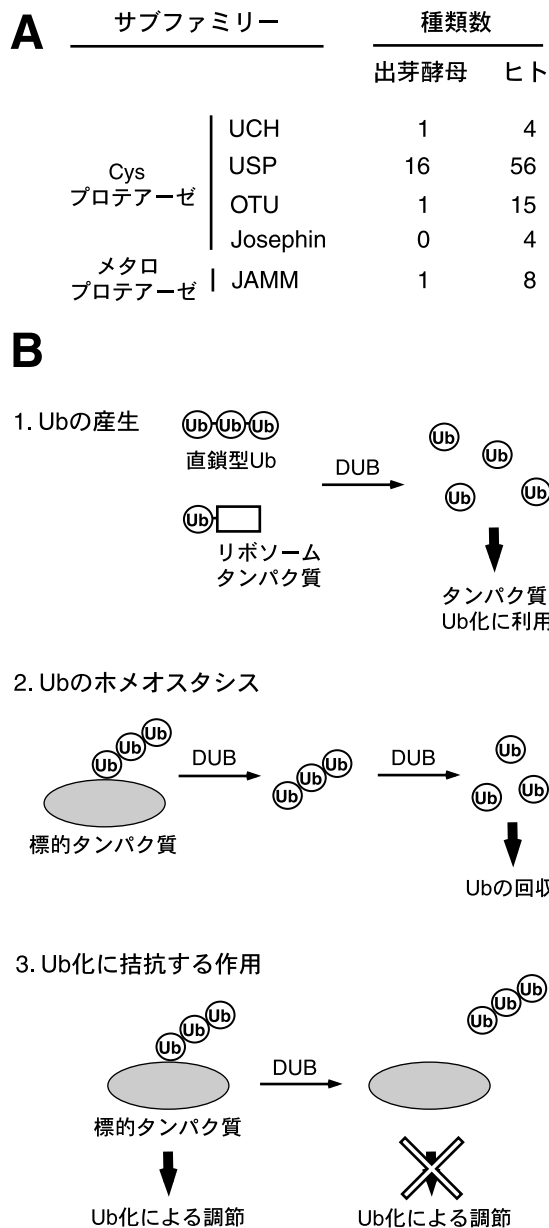


図1 脱Ub化酵素の分類と機能

(A)出芽酵母とヒトにおける脱Ub化酵素の種類数。(B)脱Ub化酵素(DUB)の主要な三つの機能。1. 翻訳されたUb融合タンパク質を限定分解し、遊離のUbを産生する。2. Ub化され分解される標的タンパク質から、Ubを切り出して回収する。3. 標的タンパク質からUbを外し、Ub化によるタンパク質の分解や機能制御を負に調節する。

近傍に配位した Zn^{2+} が、イソペプチド結合のカルボニル炭素を求核攻撃する水分子を極性化する¹⁰⁾。そして触媒ドメインのアミノ酸配列の相同性から、出芽酵母ゲノムには19種類、ヒトゲノムには90種類程度の脱Ub化酵素がコードされていると推定されている(図1A)。

3. 脱Ub化酵素の細胞機能

脱Ub化酵素には、これまでに三つの主要な働きが知ら

れている(図1B)。一つめは、Ubの生合成に関わる機能である。Ubは前駆体(複数のUbがタンデムにつながった直鎖型ポリUb鎖、あるいはリボソームタンパク質との融合タンパク質)として翻訳される¹⁰⁾。そして、Ub間やリボソームタンパク質との間のペプチド結合が脱Ub化酵素によって切断され、遊離のUbが生成される。多くの脱Ub化酵素がこの切断活性を有しており、Ub前駆体のプロセシングだけを専門に行う脱Ub化酵素はないと考えられている¹⁰⁾。

二つめは、細胞内の遊離のUb量のホメオスタシスに関する機能である。脱Ub化酵素には、Ub化タンパク質がプロテアソームやリソソームに送り込まれる前にUbをタンパク質から外して回収するという、Ubのリサイクル機能をもつものが存在する。プロテアソームの19S調節サブユニットのlid(蓋部)にはJAMMファミリーの脱Ub化酵素Rpn11/POH1が、base(基部)にはUSPファミリーに属するUbp6/USP14が含まれ、いずれも分解されるタンパク質からUbを切り離す¹²⁻¹⁴⁾。また、酵母のUSPファミリー酵素Doa4は、Ub化されて液胞に選別輸送されるタンパク質をエンドソームで脱Ub化して、Ubを回収する¹⁵⁾。最近、細胞内に存在する遊離のポリUb鎖が遊離Ubのリザーバーとなっており、Doa4は大量のUbが必要となるストレス応答時にこのUb鎖を切断することにより、遊離Ub量の維持に働いていることも明らかにされている¹⁶⁾。さらにUbp14/USP5(イソペプチダーゼT)にも、ポリUb鎖を切断して遊離Ubを供給する役割が報告されている¹⁷⁾。

そして三つめの機能が本稿のテーマ、すなわちUb化によるタンパク質の調節に拮抗する働きである。脱Ub化酵素の数の多さから、その大部分は様々な細胞内部位でそれぞれに固有のタンパク質を脱Ub化することにより、この機能を担っていると予想されてきた。そして最近、次々とそれらの基質タンパク質が同定され、脱Ub化酵素の具体的な役割が明らかになってきている。その詳細については最近の総説¹⁸⁾を参照していただき、以下では筆者らの解析を例として取り上げ、脱Ub化酵素のいくつかの細胞機能を解説する。

4. 細胞膜タンパク質のリソソームへの輸送制御

この章では、脱Ub化酵素による細胞膜タンパク質のUb化依存的なリソソームへの選別輸送の調節について述べる。

4-1 増殖因子受容体のダウンレギュレーション

増殖因子の結合により活性化されたチロシンキナーゼ型受容体は、すみやかにリソソームに運ばれて分解される(図2A)。これは受容体ダウンレギュレーションと呼ばれ、

活性化受容体からの過度の細胞増殖シグナルにより細胞の過増殖（がん化）が引き起こされることを防ぐための調節機構である。

活性化された受容体はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、初期エンドソームに輸送される。その後、エンドソーム膜が内腔に向けて陥入しくびり切られて生じるエンドソームの内部小胞に取り込まれる。このような後期エンドソームは多胞体エンドソーム (multivesicular body, MVB) とも呼ばれ、後期エンドソームがリソソームと融合することにより、増殖因子受容体はリソソーム内の加水分解酵素によって分解される¹⁹⁾。活性化された増殖因子受容体は、Ub リガーゼ c-Cbl によって Ub 化される²⁰⁾。そして、この Ub 化が活性化受容体を選択的にエンドソームからリソソームに輸送するための選別シグナルとして働いている (図 2A)。マウスのある種の発がんウイルスはそのゲノムに v-Cbl タンパク質 (c-Cbl のドミナントネガティブ変異体) をコードしており、v-Cbl を発現した細胞では活性化受容体の Ub 化が阻害されてその分解が抑制される結果、細胞の持続的増殖、がん化を引き起こす²¹⁾。このことは、増殖因子受容体の Ub 化依存的な分解が、細胞増殖の負の調節機構として非常に重要であることを示している。

