

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	脱ユビキチン化による細胞質分裂・Wnt シグナリングの制御
Title(English)	
著者(和文)	向井明子
Author(English)	Akiko Mukai
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7508号, 授与年月日:2009年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7508号, Conferred date:2009/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

＜平成 20 年度 博士論文＞

脱ユビキチン化による細胞質分裂・Wnt シグナリングの制御

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

向井 明子

指導教官：駒田 雅之 准教授

目次

序論	3
I. タンパク質のユビキチン化	
II. タンパク質の脱ユビキチン化	
III. 増殖因子受容体のダウンレギュレーション	
IV. 受容体の選別輸送	
V. 脱ユビキチン化酵素 UBPY・AMSH	
Figure legends	8
第1章 多細胞生物個体レベルでの UBPY の機能	9
1.1 背景	10
1.2 実験材料および手法	12
1.3 結果	17
1.4 考察	23
Figure legends	26
第2章細胞質分裂と脱ユビキチン化酵素	30
2.1 背景	31
2.2 実験材料および手法	33
2.3 結果	36
2.4 考察	41
Figure legends	44
Epilogue	48
引用文献	49
報文目録	54
Figures	55
謝辞	

序論

序論

I. タンパク質のユビキチン化

i. ユビキチン化システム

ユビキチン化とは、ユビキチンが基質タンパク質のリジン残基に共有結合により付加される翻訳後修飾である。ユビキチンは 76 アミノ酸から成るタンパク質で、真核生物で高度に保存されている。ユビキチン化は、そもそも無細胞系における ATP 依存的なタンパク質の分解シグナルとして見出され (Hershko et al., 1980)、後に真核生物におけるプロテアソームでの分解シグナルであることが明らかにされた (Hershko et al., 1998)。ユビキチン化は、ユビキチン活性化酵素 E1、ユビキチン結合酵素 E2、ユビキチン連結酵素 E3 の三種のタンパク質複合体の連携によって進行する。E1 は、ATP を消費してそのシステイン残基とユビキチンの C 末端の間に高エネルギーチオエステル結合を作ってユビキチンを活性化する。E1 に結合した活性化ユビキチンは、E2 に受け渡される。E3 は基質タンパク質を認識し、E2-E3 は連携してユビキチンを基質タンパク質に付加する (Fig. 1-1 A)。ヒトでは、1 種類の E1 と、約 60 種の E2、そして約 400 種の E3 が働いていると予想されている。このことから、ユビキチン化の基質特異性は主に E3 によるものと考えられるが、基質が特定されている E3 はごく一部である (Li et al., 2005)。

ii. ユビキチン化の種類

ユビキチンは、7ヶ所 (6、11、27、29、33、48、63 番アミノ酸) にリジン残基 (K) をもっている。ユビキチンの付加はユビキチンに対しても起こり、ユビキチン鎖を形成する。生体内では主に 48 番、63 番目のリジンを介して連なったユビキチン鎖の機能が明らかにされつつある。ユビキチン化は、ユビキチン 1 分子が付加されるモノユビキチン化 (Fig. 1-1 B) と、ユビキチン鎖が付加されるポリユビキチン化 (Fig. 1-1 C) がある。異なるタイプのユビキチン化が、それぞれ様々な細胞内現象に関与することが知られている。最初に見出された K48 結合型ユビキチン鎖による修飾は、タンパク質の 26S プロテアソームでの分解シグナルとして機能する。K63 連結型ユビキチン鎖修飾は、タンパク質結合ドメインとして機能し、シグナル伝達や DNA 修復に関与する (Sun et al., 2004)。モノユビキチン化は、エンドサイトーシス、リソソームでの分解、ヒストン制御、レトロウィルスの細胞膜からの出芽などに機能していることが明らかになっている (Hicke et al. 2001)。

II. 脱ユビキチン化

ユビキチン化は可逆的な反応である。基質タンパク質あるいはユビキチン鎖からユビキチンを取り外す反応を脱ユビキチン化とよぶ。脱ユビキチン化酵素によって行われ、E1~E3 による Ub 付加に拮抗する役割を果たす。

脱ユビキチン化酵素には、UCH (Ubiquitin C-terminal hydrolases)、USP (Ubiquitin specific proteases)、OTU (otubain proteases)、MJD (Machado-Joseph disease protease)、

JAMM (JAB1/MPN/Mov34)、ataxin-3/josephin の大きく分けて 5 つのファミリーが同定されている。ヒトゲノムには約 100 種の脱ユビキチン化酵素がコードされているが、これらの多くの基質・機能はいまだ明らかではない (Nijman et al., 2005)。しかし、脱ユビキチン化による細胞機能の制御の例として、タンパク質分解シグナルであるユビキチンを取り外すことによって基質タンパク質の分解を抑制する、ユビキチン化に依存したタンパク質相互作用を脱ユビキチン化により制御する、などが知られている。

III. 増殖因子受容体のダウンレギュレーション

単細胞生物の細胞増殖は環境の栄養に依存したものであるが、多細胞生物では複数の細胞が組織として協調して個体を支えているため、個体が細胞を必要としたときにだけ増殖する必要がある。そのため多細胞生物の細胞には細胞外から増殖因子を受けとり、細胞内に増殖シグナルを伝えるしくみが備わっている。しかし、多くの細胞増殖制御因子が癌関連遺伝子として同定されていることからわかるように、過剰な増殖シグナルは、細胞の癌化につながる。増殖シグナルは適切に制御されなければならない、そのメカニズムの一つが受容体のダウンレギュレーションである。

増殖因子受容体は受容体チロシンキナーゼ (RTKs : Receptor tyrosine kinases) に属し、増殖因子の結合により 2 量体を形成、自己リン酸化することにより活性化しシグナルを伝える。活性化された増殖因子受容体は増殖シグナルを伝達しつつ、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。そして初期エンドソームを経て後期エンドソームに至り、その限界膜が内腔に向けて陥入して形成される内部小胞にとりこまれる。ここで、受容体は細胞質と物理的に隔離されるため、増殖シグナルは遮断されると考えられている。そして受容体はリソソームに運ばれ、内部の加水分解酵素によって分解される。この一連のシステムを増殖因子受容体のダウンレギュレーションと呼ぶ (Fig. 1-2)。

IV. 受容体の選別輸送

III で述べたように、増殖因子受容体は活性化されると速やかに細胞内に取り込まれ、エンドソームを経てリソソームへ輸送されて分解される (Fig. 1-2 ; 分解経路)。その一方で、LDL (low-density lipoprotein) 受容体やトランスフェリン受容体などは、リガンドと結合して細胞内に取り込まれるが、エンドソーム上でリガンドと解離した後にリサイクリングエンドソームを経て細胞表面へ送り返され、再利用される (Fig. 1-2 ; リサイクリング経路)。

この選別は、初期エンドソーム膜上の Hrs/STAM 選別因子複合体が行っている。増殖因子受容体は活性化にともなってユビキチン化を受ける。初期エンドソームに局在する Hrs と STAM は共にユビキチン結合モチーフをもち、ユビキチンと結合することにより分解すべき受容体を認識して ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) 複合体へ受け渡す。ESCRT-I、II、III の連携によって受容体はエンドソームの内部小胞に取り込まれ、細胞質から隔離される。この内部小胞をもつエンドソームを形態的に MVB (multi vesicular body)、機能的に後期エンドソームと呼ぶ。そして後期エンドソームの限界膜がリソソームの

膜と融合することで、受容体はリソソーム内部の加水分解酵素により分解される。すなわち、この受容体のダウンレギュレーションにおいて、タンパク質のユビキチン化が分解経路への選別輸送シグナルとして働いている (Fig. 1-2)。

V. 脱ユビキチン化酵素 UBPY・AMSH

UBPY (Ubiquitin-specific protease Y / USP8) と AMSH (associated molecule with the SH3 domain of STAM) はともに SBM (STAM-binding motif) をもち、受容体選別因子 STAM の SH3 ドメインと結合する因子として同定された (Tanaka et al., 1999 ; Kato et al., 2000)。In vitro のユビキチン鎖切断実験から、STAM との結合は UBPY・AMSH が効率的な脱ユビキチン化を行うために必要であることが示されている (McCullough et al., 2006 ; Row et al., 2007)。最近、それに加えて UBPY と AMSH には ESCRT-III コンポーネント CHMP4 との結合モチーフである MIT (microtubule interacting and transport) ドメインが存在することが明らかになった (Row et al., 2007)。UBPY のエンドソームへの局在は ESCRT-III 複合体との相互作用に依存するが、AMSH のエンドソームへの局在はクラスリンに依存しており、AMSH の MIT ドメインの機能は明らかではない (McCullough et al., 2006 ; Row et al., 2007 ; Nakamura et al., 2006)。

UBPYはUSPファミリーに属するシステインプロテアーゼで、酵素活性ドメインとしてシステインボックス、ヒスチジンボックスをもつ。その酵素活性中心の 748 番目のシステインをアラニンに置換したUBPY^{C748A}はドミナントネガティブ変異体としてはたらく。他に、酵素活性をもたない機能不明のRHOD (Rhodanese homology domain) をもつ (Fig. 1-3 A)。

AMSHは酵素活性ドメインとしてJAMMドメインをもつメタロプロテアーゼである。酵素活性ドメインの 348 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換したAMSH^{D348A}はドミナントネガティブ変異体としてはたらく。クラスリンとの結合サイトとしてCBS (Clathrin-binding site) をもつ (Fig. 1-3 B)。

これまでに培養細胞を用いた実験から、脱ユビキチン化酵素 UBPY と AMSH は活性化された上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor ; EGF) 受容体のユビキチンを取り外し、EGF 受容体の分解を抑制することが明らかになっている。すなわち、脱ユビキチン化酵素が分解シグナルであるユビキチンを取り外すことで、受容体の分解を抑制する (Mizuno et al., 2005 ; McCullough et al., 2004)。UBPY、AMSH はどちらもマウスの全身でユビキタスに発現が確認されており、UBPY ノックアウトマウスは胎生致死、AMSH ノックアウトマウスは生後 19~23 日で死に至る。このことから、これらは個体レベルで必要不可欠な因子であり、EGF 受容体の制御以外の機能も担っていると考えられる (Niendorf et al., 2007, Ishii et al., 2001)。そこで、本研究では UBPY のさらなる機能解析を行い、脱ユビキチン化による 2 つの細胞機能の制御機構を明らかにした。

第 1 章では、多細胞個体レベルでの UBPY の機能解析を目的として、モデル生物としてキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いた解析を行った。その結果、UBPY

が個体レベルおよび哺乳動物の培養細胞レベルで Wnt/Wingless (Wg) シグナルを制御することが明らかになった。

第 2 章では、UBPY が細胞周期依存的な活性制御を受ける意味を明らかにすることを目的として細胞質分裂期に着目して解析を行い、細胞質分裂におけるユビキチン化・脱ユビキチン化の新たな役割を見出した。

Figure legends

Fig. 1-1 タンパク質のユビキチン化

(A) ユビキチン化システム。詳細は本文参照。

(B) タンパク質のモノユビキチン化。タンパク質の一箇所、あるいは複数個所のリジン残基にユビキチンモノマーが付加されるユビキチン化の様式。

(C) タンパク質のポリユビキチン化。付加されるユビキチン鎖の種類により、ポリユビキチン化の機能は異なる。K63 連結型ユビキチン鎖によるポリユビキチン化と、K48 連結型ユビキチン鎖によるポリユビキチン化の立体構造の違いを模式的に表している。

Fig. 1-2 受容体の選別輸送とダウンレギュレーション

細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれた受容体は、初期エンドソームにおいて選別を受ける。活性化された増殖因子受容体などは分解経路へ、LDL 受容体やトランスフェリン受容体などはリサイクリング経路へ選別される。リサイクリング経路へ選別された受容体は再び細胞表面へ送り返されて再利用される。それに対し、分解経路へ送られた受容体はリソソームで分解を受け、これを受容体のダウンレギュレーションという。受容体の選別は、選別因子複合体 Hrs-STAM 複合体が受容体のユビキチン化の有無によって行っている。分解経路へ選別された受容体は、ESCRT-I~III に順次受け渡されて後期エンドソームに取り込まれ、リソソームへ運ばれ分解される。

Fig. 1-3 脱ユビキチン化酵素 UBPY、AMSH のドメイン構造

(A) human UBPYのドメイン構造。MIT、RHOD、SBM、酵素活性中心としてCys-boxおよびHis-boxをもつ。UBPY^{C748A}変異体はドミナントネガティブ変異体としてはたらく。

(B) human AMSHのドメイン構造。MIT、CBS、SBM、酵素活性ドメインとしてJAMMをもつ。AMSH^{D348A}変異体はドミナントネガティブ変異体としてはたらく。

第 1 章

多細胞生物個体レベルでの UBPY の機能

第1章 多細胞生物個体レベルでの UBPY の機能

1.1 背景

UBPY ノックダウンによって様々な細胞内タンパク質のユビキチン化レベルが上昇することから、UBPY には多数の未知の基質、機能があると予想される。しかしながら、当研究室で作製された UBPY ノックアウトマウスは早期の胎生致死であり、個体における UBPY の重要性は示唆されたものの、その詳細な機能は明らかではない。また、Niendorf ら (2007) による肝臓における UBPY コンディショナルノックアウトの解析でも、培養細胞系で得られている UBPY の EGF 受容体制御以上の機能は明らかになっていない。

本研究では、ショウジョウバエにおいて時期・組織特異的な UBPY ノックダウンを行い、生体内における UBPY の機能解析を行った。

1.1.1 *Drosophila melanogaster* を用いた実験系

キイロショウジョウバエ (学名 ; *Drosophila melanogaster*) は、古くは発生学、近年は遺伝学のモデル生物として広く利用されている生物である。飼育が容易であること、世代間隔が比較的短い (Fig. 2-1 A) ことに加え、2000 年にゲノムプロジェクトが終了しているなどが利点である。ゲノムが解読されたことにより、ショウジョウバエのゲノムに存在する 13800 遺伝子の 60% がヒト遺伝子と相同性をもつことが判明した。またこれまでに判明している癌、神経退行性疾患、生活習慣病などの原因遺伝子も、その 60% ほどをハエのゲノムに見つけることができる。

ショウジョウバエにおける遺伝子強制発現の手法として、Gal4-UAS システムがある (Fischer et al., 1988)。UAS (upstream activating sequences) とは転写因子 Gal4 によって活性化されるエンハンサーであり、Gal4 発現依存的に UAS 下流の遺伝子の発現を誘導できる。任意の調節領域 (プロモーターやエンハンサー) X の下流に Gal4 遺伝子をつないだ配列をもつ X-Gal4 トランスジェニックフライと、UAS 下流に Y 遺伝子配列をつないだ配列をもつ UAS-Y トランスジェニックフライを掛け合わせて生まれた子供では、X 活性化領域で Gal4 が発現し、それにより Y 遺伝子の発現が誘導される (Fig. 2-1 B)。すなわち、様々な Gal4 トランスジェニックフライと UAS トランスジェニックフライを組み合わせることで、様々な時期・組織で任意のタンパク質を過剰発現させることができる。

このUAS-Gal4 システムを用いて干渉RNA (interfering RNA ; IR) を発現させ、遺伝子発現をノックダウンすることができる (Fig. 2-1 C)。ハエでは免疫系のメカニズムが哺乳動物細胞とは異なるため、約 500bp の遺伝子配列のヘアピンRNAを発現させ、標的遺伝子の発現をノックダウンする。このシステムでハエの全ての遺伝子を網羅すべく、様々な遺伝子を標的としたIRハエが樹立され、RNAiライブラリーとして管理、提供されている (国立遺伝学研究所系統生物研究センター (NIG-FLY) ; <http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp>, Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) ; <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>)。

Gal4-UASシステムを用いた遺伝子発現制御の遺伝子型をX-Gal4>Y, or Z IRなどで表記する。

1.1.2 Wnt/Wingless (Wg)シグナル

Wnt/Wg は分泌型のシグナル分子で、産生細胞から分泌され、拡散して濃度勾配を作るモルフォジェンの一つである。ショウジョウバエの翅のないの変異体、wingless の表現型から Wingless (Wg) 遺伝子として、マウスでは乳癌発生に関連する遺伝子 Int-1 として同定された。そのため、哺乳動物では Wg と Int-1 を合わせて Wnt と呼ぶ。Wnt タンパク質はシステインが豊富なタンパク質であり、ショウジョウバエの Wg は 1 種、ヒトゲノムには Wnt ファミリーは 19 種以上存在する。Wnt/Wg の受容体のひとつは、N 末端に Wnt/Wg と相互作用するシステインリッチドメイン (CRD) と、7 箇所の疎水性膜貫通領域をもつ Frizzled (Fz) である (Fig. 2-2 A)。Fz はショウジョウバエでは 4 種類、ヒトやマウスでは 10 種存在している。また、一回膜貫通型タンパク質 LDL receptor-related protein (LRP) 5/6 がその共受容体として機能している。上記以外にも、Wg と相互作用する膜タンパク質は少なくとも 3 つ、Wnt/Wg シグナルのアゴニスト、アンタゴニストは少なくとも 5 つ存在し、複雑なシグナル体系となっている (Kikuchi et al. 2007)。

Wnt/Wg-FzによるWntシグナル経路も、少なくとも 3 種知られている。1 つ目は、最もよく知られているcanonical 経路である (Fig. 2-2 B)。ショウジョウバエの翅の神経前駆細胞の誘導はこの経路による。Wnt非存在下では、細胞質の β -cateninは常にAPC、Axinなどから成る分解複合体にリクルートされる。そこで β -cateninはcasein kinase 1 (CK1) や glycogen synthase kinase3 (GSK3) によりリン酸化され、ついでユビキチン化を受けてプロテアソームで分解される。そのため、細胞質および核内の β -catenin量は低く抑えられている。このとき、T-cell factor (TCF) やlymphoid enhancer-binding protein (LEF) 転写因子は Groucho (Gro) などのco-repressorにより抑えられているため、Wnt標的遺伝子の転写は抑制されている。しかし、WntがFzと結合すると、細胞内のDishevelled (Dvl) はリン酸化され細胞膜への局在変化が誘導される。それはAxinの細胞膜へのリクルートや分解、分解複合体の解離などを引き起こし、 β -cateninのユビキチン化および分解は抑制される。細胞質の β -catenin増加にともない β -cateninは核に蓄積し、TCF/LEFと相互作用して標的遺伝子の転写を活性化する。 β -cateninが重要な役割を果たすこの経路は、 β -catenin 経路とも呼ばれる。2 つ目は、Dvl、Rho kinaseを介して細胞極性を制御するplanar cell polarity (PCP) 経路である。ショウジョウバエの翅の表面の毛や、哺乳動物の体毛の流れ (極性) を制御している。3 つ目は、 Ca^{2+} 経路である。脊椎動物特有の Ca^{2+} 放出を介する経路であるが、その経路・役割は他の二つに比べてあまり明らかになっていない。

これらの経路のクロストークや、それぞれの経路を活性化する Wnt や Fz の特異性など、明らかでない点が多く残されている。

1.2 実験材料および手法

Fly stocks

使用したショウジョウバエ系統は、次のとおりである。

Actin (act)-Gal4、Ay-Gal4、heat shock (hs)-flippase (FLP)、CyO^{Wg-lacZ}、scalloped (sd)-Gal4 (上田龍先生 (国立遺伝研究所) より供与)、A101 (Bloomington *Drosophila* stock center (Indiana Univ.)), w^{hs-Fz2-FLAG[2.1]} (Piddini et al., 2005, Jean-Paul Vincent (National Institute for Medical Research) より供与)、vg^{Quadrant enhancer (QE)-lacZ}、vg^{boundary enhancer (BE)-lacZ} (Kim et al., 1996, Sean Carroll (Howard Hughes Medical Institute) より供与)。

UBPY ノックダウンのための UAS-5798IR 系統は、*Drosophila* UBPY (CG5798) の coding region の 74-573 (RNAi-1)、1386-1885 (RNAi-2) をそれぞれターゲットサイトとして設計、pUAST ベクターに組み込まれたものを用いて、UAS-5798IR 配列をハエのゲノムに組み込むことで作製された (三菱化学生命科学研究所 後藤グループ・ハエバンク)。*Drosophila* UBPY を過剰発現するための UAS-5798WT 系統も、CG5798 配列が pUAST ベクターに組み込まれたものを用いて同様に樹立された (三菱化学生命科学研究所 ハエバンク)。

UBPY ノックアウトハエは、相同組み換え法 (Ends-out) (Gong et al., 2003) により作製した。ターゲティングベクターは、CG5798 の coding 配列の上流・下流 3kbp のゲノム配列を arm として設計し、リンカーを挿入した pW35 (*Drosophila* Genomics Resource Center) に挿入して作製した。CG5798 ノックアウトターゲティングベクターを導入し、相同組み換えを起こさせることで、ゲノム上の CG5798 配列をホワイト遺伝子で置換した UBPY ノックアウトハエ系統が樹立された (三菱化学生命科学研究所 ハエバンク)。

ショウジョウバエの掛け合わせ

2 種の系統を 25°C で掛け合わせ、25°C で育成した。効率よくノックダウンを行う必要のあるときは、25°C で掛け合わせ、2~3 日後に 28°C に移して育成した。Heat shock を行う際には、3 齢幼虫を 37°C でインキュベートした後、25°C または 28°C (ノックダウン時) に戻した。

成虫の翅の観察

ハエを一旦エタノール中に保存した後、エタノール中で翅を解剖した。Hoyer's medium (200 g Chloral Hydrate, 20 g Glycerol, 30 g Gum Arabic を 50 ml H₂O に加え加熱溶解したもの) でスライドガラス上にマウントし、60°C ホットプレート上でカバーガラスの上にもりをのせた状態で一晩インキュベートした。作製したサンプルは光学顕微鏡 (Axioplan2, Zeiss) で観察し、画像を取り込んだ。

免疫蛍光染色

3 齢幼虫を Phosphate-buffered saline (PBS) 中で解剖し、4% paraformaldehyde (PFA) で室温 20 分固定した。洗浄後 blocking buffer (0.2% BSA, 0.15% TritonX-100 in PBS) でブロッキングを行い、抗体染色を行った。1 次抗体を 3 時間から一晩反応させ、洗浄後約 2~6 時間 2 次抗体と反応させた。細胞外 Wg を検出する際には、次の方法で vital staining を行った (Strigini et al., 2002)。氷上の Shields and Sang M 3 Insect Medium (SIGMA) 中で解剖し、取り出した成虫原基を Shields and Sang M3 Insect Medium で希釈した anti-Wg 抗体で氷上 45 分反応させた。洗浄後、4% PFA で氷上 20 分、室温 20 分固定し、ブロッキングした。2 次抗体と反応させ、以下通常通りの手順で操作、観察した。使用した抗体は次のとおり ; mouse monoclonal anti-Wg (4D4, 1:100)、mouse monoclonal anti-Cut (2B10, 1:200) (Developmental Studies Hybridoma Bank)、mouse monoclonal anti-Dll (Duncan et al., 1998; DM. Duncan (Washington Univ.)より供与)、Mono- and poly ubiquitinated proteins, multi ubiquitin chains, mouse monoclonal antibody (clone FK2) (10 µg/ml, BIOMOL)、mouse monoclonal anti-FLAG M2 (5 µg/ml, SIGMA)、mouse monoclonal anti-EEA1 (1 µg/ml, BD Transduction Laboratories)、rabbit polyclonal anti-LAMP1 (1:2000, Carlsson et al., 1998; Dr. M. Fukuda (The Burnham Institute) より供与)。

2 次抗体は Alexa488-または Cy3-conjugated anti-mouse または rabbit IgG (Jackson laboratory 1:200) を使用した。染色したサンプルは VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc.) で封入してマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (FV500, Olympus) で観察、画像を取得した。

X-gal 染色

解剖して取り出した成虫原基を、1% glutaraldehyde in PBSで室温 15 分固定した。0.1% TritonX-100 in PBSで 3 回洗浄後、組織をX-gal staining solution (0.08% X-gal, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.2 M NaH₂PO₄, 5 M NaCl, 1 M MgCl₂, 50 mM K₃[Fe(CN)₆], 50 mM K₄[Fe(CN)₆])で 15 分から 30 分、37°Cでインキュベートした。適当な発色が得られたらPBSで洗浄し、グリセロールでスライドグラスにマウントし、光学顕微鏡 (Axioplan2, Zeiss) で観察、画像を取り込んだ。

Real-time PCR

UBPY のノックダウン効率を調べるため、act-Gal4 により Green Fluorescent Protein (GFP) (コントロール) あるいは UBPY のノックダウンを誘導した。3 齢幼虫より抽出した mRNA を鋳型に、poly dT (20) を primer に用いて Super Script III first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen) で逆転写を行った。コントロールとしてリボソーマルプロテイン rpL32 を用い、UBPY と rpL32 の増幅には次の primer を使用した。rpL32 primer (F ; 5'-gcaagcccaagggtatcgg-3'、R ; 5'-cgatgttgggcatcagatactg-3')、UBPY primer (F ;