それでは、エンドソームではいかにして Ub 化されたタンパク質とされていないタンパク質が仕分けされているのだろうか。この選別は、クラス E Vps (vacuolar protein sorting) タンパク質群により遂行される^{22,23)}。この一群のタンパク質は、生合成された液胞タンパク質の液胞への輸送に異常をきたす出芽酵母の vps 変異株の解析により同定された。これまでに見つかっている 19 種類のクラス E Vps タンパク質のほとんどすべてに哺乳類オルソログが存在し、Ub 化タンパク質のリソソーム/液胞への選別輸送機構は真核細胞において広く保存されていることがわかっている。そして、その中の 13 種類のタンパク質がエンドソーム膜上で 4 種類の複合体を形成し、タンパク質輸送経路の選別に中心的役割を担っている (図 2B)。Hrs と STAM はともに Ub 結合性のクラス E Vps タンパク質であり、エンドソーム上で複合体を形成する。Ub 化された細胞膜タンパク質は、エンドソーム上でまず Hrs-STAM 複合体に認識され、トラップされる。その後、さらに 2 種類の Ub 結合性クラス E Vps タンパク質複合体 (ESCRT-I および ESCRT-II) に順々に引き渡され、最後にエンドソームの内部小胞の形成を導く ESCRT-III の働きにより、エンドソーム内腔に取り込まれると考えられている。

4-2 脱 Ub 化酵素 UBPY と AMSH の構造

前章で紹介したエンドソーム上の Ub 化タンパク質選別因子 STAM^{24,25)} は、Src homology 3 (SH3) ドメインをもつ。この領域には、2 種類の脱 Ub 化酵素 UBPY/USP8²⁶⁾ と

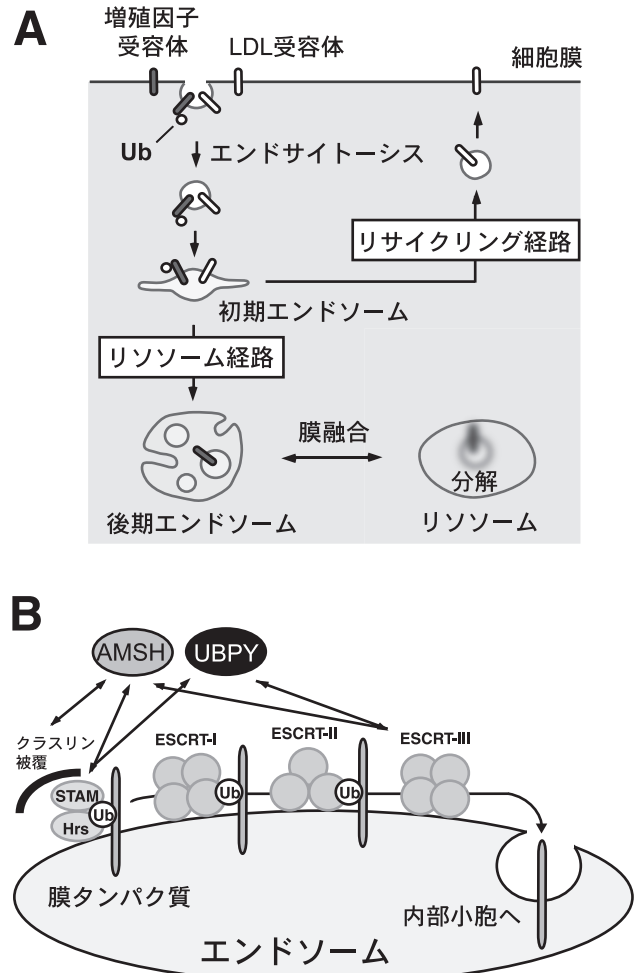


図 2 エンドサイトーシスされた細胞膜タンパク質の輸送経路の選別

(A) 細胞表面からエンドサイトーシスされた膜タンパク質のうち、活性化された増殖因子受容体などは初期エンドソームからリソソームに運ばれて分解される。一方、低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体などは細胞膜にリサイクルされる。この時、Ub 化が膜タンパク質をリソソームに輸送するための選別シグナルとして働く。(B) Ub 化された細胞膜タンパク質は、エンドソーム膜上で 4 種類のクラス E Vps タンパク質複合体 (Hrs-STAM および ESCRT-I, II, III) によってリソソーム経路に選別される。脱 Ub 化酵素 UBPY と AMSH は、この選別マシナリーと相互作用する。

AMSH²⁷⁾ が、SH3-binding motif (SBM) と呼ばれる 9 アミノ酸配列 PX (V/I) (D/N) RXXKP を介して結合する (図 2B, 図 3)。さらに、UBPY と AMSH の N 末端領域には MIT ドメインと呼ばれる共通の領域が存在し、これらのドメインは複数の ESCRT-III 構成タンパク質 (CHMP タンパク質群) と結合する^{28,29)} (図 2B, 図 3)。しかし、SBM と MIT ドメインを除くと二つの脱 Ub 化酵素の構造は全く異なっており、UBPY は USP ファミリーの Cys プロテアーゼ、AMSH は JAMM ファミリーのメタロプロテアーゼである。AMSH にはアミノ酸レベルで 55% の相同性をもつ類似の

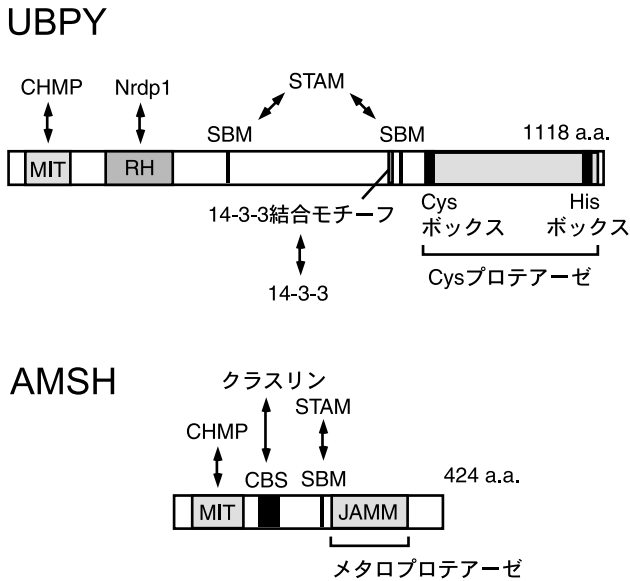


図3 脱Ub化酵素UBPYとAMSHの構造
ヒトUBPY, AMSHのドメイン/モチーフ, およびそれらと結合するタンパク質を示す。CBS: clathrin-binding site, RH: rhodanese homology domain.

脱Ub化酵素AMSH-like protein (AMSH-LP)が存在し、AMSHと同様の働きをしていると考えられている³⁰⁾。

UBPYとAMSHは初期エンドソーム上の同じタンパク質(STAM, ESCRT-III)と相互作用するが、そのエンドソーム局在化機構は異なっているようである。UBPYのエンドソーム局在にはHrs-STAM複合体との相互作用は必要でなく³¹⁾、ESCRT-IIIが必要であることが示されている²⁹⁾。一方、AMSHはクラスリン重鎖タンパク質と結合し^{28,30)}(図2B, 図3)、この相互作用によりエンドソーム膜上のクラスリン被覆ドメインに局在する³⁰⁾。

UBPYとAMSHのもう一つの違いとして、ポリUb鎖に対する基質特異性が挙げられる。UBPYはLys48連結型Ub鎖とLys63連結型Ub鎖を区別なく切断する³²⁾。これに対し、AMSHおよびAMSH-LPはLys63連結型Ub鎖を選択的に切断する^{30,32)}。筆者らは東京大学・放射光連携研究機構の深井周也准教授との共同研究により、Lys63連結型Ub鎖に対するAMSHファミリーの基質特異性発現のメカニズムをX線結晶構造解析レベルで解明しているが、その詳細は原著³³⁾に譲り、ここではこれら脱Ub化酵素の細胞機能について解説する。

4-3 UBPYとAMSHの機能

Hrs-STAM複合体は、Ub化された細胞膜タンパク質をエンドソーム上で認識、選別する。UBPY, AMSHがこの複合体と相互作用することは、これらの脱Ub化酵素が選別された膜タンパク質を脱Ub化している可能性を示唆する。そこで筆者らは、その可能性を検討した。Ub化され

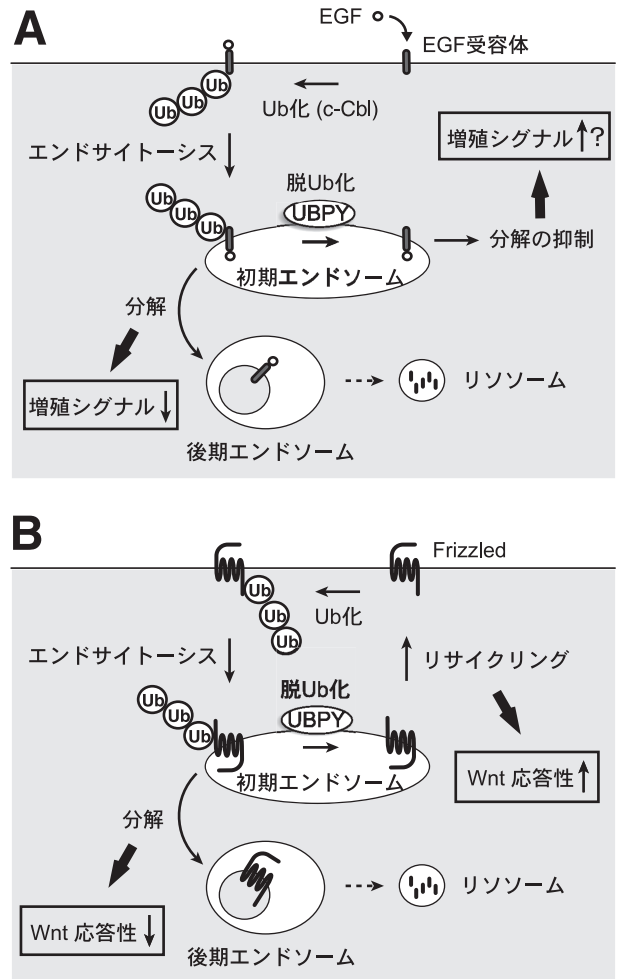


図4 UBPYによる細胞膜タンパク質の分解の負の調節
(A)EGFにより活性化されたEGF受容体のダウンレギュレーションのUBPYによる抑制。(B)UBPYによるWnt受容体Frizzledの恒常的な分解抑制を介した細胞のWnt応答性の増強。

た上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor, EGF)受容体を免疫沈降し、精製したUBPY, AMSHと試験管内で反応させたところ、UBPYだけがEGF受容体を脱Ub化した³¹⁾。またUBPYをヒト培養細胞に過剰発現させると、EGF刺激依存性のEGF受容体Ub化のレベルが大きく低下し、それに伴ってEGF依存性のEGF受容体の分解が遅延した³¹⁾。AMSHには、このような効果は見られなかった³¹⁾。逆にRNA干渉によりUBPYの発現をノックダウンすると、EGF刺激時のEGF受容体のUb化レベルの上昇とEGF受容体の分解亢進がおきる³¹⁾。これらの結果は、UBPYがEGF受容体を脱Ub化し、リソソームへの選別輸送シグナルを外すことにより、EGF受容体のダウンレギュレーションを負に調節していることを示唆している(図4A)。この調節の意義は不明であるが、活性化された増殖因子受容体の分解速度を調節することにより、細胞内に発生する細胞増殖シグナルの量を適度に調節する仕組み