5'-ccagccgagatttgaggtagctt-3'、R； 5'-atggtgaggaattcgtgtgagtc-3'）。逆転写サンプルを鋳型に、それぞれ rpL32 と UBPY に対する primer を用いて SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) と iCycler iQ (Biorad) で PCR 増幅をリアルタイムで測定、モニターした。同時に濃度のわかっている rpL32、UBPY 配列をもつプラスミドを鋳型に増幅を行い、作成した検量線に基づいてサンプル中の mRNA 濃度を算出した。

細胞培養・トランスフェクション

HeLa細胞・HEK293T細胞・NIH-3T3 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン-ストレプトマイシンを含む 4.5 mg/l glucose DMEM培地 (SIGMA) により、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。トランスフェクションは、HeLa細胞はFuGENE6 transfection reagent (Roche Diagnostics)、HEK293T 細胞 および NIH-3T3 細胞は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて行った。Wnt3a産生細胞およびそのネガティブコントロール細胞 (Wnt-3a/L clone 32, neo/L) は高田律子先生 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)より供与され、FBS、ペニシリン-ストレプトマイシンを含むDMEM:F12 (1:1) (Invitrogen/GIBCO) で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。Conditioned medium (C.M.) 採取の際は、1 × 10⁶ cells を 10 cm dishにまきこみ、4 日目にその培養上清を回収した。1000 × gで 10 分間遠心した上清をフィルトレーションし、C.M.とした (Shibamoto et al., 1998)。

発現ベクター

FLAGあるいはHAタグを付加したmouse UBPY、UBPY^{C748A}およびUBPY^{S680A}発現ベクターは当研究室により作製された (pME-FLAGおよびpME-HAに挿入されている; Kato et al.,2000; Mizuno et al.,2005; Nakamura et al., 2006)。Frizzled (Fz) 4-FLAGは西田満先生 (神戸大学) により供与されたpEGFP-N2-mouse Fz4 を元に、C末端にFLAGタグをつけてpMEに挿入して作製した。その変異体は、QuikChange site-directed mutagenesis system (Stratagene) の変法 (Sawano et al., 2000) により作製した。Wntレポーターアッセイに用いたSuper8×TOPFlashおよびSuper8×FOPFlash (Veeman et al., 2003) は後藤由希子先生 (東京大学) より、phRL-SV40 は程肇先生 (三菱化学生命科学研究所) より供与された。

RNA interference (RNAi)

UBPY および AMSH の siRNA 発現ベクターは、当研究室で human UBPY の coding region 191-209 (5'-TGAAATACGTGACTGTTTA-3' ; siRNA-1、当研究室・水野作製)、3290-3310 (5'-AATCTTCAGCAGCTTATATCC-3' ; siRNA-2、当研究室・井浦作製) をターゲットサイトとして設計、哺乳動物細胞用 siRNA 発現ベクターpSilencer 1.0-U6 (Ambion) に組み込み作製された。siRNA 発現ベクターは 48 時間おきに 2 回トランスフェクションした。他のコンストラクトを発現させる場合は、2 回目のトランスフェクションの際に siRNA 発現ベクターと共にトランスフェクションした。

レポーターアッセイ

24 well plate にまいた HEK293T 細胞に Super8×TOPFlash または Super8×FOPFlash、phRL-SV40、HA-UBPY シリーズをトランスフェクションした。翌日、培地で 5 倍に希釈した Wnt3a またはコントロール C.M.に培地を交換し、一晚培養した。細胞を洗い、1×passive lysis buffer (Promega) で lysate を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) で firefly luciferase、rhenilla luciferase の蛍光を順次発光させ、TD-20/20 Illuminometer (Turner Designs) で測定した。firefly luciferase の測定値を rhenilla luciferase 測定値で割った値を、レポーター活性として使用した。

細胞分画

細胞を細胞質と膜画分に分画する際には、細胞分画用 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM EDTA , protease inhibitor cocktail (Nacalai)) で細胞を回収し、ポッター型ガラスホモジナイザーにより細胞をホモジナイズした。Lysateを 1000 × g で 5 分遠心し、核と未破碎細胞を沈殿させ上清を回収した。この上清を 55000 × g で 1 時間遠心し、その上清を細胞質画分、沈殿を膜画分とした。

免疫沈降、ウェスタンブロッティング

トランスフェクションの 48 時間後、細胞を lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, protease inhibitor cocktail (Nacalai))で回収、氷上で 30 分可溶化し、12000 × gで 15 分遠心した上清を lysate とした。タンパク質のユビキチン化を検出する際には 10 mM N-ethylmaleimide (NEM)、リン酸化を検出する際には 1 mM Na₃VO₄を lysis buffer に添加した。回収した lysate は immunoprecipitation (IP) および immunoblotting (IB)に用いた。

Fz4 のユビキチン化を検出する際には、Fz4 と結合するユビキチン化タンパク質も検出することを避けるために、タンパク質相互作用を壊す hot-SDS-lysis法を用いた (Row et al., 2006)。100°Cの hot SDS lysis buffer (1% SDS, 50 mM NaF, 1 mM EDTA) で細胞を回収し、100 °Cで 1 分間加熱した。4 倍量の TX100-dilution buffer (1.25% Triton X-100, 25 mM Tris, pH 7.5, 125 mM NaCl, 50 mM NaF) を加え、12000 × gで 5 分遠心した上清を回収し、IP および IBに用いた。細胞表面のタンパク質を biotin化するには、細胞を PBSで 3 回洗ってから 0.5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE) in PBSで室温 30 分反応させた。15 mM Glycine in PBSで 3 回洗い、そのままあるいは Wnt3a C.M.を加えて 37°C、5% CO₂インキュベーターでインキュベートしてから lysateを lysis bufferで回収した。細胞表面の Fz4 のユビキチン化レベルを調べる際には、細胞を biotin化し、10 mM NEMを含む lysis bufferで lysateを回収し、Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) を加えて 4°Cで一晩反応させ、biotin化タンパク質を結合させた。Sepharoseを wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40) で 5 分 × 3 回洗浄し、50 μlの hot SDS lysis bufferを加えて 100°Cで 1 分 加熱、上清を回収することを 2 回繰り返した。溶出

したbiotin化タンパク質に 400 μ lのTX100-dilution bufferを加え、IPに用いた。

免疫沈降は protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) および mouse monoclonal anti-FLAG M2 抗体 (1 μ g, Sigma-Aldrich)、lysate を混ぜ 4°C で 2 時間から一晩インキュベートした。ビーズを wash buffer で 5 分×3 回洗浄し、sepharose に結合したタンパク質を Laemmli sample buffer で溶出した。

溶出したタンパク質をSDS-PAGEで分離後、通常の手順でIBした。使用した一次抗体は次のとおり； mouse monoclonal anti-multi ubiquitin FK2 (1 μ g/ml, BIOMOL；Fujimuro et al., 2005)、mouse monoclonal anti-FLAG M2 (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich)、rabbit polyclonal anti-UBPY (1:500；Kato et al., 2000)、rabbit polyclonal anti-HA (Y11, 1 μ g/ml, SantaCruz)、mouse monoclonal anti- γ -tubulin (GTU-88, 1 μ g/ml, SIGMA-Aldrich)。二次抗体にはhorseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or rabbit IgG (1:20000, Jackson Immuno Research Laboratories) を用い、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo) で発光、検出した。バンドの定量の際はメンブレンの発光データを LAS1000 Plus (FUJIFILM)で取り込み、画像解析を行った。

BioExpress を用いた in silico analysis

疾患組織において異常な発現を示す遺伝子を調べるために、データベース BioExpress (Gene Logic, Ocimum Biosolutions Inc.の一部門) を用いた。BioExpress システムには、健康者および患者の様々な組織における様々な遺伝子の mRNA 発現プロファイルがあり、そこにはヒトのサンプルを解析した Affymetrix 社の遺伝子発現解析用アレイ Genechip HG-U133 microarray のデータが含まれている。このデータから、MAS5.0 intensity value および、present/absent call を用いて、正常サンプルと癌サンプルを比較した。

1.3 結果

1.3.1 *Drosophila melanogaster* UBPY の同定

ショウジョウバエの UBPY ホモログ (dUBPY) として、CG5798 遺伝子を同定した。CG5798 遺伝子は哺乳動物の UBPY と同様に特徴的なドメイン構造として MIT ドメイン、Rhodanese homology ドメイン、2 つの SBM、酵素活性ドメインをもつ (Fig. 2-3 A, B)。

哺乳動物細胞の培養細胞において、細胞内のタンパク質のユビキチン化レベルは UBPY をノックダウンすると上昇し、UBPY を過剰発現すると減少する。ショウジョウバエで同定した UBPY ホモログ CG5798 が哺乳動物 UBPY と同じ機能をもつか調べるため、scalloped (sd) プロモーター依存的に wing disc (翅成虫原基；将来翅になる組織) の一部で Gal4 が発現する sd-Gal4 で dUBPY を過剰発現あるいはノックダウンした。wing disc から lysate を回収し、抗ユビキチン化タンパク質抗体 FK2 で IB してユビキチン化タンパク質を検出した (Fig. 2-3 C)。UBPY ノックダウンでは lysate のユビキチン化レベルが上昇、UBPY 過剰発現ではユビキチン化レベルが減少しており、哺乳動物の培養細胞で UBPY のノックダウン、過剰発現を行った場合と同様の結果となった。CG5798 は、哺乳動物の UBPY と相同の脱ユビキチン化活性をもつことが示唆された。

1.3.2 UBPY ノックダウンによる翅の表現型

生体内で UBPY の機能を探るため、様々なプロモーターの Gal4 を用いて、様々な時期・組織において UBPY をノックダウンした。まずノックダウン効率を Real-time PCR により調べたところ、全身で UBPY をノックダウンした 3 齢幼虫では、UBPY の mRNA はコントロールの 30~50% に抑えられていた。

UBPY を主に神経や、胚の時期に全身、上皮細胞でノックダウンした場合は全て致死となり、その重要性が示唆された。翅で発現する sd-Gal4 でノックダウンした場合は、翅が小さくなる、翅脈 (vein) と呼ばれる線が太くなる、翅のふちの感覚毛が減少する (Fig. 2-4 B 下段 拡大図) などの表現型が見られた (Fig. 2-4 B)。異なるターゲットサイトに対して設計した RNAi でも、同じ表現型であった (Fig. 2-4 C)。この表現型は、UBPY ノックダウンと同時に UBPY の過剰発現を行うことでレスキューすることができた (Fig. 2-4 D)。また、UBPY のノックアウトハエ (-/-) は胚性致死であったが、UAS-dUBPY をもたせるとリークした dUBPY タンパク質によって蛹まで成長できるようになった。この部分的にレスキューされた蛹を解剖し、その翅を調べたところ、UBPY ノックダウンとよく似た表現型であった (Fig. 2-4 E)。これらの結果から、sd-Gal4 > UBPY IR の翅の表現型は、UBPY 発現量の減少によるものであることが示された。

1.3.3 UBPY ノックダウンは、Notch シグナルではなく Wingless シグナルを減少させる

翅の形成においては、Notch 経路、Notch により誘導される Wg 経路が重要なはたらきを

する。UBPY ノックダウンによって異常になったシグナル経路を明らかにするために、Notch および Wg のターゲット因子の発現を調べた。

UBPY ノックダウンによって Notch シグナルが変化しているか調べるために、Notch シグナルのターゲット因子である Cut、vestigial boundary enhancer (vg^{BE} ; Kim et al., 1996)、Wg の発現を調べた。コントロールおよび UBPY をノックダウンした幼虫から wing disc を取り出し、染色した。anti-Cut 染色 (Fig. 2-5 A,B)、 vg^{BE} -lacZ (Fig. 2-5 C,D) および Wg-lacZ (Kassis et al., 1992) (Fig. 2-5 E, F) の X-gal の染色はいずれもコントロールとノックダウンで違いは見られず、UBPY ノックダウンは Notch シグナルに強い影響を与えていないことがわかった。

次に、Wg シグナルについて調べた。Wg シグナルのターゲット因子、distalless (Dll; Duncan et al., 1998)、vestigial quadrant enhancer-lacZ (vg^{QE} -lacZ; Kim et al., 1996)、エンハンサー トラップ マーカー A101 (Campuzano et al., 1992) について調べた。Anti-Dll 抗体による染色 および vg^{QE} -lacZ の発現は UBPY ノックダウンでわずかに減少するにとどまったが (Fig. 2-5 G-J)、A101 の染色は wing disc の中央部で顕著に減少した (Fig. 2-5 K,L 矢印)。A101 は神経前駆細胞 (SOP; sensory organ precursor) のエンハンサー トラップ マーカーであり、A101 で染まる細胞は将来末梢神経器官となる。Wing disc の中央部にある、Wg-lacZ が発現する線状の領域を margin と呼ぶ。この margin をはさんで 2 列に並ぶ SOP は、将来成虫の翅のふちの感覚毛になる (Fig. 2-5 M)。margin の SOP は margin の Wg 産生細胞より分泌された Wg によって誘導されることがわかっている。UBPY ノックダウンでは、margin 以外の SOP の染色はコントロールと同程度であったが、margin の SOP が特異的に減少した (Fig. 2-5 L)。これらの結果より、UBPY をノックダウンした wing disc では、Wg シグナルが減少し、SOP の誘導が減少した結果、成虫の翅の縁の感覚毛が減少したことが示唆された。

1.3.4 UBPY ノックダウンにより Wingless が受容細胞内に蓄積する

Wg シグナルが正常に働くためには、様々なステップが必要である。Wg が正常に産生されること、脂質や糖による翻訳後修飾を適切に受けること、Wg が産生細胞から正常に分泌されること、受容細胞が Wg を受け取ること、Wg を受け取った細胞内で適切にシグナルが伝えられることなどである。そこで、UBPY ノックダウンによる Wg シグナルの低下について、①Wg の産生および分泌、②Wg の細胞内への取り込み、③Wg の活性または受容細胞内でのシグナル伝達、における異常の可能性を調べた。

① Wg-lacZ の染色および Wg タンパク質の染色より、UBPY ノックダウン wing disc でも margin において Wg は正常に産生されていることがわかる (Fig. 2-5 E, F; Fig. 2-6 B, D)。細胞外の Wg を検出する vital staining (Strigini et al., 2002) により細胞外に分泌された Wg を検出したところ、コントロールと UBPY ノックダウン wing disc で顕著な違いは見られなかった (Fig. 2-6 A,C)。すなわち、UBPY ノックダウン wing disc でも Wg の産生および分泌は正常に行われていると考えられる。

② 次に、細胞内にとりこまれた Wg を調べた。受容細胞で細胞内に取り込まれた Wg は、小さな小胞として検出できる (Fig. 2-6 B 矢頭)。UBPY ノックダウンでは、細胞内に取り込

まれた Wg が多数の大きな小胞に蓄積した (Fig. 2-6 D)。この結果は、UBPY ノックダウン細胞では、Wg の取り込みは正常に行われているが、細胞内に取り込まれた後何らかのオルガネラに蓄積することが示唆された。

③ このWg蓄積がWg産生細胞の異常により分泌されたWgに異常があるためであるのか、それともWg受容細胞内での異常によるのか調べた。Ay-Gal4 を利用してUBPYノックダウンのクローン (GFP+) を作り、クローンとそれ以外の細胞内でのWgの蓄積を調べたところ、Wgの蓄積は細胞自律的cell autonomousであった (Fig. 2-6 E-E”)。すなわち、Wg産生細胞の異常ではなく、Wg受容細胞の異常によるものであることがわかった。

1.3.5 UBPY ノックダウンにより Wingless、Frizzled、ユビキチン化タンパク質が後期エンドソームへ蓄積する

UBPY ノックダウンで観察された Wg の蓄積が細胞内のどこで起こっているのか調べるために、3 齢幼虫の wing disc を anti-Wg 抗体および各エンドソームマーカーで 2 重染色した。UBPY ノックダウンによって蓄積した Wg 小胞は、初期エンドソームマーカー Rab5 (Fig. 2-7 B-B”) およびリサイクリングエンドソームマーカー Rab11 の染色とは一致しなかったが (Fig. 2-7 D-D”)、後期エンドソームマーカー Rab7 の染色と一致した (Fig. 2-7 F-F”)。詳細に見ると、Wg は Rab7 で染まる後期エンドソームの内部に局在していた (Fig. 2-7 F-F”, inset ; 拡大図)。また、UBPY ノックダウンによって、後期エンドソームの肥大化が観察された (Fig. 2-7. E-E”, F-F”)。

Wg は、Wg 受容体 Fz に結合し、共にエンドサイトーシスされる。UBPY ノックダウンにおいて、Wg と共に Fz も肥大化した後期エンドソームに蓄積するかどうか調べた。内在性の Fz タンパク質を染色できる抗体がないので、heat shock により C 末端に FLAG タグが付加された *Drosophila* Fz2 が発現するハエ (hs-Fz2-FLAG) を用いた。37°C で 40 分 heat shock してタンパク質発現を誘導し、25°C で 3 時間インキュベートすると、発現させた Fz2-FLAG タンパク質はほぼ分解されつつある状態になる (Piddini et al. 2005)。Anti-FLAG 抗体と anti-Rab7 抗体で染色して調べると、コントロールでは Fz2-FLAG は分解され、細胞内の Fz2-FLAG は非常に少なかった (Fig. 2-7 G-G”)。しかし、UBPY ノックダウンでは Fz2-FLAG は肥大化した後期エンドソームに蓄積していた (Fig. 2-7 H-H”)。このことから、UBPY ノックダウン細胞では Wg は受容体 Fz と結合し細胞内に取り込まれ、Wg-Fz 複合体は後期エンドソーム内部に蓄積していると考えられる。

培養細胞では、UBPY ノックダウンによって EGF 受容体を含むユビキチン化タンパク質がエンドソームに蓄積する (Mizuno et al., 2006)。そこで、UBPY ノックダウン wing disc のユビキチン化タンパク質についても調べた。Sd-Gal4 で UBPY をノックダウンした wing disc を抗ユビキチン化タンパク質抗体 FK2 で染色すると、UBPY ノックダウン領域でユビキチン化タンパク質の小胞が多数観察され (Fig. 2-7 I, J)、それらは Rab7 で囲まれたエンドソーム内部に蓄積していた (Fig. 2-7 K-K”, L-L”)。

これらのことから、UBPY ノックダウン細胞では、UBPY の基質となるユビキチン化タン

パク質が後期エンドソームに蓄積しており、エンドサイトーシスされた Wg-Fz 複合体もユビキチン化を受けている可能性が示唆された。

1.3.6 UBPY は哺乳動物細胞で Wnt シグナルを正に制御する

これまでの結果より、UBPYをノックダウンした翅におけるWgシグナル減少は、Wgを受け取る細胞内での異常であることがわかった。それにより、生化学的な解析を行うために培養細胞系を利用できることが示唆された。そこで、まずUBPYが哺乳動物細胞においてもWgシグナルを正に制御するのか調べるために、レポーターアッセイを行った。レポーター Super8×TOPFlashは8コピーのTCF/LEF結合領域下流にluciferase配列がつながれており、Wnt canonical 経路のシグナルに応答してfirefly luciferase (ホタルルシフェラーゼ) を発現する。ネガティブコントロールSuper8×FOPFlashは、TCF/LEF結合領域に変異をもつためWntシグナルに応答しない。トランスフェクションおよび、細胞量のコントロールとして、rhenilla luciferase (ウミシイタケルシフェラーゼ) を発現するphRL-SV40 を用いた。HEK293T細胞にSuper8×TOPFlashまたはSuper8×FOPFlash、phRL-SV40、HA-UBPYシリーズをトランスフェクションした。Wnt3aまたはコントロール C.M.で刺激し、Dual-Luciferase Reporter Assay Systemでluciferaseを測定した。firefly luciferaseの測定値をrhenilla luciferase測定値で割った値を、レポーター活性として使用した。その結果、レポーター活性は野生型UBPYを過剰発現させると増加し、ドミナントネガティブ変異体UBPY^{C748A}を過剰発現させると抑制された。そして恒常活性型変異体UBPY^{S680A}を過剰発現させると、レポーター活性は非常に強く活性化した (Fig. 2-8 A)。この結果より、UBPYは哺乳動物細胞内でもWntシグナルを正に制御することがわかった。

次に、UBPYがWntシグナル伝達のどのステップに関与しているのか調べるために、Dishevelled (Dvl) のリン酸化と細胞質の β -catenin 量に着目した。Wnt依存的なDvlのリン酸化は、Wntシグナルのcanonical 経路およびPCP 経路の活性化を反映すると考えられている。Canonical 経路では、その下流で β -catenin が安定化される (Fig. 2-2 B)。もしUBPYがDvlや β -cateninの下流でWntシグナルを制御していた場合、UBPYはこれらに影響を与えないはずである。まず、 β -cateninについて調べた。細胞質の β -catenin は無刺激時では低いレベルに抑えられており、Wnt刺激によって安定化する (Fig. 2-8 B)。FLAG-UBPY、FLAG-UBPY^{S680A}を発現させると、 β -cateninが安定化したが、ドミナントネガティブ変異体FLAG-UBPY^{C748A}により細胞質の β -cateninは減少した。すなわち、UBPYは β -cateninより上流でWntシグナルを制御することがわかった。次に、Dvlについて調べた。Dvl2はWnt3a刺激依存的にリン酸化を受け、それはシフトアップしたバンドとして検出される。FLAG-UBPY、FLAG-UBPY^{S680A}を過剰発現させるとDvl2に対するリン酸化Dvl2の割合は増加したが、FLAG-UBPY^{C748A}では減少した (Fig. 2-8 C)。これらの結果より、UBPYはDvlより上流でWntシグナルを制御していることが示唆された。

1.3.7 Wnt 受容体 Frizzled は UBPY の基質である

以上の結果より、UBPYはDvlより上流、すなわち受容体Fzを制御することによりWntシグナルを制御している可能性が示唆された。そこで、Fzがユビキチン化を受けるのか、そしてUBPYの基質であるか調べた。

HeLa細胞にFz4-FLAGおよびHA-UBPY^{C748A}を過剰発現させ、Wnt3a刺激後、Hot-SDS-lysis法によりlysateを回収し、anti-FLAG抗体でIP、抗ユビキチン化タンパク質抗体FK2でIBした。強い界面活性剤と加熱によりタンパク質相互作用を壊し、ユビキチン化タンパク質がFz4と共沈することを防ぐ狙いでHot-SDS-lysis法を用いた。その結果、Wnt刺激に関わらずスミアのFz4のユビキチン化が検出され、それはドミナントネガティブ変異体UBPY^{C748A}の過剰発現により増加した (Fig. 2-9 A)。また、2種のRNAiベクターによりUBPYの発現をノックダウンした場合も、Fz4のユビキチン化レベルが増加した (Fig. 2-9 B)。

これらのFK2抗体によるスミアのプロットがFz4-FLAGのユビキチン化であることを確認するために、Fz4^{K0}-FLAG変異体を作製した。7回膜貫通型タンパク質であるFz4は、細胞膜によって細胞の外側にある領域と、細胞の内側にある領域に分けられる。その細胞内領域には12個のリジン残基が存在し、これらはユビキチン化される可能性がある (Fig. 2-2 A)。そこで、これらのリジンを全てアルギニンに置換したFz4^{K0}変異体を作製した。HeLa細胞にFz4-FLAGまたはFz4^{K0}-FLAGと、HA-UBPY^{C748A}をトランスフェクションし、細胞表面のFz4のユビキチン化を調べた。野生型Fz4-FLAGはユビキチン化を受けており、HA-UBPY^{C748A}の過剰発現によりユビキチン化レベルは上昇した。それに対し、Fz4^{K0}-FLAG変異体はユビキチン化を受けず、UBPY^{C748A}過剰発現でもユビキチン化されなかった (Fig. 2-9 C)。Fz4のユビキチン化と見られるスミアがHot-SDS-lysis法でも検出されたこと、Fz4^{K0}変異体では検出されないことから、Fz4がユビキチン化されることが確認できた。

次に、UBPYがFz4と相互作用するか調べた。HeLa細胞にFz4-FLAGおよびHA-UBPY、HA-UBPY^{C748A}を過剰発現させ、Wnt3a刺激後lysateを回収し、anti-FLAG抗体でIP、anti-HA抗体でIBした。Fz4-FLAGとHA-UBPYは結合し、Fz4-FLAGとHA-UBPY^{C748A}の結合はHA-UBPYとの結合よりも強かった (Fig. 2-9 D)。ドミナントネガティブ変異体UBPY^{C748A}は、酵素活性欠失変異体であるため基質との結合が安定化していると考えられる。

以上の結果より、Fz4は定常的にユビキチン化を受けており、UBPYはFz4と結合してFz4を脱ユビキチン化することが示唆された。

1.3.8 UBPYはFrizzledをエンドソーム上で脱ユビキチン化する

次に、Fz4-FLAGの細胞内局在を調べた。HeLa細胞にFz4-FLAGを過剰発現させて、anti-FLAGと抗ユビキチン化タンパク質抗体FK2で染色した。Fz4-FLAGの過剰発現された領域でユビキチン化タンパク質の染色が強くなっており、Fzがユビキチン化を受けていることが示唆された (Fig. 2-10 A-A'')。細胞内にUBPY^{C748A}を過剰発現させると、ユビキチン化タンパク質が肥大化したエンドソームに蓄積する。このユビキチン化タンパク質にはEGF受容体も含まれており、UBPYの基質が蓄積している可能性が示唆されている (Mizuno et al., 2006)。Fz4-FLAGとHA-UBPY^{C748A}を同時に過剰発現させると、Fz4-FLAGはこの肥大化エ