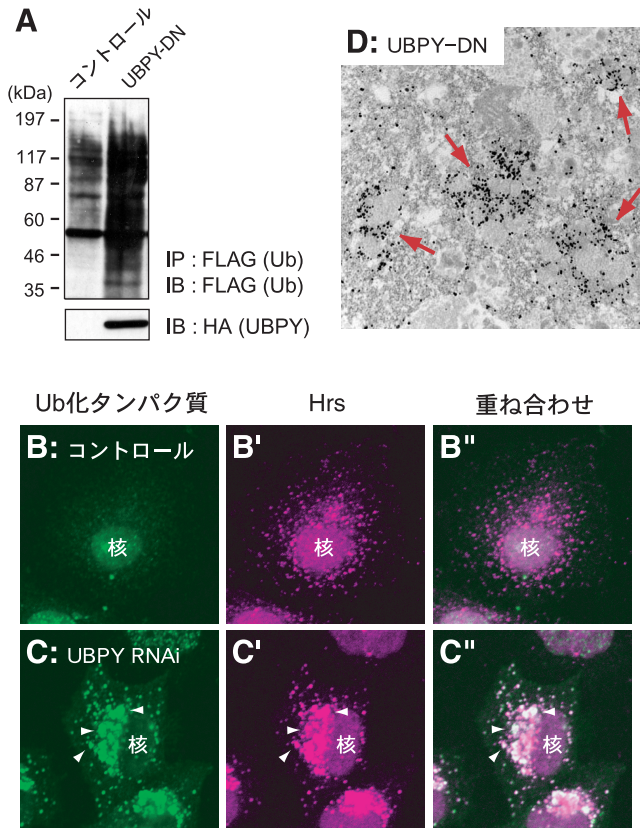


図5 UBPYによるエンドソーム膜上でのタンパク質の脱Ub化 (A)コントロールとUBPYのドミナントネガティブ変異体UBPY-DN (HA タグ) を過剰発現させたヒト細胞にUb (FLAG タグ) を共発現させ、抗FLAG抗体で細胞内のUb化タンパク質を検出した。(B-C'')コントロール(B-B'')とRNA干渉でUBPYをノックダウンした(C-C'')ヒト細胞の、抗Ub抗体(B, C)と抗Hrs抗体(B', C')による二重染色。矢じりはHrs陽性の初期エンドソームへのUb化タンパク質の蓄積を示す。(D)UBPYのドミナントネガティブ変異体UBPY-DNを過剰発現させたヒト細胞にUb (FLAG タグ) を共発現させ、抗FLAG抗体による免疫電子顕微鏡観察を行った。矢印は、凝集したエンドソームの膜上へのUb化タンパク質(金粒子として検出)の蓄積を示す。

かもしれない。Ub化に拮抗して増殖因子受容体の分解を抑制するUBPYの働きは、そのノックアウトマウスにおいても観察される。UBPYノックアウトは胎性致死となるが、そのコンディショナルノックアウトの肝臓ではEGF受容体や肝細胞増殖因子(HGF)受容体の量が著しく低下することが示されている³⁴⁾。

さらに筆者らは最近、UBPYによる細胞膜タンパク質の分解調節の*in vivo*における意義を解明するため、UBPYのオルソログCG5798 (dUBPY) の発現をRNA干渉を用いてノックダウンしたショウジョウバエの解析を行った(三菱化学・生命科学研究所の後藤聡博士との共同研究)。その結果、翅でdUBPYをノックダウンすると、翅の辺縁部において外からの刺激を感知する感覚毛の形成が阻害された³⁵⁾。感覚毛の前駆細胞は、幼虫期の翅成虫原基におい

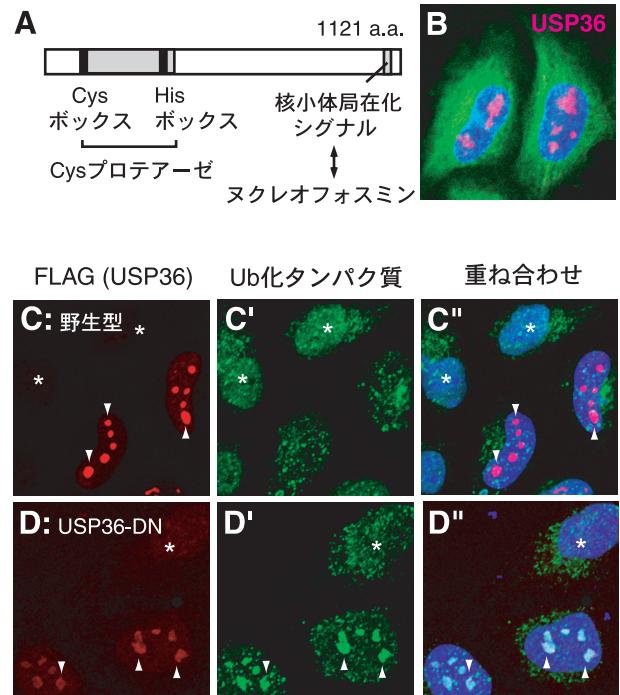


図7 核小体で働く脱Ub化酵素 USP36

(A)ヒトUSP36のドメイン構造。(B)抗USP36抗体によるヒト細胞の免疫蛍光染色(赤)。DNA(青)、微小管(緑)と共染色した。(C-D'')FLAGタグをつけた野生型USP36(C-C'')とそのドミナントネガティブ変異体USP36-DN(D-D'')発現細胞の、抗FLAG抗体(C, D)と抗Ub抗体(C', D')による二重染色。DNA(青)と共染色した(C', D')。矢じりは核小体、*はFLAG-USP36非発現細胞を示す。

てWingless/Wntによって誘導される。Wnt受容体Frizzledについてのヒト培養細胞およびショウジョウバエ個体レベルでの解析により、Frizzledの恒常的な(Wnt非依存的な)リソソームへの輸送/分解がそのUb化とUBPYによる脱Ub化のバランスによって調節されており、UBPYはFrizzledのリソソームでの分解を抑制してその細胞膜レベルを上昇させることにより、細胞のWnt応答性を高めていることが明らかとなった³⁶⁾(図4B)。

しかし一方で、ヒト培養細胞においてUBPYの機能を阻害するとEGF受容体の分解が抑制されるとの報告もあり、UBPYによる細胞膜タンパク質の脱Ub化がその分解を抑制するのか促進するのかについては、必ずしもコンセンサスが得られていない(詳細については筆者による総説³⁶⁾を参照されたい)。AMSHについても、EGF受容体の脱Ub化と分解に及ぼす影響に関して相反する結果が報告されており、まだ統一した結論は出ていないといえる³⁶⁾。ちなみに、AMSHのノックアウトマウスは発育や脳形成の不全を呈して生後3週間程で死亡するが、その理由は不明である³⁷⁾。