ンドソームに蓄積し、Fz4 とUBPY^{C748A}はよく共局在した (Fig. 2-10 B-B’’)。この時、Fz4-FLAGはユビキチン化タンパク質とよく共局在した (Fig. 2-10 C-C’’)。これらの結果から、FzはエンドソームにおけるUBPYの基質であることが示唆された。

1.3.9 UBPY は Frizzled の分解を抑制する

UBPYがFz4 のユビキチン化レベルを変化させることで、Fz4 の分解を制御するか調べた。HeLa細胞にFz4-FLAGおよびHA-UBPY^{C748A}、HA-UBPY^{S680A}を過剰発現させ、細胞表面をbiotin化した時点を0時間とし、Wnt3a C.M.で刺激をした。Lysateを回収し、anti-FLAG抗体でIP、streptavidin-Peroxidase (POD) でIBすることによりbiotin化されたFz4-FLAGを検出した (Fig. 2-11 A)。UBPY^{C748A}過剰発現では分解レベルはmockと顕著な違いは見られなかったが、UBPY^{S680A}過剰発現では分解が抑制された (Fig. 2-11 B)。UBPY^{S680A}過剰発現下ではFz4 の分解経路への選別が抑制され、安定化することが示唆された。

UBPY を過剰発現させたショウジョウバエの wing disc において、Fz2-FLAG の発現を誘導後0時間、またはその3時間後に解剖、固定した。発現誘導直後には、Fz2-FLAG は wing disc 全体に強く発現が見られる (Fig. 2-11 C, D)。そして、3 時間後のコントロールではFz2-FLAG はほぼ分解されつつあったが (Fig. 2-11 E)、UBPY を過剰発現した wing disc では、UBPY 過剰発現領域特異的に Fz2-FLAG の強い染色が見られた (Fig. 2-11 F)。UBPY は生体内でも Fz を安定化することが示唆された。

以上より、UBPY は Fz のユビキチンを取り外して分解を抑制することにより、Wnt シグナルを正に制御することが示唆された。

1.3.10 慢性リンパ性白血病 CLL における UBPY、STAM1、AMSH-LP の高発現

Wnt シグナルは生物の発生だけでなく、様々なヒトの疾患にも関与する (Moon et al., 2004)。そのなかに、最も一般的なヒト白血病の一つであるヒト慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia; CLL) がある。CLL では、アポトーシスの抑制により悪性 B 細胞の生存が長くなると考えられている。正常な B 細胞では、Wnt は分化の初期にその成長と生存を制御している。しかし、CLL では複数の Wnt リガンドや Fz 受容体遺伝子の mRNA 発現が上昇しており、その中のいくつかは、約 5 年で死に至る悪性度の高い CLL でさらに発現が亢進している。また、薬剤による Wnt シグナル (canonical 経路) の活性化は CLL の生存を高め、逆にその抑制は CLL のアポトーシスを活性化することが報告されている (Lu et al., 2004)。これらのことから、Wnt シグナルは CLL の悪性化に関与することが示唆されている。

データベース BioExpress を使って UBPY 発現が異常になっている疾患を調べたところ、正常血球細胞とくらべて CLL 細胞で UBPY の mRNA が上昇していることがわかった。しかし、他の種類の白血病、たとえば急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia; AML)、慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia; CML)、急性リンパ性白血病 (acute lymphoid leukemia; ALL) では UBPY の有意な発現上昇はなかった。そして、UBPY と結

合する STAM1、STAM1 と結合する脱ユビキチン化酵素 AMSH-like protein (AMSH-LP) (Kikuchi et al., 2003) も、CLL で発現が上昇していた (Fig. 2-12)。

したがって、Wnt-Fz 遺伝子の転写亢進だけでなく、受容体のダウンレギュレーション機構を介した Wnt-Fz タンパクの安定化も CLL の悪性化に寄与しているかもしれない。

1.4 考察

Drosophila の翅において UBPY は Wnt シグナルを制御する

Sd-Gal4 による UBPY ノックダウンでは、翅の感覚毛の減少を含む、全体的な形態の異常が引き起こされた (Fig. 2-4)。その原因を調べたところ、Notch シグナルに顕著な変化は見られなかったが、Wg シグナルへの影響が見られた。Wg シグナルターゲット因子である Dll、vg^{QE}-lacZ の減少は非常に小さなものだったが、margin における A101 が顕著に減少した (Fig. 2-5)。UBPY ノックダウン翅の感覚毛の減少は、A101 で染まる SOP の減少によるものであり、すなわち SOP を誘導する Wg シグナルの減少であることが示唆された。モルフォジェンである Wg の機能は、その濃度によって異なる。vg や Dll の誘導には比較的低い Wg シグナルで十分であるが、SOP の誘導には vg や Dll が必要とするよりも強い Wg シグナルが必要である (Carl et al., 1997)。UBPY は、強い Wg シグナルが必要とされる領域で、そのシグナル強度を維持するはたらきをしているのかもしれない。

UBPY をノックダウンした wing disc では、Wg は正常に産生細胞から分泌されていたが、受容細胞内に蓄積していた。この蓄積が cell autonomous であったことから、UBPY ノックダウン翅で見られた Wg シグナルの減少は、Wg 受容細胞内でのシグナル伝達が減少したためであることが示唆された (Fig. 2-6)。また、UBPY ノックダウン細胞では Wg、ユビキチン化タンパク質、Fz が肥大化した後期エンドソーム内部に蓄積していた (Fig. 2-7)。UBPY ノックダウン細胞では、Wg-Fz 複合体のユビキチンが取り外されない状態で後期エンドソーム内部に取り込まれ、シグナルは遮断されている状態で蓄積していると考えられる。

UBPY はエンドソーム上で Frizzled を脱ユビキチン化する

培養細胞での Wnt レポーターアッセイの結果より、UBPY は哺乳動物細胞でも Wnt シグナルを正に制御することがわかった (Fig. 2-8 A)。UBPY が β -catenin や Dvl より上流で (Fig. 2-8 B, C)、Fz を介して Wnt シグナルを制御する可能性が示唆されたことから、Fz のユビキチン化について調べた。

Fz がユビキチン化を受けることはこれまで報告されていなかったが、Fz4-FLAG はユビキチン化されることがわかった。ドミナントネガティブ変異体 UBPY^{C748A} や UBPY ノックダウンによって Fz のユビキチン化レベルが上昇したこと、UBPY と Fz4-FLAG が結合したことから、Fz4-FLAG は UBPY の基質であることがわかった (Fig. 2-9)。

しかしながら、UBPY が Fz 以外の Wnt シグナル因子に対しても脱ユビキチン化を行い、Wnt シグナルを制御する可能性も残されている。Wnt シグナルでは、 β -catenin が常にユビキチン化・分解を受け、Wnt 刺激によって安定化してシグナルが伝えられることが知られている。UBPY が β -catenin のユビキチン化を制御するか調べたが、UBPY によるユビキチン化レベルの制御はみられなかった (not shown)。また β -catenin を基質とする脱ユビキチン化酵素として Faf が報告されており、UBPY が β -catenin を制御する可能性は少ないと考えられる (Taya et al., 1999)。

また、Fz4 とUBPY^{C748A}を同時に過剰発現させると、これらは肥大化したエンドソームによく共局在した (Fig. 2-10)。UBPY機能阻害が初期エンドソームへ基質であるユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こすことが示唆されており (Mizuno et al., 2006)、Fz4-FLAGのUBPYによる脱ユビキチン化の場合はRTKsと同様にエンドソーム上であると考えられる。

UBPY は Frizzled を安定化して Wnt シグナルを正に制御する

UBPY^{S680A}を過剰発現したHeLa細胞では、Fz4-FLAGの分解が抑制された。また、UBPYを過剰発現させたwing discでもFz2-FLAGの分解が抑制された (Fig. 2-11)。すなわち、UBPYはエンドソーム上でFzのユビキチンを取り外して安定化することにより、シグナル制御をしていることが示唆される (Fig. 2-13 A)。

ショウジョウバエの Wing disc の margin においては Wg によって Fz の発現レベルが抑制されている (Cadigan et al., 1998)。Wg 受容細胞の Fz レベルを制御することで、SOP 誘導に必要な Wnt シグナルを、SOP を誘導する必要がある細胞だけが受けられるよう制御されていると考えられる (Fig. 2-13 B)。また、Fz の発現亢進が疾患の悪性化に関与することが示唆されている CLL において、UBPY が高発現していることがわかった (Fig. 2-12 A)。UBPY による Fz タンパク質の安定化は、生物の発生や疾患の進行において重要な役割を果たしているかもしれない。

今後、Fz のユビキチン化酵素の同定されることで、さらに Fz のユビキチン化による Wnt シグナル制御メカニズムが明らかになると期待される。

Figure legends

Fig. 2-1 *Drosophila melanogaster* を用いた実験系

(A) キイロショウジョウバエの生活環。生まれた卵 (embryo) は、1 日で孵化し、幼虫 (larva) となる。幼虫は 1 齢幼虫 (1 日)、2 齢幼虫 (1 日)、3 齢幼虫 (2 日) を経て蛹 (pupa) となる。5 日間かけて成熟し、成虫となる。

(B) X-Gal4 による Y 遺伝子の発現誘導。X-Gal4 をもつハエと UAS-Y をもつハエを掛け合わせて生まれたハエでは、X-Gal4 発現領域で Y 遺伝子の発現が誘導される。

(C) X-Gal4 による Z 遺伝子のノックダウン。X-Gal4 をもつハエと UAS-Z IR をもつハエを掛け合わせて生まれたハエは、X-Gal4 発現領域で Z 遺伝子の発現がノックダウンされる。

Fig. 2-2 Wnt / Wingless (Wg) シグナリング

(A) mouseFz4 の構造の模式図。CRD で Wnt と相互作用する。7 回膜貫通型受容体であり、細胞膜によって、細胞外領域と細胞内領域に分けられる。細胞内領域のリジン残基を K で示した。

(B) Wnt/Wg canonical (β -catenin) 経路の模式図。詳細は本文参照。

Fig. 2-3 *Drosophila melanogaster* UBPY の同定

(A) *Homo sapiens* UBPY のドメイン構造。MIT、RHOD、SBM、USP ファミリーの特徴である Cys-box および His-box を酵素活性中心としてもつ。

(B) *Drosophila melanogaster* UBPY (CG5798) のドメイン構造。MIT、RHOD、SBM、Cys-box および His-box をもつ。

(C) sd-Gal4 により UBPY ノックダウンまたは過剰発現を行った wing disc から lysate を回収し、FK2 抗体で IB した (top)。Loading control として anti-tubulin 抗体で IB した (bottom)。

Fig. 2-4 UBPY ノックダウンによる翅の表現型

ハエの成虫の翅の全体像 (top; wing margin の感覚毛を矢頭で示す) と、margin の拡大図 (bottom) を示す。

(A) コントロール (sd-Gal4>GFP IR)

(B) UBPY RNAi-1 (sd-Gal4>lacZ; UBPY IR-1)

(C) UBPY RNAi-2 (sd-Gal4>UBPY IR-2)

(D) rescue (sd-Gal4>UBPY-IR-1; dUBPY)

(E) partially rescued knockout (dUBPY/dUBPY; -/-)

Fig. 2-5 UBPY ノックダウンは、Notch シグナルではなく Wingless シグナルを減少させる

(A-L) コントロール (Sd-Gal4>GFP IR ; A, C, E, G, I, K) とUBPYノックダウン (sd-Gal4>UBPY IR ; B, D, F, H, J, L) の3齢幼虫wing discを各種マーカーで染色した; anti-Cut (A, B), vg^{BE}-lacZ (C,D), Wg-lacZ (E, F), anti-Dll (G, H), vg^{QE}-lacZ (I, J), A101 (K, L; marginのSOPを矢印で示した)。

(M) 幼虫から成虫になるまでの発生における wing disc の形態変化と、margin (赤線)、SOP (青丸) の位置を模式的に示した。

Fig. 2-6 UBPY ノックダウンにより Wingless が受容細胞内に蓄積する

(A-D) コントロール (sd-Gal4>GFP IR ; A,B) と UBPY ノックダウン (sd-Gal4>UBPY IR ; C, D) の3齢幼虫 wing disc の細胞外 Wg (A, C) および細胞内 Wg (B, D) を染色した。矢頭で細胞内に蓄積した Wg を示す (B, D)。

(E-E'') UBPYノックダウンクローン (GFP⁺) をつくり、wing discをanti-Wgで染色した。Wgはcell autonomousに蓄積した。Bar=10 μm

Fig. 2-7 UBPY ノックダウンにより Wingless、Frizzled、ユビキチン化タンパク質は後期エンドソームへ蓄積する

(A-F'') コントロール (sd-Gal4>GFP IR ; A-A'', C-C'', E-E'')、UBPY ノックダウン (sd-Gal4>UBPY IR ; B-B'', D-D'', F-F'') の3齢幼虫 wing disc を、anti-Wg および anti-Rab5 抗体 (A-A'', B-B''), anti-Wg および anti-Rab7 抗体 (C-C'', D-D''), anti-Wg および anti-Rab11 抗体 (E-E'', F-F'') で染色した。Inset; 拡大図。Bars= 10 μm

(G-G'', H-H'') hs-Fz2-FLAG をもつコントロール (sd-Gal4>GFP IR ; G-G'') または UBPY ノックダウン (sd-Gal4>UBPY IR ; H-H'') ハエの3齢幼虫を 37°C で 40 分 heat shock し、28°C で 3 時間インキュベートした。Wing disc を取り出し、anti-FLAG および anti-Rab7 抗体で染色した。(G-G'')では anti-FLAG 染色の取り込み強度を上げている。

(I, J) コントロール (sd-Gal4>GFP IR ; I) と UBPY ノックダウン (sd-Gal4>UBPY IR ; J) の3齢幼虫の wing disc を FK2 抗体で染色し、1 μm ずつ深さを変えて取り込んだ画像を重ねて示した。Bars=100 μm

(K-K'', L-L'') コントロール (sd-Gal4>GFP IR ; K-K'') または UBPY ノックダウン (sd-Gal4>UBPY IR ; L-L'') の3齢幼虫 wing disc を、FK2 および anti-Rab7 抗体で染色した。(K-K'') では FK2 染色の取り込み強度を上げている。Bars=10 μm

Fig. 2-8 UBPY は哺乳動物細胞で Wnt シグナルを正に制御する

(A) HEK293T 細胞に、TOPFlash または FOPFlash、pRh-SV40、FLAG-UBPY または FLAG-UBPY^{C748A}、FLAG-BPY^{S680A} をトランスフェクションし、Wnt3a または control C.M. で一晩インキュベートした。Firefly luciferase、rhenilla luciferase を測定し、firefly / rhenilla の値をレポーター活性とした (**p* < 0.05 *t*-test)。

(B) HEK293T 細胞に、FLAG-UBPY または FLAG-UBPY^{C748A}、FLAG-UBPY^{S680A} をトランス

フェクションし、Wnt3a またはcontrol C.M.で一晩インキュベートした。細胞分画し、膜画分と細胞質画分を分けてそれぞれIBした。細胞質画分をanti- β -catenin (top)、anti-FLAG (third from top)、loading control としてanti-tubulin (second from top) でIBした。膜画分をanti- β -catenin (second from bottom) 、anti-FLAG (bottom) でIBした。

(C) NIH-3T3 細胞にFLAG-UBPYまたはFLAG-UBPY^{C748A}、FLAG-BPY^{S680A}をトランスフェクションし、Wnt3a またはcontrol C.M.で一晩インキュベートした。Lysateをanti-Dvl2 (top)でIBした。非リン酸化Dvl2 を黒い矢頭で、リン酸化Dvl2 を白い矢頭で示した。FLAG-UBPYの発現を確認するためにanti-FLAGで (second from top)、loading controlとしてanti-tubulin (bottom) でIBした。

Fig. 2-9 Wnt 受容体 Frizzled は UBPY の基質である

(A) HeLa細胞にFz4-FLAG、HA-UBPY^{C748A}をトランスフェクションし、Wnt3a C.M.で 30 分刺激後、Hot-SDS-lysis法でlysateを回収した。anti-FLAG抗体でIPし、FK2 抗体 (top)、anti-FLAG抗体 (second from top) でIBした。Lysateをanti-HAでIBし、HA-UBPY^{C748A}の発現を確認した (bottom)。

(B) 2 種類の UBPY siRNA 発現ベクターをトランスフェクションして UBPY をノックダウンした HeLa 細胞に、Fz4-FLAG をトランスフェクションした。Wnt3a C.M.で 30 分刺激後、Hot-SDS-lysis 法で lysate を回収し、anti-FLAG 抗体で IP、FK2 抗体 (top)、anti-FLAG 抗体 (second from top) で IB した。lysate を anti-UBPY 抗体で IB することにより UBPY のノックダウンを確認し (third from top)、loading control として anti-tubulin 抗体で IB した (bottom)。

(C) HeLa細胞に、Fz4-FLAGまたはFz4^{K0}-FLAG、HA-UBPY^{C748A}をトランスフェクションした。細胞表面をbiotin化してからlysateを回収し、一部をanti-HA抗体でIBした (bottom)。残りのlysateからstreptavidin-sepharoseでbiotin化タンパク質を精製し、anti-FLAG抗体でIP、FK2 抗体 (top)、anti-FLAG抗体 (second from top) でIBした。

(D) HeLa細胞にFz4-FLAG、HA-UBPY、HA-UBPY^{C748A}をトランスフェクションし、lysateを回収した。Anti-FLAG抗体でIPしたサンプルをanti-HA (top)、anti-FLAG (second from top) 抗体でIBした。HA-UBPYの発現を確認するために、lysateをanti-HAでIBした (bottom)。

Fig. 2-10 UBPY は Frizzled をエンドソーム上で脱ユビキチン化する

(A-A'') HeLa 細胞に Fz4-FLAG をトランスフェクションし、anti-FLAG および FK2 抗体で染色した。

(B-C'') HeLa細胞にFz4-FLAGとHA-UBPY^{C748A}をトランスフェクションし、anti-FLAGおよびanti-HA抗体 (B-B'')、anti-FLAGおよびFK2 抗体 (C-C'') で染色した。

asterisk (*) で核を示す。

Fig. 2-11 UBPY は Frizzled の分解を抑制する

(A) HeLa細胞にFz4-FLAGおよびHA-UBPY^{C748A}、HA-UBPY^{S680A}を過剰発現させ、細胞表面をbiotin化した。Wnt3a刺激後 0、3、6 時間後に細胞を回収し、anti-FLAG抗体でIP、streptavidin-POD (top) とanti-FLAG (second from top) でIBした。UBPYの発現は、lysateをanti-HA抗体でIBすることにより確認した (bottom)。

(B) (A) の anti-FLAG 抗体で IP、streptavidin-POD で IB した biotin 化 Fz4 バンド (A; top) と IP・IB anti-FLAG 抗体の全 Fz4 量バンド (A; second from top) を定量した。biotin 化 Fz4 の値を全 Fz4 量の値で割り、刺激 0 時間の値を 1 として分解レベルを算出した (* $p < 0.01$ t -test)。

(C-F) hs-Fz2-FLAG をもつコントロール (sd-Gal4>GFP IR / hs-Fz2-FLAG ; C, E) と dUBPY 過剰発現 (sd-Ga4>dUBPY / hs-Fz2-FLAG ; D, F) のハエの 3 齢幼虫を 37°C で 40 分 heat shock した。その後 0 時間 (C, D) または 3 時間 (E, F) 25°C インキュベートしてから wing disc をとりだし、anti-FLAG 抗体で染色した。Bars=100 μ m

Fig. 2-12 慢性リンパ性白血病 CLL における UBPY、STAM1、AMSH-LP の高発現

(A-C) BioExpress データベースより取得した、正常、急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia; AML)、微分化急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia, minimal differentiation; AML-MO)、慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia; CLL)、慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia; CML) の白血球細胞 における、UBPY (A)、STAM1 (B)、AMSH-like protein (AMSH-LP) (C) の遺伝子発現 value。個別サンプルにおける各 mRNA 発現量の値を黒で、同種細胞サンプル全てから求めた平均値を赤で示す。

(D) 各種類の細胞における UBPY、STAM1、AMSH-like protein それぞれの mRNA 発現量の平均値 (average)、その p -value (t -test)、平均値より算出した正常細胞に対する相対量 (fold change) を示す。Normal (n=49), AML (n=2), AML-MO (n=4), CLL (n=37), CML (n=5)

Fig. 2-13 UBPY による Wnt シグナル制御のモデル

(A) UBPY による Wnt シグナル制御のモデル図。Wnt-Fz はシグナルを出しつつ細胞内に取り込まれる。UBPY はエンドソーム上で Fz のユビキチンを取り外し、後期エンドソームへの取り込みとそれに続くリソソームでの分解を抑制する。

(B) wing disc における Wg タンパク質の濃度勾配と、Fz の発現。Wing disc における Fz の発現は Wg によって抑制される。Margin に近接した位置で SOP が誘導される。UBPY は、SOP の誘導に十分な Wnt シグナルに必要な Fz タンパク質量を維持するはたらきがあるかもしれない。

第 2 章

細胞質分裂と脱ユビキチン化酵素

第2章 細胞質分裂と脱ユビキチン化酵素

2.1 背景

2.1.1 細胞質分裂

細胞分裂は、染色体の分配を行う有糸分裂 (mitosis) とそれに続く細胞質が2つに分離する細胞質分裂 (cytokinesis) から成る。有糸分裂では、複製された染色体は紡錘体によって細胞内で二組に分けられる。動物細胞の細胞質分裂では、アクチンとミオシンでできた収縮環が細胞質を絞り込んで分裂溝というくびれが生じ、やがて完全にくびり切られる (Fig. 3-1 A)。

本研究では、HeLa 細胞を tubulin と DNA で染色した形態から細胞質分裂を4つのステージに分けた (Fig. 2-1 C)。ステージ1 (S1) では、2つの核の間に分裂溝と、微小管を主成分とする central spindle が現れる。このとき、クロマチンは有糸分裂時に凝集したままである。ステージ2 (S2) では分裂溝がさらに深くなり、central spindle は圧縮され始める。凝集していたクロマチンは脱凝集を始める。ステージ3 (S3) では、central spindle の圧縮とクロマチンの脱凝集がさらに進行するが、娘細胞の形は依然丸いままである。細胞質分裂の最終ステージであるステージ4 (S4) では、細胞は dish に接着をはじめ、2つの娘細胞をつなぐ central spindle は非常に細くなる。この時期の central spindle の中央領域を midbody と呼ぶ。最終的に midbody が切断されること (abscission) で、細胞質分裂は終了する。

central spindle には、細胞質分裂に必要な様々な因子が局在していることが報告されている (Fig. 2-1 D)。例えば、Mitotic kinesin MKLP1・2 や Rho GTPase-activating protein MgcRacGAP、Aurora B kinase、Cep55 などである (Zhao et al., 2006)。これらが適切に細胞質分裂を制御するには central spindle への局在が必要であり、central spindle は細胞質分裂において非常に重要な領域であるといえる。

2.1.2. 細胞質分裂におけるメンブレントラフィック

植物細胞の細胞質分裂は動物細胞の細胞質分裂とは異なり、有糸分裂によって形成された2つの核の間に細胞板とよばれる仕切りが形成される (Fig. 3-1 B)。この過程で、小胞の融合が起こることは古くから知られていた。有糸分裂終期から細胞内で古い紡錘体の赤道面に細胞膜の原料が詰まったゴルジ体由来の小胞が集まり、融合して新しい細胞壁を形成する (Segui-Simarro et al., 2004)。

最近の顕微鏡や蛍光プローブ技術の発達にともない、動物細胞の細胞質分裂でも細胞質分裂に膜融合が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある (Fig. 3-1 D)。アフリカツメガエル卵割では、分裂溝付近へのエキソサイトーシス様の小胞の融合が起こっており、それは細胞質分裂に必要な膜を供給していると考えられている (Danilchik et al., 2003)。C.elegans や Drosophila の解析からは、ゴルジ由来の小胞が膜の供給源であることが示唆されている (Skop et al., 2002, Farkas et al., 2003)。S2 (Drosophila melanogaster shnider No.2)

細胞と RNAi ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニング (Echard et al., 2004)、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞の midbody へ局在するタンパク質のプロテオーム解析 (Skop et al., 2004) から、分泌・膜融合関連タンパク質が多く細胞質分裂に関与することが示唆されている。細胞質分裂に関与する膜融合関連タンパク質の一つに、SNARE 因子がある。SNARE は 2 種類がセットになって小胞と膜の融合を制御すると考えられており、小胞上の vesicular-SNARE (v-SNARE) と標的膜上の target-SNARE (t-SNARE) が特異的に結合することにより、輸送小胞と標的膜の特異的な融合を行う (Fig. 3-1 E)。そして細胞質分裂を制御する v-SNARE として VAMP8/endobrevin、t-SNARE として Syntaxin2 が同定されている (Fig. 3-1 D ; Low et al., 2003)。しかし、膜輸送による細胞質分裂制御機構の解明はまだ始まったばかりである (Albertson et al., 2005)。

2.1.3 UBPY の活性制御

UBPY は、細胞周期依存的にその脱ユビキチン化活性が制御されている。すなわち、間期には UBPY の 680 番目のセリンのリン酸化依存的に 14-3-3 が結合することにより活性が抑えられているが、M 期（細胞分裂期）には 14-3-3 が解離し、活性抑制が解除される (Mizuno et al., 2007)。しかしながら、これまでに知られている EGF 受容体ダウンレギュレーション制御などの UBPY の機能以外に、細胞周期依存的な機能は明らかとなっていない。そこで本章では、細胞質分裂における UBPY の機能に着目して解析した。

2.2 実験材料および手法

細胞培養、トランスフェクション

HeLa細胞・NIH-3T3細胞・COS-7細胞は、FBS、ペニシリン-ストレプトマイシンを含む 4.5 mg/l glucose DMEM培地 (SIGMA) により、37°C、5% CO₂条件下で培養した。トランスフェクションはFuGENE6 transfection reagent (Roche Diagnostics) を用いて、DNA 1 µgに対しFuGENE6 を 3 µl、DMEMを 100 µlの割合で行った。

発現ベクター

FLAGあるいはHAタグを付加したmouse UBPY、UBPY^{C748A}およびhuman AMSH発現ベクターは当研究室により作製された (pME-FLAGおよびpME-HAに挿入されている; Kato et al., 2000 ; Mizuno et al., 2005 ; Nakamura et al., 2006)。Mouse VAMP8 cDNAはW. Hong (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore) により供与され、pME-FLAGおよびpME-HAに挿入した。そのリジンをアルギニンに置換した変異体は、QuikChange site-directed mutagenesis system (Stratagene) により作製した。pEF-FLAG-syntaxin2、pEF-FLAG-SNAP23 は福田光則先生 (東北大学; Fukuda et al., 2005) より、HAタグを付加したモノユビキチン発現ベクターHA-Ub は鈴木俊顕先生 (東京都臨床研) より供与された。

RNA interference (RNAi)

UBPY および AMSH の siRNA 発現ベクターは、当研究室で human UBPY の coding region 191-209 (5'-TGAAATACGTGACTGTTTA-3' ; siRNA-1、当研究室・水野作製)、3290-3310 (5'-AATCTTCAGCAGCTTATATCC-3' ; siRNA-2、当研究室・井浦作製)、AMSH の coding region 652-670 (5'-CCTTCAGACTGTACACAA-3' ; siRNA-1)、1031-1049 (5'-TCTCCAGTGTGACCTACA-3' ; siRNA-2) (当研究室・小林作製) をターゲットサイトとして設計、哺乳動物細胞用 siRNA 発現ベクターpSilencer 1.0-U6 (Ambion) に組み込み作製された。siRNA 発現ベクターは 48 時間おきに 2 回トランスフェクションした。他のコンストラクトを発現させる場合は、2 回目のトランスフェクションの際に siRNA 発現ベクターと共にトランスフェクションした。

免疫沈降、ウェスタンブロッティング

細胞をRIPA buffer (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A) で回収、氷上 30 分可溶化し、12000 × gで 15 分遠心した上清をlysateとした。タンパク質のユビキチン化を検出する際には、10 mM NEMを添加した。IPはprotein A Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) およびmouse monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich)またはrabbit polyclonal anti-VAMP8 (Synaptic Systems)、lysateを混ぜ一晩インキュベートし

たのち、ビーズをwash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40) で 5 分 × 3 洗浄し、ビーズに結合したタンパク質をLaemmli sample bufferで溶出した。

溶出したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、通常の手順で IB した。一次抗体として mouse monoclonal anti-multi ubiquitin FK2 (1 µg/ml, MBL ; Fujimuro et al., 2005)、mouse monoclonal anti-FLAG M2 (4 µg/ml, Sigma-Aldrich)、rabbit polyclonal anti-UBPY (1:500 ; Kato et al., 2000)、mouse monoclonal anti-HA (0.4 µg/ml, Roche Diagnostics)、mouse monoclonal anti- α -tubulin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) を使用した。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 抗体または anti-rabbit IgG 抗体 (1:20000, GE Healthcare) を用い、ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare) を用いて発光、検出した。

免疫蛍光染色

細胞をPBSで洗浄後、100%メタノールあるいは4% PFAを含むPBSで氷上 10 分間固定し、後者の場合は 0.2% Triton X-100 または 0.05% saponinを含むPBSで 10 分間可溶化した。その後 5% FBSを含むPBS (blocking buffer) でブロッキングし、1 次抗体で 1 時間染色した。使用した 1 次抗体は次のとおり ; mouse monoclonal anti-multi ubiquitin clone FK2 (1 µg/ml, MBL ; Fujimuro et al., 2005)、rabbit polyclonal anti-UBPY (1:500 ; Mizuno et al., 2005)、mouse monoclonal anti-AMSH (10 µg/ml ; Tanaka et al., 1999 ; 田中伸幸先生 (宮城がんセンター) より供与)、mouse monoclonal anti- α -tubulin (40 µg/ml, Sigma-Aldrich)、rabbit polyclonal anti- β -tubulin (1 µg/ml, Abcam)、rabbit polyclonal anti-FLAG (0.4 µg/ml, Sigma-Aldrich)、rabbit polyclonal anti-HA (2 µg/ml, Sigma-Aldrich)、mouse monoclonal anti-Aurora B (2.5 µg/ml, BD Biosciences Transduction laboratories)、rabbit polyclonal anti-MKLP1 (10 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology)、rabbit polyclonal anti-Hrs (1:2000 ; Komada et al., 1997)、mouse monoclonal anti-EEA1 (1 µg/ml, BD Transduction Laboratories)、rabbit polyclonal anti-LAMP1、anti-LAMP2 (1:2000 ; Carlsson et al., 1998 ; Dr. M. Fukuda (The Burnham Institute) より供与)、mouse monoclonal anti-LBPA (1:10 ; Kobayashi et al., 1998 ; 小林俊秀先生 (RIKEN, Wako) より供与)、rabbit polyclonal anti-VAMP8 (1:30, Synaptic Systems)、rabbit polyclonal anti-GFP (2 µg/ml, Molecular Probes)。ユビキチン化タンパク質とユビキチン鎖の競合実験では、FK2 抗体 0.03 µg と 0.5 µg のユビキチン鎖 (K48- or K63-linked, Ub₂₋₇, Boston Biochem) と混ぜて 1 時間インキュベートしてから使用した。

PBS で 5 分 × 3 回洗浄後、blocking buffer で希釈した二次抗体を 1 時間、室温で反応させた。二次抗体には Alexa-488 または Alexa-594-conjugated anti-mouse IgG 抗体または rabbit IgG 抗体 (1:1000, Molecular Probes) を用いた。DNA (核) の染色には、SYTOX Green Nucleic Acid Stain (1:10000, Molecular Probes/Invitrogen) あるいは TO-PRO-3 iodide (642/661) (1:200, Molecular Probes/Invitrogen) を使用した。

サンプルは VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc.) で封入し、共焦点顕微鏡 (LSM5, Carl Zeiss) を用いて観察、画像を取得した。

2.3 結果

2.3.1. UBPY は細胞質分裂期に central spindle に局在する

細胞分裂期（M 期）の UBPY 機能を探るため、M 期の HeLa（ヒト子宮頸癌細胞由来）細胞における UBPY の局在を調べた。間期における内在性 UBPY は、細胞質に広がった局在を示す。しかし、細胞質分裂後期の細胞では、細胞質への染色に加えて細胞がくびりきれ部分、anti-tubulin 抗体で強く染まる central spindle に局在することがわかった。そして、この局在は細胞質分裂の終期ステージ 4 に限られたもので、2 本のバンドのパターンを示した（Fig. 3-2 A-A''）。また、NIH-3T3（マウス繊維芽細胞由来）細胞や COS-7（アフリカミドリザル腎臓由来）細胞でも、同様の局在が観察された（Fig. 3-2 B-B'', C-C''）。この染色は他のウサギを利用して作製された anti-UBPY 抗体でも見られたが、免疫前の抗血清では検出されなかった（not shown）。

また、HeLa 細胞に過剰発現させた FLAG-UBPY も、同様の局在を示した（Fig. 3-2 D-D''）。これらの結果から、内在性の UBPY および過剰発現させた UBPY の一部は細胞質分裂期ステージ 4 において central spindle に 2 本のバンドのパターンで局在することがわかった。

2.3.2. AMSH は細胞質分裂期に central spindle に局在する

UBPY と同様に、AMSH もエンドソーム上で働く脱ユビキチン化酵素である。AMSH の細胞分裂期における細胞内局在を調べたところ、AMSH も細胞質分裂中に central spindle に局在した。しかし、その時期と局在パターンは UBPY とは異なっていた。AMSH の central spindle への局在はステージ 1 からステージ 4 の細胞質分裂期を通じたもので、またおそらくリング状の構造であるため、1 本のバンド（Fig. 3-3 A-A'', B-B'', D-D''）あるいはリング状（Fig. 3-3 C-C''）に観察された。また、間期の細胞では、AMSH は midbody remnant と呼ばれる、細胞分裂後に片方の娘細胞に受け継がれる midbody 由来の構造体にも局在することが観察された（Fig. 3-3 B-B'', C-C'' asterisk）。この内在性 AMSH の局在は COS-7 細胞や NIH-3T3 細胞でも同様に観察された（Fig. 3-3 E-E'', F-F''）。また、HeLa 細胞に過剰発現させた FLAG-AMSH も同様に central spindle へ局在した（Fig. 3-3 G-G''）。

2.3.3. ユビキチン化タンパク質は細胞質分裂期に central spindle に局在する

脱ユビキチン化酵素が central spindle に局在することは、その基質となるユビキチン化タンパク質が存在することを示唆している。そこで、抗ユビキチン化タンパク質抗体 FK2 を用いて細胞分裂中の HeLa 細胞におけるユビキチン化タンパク質の局在を調べた。間期の細胞では、ユビキチン化タンパク質は細胞質に薄いぼやけた染色を示すが、細胞質分裂中の細胞では、central spindle に強い 2 本のバンドの染色が見られた。このシグナルは細胞質分裂初期のステージ 1 で見られ始め、ステージ 2 で最も強く、ステージ 3 にかけて減少し、細胞質分裂終期のステージ 4 では消失した（Fig. 3-4 A-D''）。同様の染色は、COS-7 細胞および NIH-3T3 細胞でも観察された（Fig. 3-4 E-E'', F-F''）。この FK2 抗体によるユビキチン化タ

ンパク質の染色が非特異的なものではないことを確認するため、FK2 抗体をユビキチン鎖とインキュベートしてから染色に用いた。すると、細胞質および central spindle のシグナルは競合させたユビキチン鎖量依存的に減少し (data not shown)、FK2 は内在性のユビキチン化タンパク質を認識していることが確認できた (Fig. 3-4 G-I)。また、HA タグが付加されたモノユビキチンを細胞に過剰発現させ、anti-HA 抗体と FK2 抗体で染色した。HA タグ付きのユビキチンも同様に central spindle へ局在し、FK2 の染色とよく共局在した (Fig. 3-4 J-J')。

次に、ユビキチン化タンパク質と脱ユビキチン化酵素が共局在するかどうか調べた。UBPY はステージ 4 に、ユビキチン化タンパク質はステージ 1~3 にと、central spindle に局在するステージが異なる。その一方で AMSH とユビキチン化タンパク質は共にステージ 2~3 において同時期に central spindle に局在する。そこで、FK2 抗体と anti-AMSH 抗体はともにマウス由来であり共染色できないため、HA-Ub と AMSH の局在を調べた (Fig. 3-4 K-K')。AMSH 陽性のリング状の構造は HA-Ub 陽性の 2 本のバンドにはさまれた位置であり、同時期に central spindle に局在しながらも、両者の局在は一致しなかった。UBPY、AMSH、ユビキチン化タンパク質は central spindle において共局在しないことがわかった。

2.3.4. ユビキチン化タンパク質・UBPY・AMSH は細胞質分裂に重要な領域に局在する

central spindle には、細胞質分裂に必要な不可欠な因子が数多く局在する。そのうちの一つ、MKLP1 は central spindle の中央領域に局在し、Aurora B kinase はそれをはさむ領域に局在する (Fig. 3-1; Gruneberg et al., 2004)。これらの因子をマーカーとして用いて、ユビキチン化タンパク質、UBPY および AMSH の局在を調べた。ユビキチン化タンパク質の central spindle への局在レベルが一番高いステージ 2 において、ユビキチン化タンパク質と Aurora B は共局在した (Fig. 3-5 A-A')。しかし、ユビキチン化タンパク質は MKLP1 をはさむ領域に局在し、MKLP1 とは共局在しなかった (Fig. 3-5 B-B')。UBPY は central spindle に局在するステージ 4 において Aurora B と共局在した (Fig. 3-5 C-C')。それに対し、central spindle の AMSH 陽性リングは、MKLP1 が局在する central spindle 中央領域に局在した (Fig. 3-5 D-D')。これらの結果より、細胞質分裂に重要な役割を果たす因子が局在する重要な領域で、タンパク質のユビキチン化と脱ユビキチン化が起こっていることが示唆された。

2.3.5. UBPY・AMSH の central spindle への局在メカニズムについて

UBPY や AMSH は、エンドソーム上で Hrs/STAM 選別因子複合体や ESCRT-III と相互作用する (Clague et al., 2006 ; Row et al., 2007)。UBPY や AMSH の細胞質分裂期の central spindle への局在メカニズムが、これまで知られているエンドソームへの局在メカニズムと同じであるのか調べるために、エンドソーム関連因子とエンドソームマーカーの細胞質分裂期における局在を調べた。Hrs および STAM はいずれもステージ 4 に central spindle 中央部に局在した (Fig. 3-6 A-A', B-B')。すなわち、AMSH は Hrs/STAM とステージ 4 で

のみ共局在するものの、ステージ 1~3 では共局在しなかった。また、UBPY と Hrs/STAM は局在パターンが異なっていた。

それに対し、初期エンドソームマーカー EEA1 や後期エンドソームマーカー LAMP1、LAMP2 (not shown)、LBPA は細胞質分裂期の細胞の central spindle には全く局在しなかった (Fig. 3-6 C-E)。これらのことから、UBPY や AMSH の central spindle への局在は、それらのエンドソームへの局在メカニズムとは異なることが示唆された。

2.3.6. UBPY および AMSH は効率的な細胞質分裂に必要である

多くの細胞質分裂因子の機能障害は、細胞質分裂に失敗した結果として複数の核を含む多核化した細胞を生み出す。そこで、細胞の多核化を指標にして、UBPY や AMSH の細胞質分裂における機能を調べた。HeLa 細胞に RNAi 発現ベクターをトランスフェクションして UBPY あるいは AMSH をノックダウンし、細胞を固定した。Off target 効果の可能性を否定するために、異なる配列をターゲットサイトとしたベクターをそれぞれ 2 種類ずつ用いた (Fig. 3-7 A)。SYTOX Green で核を、抗 tubulin 抗体で細胞の形を染色し (Fig. 3-7 B)、共焦点顕微鏡下で多核となった細胞の割合を計測した (Fig. 3-7 C)。mock として、RNAi 空ベクターのみトランスフェクションした場合は、多核化した細胞の割合は $7\pm 2\%$ であったが、UBPY RNAi-1 と UBPY RNAi-2 をトランスフェクションした細胞ではそれぞれ $12\pm 1\%$ と $12\pm 2\%$ 、AMSH RNAi-1 と AMSH RNAi-2 をトランスフェクションした細胞では $18\pm 2\%$ と $17\pm 3\%$ であった。UBPY と AMSH を同時にノックダウンした場合も、多核化率は 17~20% であり、多核化率が加算的に増加することはない。

また、UBPY や AMSH をノックダウンした細胞で細胞質分裂のステージ 1 ~ 4 にある細胞の分布に違いが見られるか調べたところ、mock と有意な差は見られなかった (Fig. 3-7 D)。しかし、AMSH をノックダウンしたステージ 4 にある細胞では、mock より長い (約 20 μm 以上) midbody が観察された (Fig. 3-7 E 矢印)。そして、その異常な midbody には、ユビキチン化タンパク質が蓄積していた (Fig. 3-7 E 矢頭)。そこで、ステージ 4 の細胞で、長い central spindle をもつ細胞の数を数えてグラフ化したところ (Fig. 3-7 F)、UBPY ノックダウンでは変化は見られなかったが、AMSH ノックダウンではこのような細胞の数が有意に増加していた。これらのことから、UBPY や AMSH は細胞質分裂の進行ではなく、その最終ステップ abscission を制御することが示唆された。

2.3.7. VAMP8 は central spindle でユビキチン化を受ける

UBPY の機能障害はユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こし、これらユビキチン化タンパク質は UBPY の基質である可能性がある (Mizuno et al., 2006 ; Row et al., 2006) 。ドミナントネガティブ変異体 UBPY^{C748A} によって蓄積するユビキチン化タンパク質を liquid chromatography / mass / mass spectrometry (LC-MS/MS) により網羅的に同定した解析で、VAMP8 のアミノ酸 38 番目から 45 番目の GENLEHLR のペプチド断片が同定された (Mizuno et al., unpublished)。これは、VAMP8 自身がユビキチン化を受けるか、他のユビ

キチン化を受けるタンパク質と相互作用するということを意味する。v-SNAREである VAMP8 は、エンドソームの融合やエキソサイトーシスにおける膜融合を制御する因子である (Fig. 3-1 E ; Antonin et al., 2000 ; Wang et al., 2004)。それに加え、VAMP8 はcentral spindleに局在し、そのドミナントネガティブ変異体の過剰発現や、VAMP8 と結合する t-SNAREであるsyntaxin2 のノックダウンが細胞質分裂の最終ステップを阻害することから、VAMP8 は細胞質分裂にも関与することが示唆されている (Low et al., 2003 ; Zhao et al., 2006)。そこで、VAMP8 に着目して解析を行った。

HeLa 細胞における内在性の VAMP8 および過剰発現させた FLAG タグ付きの VAMP8 は、ステージ 2~4 に central spindle に局在し、ステージ 2~3 においては抗ユビキチン化タンパク質抗体 FK2 による染色と共局在を示した (Fig. 3-8 A-A", B-B")。間期における FLAG-VAMP8 はエンドソームに局在したが、その過剰発現によるエンドソームのユビキチン化タンパク質の増加はみられなかった (Fig. 3-8 C-C")。すなわち、VAMP8 は、central spindle でユビキチン化を受けることが示唆された。

そこで、VAMP8 がユビキチン化を受けているのか生化学的に調べた。VAMP8 は SNARE であることを特徴付ける SNARE モチーフと C 末端の膜貫通領域 (transmembrane region) をもつ。膜貫通領域にリジンは存在せず、膜貫通領域外に 7 つのリジンがある (Fig. 3-8 D)。ユビキチンはタンパク質のリジン残基に結合するため、これら膜貫通領域外の 7 リジン残基はユビキチンが付加される可能性がある。これらのリジンを、ユビキチン化を受けないアルギニンに置換した変異体を作製した。7 箇所のうち、24 番目と 47 番目と 57 番目のリジンをそれぞれアルギニンに置換した K24R、K47R、K57R 変異体、近接した 4 つのリジン (64、68、72、75 番目のリジン) をアルギニンに置換した 4KR 変異体および全てのリジンをアルギニンに置換した K0 変異体を作製した (Fig. 3-8 D)。これらの FLAG タグ付き野生型および変異型 VAMP8 を用いて VAMP8 のユビキチン化を調べた。FLAG-VAMP8 を発現させた HeLa 細胞 lysate を FLAG 抗体で IP、anti-FLAG 抗体で IB すると、どの変異体でもユビキチン化されていない FLAG-VAMP8 が検出される (Fig. 3-8 E, 左図)。野生型 VAMP8 および K24R、K47R、K57R 変異体では、ユビキチンが付加したと考えられる、約 8 kDa ずつシフトアップしたバンドが見られた。4KR 変異体では、これらのバンドは薄く、ユビキチンが 1 個または 2 個付加された分子量のバンドは検出されなかった。そして K0 変異体では、これらのシフトアップしたバンドは全く検出されなかった (Fig. 3-8 E, 左図)。これを抗ユビキチン化タンパク質抗体 FK2 で IB すると、モノユビキチン化タンパク質は親和性が低いためか検出できなかったが、ユビキチンが 2 個あるいは 3 個付加した分子量のバンドが検出された (Fig. 3-8 E, 右図)。この結果より、VAMP8 はユビキチン化を受けることがわかった。また、これらのバンドは、Hot-SDS-lysis 法でタンパク質相互作用を破壊する条件で行っても検出され、VAMP8 に結合するほかのユビキチン化タンパク質である可能性は除外できる (not shown)。

2.3.8. UBPY および AMSH は VAMP8 を脱ユビキチン化する

VAMP8 がUBPYやAMSHの基質であるかどうか調べるため、HeLa細胞にFLAG-VAMP8 およびHA-UBPY、ドミナントネガティブ変異体HA-UBPY^{C748A}、HA-AMSH、ドミナントネガティブ変異体HA-AMSH^{D348A}を過剰発現させ、抗FLAG抗体でIP、抗ユビキチン化タンパク質抗体FK2 でIBすることによりVAMP8 のユビキチン化レベルを調べた。野生型HA-UBPY やHA-AMSHを過剰発現させた際には、ユビキチンが2個あるいは3個付加したVAMP8 のバンドがうすくなり、ドミナントネガティブ変異体HA-UBPY^{C748A}、HA-AMSH^{D348A}を過剰発現させると、これらのバンドは濃くなった (Fig. 3-9 A)。また、ドミナントネガティブ変異体の過剰発現によって薄くモノユビキチン化フォームのVAMP8 も検出されるようになった。また、同じサンプルをanti-FLAG抗体でIPしanti-HA抗体でIBすると、共沈したHA-UBPY、HA-UBPY^{C748A}、HA-AMSH、HA-AMSH^{D348A} が検出され、UBPYとAMSHがVAMP8 と結合することがわかった (Fig. 3-9 A)。HeLa細胞でそれぞれ2種類のRNAiベクターを用いてUBPYやAMSHの発現をノックダウンし、FLAG-VAMP8 のユビキチン化レベルを調べた。UBPY、AMSHいずれのノックダウンによっても、VAMP8 のユビキチン化レベルは上昇した (Fig. 3-9 B)。

そして、内在性のVAMP8 のユビキチン化レベルも、UBPY^{C748A}やAMSH^{D348A}の過剰発現により上昇した (Fig. 3-9 C)。これらの結果から、VAMP8 はUBPYやAMSHによってcentral spindleで脱ユビキチン化を受けることが示唆された。

2.3.9. VAMP8 のユビキチン化の意味について

VAMP8 が脱ユビキチン化されないことによって VAMP8 の細胞内局在に影響があるか調べるため、HeLa 細胞においてUBPY、AMSH をノックダウンして内在性 VAMP8 の局在を調べた (Fig. 3-10 A-F)。UBPY、AMSH ノックダウンによっても VAMP8 は正常に central spindle に局在し、VAMP8 のユビキチン化はその central spindle への局在には関与しないことがわかった。

また、v-SNARE である VAMP8 と、その結合パートナーt-SNARE の Syntaxin2 および SNAP23 との結合がVAMP8のユビキチン化によって影響をうけるか調べた。HeLa細胞に、FLAG-Syntaxin2 あるいはFLAG-SNAP23および、HA-VAMP8を過剰発現させ、anti-FLAG抗体でIPし、抗ユビキチン化タンパク質抗体FK2でIBした (Fig. 3-10 G)。ユビキチンが2つ、あるいは3つ付加されたVAMP8が検出され、ユビキチン化したVAMP8はSyntaxin2やSNAP23と共沈し、ユビキチン化されたVAMP8はt-SNARE結合性を保持していることが示唆された。

2.4 考察

細胞質分裂において脱ユビキチン化酵素とユビキチン化タンパク質の central spindle への局在は、時期・位置的に制御される

本研究では、細胞質分裂中に central spindle の Aurora B 陽性領域においてタンパク質のユビキチン化が一時的に上昇することを明らかにし、細胞質分裂がユビキチン化によって制御されている可能性を示した (Fig. 3-4, 3-5)。ユビキチン化タンパク質は HeLa 細胞だけでなく、種と組織の異なる細胞株でも central spindle において同じ局在パターンを示すことから (Fig. 3-4)、これは少なくとも哺乳動物において一般的な制御機構であると考えられる。それに加え、エンドソームで機能すると考えられていた脱ユビキチン化酵素 UBPY・AMSH も細胞質分裂時には central spindle に局在することがわかった (Fig. 3-2, 3-3)。しかし、UBPY、AMSH、ユビキチン化タンパク質は局在時期・部位が異なり、これらが同時期に同じ位置に局在することはなかった (Fig. 3-11)。central spindle において AMSH はユビキチン化タンパク質の 2 本のバンドに挟まれる位置に局在し、UBPY はユビキチン化タンパク質と同じパターンであるが、ユビキチン化タンパク質が消失する細胞質分裂ステージ 4 にのみ central spindle に局在した。これは、central spindle におけるタンパク質のユビキチン化を時期・位置的に制御するメカニズムであると考えられる。AMSH は細胞質分裂期を通し、central spindle 中央領域に局在して脱ユビキチン化することによって、central spindle 中央領域でタンパク質がユビキチン化されることを防ぐ。このことは AMSH ノックダウン細胞でステージ 4 の central spindle でユビキチン化タンパク質が蓄積したことからも示唆される (Fig. 3-7 E)。そして、UBPY がステージ 4 に central spindle の中央領域をはさむ位置に局在するようになると、細胞質分裂の最終ステップでタンパク質のユビキチンが取り外される。UBPY と AMSH は、それぞれが特定の時期・位置に central spindle に局在することで、central spindle でのタンパク質のユビキチン化の時期・位置を厳密に制御していると考えられる (Fig. 3-11)。