ドミナントネガティブ変異体やRNA干渉を用いてUBPYの機能をヒト培養細胞で阻害すると、初期エンド

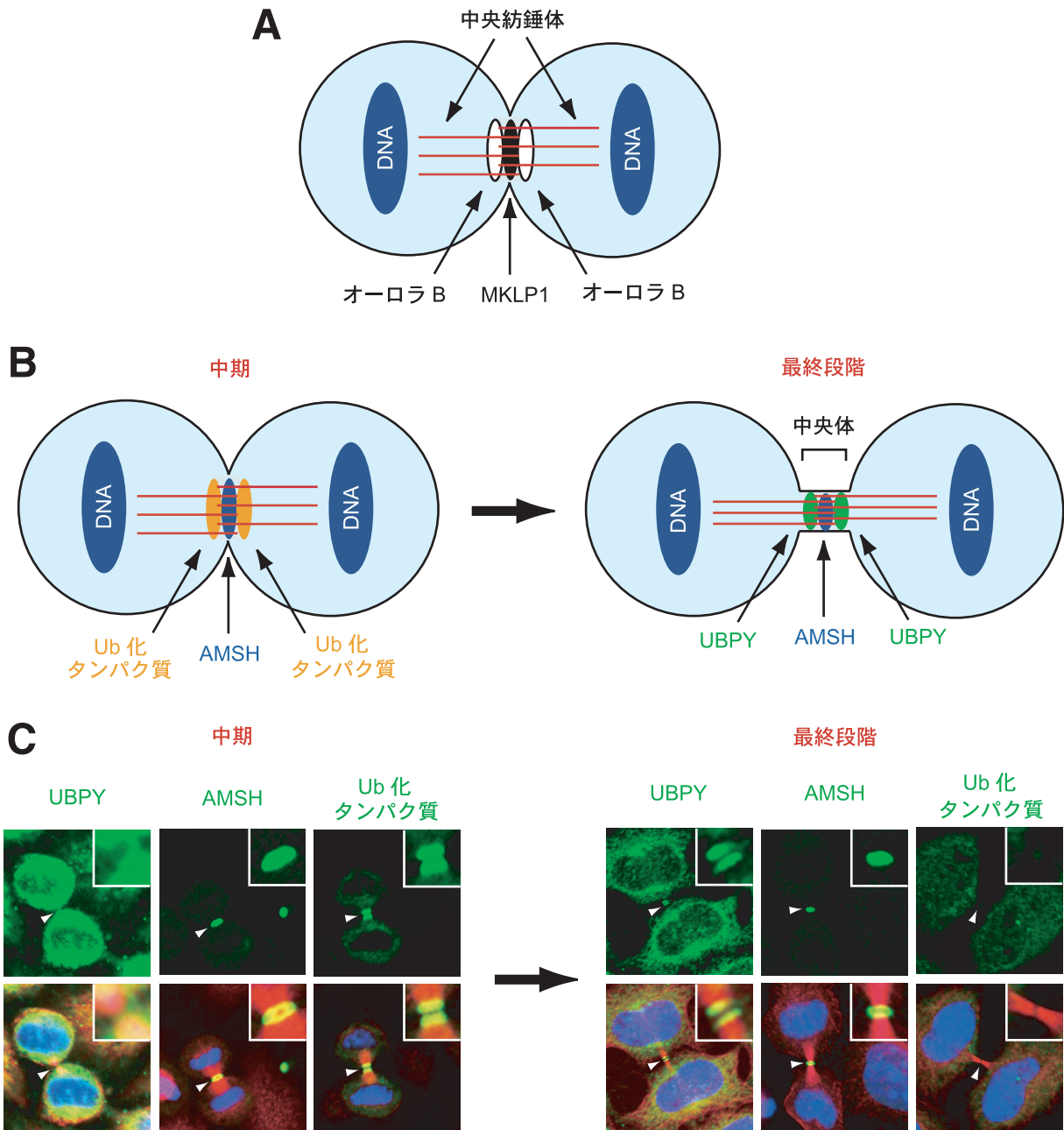


図6 細胞質分裂におけるタンパク質のUb化と脱Ub化
 (A) 動物細胞の細胞質分裂における中央紡錘体の形成と、中央紡錘体へのMKLP1とオーロラ B キナーゼの局在化。(B) 細胞質分裂の進行と、それに伴うUBPY, AMSH, およびUb化タンパク質の局在パターンの変動を模式的に示した。(C) 上段: 細胞質分裂期のヒト細胞におけるUBPY, AMSH, およびUb化タンパク質の免疫蛍光染色(緑)。下段: DNA(青), 微小管(赤)との共染色。矢じりは分裂溝の位置を示す。

ソームにUb化タンパク質が蓄積する³⁸⁾(図5A-C)。電子顕微鏡観察の結果, Ub化タンパク質はエンドソームの細胞質側表面に蓄積し, そのようなエンドソームどうしが凝集していることがわかった³⁸⁾(図5D)。UBPYノックアウトマウス由来の細胞においても, 形態変化した初期エンドソームへのUb化タンパク質の蓄積が観察されている³⁴⁾。UBPYの機能を阻害した時に細胞内に蓄積するUb化タンパク質は, 本来UBPYによって脱Ub化される基質タンパ

ク質がUb化されたまま細胞内に蓄積したものと予想された。したがって, これらのUb化タンパク質を網羅的に同定することにより, UBPYの基質タンパク質を明らかにすることができると考えられた。そこで, UBPYのドミナントネガティブ変異体(酵素活性欠失体)を過剰発現させたヒト細胞に蓄積したUb化タンパク質を抗Ub抗体を用いて精製し, 質量分析(液体クロマトグラフィー/タンデムマスペクトロメトリー)により, その網羅的な同定を

行った(九州大学・生体防御医学研究所の中山敬一教授、松本雅記准教授との共同研究、一部を発表³⁹⁾). その結果、増殖因子受容体の他にも様々な細胞膜タンパク質がUBPYの基質候補として同定された。それらが本当にUBPYの基質であるかどうかについては個別の検証を待たねばならないが、この結果は細胞膜上の多様なタンパク質の分解、すなわち発現量がUb化と脱Ub化のバランスによって制御されていることを示唆しているのではないかと考えている。