また、MKLP1 や Aurora B など既知の細胞質分裂制御因子が central spindle に局在していることや、central spindle 局在タンパク質のスクリーニングから新たに細胞質分裂制御因子が同定されていることなどから、central spindle は細胞質分裂に重要な場所だと考えられる。この細胞質分裂に重要な場所で起こっている時期・位置の限定されたユビキチン化は、細胞質分裂に重要であると考えられる。

細胞質分裂における脱ユビキチン化酵素の役割

UBPY と AMSH の RNAi によるノックダウンで細胞質分裂が阻害されたことから、効率的な細胞質分裂には適切な脱ユビキチン化、タンパク質のユビキチン化の制御が必要であることが示唆された (Fig. 3-7 C)。この細胞質分裂阻害がそれほど強くなかったことは、UBPY や AMSH が細胞質分裂の効率を上げるために必要だが、不可欠ではないことを示唆する。また、UBPY や AMSH のノックダウンで細胞質分裂の進行に異常が見られなかったこと、

AMSH ノックダウン細胞で異常に長い midbody をもつ細胞が観察された (Fig. 3-7 D-G)ことから、central spindle における脱ユビキチン化は、abscission に必要であることが示唆される。しかしながら、本実験では実験ごとに一時的に RNAi vector をトランスフェクションし、5 日間かけて UBPY や AMSH をノックダウンして細胞質分裂異常を測定しているため、ノックダウンが不十分でばらつきがあること、ノックダウンされている期間が不十分である可能性も除外できない。これらを改善するためには、誘導性 siRNA 発現ベクターの安定発現株を取得し全体のノックダウン効率を上げるとともに、十分にノックダウンされている時間をそろえて細胞質分裂異常を測る必要がある。

また VAMP8 がユビキチン化を受けること、そして UBPY・AMSH の基質であることを見出した (Fig. 3-8, 3-9)。VAMP8 の機能がユビキチン化と脱ユビキチン化により制御される可能性を検討するために、VAMP8 の K0 変異体が細胞質分裂においてドミナントネガティブに働くかどうか調べた。しかし、多核化細胞の数は FLAG-VAMP8^{K0} の過剰発現によって増加しなかった (not shown)。VAMP8 の K0 変異体では、完全に内在性 VAMP8 機能を阻害できない可能性も考えられる。SNARE としての VAMP8 の機能がユビキチン化によって影響を受けるか調べることを目的に、VAMP8 と Syntaxin2、SNAP23 との結合を免疫沈降によって調べたが、ユビキチン化された VAMP8 もこれら t-SNARE と共沈した。しかし VAMP8 は自身が 2 量体を形成することがわかっており (Mascia et al., 2007)、ユビキチン化された VAMP8 がユビキチン化されていない VAMP8 を介して t-SNARE と共沈した可能性がある。VAMP8 のユビキチン化とその SNARE 機能を調べるためには、精製したユビキチン化 VAMP8、t-SNARE と人工脂質二重膜を用いて、人工的な膜融合実験をする必要がある。また、UBPY、AMSH ノックダウンによる VAMP8 の central spindle への局在への影響は見られなかった (Fig. 3-10)。VAMP8 のユビキチン化の意味を明らかにするには、さらに今後の解析が必要である。

central spindle におけるタンパク質のユビキチン化について

細胞質分裂におけるユビキチン化の役割を明らかにするには、本研究で同定した VAMP8 以外の central spindle におけるユビキチン化される基質の同定が役に立つだろう。central spindle における VAMP8 の central spindle への局在パターンと抗ユビキチン化タンパク質抗体 FK2 の染色パターンは、細胞質分裂期を通して全て一致するわけではない。したがって、central spindle においてユビキチン化を受けるタンパク質は、VAMP8 だけではないと考えられる。先行研究から、Aurora B は細胞分裂期にユビキチン化を受けることがわかっているが、その時期は細胞質分裂が始まる前である。また、HeLa 細胞において UBPY^{C748A} や AMSH^{D348A} を過剰発現させても、Aurora B のユビキチン化を検出することはできなかった (not shown)。これらのことから、Aurora B は central spindle におけるユビキチン化タンパク質ではない可能性が高い。また最近、midbody で機能する E3 ligase として BRUCE、その基質として MKLP1 が同定されている (Pohl et al., 2008)。しかし、これらも midbody 中央に局在し、2 本のバンドとなるユビキチン化タンパク質の局在パターンとは異なっている。

central spindleにおけるユビキチン化タンパク質を明らかにする方法の一つとして、同調させた培養細胞より midbody を分離して集め、FK2 カラムでユビキチン化タンパク質のみ回収して質量分析により同定する方法が考えられる。また、central spindle で機能する E3 ユビキチン ligase があるならば、それを明らかにすることも重要だろう。CHO 細胞の midbody に局在するタンパク質を網羅的に同定したプロテオーム解析で、E3 ligase である NEDD4 が同定されている (Skop et al., 2004)。しかし、内在性 NEDD4 および過剰発現させた NEDD4 はいずれも midbody に局在しなかった (not shown)。Central spindle におけるタンパク質のユビキチン化の意味を明らかにするためには、さらに今後の解析が期待される。

Figure legends

Fig. 3-1 細胞質分裂と膜輸送

- (A) 動物細胞の細胞質分裂。有糸分裂後、細胞膜のすぐ下に集合するアクチンとミオシンなどの繊維を含む収縮環によって細胞質が 2 つにくびれさせられ、二つの娘細胞に分割される
- (B) 植物細胞の細胞質分裂。有糸分裂終期から、細胞内で古い紡錘体の赤道面に細胞膜の原料が詰まったゴルジ体由来の小胞が集まり、融合して新しい細胞壁を形成する。
- (C) HeLa 細胞の細胞質分裂のステップ。詳細は本文参照。
- (D) 動物細胞の細胞質分裂における膜輸送。細胞質分裂時には、ゴルジやリサイクリングエンドソームから膜輸送が起こり、central spindle において膜が供給されることを模式的に示している。また、細胞質分裂に重要な因子の例として MKLP1・2、MgcRacGAP、Aurora B、Cep55 の、細胞質分裂に関与する膜融合関連因子として SNARE ファミリーの VAMP8 および Syntaxin2 の central spindle への局在を示した。
- (E) SNARE 仮説の模式図。小胞上の vesicular-SNARE (v-SNARE)、標的膜上の target-SNARE (t-SNARE) が特異的に結合することにより、輸送小胞と標的膜の特異的な融合を行う。

Fig. 3-2 UBPY は細胞質分裂期に central spindle に局在する

- (A-C'') HeLa 細胞 (A-A''), COS-7 細胞 (B-B''), NIH-3T3 細胞 (C-C'') を抗 UBPY 抗体および抗 tubulin 抗体、TO-PRO-3 で染色した。
- (D-D'') HeLa 細胞に FLAG-UBPY をトランスフェクションし、anti-FLAG と anti-tubulin 抗体、TO-PRO-3 で染色した。
- 細胞質分裂期ステージ 4 にある細胞を観察した。矢頭で midbody を示し、その拡大図を右上 inset に示した。Bars=10 μ m

Fig. 3-3 AMSH は細胞質分裂期に central spindle に局在する

- (A-D'') HeLa 細胞を anti-AMSH および anti-tubulin 抗体、TO-PRO-3 で染色した。細胞質分裂期のステージ 1 (A-A''), ステージ 2 (B-B'', C-C''), ステージ 4 (D-D'') にある細胞を選び、観察した。Midbody remnant を asterisk (*) で示した。
- (E-E'', F-F'') COS-7 細胞 (E-E''), NIH-3T3 細胞 (F-F'') を anti-AMSH および anti-tubulin 抗体で染色し、ステージ 2 にある細胞を観察した。
- (G-G'') HeLa 細胞に FLAG-AMSH をトランスフェクションして anti-FLAG と anti-tubulin 抗体で染色し、ステージ 4 にある細胞を観察した。
- Inset ; central spindle の拡大図。Bars=10 μ m

Fig. 3-4 ユビキチン化タンパク質は細胞質分裂期に central spindle に局在する

- (A-D'') HeLa 細胞を FK2 抗体および anti-tubulin 抗体、TO-PRO-3 で染色し、細胞質分裂

期のステージ 1 (A-A''), 2 (B-B''), 3 (C-C''), 4 (D-D'')にある細胞を選び、観察した。
 (E-E'', F-F'') COS-7 細胞 (E-E''), NIH-3T3 細胞 (F-F'') を FK2 および anti-tubulin 抗体で染色し、ステージ 2 にある細胞を観察した。
 (H-H', I-I') K48 連結型 (H-H'), K63 連結型 (I-I') ユビキチン鎖とインキュベートした FK2 抗体を用いて HeLa 細胞を染色し、ステージ 2 にある細胞を観察した。
 (J-J'', K-K'') HeLa 細胞に HA-Ub をトランスフェクションし、anti-HA 抗体および FK2 抗体 (J-J''), anti-HA および anti-AMSH 抗体 (K-K'') で染色した。
 Inset ; central spindle の拡大図。Bars=10 μ m

Fig. 3-5 ユビキチン化タンパク質・UBPY・AMSH は細胞質分裂に重要な領域に局在する

(A-A'') HeLa 細胞に HA-Ub をトランスフェクションし、anti-HA および anti-Aurora B 抗体、TO-PRO-3 で染色し、ステージ 2 の細胞を観察した。
 (B-B'') HeLa 細胞を FK2 抗体 および anti-MKLP1 抗体、TO-PRO-3 で染色し、ステージ 2 の細胞を観察した。
 (C-C'') HeLa 細胞を anti-UBPY および anti-Aurora B 抗体、TO-PRO-3 で染色し、ステージ 4 の細胞を観察した。
 (D-D'') HeLa 細胞を anti-AMSH および anti-MKLP1 抗体、TO-PRO-3 で染色し、ステージ 2 の細胞を観察した。
 Inset ; central spindle の拡大図。Bars=10 μ m

Fig. 3-6 エンドソーム関連因子の central spindle への局在について

HeLa 細胞を抗 tubulin 抗体と TO-PRO-3 および、anti-Hrs (A-A''), anti-STAM1 (B-B''), anti-EEA1 (C-C''), anti-LAMP1 (D-D''), anti-LBPA 抗体 (E-E'') で染色した。
 Inset ; central spindle の拡大図。Bars=10 μ m

Fig. 3-7 UBPY および AMSH は効率的な細胞質分裂に必要である

(A) HeLa 細胞に mock、2 種の UBPY siRNA、2 種の AMSH siRNA 発現ベクターをトランスフェクションした際のタンパク量を anti-UBPY (top)、anti-AMSH (middle)、anti-tubulin 抗体 (bottom) の IB で示す。
 (B) HeLa 細胞に mock、UBPY-1 siRNA、AMSH-1 siRNA 発現ベクターをトランスフェクションし、SYTOX Green (DNA) および anti-tubulin 抗体で染色した。多核化した細胞を矢頭で示す。Bars=50 μ m
 (C) mock、2 種 UBPY siRNA、2 種 AMSH siRNA 発現ベクターをトランスフェクションした細胞から無作為に選んだ 400~500 細胞における多核化した細胞の割合を計測し、グラフ化した。(* $P<0.01$ t -test)
 (D) mock、2 種 UBPY siRNA、2 種 AMSH siRNA 発現ベクターをトランスフェクションし、

直径 15 mm のカバーガラス上の細胞のなかで細胞質分裂期ステージ 1~3 にある細胞と、ステージ 4 にある細胞の割合を計測した。(n=3)

(E) AMSH-1 siRNA 発現ベクターをトランスフェクションした細胞を、FK2 抗体および anti-tubulin 抗体で染色した。細胞質分裂期ステージ 4 で長い central spindle (~20 μ m 以上、図中の矢印)をもつ細胞を示す。Central spindle 中央に残った FK2 染色を矢頭で、核を asterisk (*) で示す。Bar=10 μ m

(F) (E)の実験で、約 20 μ m 以上の異常な central spindle をもつステージ 4 の細胞を数え、グラフ化した。(n=3、* P <0.01 t -test)

Fig. 3-8 VAMP8 は central spindle でユビキチン化を受ける

(A) HeLa 細胞を、anti-VAMP8 と FK2 抗体、TO-PRO-3 で染色した。Inset ; central spindle の拡大図。

(B, C) HeLa 細胞に FLAG-VAMP8 を過剰発現させ、anti-FLAG および FK2 抗体で共染色した。細胞質分裂ステージ 3 (B) と間期 (C) の細胞を示す。Inset ; central spindle (B) またはエンドソーム (C) の拡大図。

(D) mouseVAMP8 と、本研究で用いた変異体のドメイン構造の模式図。SNARE モチーフ、transmembrane ドメイン、7 つのリジン残基を示す。

(E) HeLa 細胞に FLAG-VAMP、FLAG-VAMP8 変異体を過剰発現させ、lysate を anti-FLAG 抗体で IP した。左図はその anti-FLAG 抗体による IB、右図は FK2 抗体による IB を示す。黒い矢頭は FLAG-VAMP8 (band 0 ; ~14 kDa) とユビキチンが 1 つ (band1 ; ~22 kDa)、2 つ (band2 ; ~30 kDa)、3 つ (band3 ; ~38 kDa) 付加された VAMP8 を示す。asterisk (*) は、IP に用いた IgG の軽鎖 (light chain ; L) を示す。白抜き矢頭のバンドについては不明。

Fig. 3-9 UBPY および AMSH は VAMP8 を脱ユビキチン化する

(A) HeLa細胞にFLAG-VAMP8 と、HA-UBPY、HA-UBPYC^{748A}、HA-AMSH、HA-AMSH^{D748A}のいずれかをトランスフェクションし、lysateを回収した。Anti-FLAG抗体でIPし、FK2 抗体 (top panel)、anti-HA (second from top)、anti-FLAG抗体 (third from top) でIBした。脱ユビキチン化酵素の発現は、lysateをanti-HA抗体でIBして確認した (bottom)。

(B) HeLa 細胞で UBPY または AMSH をノックダウンし、FLAG-VAMP8 を過剰発現させた。Lysate を anti-FLAG 抗体で IP し、FK2 抗体 (top)、anti-FLAG (second from top) で IB した。UBPY、AMSH ノックダウンは、lysate を anti-UBPY (third from top)、anti-AMSH 抗体 (fourth from top) で IB することにより確認した。Loading control として、lysate を anti-tubulin (bottom) で IB した。

(C) HeLa細胞にFLAG-UBPY、FLAG-UBPYC^{748A}、FLAG-AMSHまたはFLAG-AMSH^{D748A}をトランスフェクションし、lysateを回収した。Anti-VAMP8 抗体でIPし、FK2 抗体 (top panel)、anti-VAMP8 (second from top) でIBした。脱ユビキチン化酵素の発現は、lysateをanti-FLAG抗体でIBして確認した (bottom)。

Fig. 3-10 VAMP8 のユビキチン化の意味について

(A-F'') HeLa 細胞に mock (A-A'', D-D''), UBPY-1 siRNA (B-B'', E-E''), AMSH-1 siRNA (C-C'', F-F'') 発現ベクターをトランスフェクションし、anti-VAMP8 と anti-tubulin 抗体、TO-PRO-3 で染色した。細胞質分裂期ステージ 2 (A-C'') とステージ 4 (D-E'') にある細胞を観察した。Inset ; central spindle の拡大図。Bars=10 μ m

(G) HeLa 細胞 HA-VAMP8 と、FLAG-syntaxin2 あるいは FLAG-SNAP23 を過剰発現させ、lysate を anti-FLAG 抗体で IP した。これを FK2 抗体 (top)、anti-HA (second from top)、anti-FLAG (third from top) 抗体で IB した。HA-VAMP8 の発現は lysate を anti-HA 抗体で IB することにより確認した。

Fig. 3-11 細胞質分裂におけるユビキチン化タンパク質・UBPY・AMSH の局在のまとめ

central spindle における UBPY・AMSH・ユビキチン化タンパク質の局在領域・時期を模式的に示した。

Epilogue

本研究により、脱ユビキチン化による 2 つの細胞制御機構が明らかになった。

第 1 章の多細胞生物個体レベルでの UBPY の機能解析から、Wnt の受容体 Fz がユビキチン化を受けること、そして脱ユビキチン化されることにより Wnt シグナルが制御されることが明らかになった。脱ユビキチン化酵素 UBPY は、Fz のユビキチンを取り外すことでその分解を抑制していることが示唆され、培養細胞および多細胞生物個体の生体内において Wnt シグナルを正に制御していた。筆者の知る限り、生体内において脱ユビキチン化により受容体シグナルが制御されることを示した初めての例である。

第 2 章の細胞質分裂における脱ユビキチン化酵素の解析から、細胞質分裂がユビキチン化・脱ユビキチン化によって制御されることが明らかになった。細胞質分裂期の細胞でユビキチン化タンパク質、脱ユビキチン化酵素 UBPY・AMSH が central spindle に局在することを見出し、脱ユビキチン化酵素が正常な細胞質分裂に必要であることが示された。

本研究では脱ユビキチン化酵素に着目して解析を行い脱ユビキチン化による 2 つの細胞制御機構が明らかになった。今後、Fz および central spindle におけるユビキチン化を担うユビキチン化酵素が同定されることで、ユビキチン化・脱ユビキチン化による Wnt シグナルおよび細胞質分裂の制御機構の理解が深まると考えられる。

ユビキチン化に比べて解析が遅れている脱ユビキチン化ではあるが、このように細胞レベルから個体レベルまで、多様な機能があることが示唆された。今後の更なる解析が期待される。

引用文献

- Albertson R., Riggs B., Sullivan W. (2005) Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trend. Cell Biol.* **15**, 92-101
- Antonin W., Holroyd C., Tikkanen R., Honing S., Jahn R. (2000) The R-SNARE endobrevin/VAMP8-mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3289-3298
- Bache KG., Raiborg C., Mehlum A., Stenmark H. (2003) STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J. Biol. Chem.*, **278**, 12513-12521
- Bruzzone F., Vallarino M., Berruti G., Angelini C. (2008) Expression of the deubiquitinating enzyme mUBPy in the mouse brain. *Brain Res.* **1195**, 56-66
- Cadigan KM., Fish MP., Rulifson EJ., Nusse R. (1998) Wingless repression of *Drosophila* frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell*, **93**, 767-777
- Campuzano S., Modolell J. (1992) Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet.*, **8**, 202-208
- Neumann CJ., Cohen SM. (1997) Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development*, **124**, 871-880
- Carlsson, S.R., J. Roth, F. Piller, and M. Fukuda. (1988) Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* **263**, 18911-18919.
- Carlton JG., Agromayor M., Martin-Serrano J. (2008) Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 10541-10546
- Danilchik MV., Bedrick SD., Brown EE., Ray K. (2003) Furrow microtubules and localized exocytosis in cleaving *Xenopus laevis* embryos. *J. Cell Sci.* **116**, 273-283
- Duncan DM, Burgess A, Duncan I. (1998) Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes & Develop.*, **12**, 1290-1303
- Farkas RM., Giansanti MG., Gatti M., Fuller MT. (2003) The *Drosophila* Cog5 homologue is required for cytokinesis, cell elongation, and assembly of specialized golgi architecture during spermatogenesis. *Mol Biol Cell.*, **14**, 190-200
- Fischer JA, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, **332**, 853-856
- Freeman, M. (1996) Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell*, **87**, 651-660

- Freeman, M. (1997) Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development*, **124**, 261-270
- Fukuda, M., Imai, A., Nashida, T., Shimomura, H. (2005) Slp4-a/granuphilin-a interacts with syntaxin-2/3 in a Munc 18-2-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **280**, 39175-39184
- Gnesutta N., Ceriani M., Innocenti M., Mauri I., Zippel R., Sturani E., Borgonovo B., Berruti G., Martegani E. (2001) Cloning and characterization of mouse UBPY, a deubiquitinating enzyme that interact with the ras guanine nucleotide exchange factor CDC25^{Mm}/Ras-GEF1, *J. Biol. Chem.*, **276**, 39448-39454
- Gong W., Golic K G. (2003) Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 2556-2561
- Gruneberg U., Neef R., Honda R., Nigg E., Barr FA. (2004) Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J. Cell Biol.* **166**, 167-172
- Hershko A., Ciechanover A., Heller H., Haas AL., Rose IA. (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1783-1786
- Hershko A., Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479
- Hicke L., (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Mol. Cell Biol.*, **2**, 195-201
- Hujimuro M., and Yokosawa H. (2005) Production of antipolyubiquitin monoclonal antibodies and their use for characterization and isolation of polyubiquitinated protein. *Meth. Enzymol.* **399**, 75-86.
- Ishii N., Wada Y., Yamada M., Miura S., Murata K., Asao H., Kondo H., Sugamura K. (2001) Loss of neurons in the hippocampus and cerebral cortex of AMSH-deficient mice., *Mol. Cell Biol.*, **21**, 8626-8637
- Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D. (1997) The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development*, **124**, 761-771.
- Kassis JA., Noll E, VanSickle EP., Odenwald WF., Perrimon N. (1992) Altering insertional specificity of a *Drosophila* transposable element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 1919-1923
- Kato M., Miyazawa K., Kitamura N. (2000) A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *J Biol Chem.* **275**, 37481-37487
- Kikuchi A., Yamamoto H., Kishida S. (2007) Multiplicity of the interaction of Wnt proteins and their receptors. *Cellular Signaling*, **19**, 659-671
- Kikuchi K., Ishii N., Asao H., Sugamura K. (2003) Identification of AMSH-LP containing

- a Jab/MPN domain metalloenzyme motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 637-643
- Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, Carrol SB. (1996) Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila vestigial* gene. *Nature*, **389**, 133-138
- Kobayashi, T., E. Stang, K.S. Fang, P. De Moerloose, R.G. Parton, and J. Gruenberg. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**:193-197.
- Komada, M., Masaki R., Yamamoto A., Kitamura N. (1997) Hrs, a tyrosine kinase substrate with a conserved double zinc finger domain, is localized to the cytoplasmic surface of early endosomes. *J. Biol. Chem.* **272**, 20538-20544.
- Li W., Chanda SK., Micik I., Joazeiro CA. (2005) Methods for the functional genomic analysis of ubiquitin ligases. *Methods Enzymol.*, **389**, 280-291.
- Low SH., Li X., Miura M., Kudo N., Quiñones B., Weimbs T. (2003) Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. *Dev. Cell*, **4**, 753-759
- Lu D., Zhao Y., Tawatao R., Cottam HB., Sen M., Leoni LM., Kipps TJ., Corr M., Carson DA. (2004) Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 3118-3123
- Ma Y., Creanga A., Lum L., Beachy PA. (2006) Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature*, **443**, 359-363
- Mascia L., Langosch D. (2007) Evidence the late-endosomal SNARE multimerization complex is promoted by transmembrane segments. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1768**, 457-466
- McCullough J., Clague MJ., Urbe S. (2004) AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol.* **166**, 487-492.
- McCullough J., Row PE., Lorenzo Ó., Doherty M., Beynon R., Clague MJ., Urbé S. (2006) Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr. Biol.* **16**. 160-165
- Mizuno E., Iura T., Mukai A., Yoshimori T., Kitamura N., Komada M. (2005) Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5163-5174.
- Mizuno E., Kobayashi K., Yamamoto A., Kitamura N., Komada M. (2006) A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. *Traffic*, **7**, 1017-1031
- Mizuno E., Kitamura N., Komada M. (2007) 14-3-3-dependent inhibition of deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase. *Exp Cell Res.*

- Moon RT., Kohn AD., De Ferrari GV., Kaykas A. (2004) Wnt and β -catenin signaling: diseases and therapies. *Nature Rev. Genetics*, **5**, 689-699
- Nakamura M, Tanaka N, Kitamura N, Komada M. (2006). Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes. *Genes Cells*. **11**, 593-606.
- Niendorf S, Okshe A, Kisser A, Löhler J, Prinz M, Schorle H, Feller S, Lewitzky M, Horak Ivan, Knobeloch K. (2007) Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Mol Cell Biol.*, **27**, 5029-5039
- Nijman SM., Luna-Vargas MP., Veilds A., Brummelkamp TR., Dirac AM., Sixma TK., Bernards R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. **123**, 773-786
- Park WJ., Liu J., Adler PN. (1994) The frizzled gene of *Drosophila* encodes a membrane protein with an odd number of transmembrane domains. *Mecha. Dev.* **45**, 127-137
- Piddini E., Marshall F., Dubois L., Hirst E., Vincent JP., (2005) Arrow (LRP6) and Frizzled2 cooperate to degrade Wingless in *Drosophila* imaginal discs. *Development*, **132**, 5479-5489
- Pohl C., Jentsch S. (2008) Final stage of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. *Cell*, **132**, 832-845
- Row PE, Prior IA, McCullough J, Clague MJ, Urbe S. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J Biol Chem.*, **281**, 12618-12624.
- Row PE., Liu H., Hayes S., Welchman R., Charalabous P., Hofmann K., Clague MJ., Sanderson CM., Urbé S. (2007) The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30929-30937
- Sawano A., Miyawaki A. (2000) Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucl. Acid Res.* **28**, e78
- Segui-Simarro J.M., Austin JR., White EA., Staehelin LA. (2004) Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *The Plant Cell*, **16**, 836–856,
- Shibamoto S., Higano K., Takada R., Ito F., Takeichi M., Takada S. (1998) Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signaling. *Genes to Cells*, **3**, 659-670
- Skop AR., Bergmann D., Mohler WA., White JG. (2002) Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage

- furrow apex. *Curr. Biol.*, **11**, 735 – 746
- Skop AR., Liu H., Y J-III, Meyer BJ., Heald R. (2004) Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science*, **305**, 61-66
- Strigini M., Cohen SM. (2002) Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr. Biol.*, **10**, 293-300
- Sun L., Chen ZJ. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 119-126.
- Tanaka N., Kaneko K., Asao H., Kasai H., Endo Y., Fujita T., Takeshita T., Sugamura K. (1999) Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19129-19135.
- Taya S., Yamamoto T., Kanai-Azuma M., Wood SA., Kaibuchi K. (1999) The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilize β -catenin. *Genes to Cells*, **4**, 757-767
- Veeman MT., Slusarski DC., Kaykas A., Hallagan L., Moon RT. (2003) Zebrafish Prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr. Biol.*, **13**, 680–685
- Wang CC., Ng CP., Lu L., Atlashkin V., Zhang W., Seet LF., Hong W. (2004) A role of VAMP8 / endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells., *Dev. Cell.*, **7**, 359-371
- Zhao WM., Seki A., Fang G. (2006) Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3881-3896

報文目録

Mizuno E., Iura T., Mukai A., Yoshimori T., Kitamura N., Komada M.

Regulation of EGF receptor downregulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes.

Mol. Biol. Cell **16**, 5163-5174 (2005)

Mukai A., Mizuno E., Kobayashi K., Matsumoto M., Nakayama K.I., Kitamura N., Komada M.

Dynamic regulation of ubiquitination and deubiquitination at the central spindle during cytokinesis.

J. Cell Sci. **121**, 1325-1333 (2008)

Mukai A., Awano W., Watanabe W., *Komada M., *Goto S. (*corresponding author)

Balanced ubiquitylation and deubiquitylation regulate Frizzled degradation and cellular responsiveness to Wingless/Wnt

(In preparation)

向井明子、駒田雅之

エンドソームにおけるメンブレントラフィックと細胞質分裂の接点.

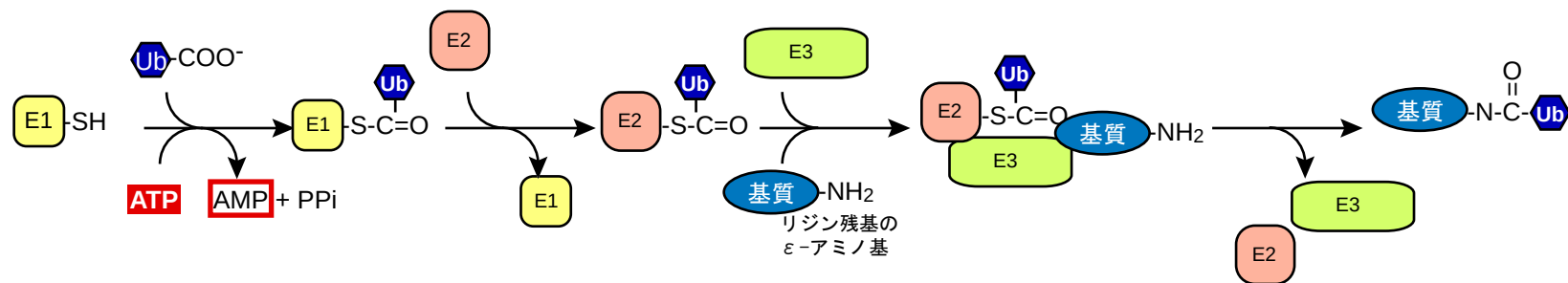
タンパク質核酸酵素 **53**, 2094-2098, 12 月号 増刊号「メンブレントラフィックの奔流」
(2008)

駒田雅之、向井明子

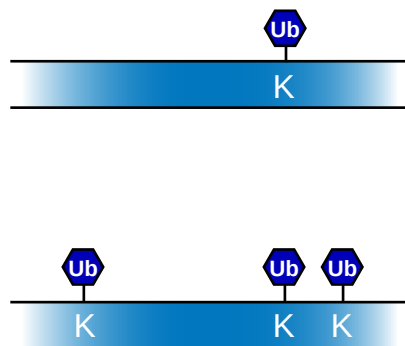
ユビキチン修飾系による細胞質分裂の制御

タンパク質核酸酵素 **54**, 11-19, 1 月号 (2009)

A. ユビキチン化システム

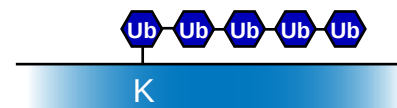


B. モノユビキチン化



C. ポリユビキチン化

K-63 linked



K-48 linked

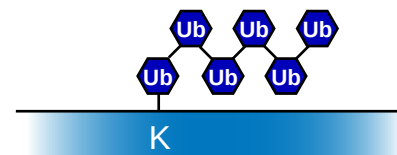


Fig. 1-1 タンパク質のユビキチン化

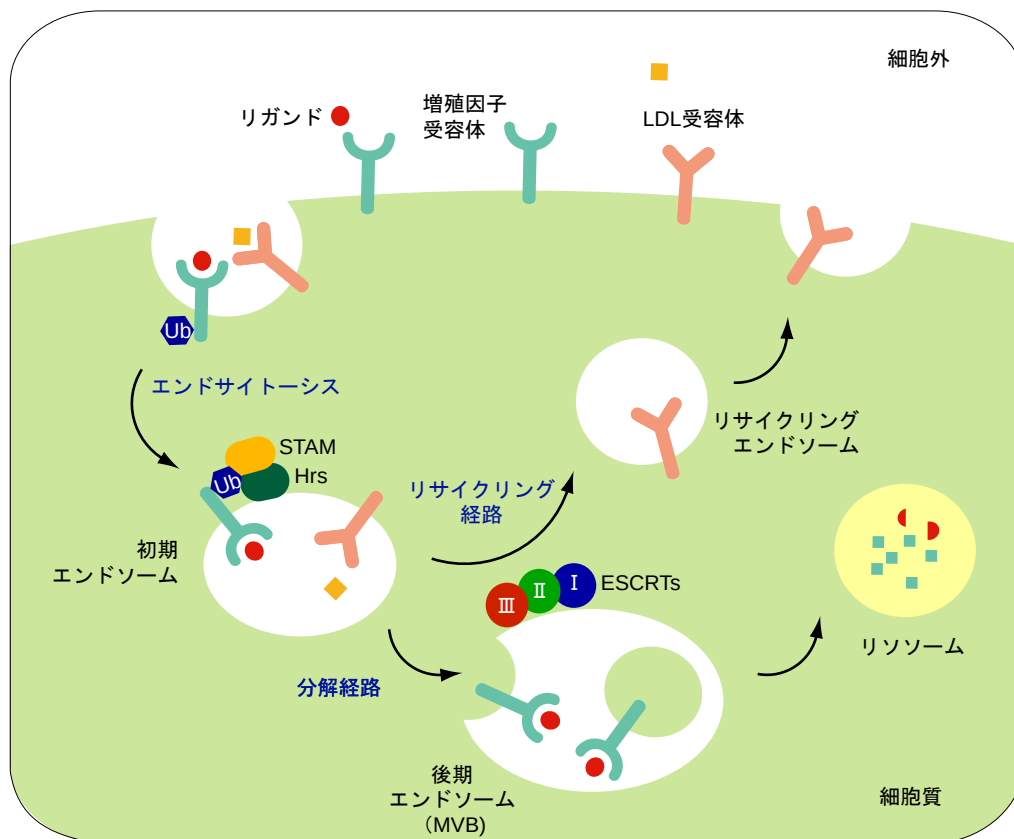


Fig. 1-2 受容体の選別輸送とダウンレギュレーション

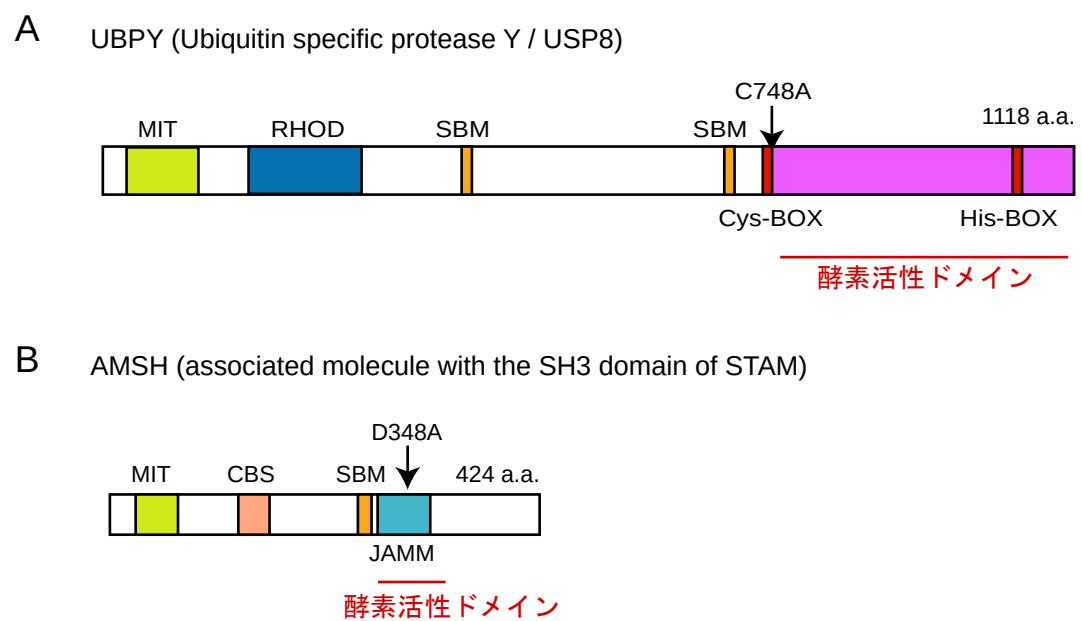


Fig. 1-3 脱ユビキチン化酵素UBPY、AMSHのドメイン構造

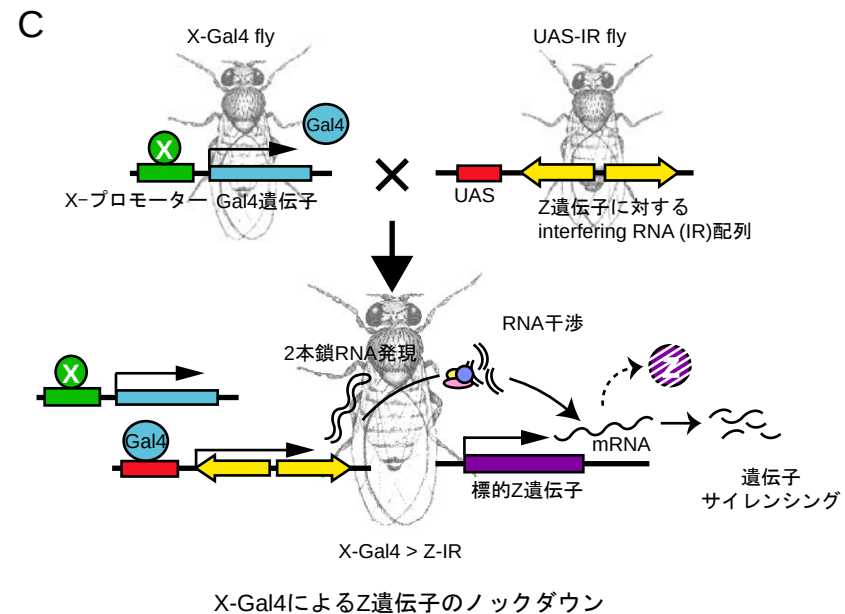
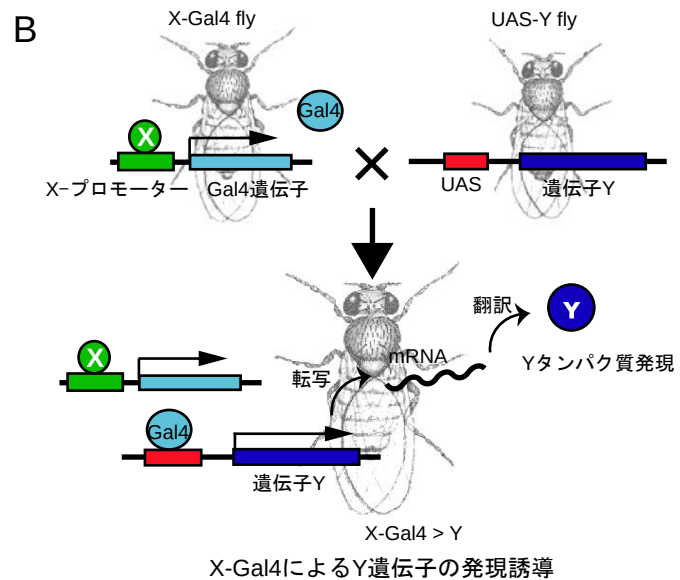
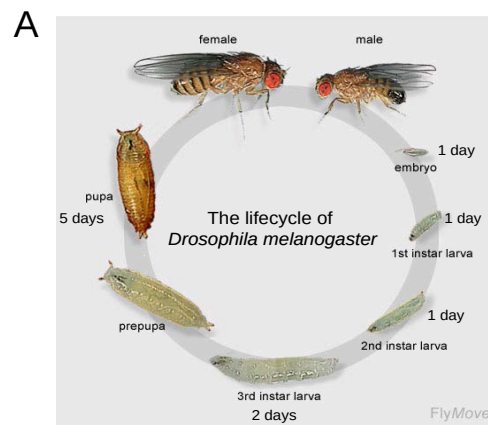


Fig. 2-1 *Drosophila melanogaster*を用いた実験系

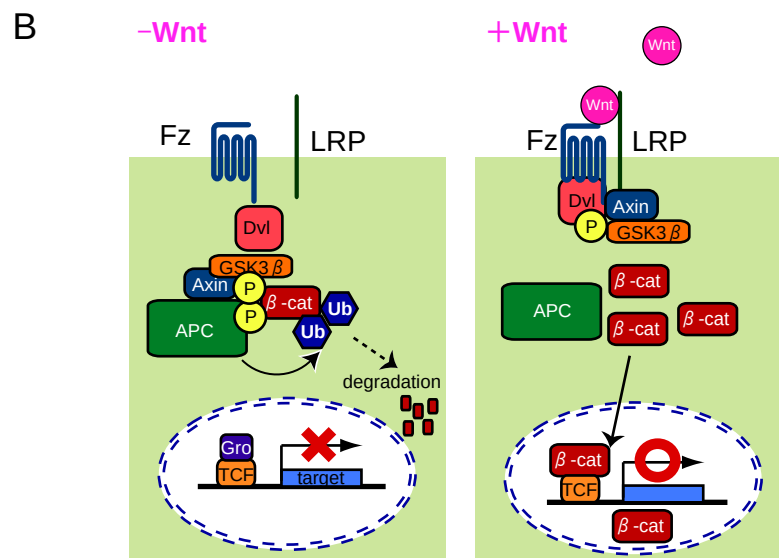
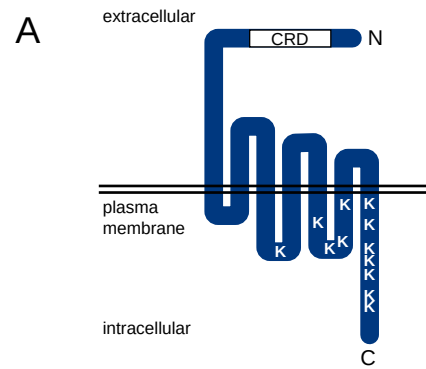
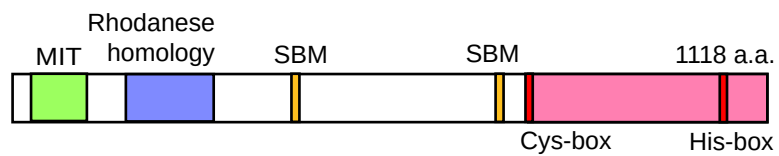
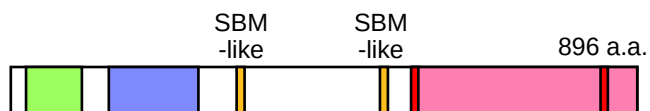


Fig. 2-2 Wnt/Wingless シグナリング

A hUBPY (*Homo sapiens*)



B dUBPY, CG5798 (*Drosophila melanogaster*)