5. 細胞質分裂の制御

この章では、エンドソームで働くことが明らかになってきた脱Ub化酵素UBPY、AMSHと細胞質分裂の意外な関連について紹介する。

UBPYと共免疫沈降してくる結合タンパク質を質量分析で同定したところ、14-3-3タンパク質のアイソフォーム ϵ 、 γ 、 ξ が同定された⁴⁰⁾。解析の結果、14-3-3タンパク質はUBPYに存在する14-3-3結合コンセンサス配列RSYS⁶⁸⁰SP(図3)にSer680のリン酸化依存的に結合すること、この結合によりUBPYの酵素活性が抑制されることが明らかとなった⁴⁰⁾。さらに、細胞周期のM期にUBPYのSer680が脱リン酸化され、その酵素活性が上昇することがわかった⁴⁰⁾。このことは、UBPYが何らかのM期特異的機能を有することを示唆しており、その機能について解析を進めた。

抗UBPY抗体を用いてM期におけるUBPYの細胞内局在を調べた結果、M期の最終段階である細胞質分裂期に特徴的な局在パターンを示すことがわかった。細胞質分裂は、M期において染色体DNAが細胞の赤道面から両極に分離した後に、二つの娘細胞を分割するプロセスである⁴¹⁾(図6)。動物細胞の場合、細胞の赤道面に生じる分裂溝のくびれが進行し、最後に中央体の部分で細胞膜が切れて二つの娘細胞が生じる。この時、分離する染色体DNAの間に中央紡錘体と呼ばれる微小管束が形成される。中央紡錘体上の二つの領域には、細胞質分裂に重要な役割を果たす様々なタンパク質が局在化する。一つはキネシン様タンパク質MKLP1などが局在する領域であり⁴²⁾(図6A)、この領域は細胞質分裂の最終段階には中央体リングと呼ばれるリング状の構造となる。もう一つはMKLP1陽性領域の両隣りに位置し、ここにはオーロラBキナーゼなどが局在する⁴³⁾(図6A)。UBPYは細胞質分裂の中期までは細胞内に比較的均一に局在するが、最終段階にオーロラB陽性領域に強く局在化した³⁹⁾(図6B, C)。

そこで、エンドソームで機能するもう一つの脱Ub化酵素AMSHについても調べてみた結果、AMSHもまた中央紡錘体に局在することがわかった。しかしそのパターンはUBPYとは時間的、空間的に異なるものであり、AMSH

はMKLP1陽性領域に(正確には、MKLP1領域を土星の輪のように取り巻いて)局在した³⁹⁾(図6B, C)。さらに、UBPYは細胞質分裂の最終段階に初めて中央紡錘体に局在化したのに対し、AMSHはその初期の段階から持続して局在が見られた。

脱Ub化酵素が局在するという事は、その基質となるUb化タンパク質がそこに存在するはずであると考え、抗Ub抗体を用いて細胞質分裂期のヒト細胞を染色した。その結果、UBPYが局在化する前の段階に、UBPYと同じくオーロラB陽性領域において、タンパク質のUb化レベルが一過的に大きく上昇することがわかった³⁹⁾(図6B, C)。したがって、UBPYはこのタンパク質Ub化を細胞質分裂の最終段階まで持続させないため(時間的調節)、AMSHはオーロラB陽性領域の外でのUb化を防ぐため(空間的調節)に働いていることが示唆された。そして、UBPYあるいはAMSHをノックダウンすることにより細胞質分裂の効率が低下することから、中央紡錘体上での時空間的に制御されたタンパク質Ub化が細胞質分裂に重要な役割を果たしていることが示唆された³⁹⁾。また筆者らの論文と時を同じくして、BRUCEという巨大なUbリガー様タンパク質がMKLP1陽性の中央体リングに局在し、中央紡錘体におけるタンパク質のUb化を担っているという報告が出されている⁴⁴⁾。

それでは、細胞質分裂期に中央紡錘体上でUb化されるタンパク質は何であろうか。前出のUBPYの基質タンパク質の網羅的な解析で同定されたタンパク質の中に細胞質分裂に関与するものがないか調べたところ、VAMP8が含まれていることがわかった。VAMP8は、エンドソームのホモ融合や分泌小胞と細胞膜の融合に関与するv-SNAREタンパク質であるが^{45, 46)}、細胞質分裂期には分裂溝領域の細胞膜と細胞内の膜小胞の融合を促し、細胞質分裂に伴う細胞の表面積の増加に必要な膜成分を供給する役割を担っている⁴⁷⁾。そこでVAMP8のUb化と脱Ub化を調べた結果、細胞質分裂期にVAMP8がオーロラB陽性領域においてUb化タンパク質と共局在すること、Ub化されること、UBPYとAMSHのいずれによっても脱Ub化されることが示され、細胞質分裂期のVAMP8機能がUb化と脱Ub化によって調節されていることが示唆された³⁹⁾。その調節が何なのかは不明であるが、VAMP8は膜貫通タンパク質であることからUb化がプロテアソームでの分解シグナルとして働くとは考えにくく、興味もたれる。しかし抗Ub抗体による強い染色強度から、中央紡錘体でUb化されるタンパク質はVAMP8だけではないと筆者らは予想しており、Ub化/脱Ub化による細胞質分裂の制御機構の解明にはその網羅的な同定が必要だと考えている。

6. 核小体機能の制御

ヒトの約90種類の脱Ub化酵素の中には、機能解析のなされていないものがまだ数多く残されている。そこで筆者らは、UBPYとAMSHの解析のために確立した実験手法を他の脱Ub化酵素にも応用することを考え、それまで細胞機能が不明であった脱Ub化酵素の解析に着手している。この章では、そのような解析から明らかになってきた新規の脱Ub化酵素 USP36 (図7A)の機能を紹介する。