C

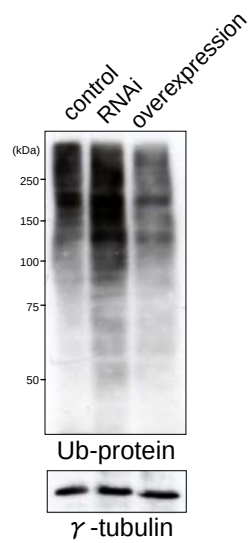


Fig. 2-3 *Drosophila melanogaster* UBPYの同定

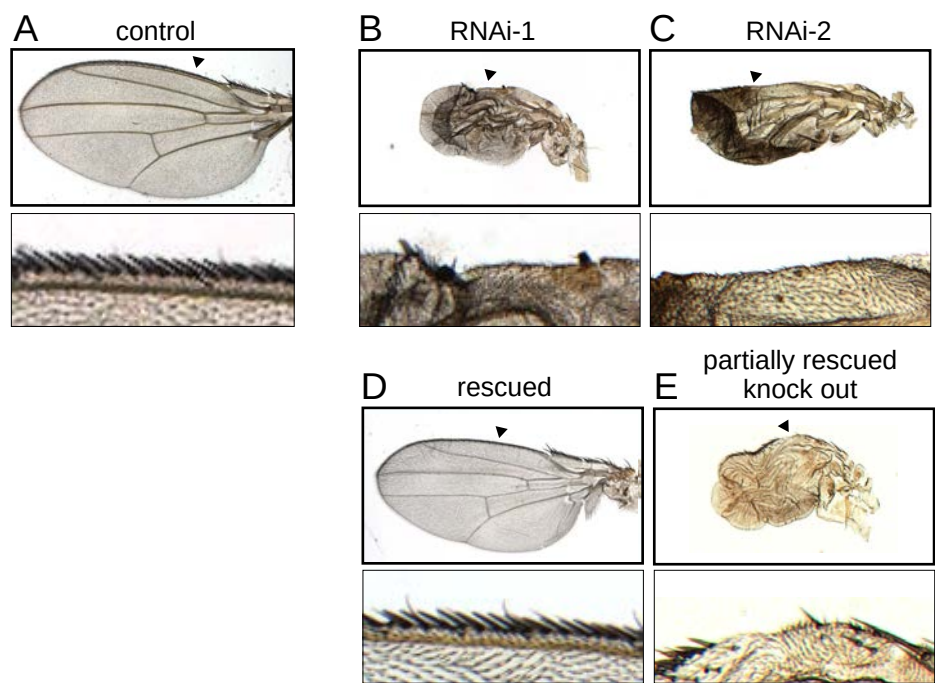


Fig. 2-4 UBPYノックダウンによる翅の表現型

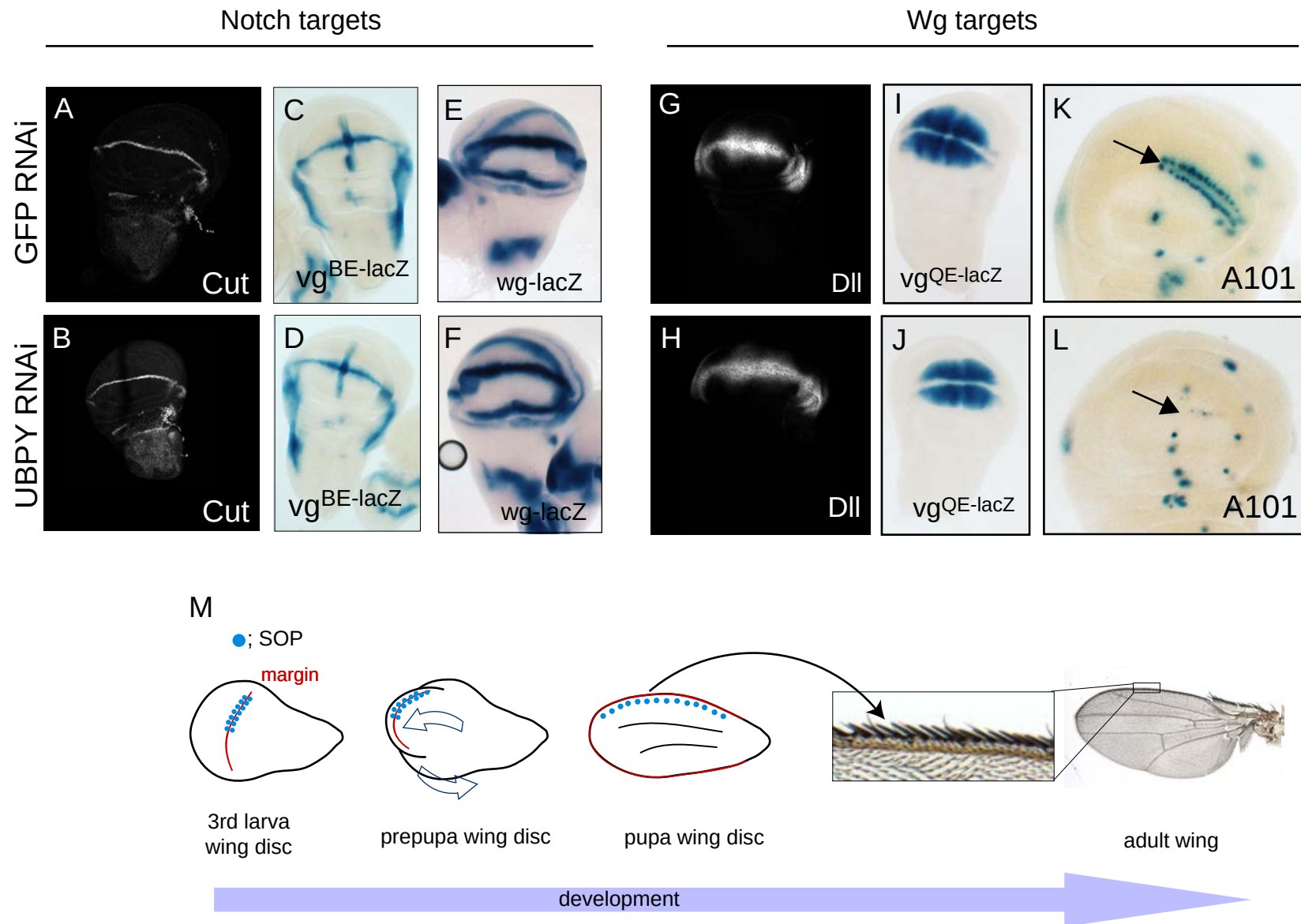


Fig. 2-5 UBPYノックダウンは、NotchシグナルではなくWinglessシグナルを減少させる

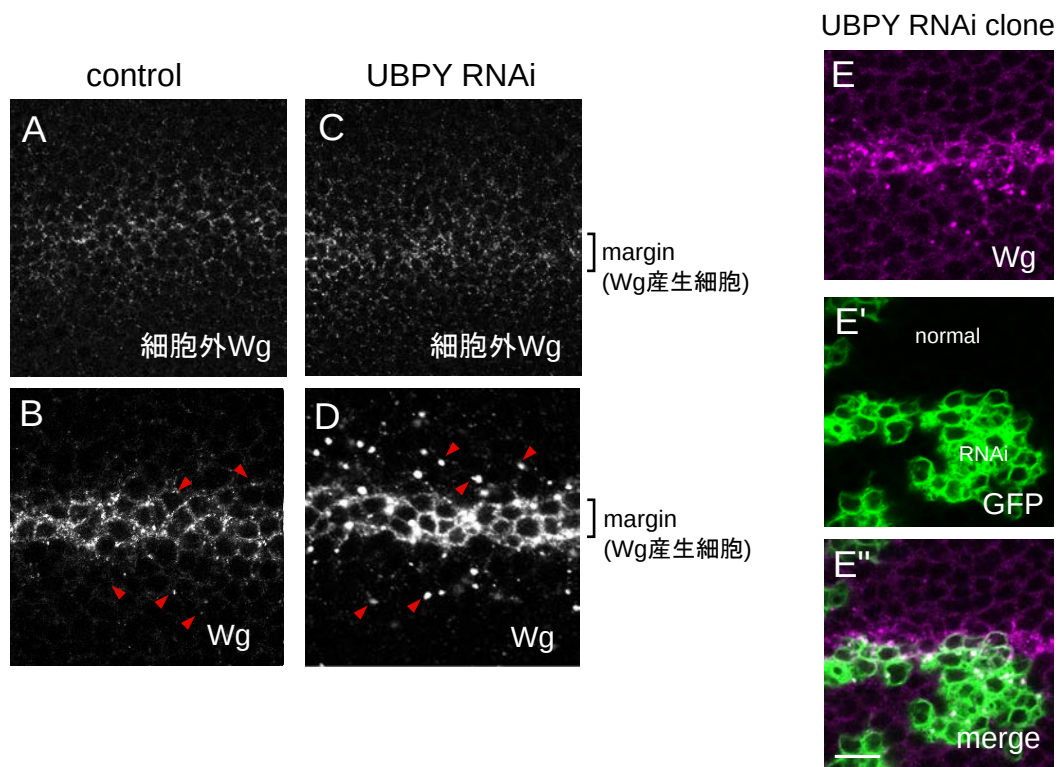


Fig. 2-6 UBPYノックダウンによりWinglessが受容細胞内に蓄積する

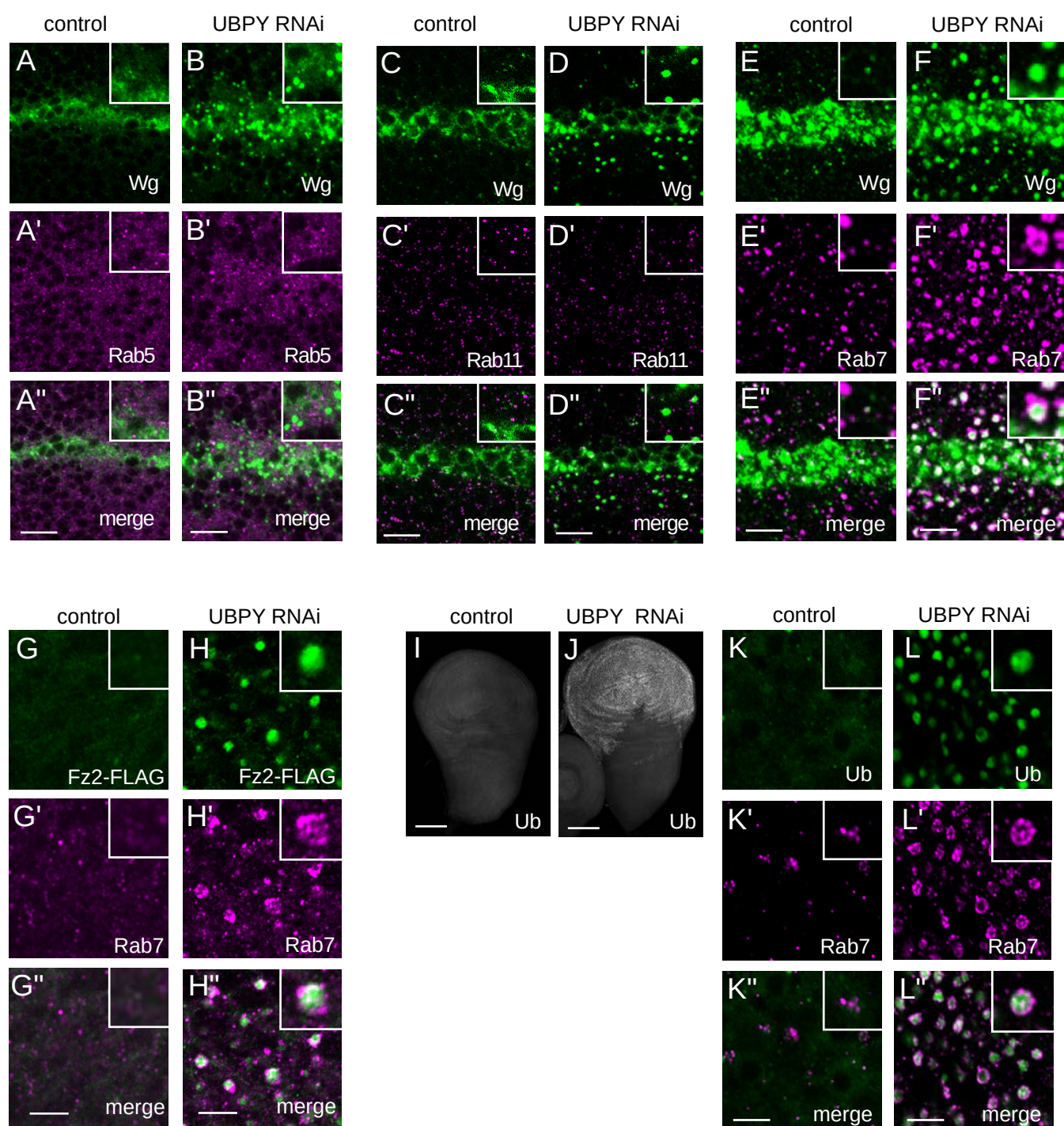


Fig. 2-7 UBPYノックダウンによりWingless、Frizzled、ユビキチン化タンパク質が後期エンドソームへ蓄積する

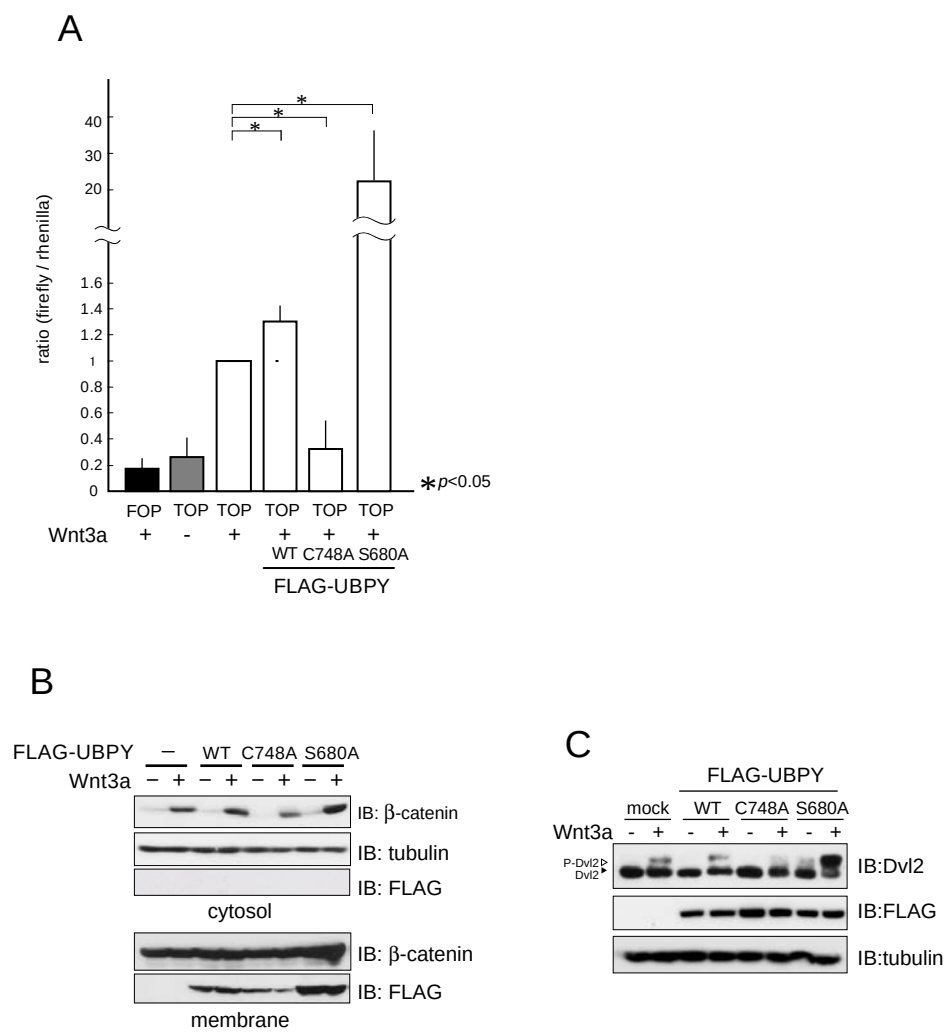
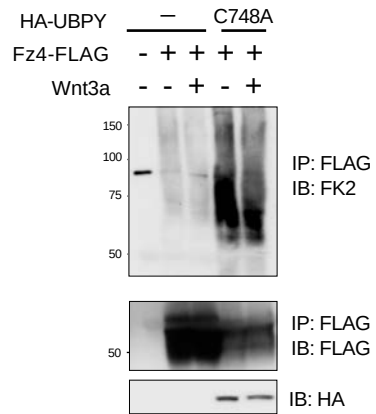
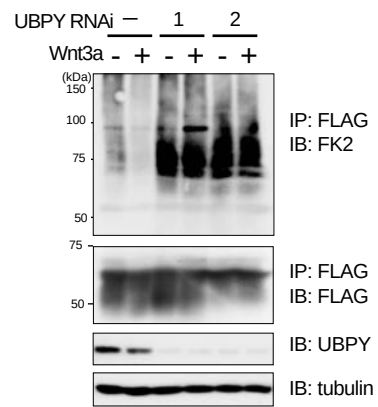


Fig. 2-8 UBPYは哺乳動物細胞でWntシグナルを正に制御する

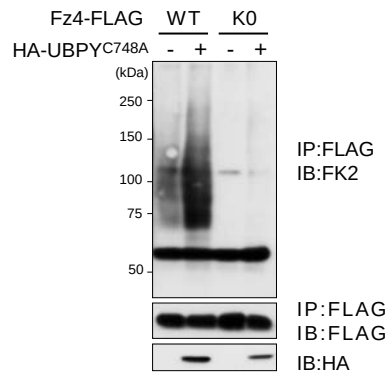
A



B



C



D

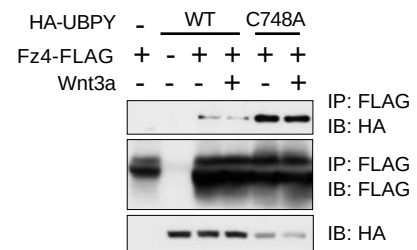


Fig. 2-9 Wnt受容体FrizzledはUBPYの基質である

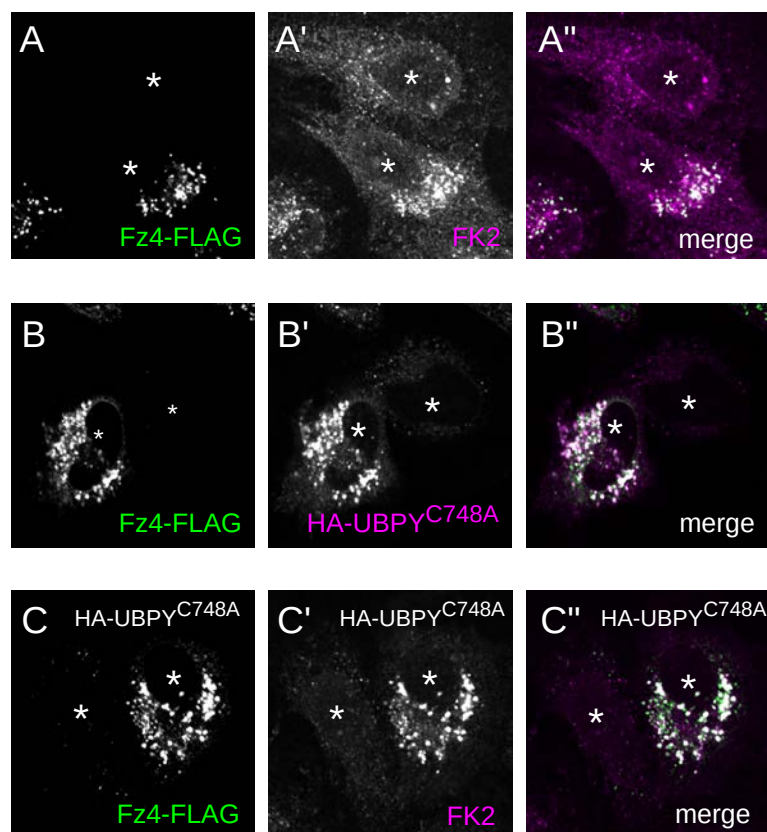


Fig. 2-10 UBPYはFrizzledをエンドソーム上で脱ユビキチン化する

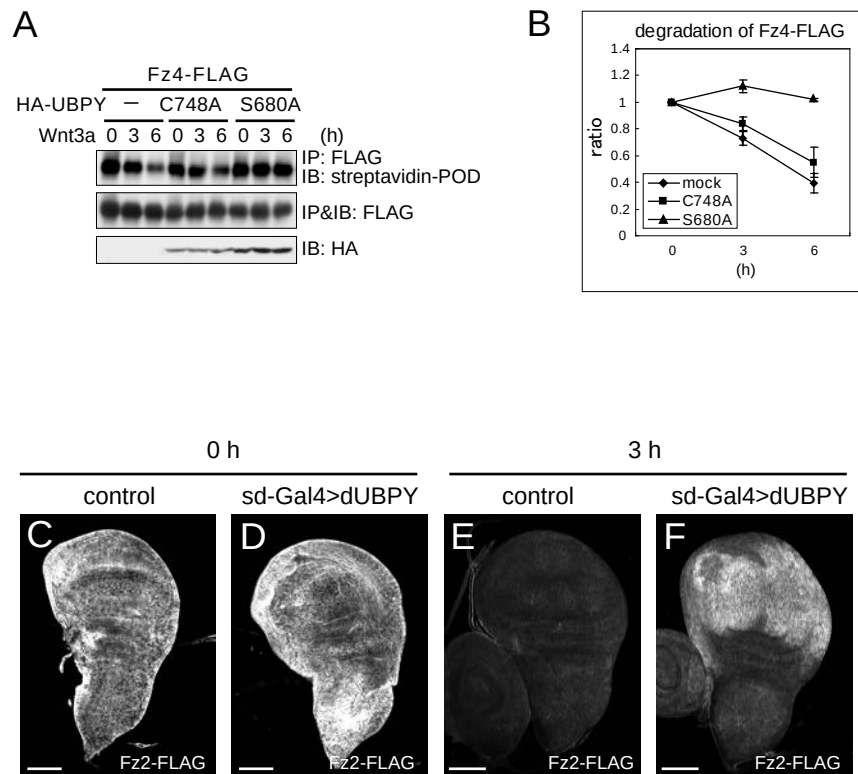


Fig. 2-11 UBPYはFrizzledの分解を抑制する

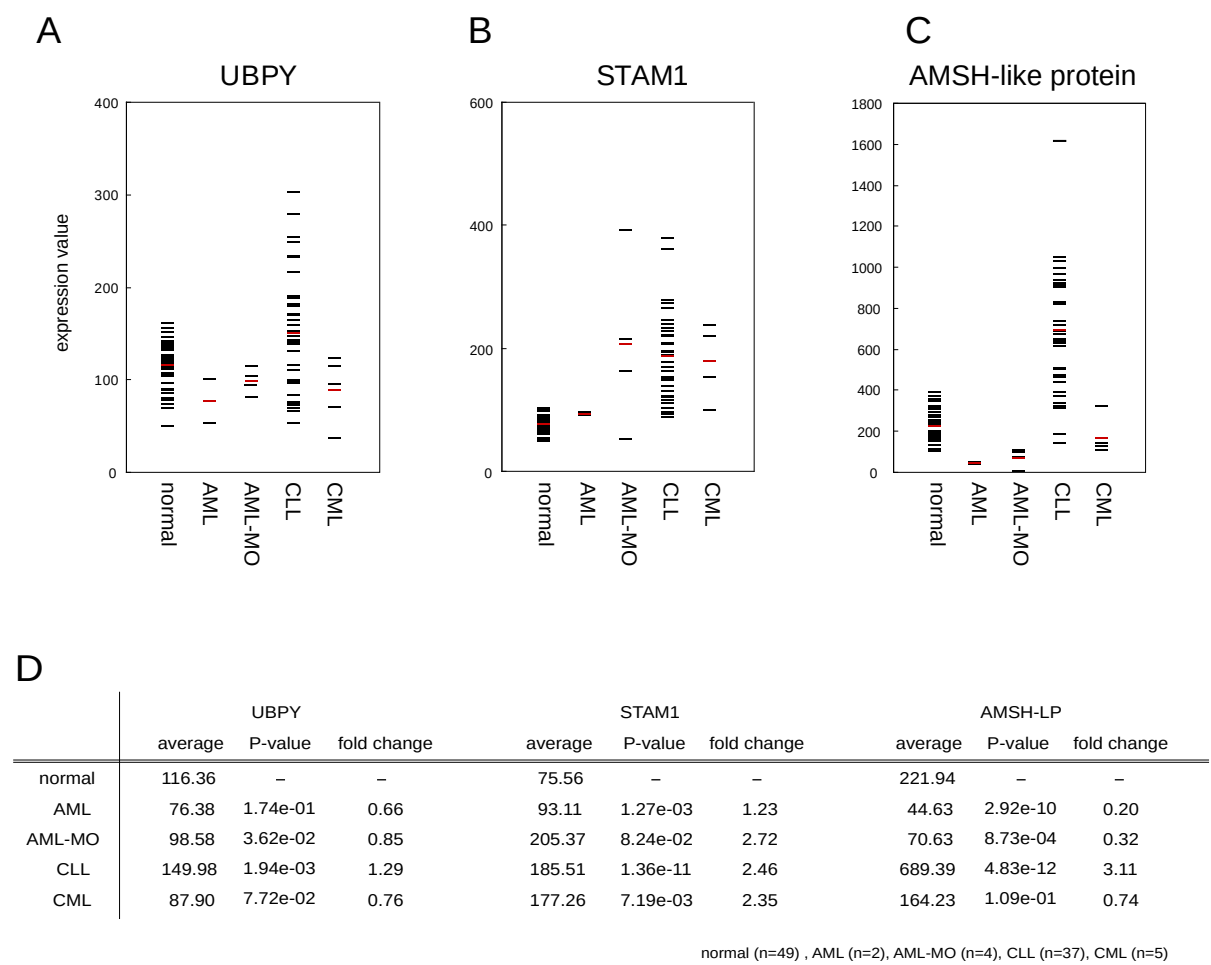
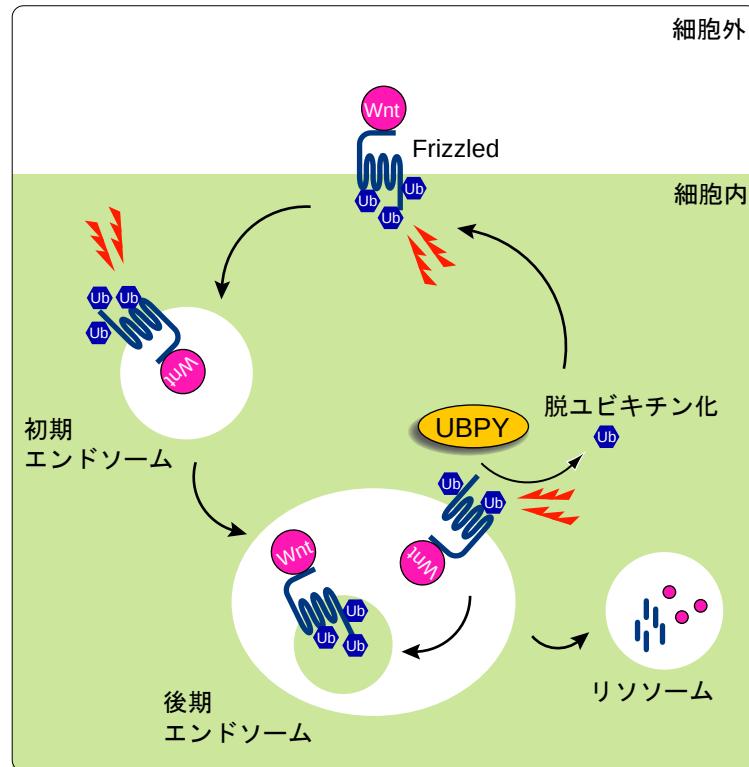