まず、USP36に対する抗体を作製してヒト培養細胞の免疫染色を行った。その結果、USP36が核小体に特異的に局在することがわかった⁴⁸⁾(図7B)。強制発現させたUSP36も核小体に局在し(図7C-C'), そのドミナントネガティブ変異体(酵素活性欠失体)を過剰発現させた時には核小体にUb化タンパク質が蓄積した⁴⁸⁾(図7D-D')。これは、内在性USP36の活性が阻害された結果、その基質タンパク質がUb化されたまま細胞内に蓄積したものと考えられ、USP36が核小体で機能することがわかった。UBPYの場合と同様に、USP36のドミナントネガティブ変異体を発現させた細胞に蓄積したUb化タンパク質を抗Ub抗体で精製し網羅的プロテオーム解析を行った結果、多数の核小体タンパク質がその基質候補として同定された(九州大学・生体防御医学研究所の中山敬一教授、松本雅記准教授との共同研究)。筆者らは、その中ですでにUb化されることが知られているタンパク質であるフィブリラリン⁴⁹⁾とヌクレオフォスミン⁵⁰⁾について検討した。その結果、それらは本当にUSP36の基質であること、そして、USP36による脱Ub化がフィブリラリンとヌクレオフォスミンのプロテアソームでの分解を抑制することにより、細胞内でのこれらタンパク質の発現量を増加させていることがわかった⁴⁸⁾。

核小体の主要機能は、リボソームを生合成することである⁵¹⁾。核小体は、核内においてリボソームRNA(rRNA)遺伝子のクラスターを含む染色体領域に形成し、そこでrRNA前駆体の転写と多段階のプロセッシング、そしてrRNAとリボソームタンパク質の会合が行われる。そして作られた60Sと40Sの大小リボソームサブユニットは細胞質に運び出され、成熟型80Sリボソームが形成される。RNA干渉によりUSP36の発現をノックダウンした細胞では、核小体の消失およびrRNAの転写とプロセッシングの遅延が観察された⁴⁸⁾。フィブリラリンやヌクレオフォスミンはrRNAのプロセッシングに関与していることから^{49,50)}、USP36がリボソーム生合成に必要な様々なタンパク質の分解を抑制することにより、リボソーム生合成を正に調節していることが示唆された。核小体の構造は、転写されたrRNA前駆体の局在部位に様々なリボソーム生合成関連タンパク質がリクルートされることにより形成されると考え

られている⁵²⁾。したがってUSP36ノックダウンによる核小体構造の消失は、リボソーム生合成レベルの低下によって引き起こされた二次的影響であろうと考えている。

それでは、USP36の核小体局在はどのように規定されているのだろうか。USP36をN末端、中央、C末端の三つの領域に分断し、それらの細胞内局在を調べた結果、C末端領域だけが核小体に局在した⁴⁸⁾。多くの核小体タンパク質の場合、塩基性アミノ酸のクラスターが核小体局在化シグナルとして働いている⁵³⁾。USP36のC末端領域には五つの塩基性アミノ酸クラスターが存在する。そこでそれぞれを個別に欠失させた変異体の局在を調べた結果、そのうちのひとつ(¹⁰⁷⁶RGKEKKIKKFKREKR¹⁰⁹¹)を欠失させた場合のみ、USP36の核質への漏出が観察された⁵⁴⁾。逆に、この塩基性アミノ酸クラスターを緑色蛍光タンパク質EGFPに融合することにより、EGFPが核小体に局在するようになった⁵⁴⁾。したがって、このアミノ酸配列が核小体局在化に必要かつ十分であること、すなわちUSP36の核小体局在化シグナルであることが示された(図7A)。

いくつものタンパク質が核小体タンパク質ヌクレオフォスミンとの結合を介して核小体に局在することが知られており、様々なタンパク質を核小体につなぎ止めるハブ因子としてのヌクレオフォスミンの機能が提唱されている⁵³⁾。そこで、USP36にも同様のメカニズムが働いているか調べた結果、USP36の核小体局在化シグナルとして働く塩基性アミノ酸クラスターがヌクレオフォスミンと結合することがわかった⁵⁴⁾(図7A)。さらに、RNA干渉によりヌクレオフォスミンをノックダウンした細胞ではUSP36の核小体局在が失われたことから、核小体局在化シグナルを介したヌクレオフォスミンとの結合により、USP36が核小体に局在化することがわかった⁵⁴⁾。

最後に、ヌクレオフォスミンを介したUSP36の核小体への局在化が、USP36の機能発現に必要なものであるか調べた。その結果、ヌクレオフォスミンのノックダウンによりUSP36の基質であるフィブリラリンのUb化レベルが上昇することがわかった。このことは、ヌクレオフォスミンがUSP36をリクルートすることにより、核小体におけるタンパク質のUb化レベルを調節していることを示唆した⁵⁴⁾。ヌクレオフォスミンは多機能性の核小体タンパク質であるが、近年、脱SUMO化酵素であるSEN3とSEN5をリクルートすることにより、核小体におけるタンパク質のSUMO化レベルを調節していることが示されている^{55,56)}。したがって、ヌクレオフォスミンが核小体においてUb化やSUMO化などの様々なタンパク質修飾のレベルを調節していることが示唆される。ヌクレオフォスミン遺伝子の変異や過剰発現はがんにおいて頻繁に見られ、そのがん化への関与が強く示唆されている⁵⁷⁾。したがって、USP36を介したヌクレオフォスミンによる核小体タンパク質のUb

化レベルの調節がいかにがん化と関連しているのか、今後の研究の進展が期待される。

7. おわりに

その重要性が次々と明らかになってきた脱 Ub 化酵素群であるが、その細胞機能の全貌の解明には、まだ未解析の脱 Ub 化酵素の機能を同定することが不可欠である。そのためには、個々の酵素の機能を一つ一つ解き明かしていく地道な仕事が必要であろう。一方で、75 種類の脱 Ub 化酵素の結合タンパク質を網羅的に同定したプロテオーム解析も最近、報告されており⁵⁸⁾、このようなデータベースは個々の酵素の解析を進める上で有効な情報となる。脱 Ub 化酵素の数は Ub リガーゼ (ヒトでは~600 種類) に比べると格段に少なく、脱 Ub 化酵素は Ub リガーゼより広範な基質をもつ可能性も指摘されている。その特異性がどのように規定されているのか、そしてそのような緩い基質特異性で細胞機能がいかにして厳密に制御されているのか、今後解明しなければならない重要課題である。また最近、多様で複雑な連結型の Ub 鎖の存在が明らかになってきており、異なるタイプの Ub 鎖に対する脱 Ub 化酵素の切断特異性も興味深い問題である。

謝辞

本稿中の UBPY と AMSH に関する研究は、主に筆者の研究室の卒業生である山崎 (水野) 英美、向井明子の両博士によってなされたものです。また、本研究を行うにあたり、三菱化学・生命科学研究所の後藤聡先生 (シヨウジョウバエの解析)、九州大学の中山敬一先生、松本雅記先生 (プロテオーム解析)、長浜バイオ大学の山本章嗣先生 (電子顕微鏡観察)、名古屋大学の稲田利文先生 (リボソーム定量) に大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。

文 献

- Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L., & Kaiser, P. (2008) *J. Proteome Res.*, **10**, 4566-4576.
- Tanaka, K. (2009) *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **85**, 12-36.
- Haglund, K. & Dikic, I. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3353-3359.
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., & Sorkin, A. (2006) *Mol. Cell*, **21**, 737-748.
- Lauwers, E., Jacob, C., & Andre, B. (2009) *J. Cell Biol.*, **185**, 493-502.
- Hicke, L. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 195-201.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., & Peng, J. (2009) *Cell*, **137**, 133-145.
- Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., & Iwai, K. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 123-132.
- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S., & Dikic, I. (2009) *Cell*, **136**, 1098-1109.
- Amerik, A.Y. & Hochstrasser, M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 189-207.
- Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., & Bernards, R. (2005) *Cell*, **123**, 773-786.
- Yao, T. & Cohen, R.E. (2002) *Nature*, **419**, 403-407.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates III, J.R., & Koonin, E.V. (2002) *Science*, **298**, 611-615.
- Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H., & Finley, D. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 495-507.
- Amerik, A.Y., Nowak, J., Swaminathan, S., & Hochstrasser, M. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3365-3380.
- Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., & Tanaka, K. (2009) *Cell*, **137**, 549-559.
- Amerik, A.Y., Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K. D., & Hochstrasser, M. (2000) *EMBO J.*, **16**, 4826-4838.
- Komander, D., Clague, M.J., & Urbe, S. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 550-563.
- Falguieres, T., Luyet, P.P., & Gruenberg, J. (2009) *Exp. Cell Res.*, **315**, 1567-1573.
- Thien, C.B. & Langdon, W.Y. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 294-305.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., & Yarden, Y. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 3663-3674.
- Komada, M. & Kitamura, N. (2005) *J. Biochem.*, **137**, 1-8.
- Raiborg, C. & Stenmark, H. (2009) *Nature*, **458**, 445-452.
- Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N., & Komada, M. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3675-3689.
- Mizuno, E., Kawahata, K., Okamoto, A., Kitamura, N., & Komada, M. (2004) *J. Biochem.*, **135**, 385-396.
- Kato, M., Miyazawa, K., & Kitamura, N. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 37481-37487.
- Tanaka, N., Kaneko, K., Asao, H., Kasai, H., Endo, Y., Fujita, T., Takeshita, T., & Sugamura, K. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 19129-19135.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., & Urbe, S. (2006) *Curr. Biol.*, **16**, 160-165.
- Row, P.E., Liu, H., Hayes, S., Welchman, R., Charalabous, P., Hofmann, K., Clague, M.J., Sanderson, C.M., & Urbe, S. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 30929-30937.
- Nakamura, M., Tanaka, N., Kitamura, N., & Komada, M. (2006) *Genes Cells*, **11**, 593-606.
- Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N., & Komada, M. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5163-5174.
- McCullough, J., Clague, M.J., & Urbe, S. (2004) *J. Cell Biol.*, **166**, 487-492.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., & Fukai, S. (2008) *Nature*, **455**, 358-362.
- Niendorf, S., Oksche, A., Kisser, A., Lohler, J., Prinz, M., Schorle, H., Feller, S., Lewitzky, M., Horak, I., & Knobeloch, K.-P. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 5029-5039.
- Mukai, A., Awano, W., Watanabe, W., Komada, M., & Goto, S. (2010) *EMBO J.*, in press.
- Komada, M. (2008) *Curr. Drug Discov. Technol.*, **5**, 78-84.
- Ishii, N., Owada, Y., Yamada, M., Miura, S., Murata, K., Asao,

- H., Kondo, H., & Sugamura, K. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8626–8637.
- 38) Mizuno, E., Kobayashi, K., Yamamoto, A., Kitamura, N., & Komada, M. (2006) *Traffic*, **7**, 1017–1031.
- 39) Mukai, A., Mizuno, E., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kitamura, N., & Komada, M. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 1325–1333.
- 40) Mizuno, E., Kitamura, N., & Komada, M. (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 3624–3634.
- 41) Barr, F.A. & Gruneberg, U. (2007) *Cell*, **131**, 847–860.
- 42) Mishima, M., Kaitna, S., & Glotzer, M. (2002) *Dev. Cell*, **2**, 41–54.
- 43) Gruneberg, U., Neef, R., Honda, H., Nigg, E.A., & Barr, F.A. (2004) *J. Cell Biol.*, **166**, 167–172.
- 44) Pohl, C. & Jentsch, S. (2008) *Cell*, **132**, 832–845.
- 45) Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Honing, S., & Jahn, R. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3289–3298.
- 46) Wang, C.-C., Ng, C.P., Lu, L., Atlashkin, V., Zhang, W., Seet, L.-F., & Hong, W. (2004) *Dev. Cell*, **7**, 359–371.
- 47) Low, S.H., Li, X., Miura, M., Kudo, N., Quinones, B., & Weimbs, T. (2003) *Dev. Cell*, **4**, 753–759.
- 48) Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N., & Komada, M. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 678–686.
- 49) Chen, M., Rockel, T., Steinweger, G., Hemmerich, P., Risch, J., & von Mikecz, A. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3576–3587.
- 50) Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., & Zhang, Y. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 1151–1164.
- 51) Tschochner, H. & Hurt, E. (2003) *Trends Cell Biol.*, **13**, 255–263.
- 52) Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., & Gebrane-Younes, J. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 2265–2270.
- 53) Emmott, E. & Hiscox, J.A. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 231–238.
- 54) Endo, A., Kitamura, N., & Komada, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 27918–27923.
- 55) Haindl, M., Harasim, T., Eick, D., & Muller, S. (2008) *EMBO Rep.*, **9**, 273–279.
- 56) Yun, C., Wang, Y., Mukhopadhyay, D., Backlund, P., Kolli, N., Yergey, A., Wilkinson, K.D., & Dasso, M. (2008) *J. Cell Biol.*, **183**, 589–595.
- 57) Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., & Pandolfi, P.P. (2006) *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 493–505.
- 58) Sowa, M.E., Bennett, E.J., Gygi, S.P., & Harper, J.W. (2009) *Cell*, **138**, 389–403.
-