Fig. 2-12 CLLにおけるSTAM、UBPY、AMSH-LPの高発現

A



B

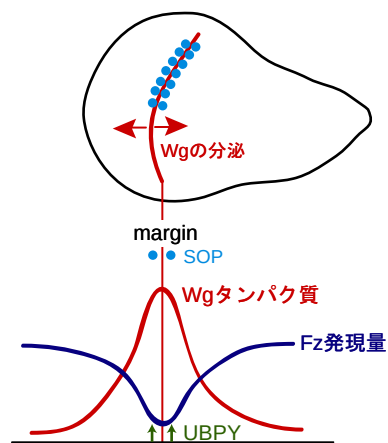


Fig. 2-13 UBPYによるWntシグナル制御のモデル

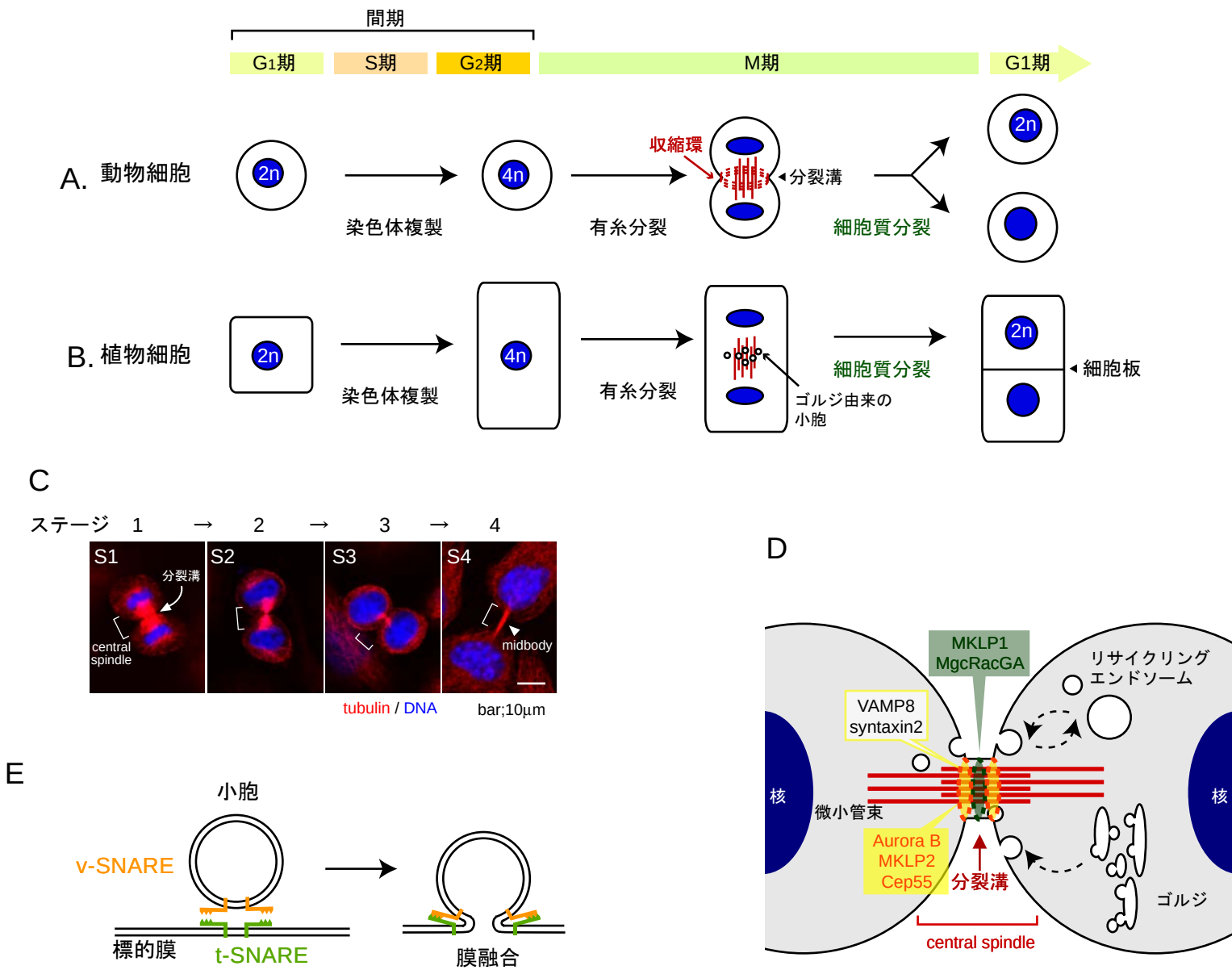


Fig. 3-1 細胞質分裂と膜輸送について

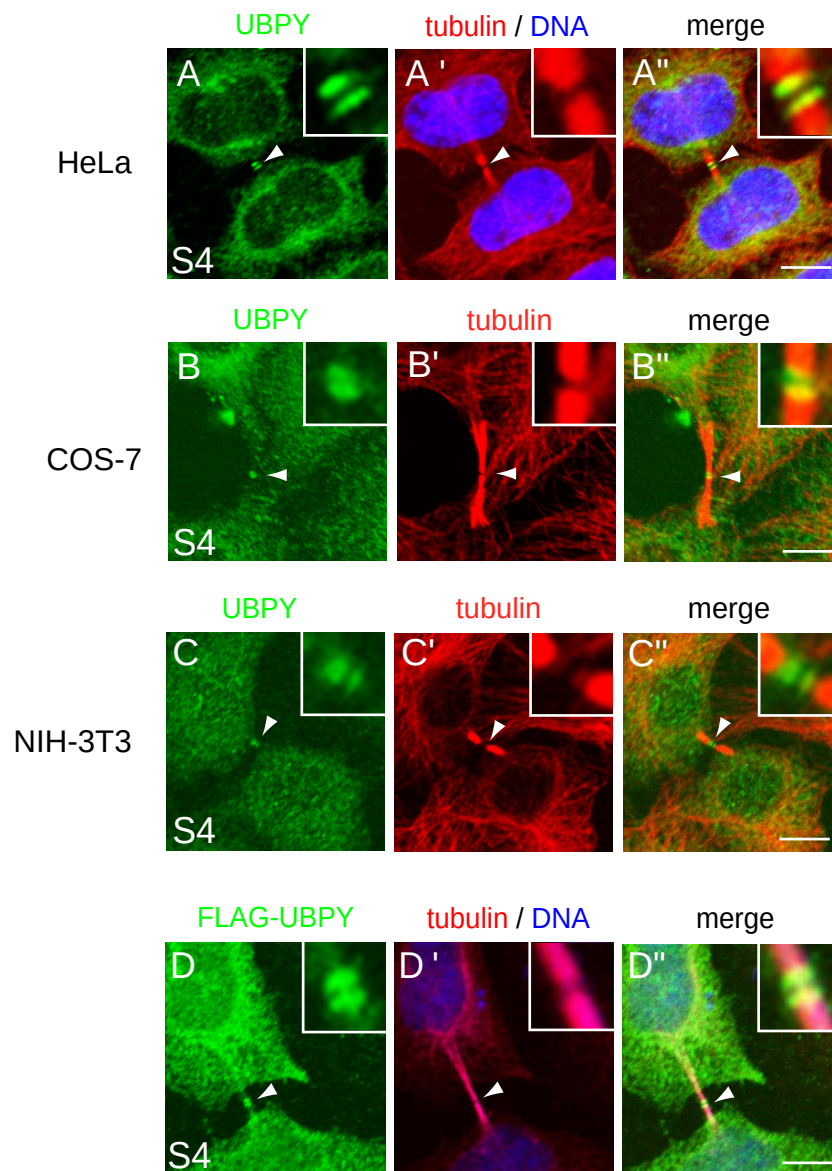


Fig. 3-2 UBPYは細胞質分裂期にcentral spindleに局在する

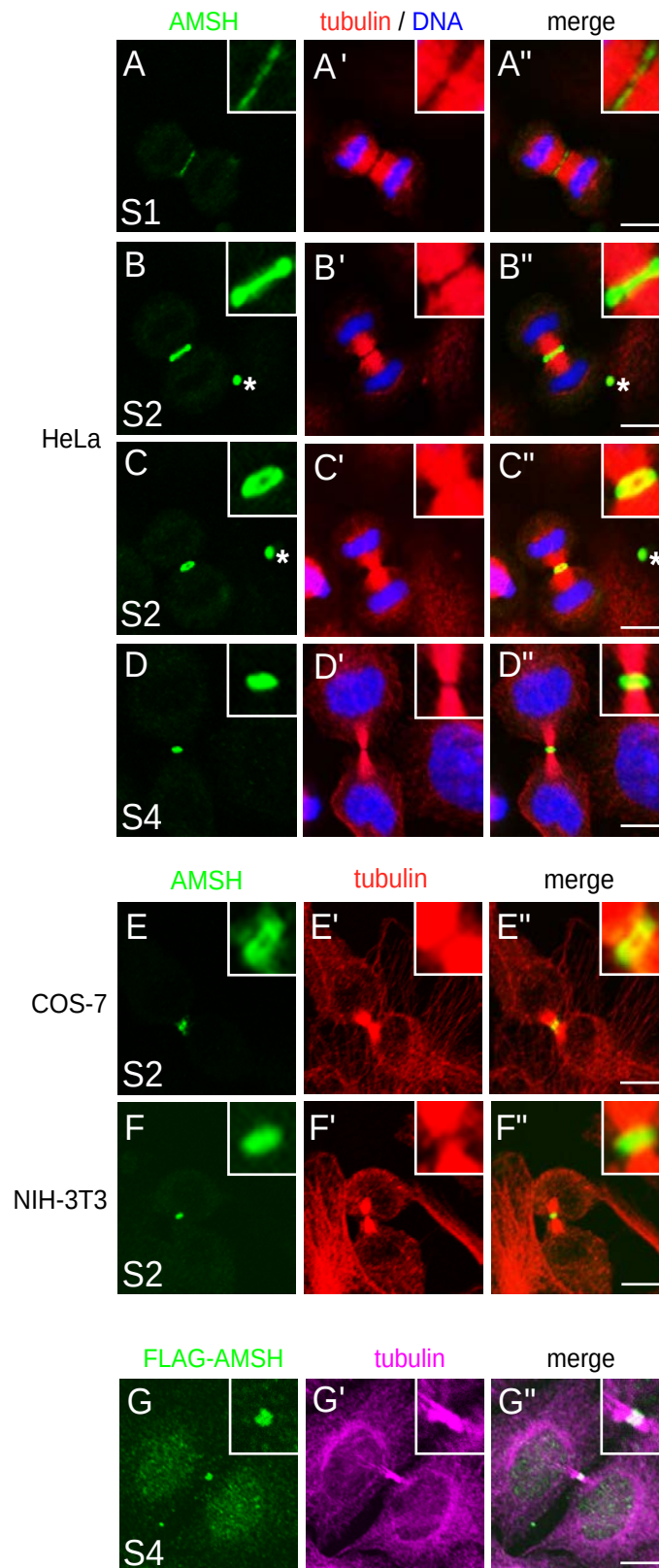


Fig. 3-3 AMSHは細胞質分裂期を通してcentral spindleに局在する

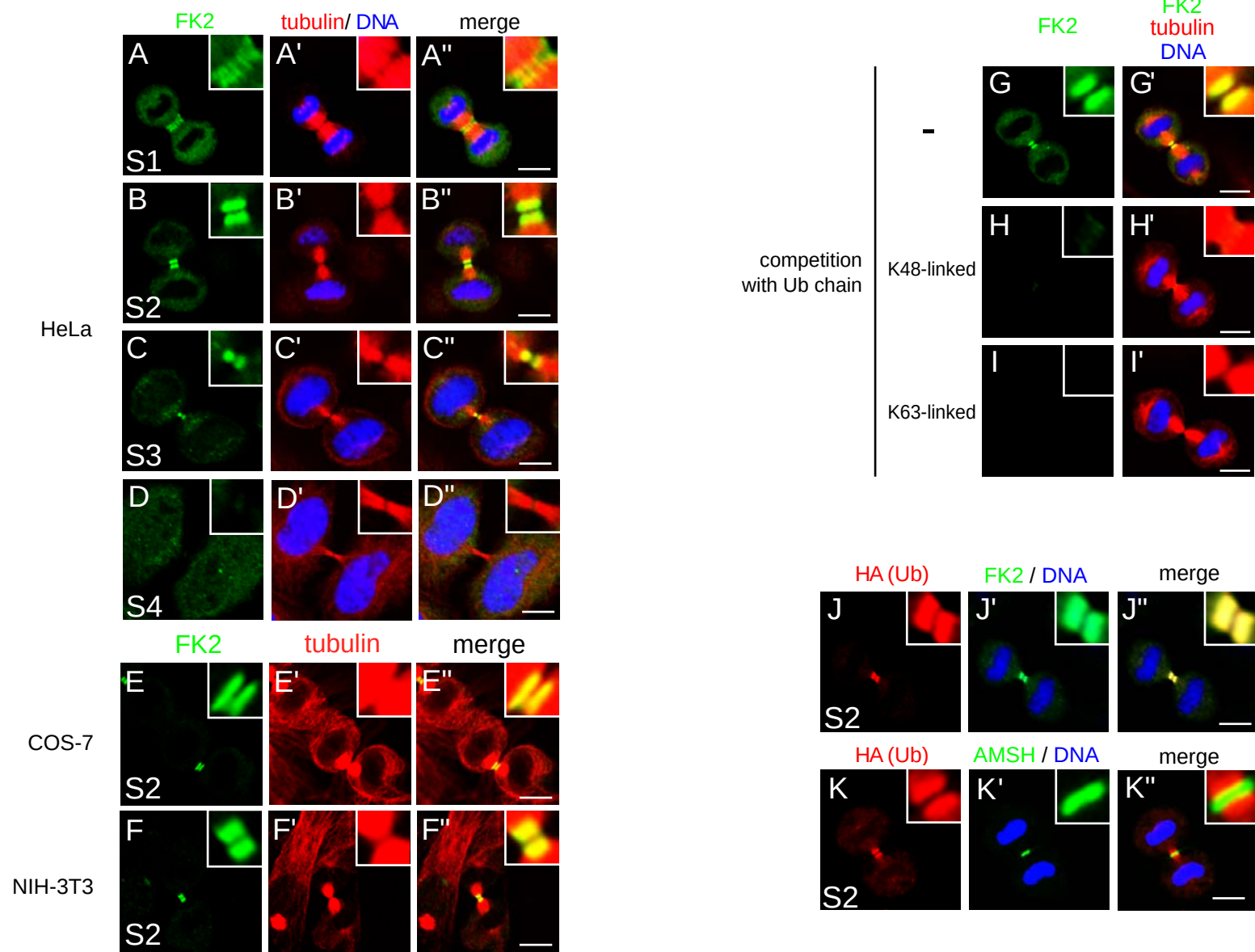


Fig. 3-4 ユビキチン化タンパク質は細胞質分裂期にcentral spindleに局在する

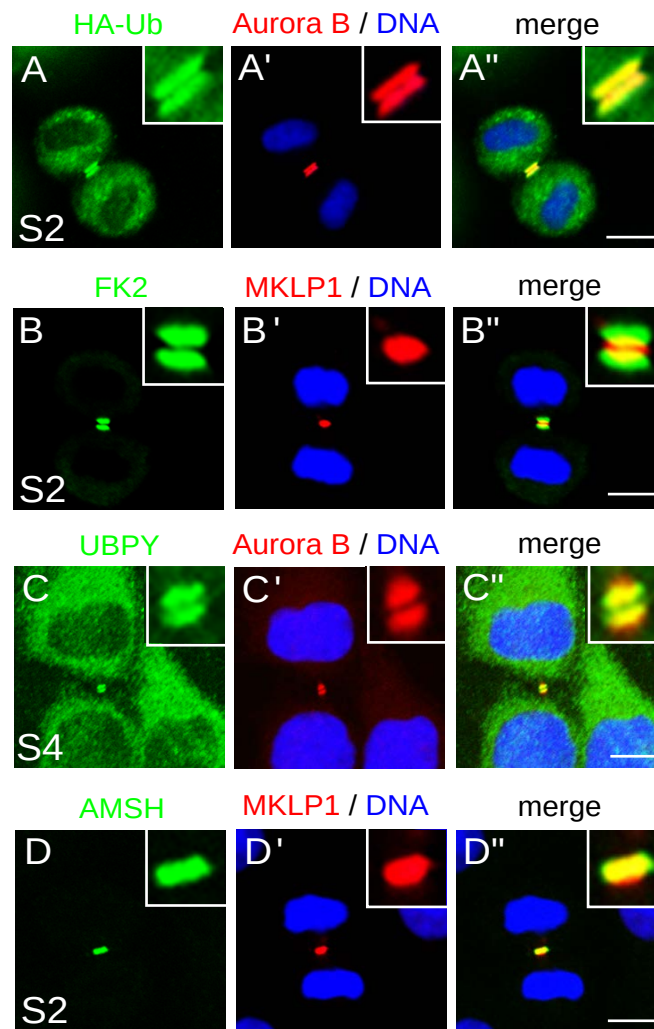


Fig. 3-5 ユビキチン化タンパク質・UBPY・AMSHは細胞質分裂に重要な領域に局在する

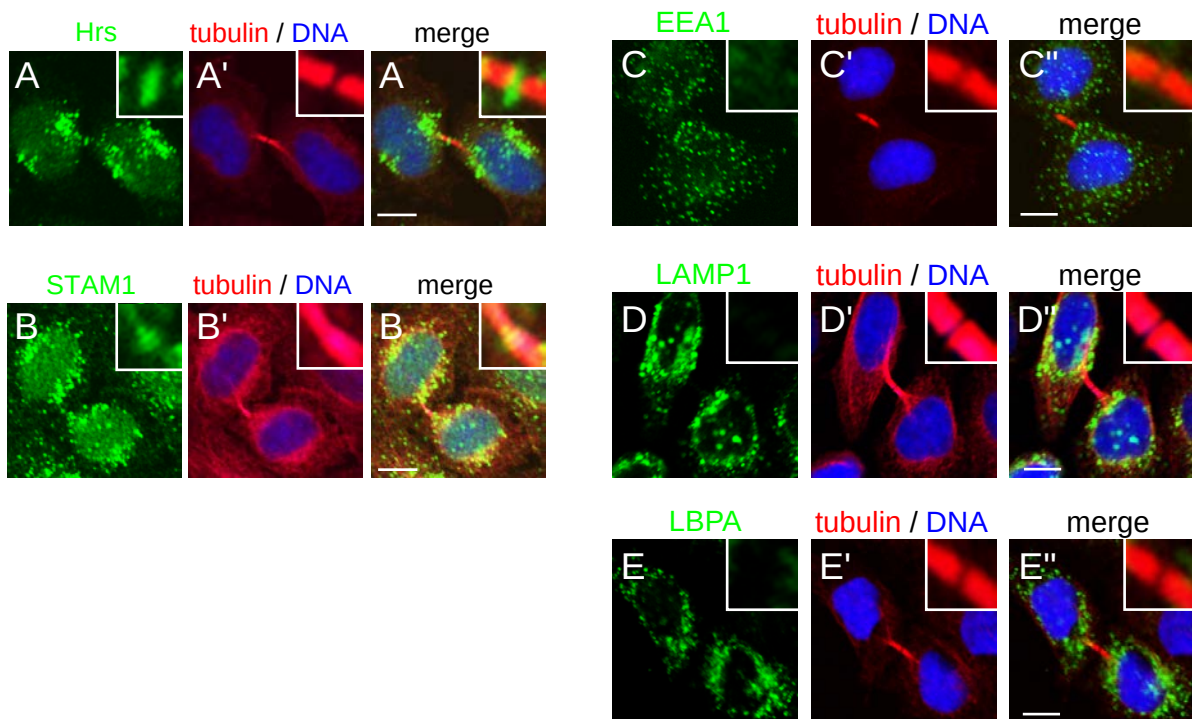


Fig. 3-6 エンドソーム関連因子のcentral spindleへの局在メカニズムについて

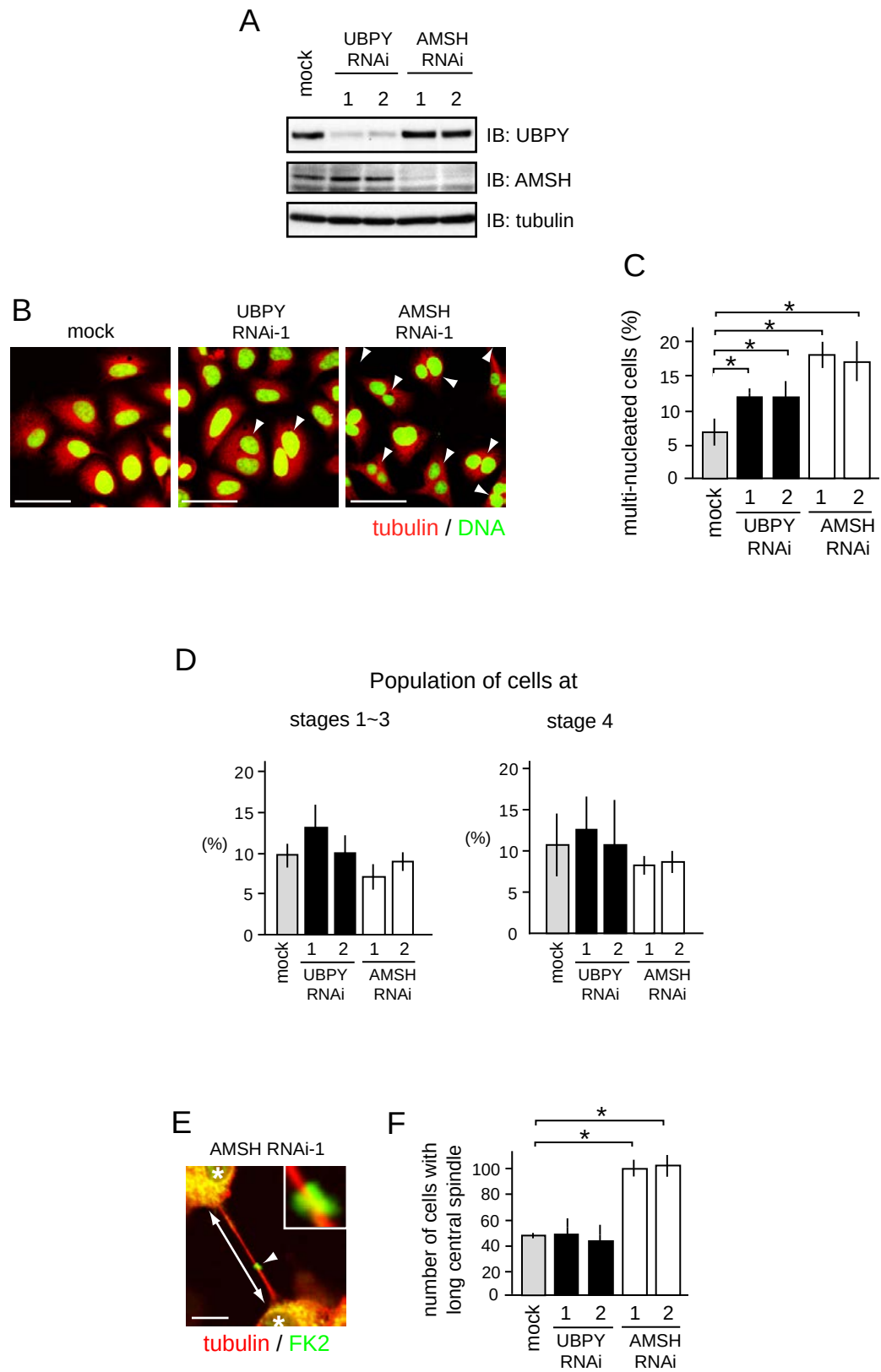


Fig. 3-7 UBPYおよびAMSHは効率的な細胞質分裂に必要である

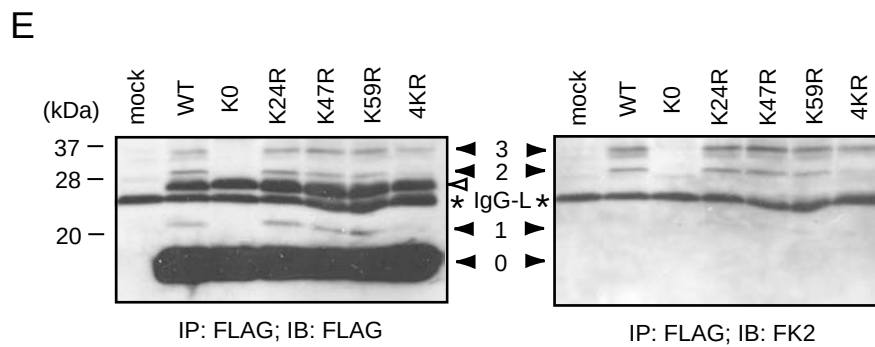
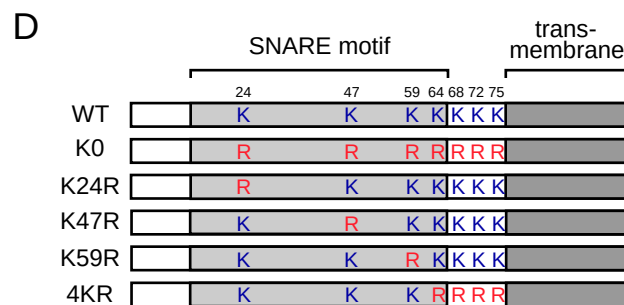
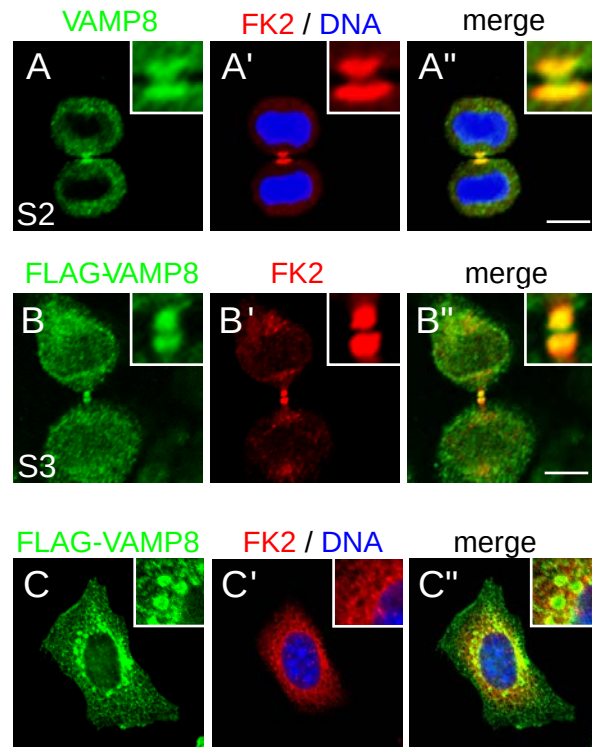


Fig. 3-8 VAMP8はcentral spindleでユビキチン化を受ける

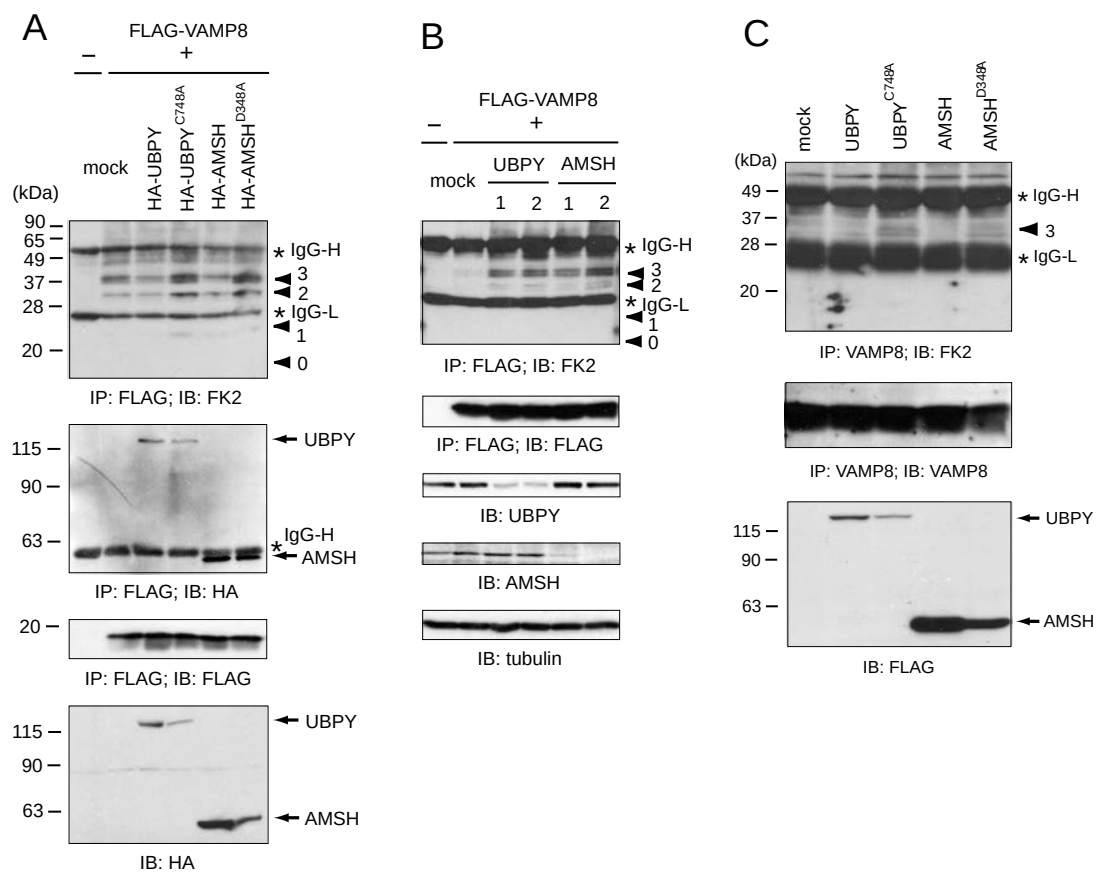


Fig. 3-9 UBPYおよびAMSHはVAMP8のユビキチン化レベルを制御する

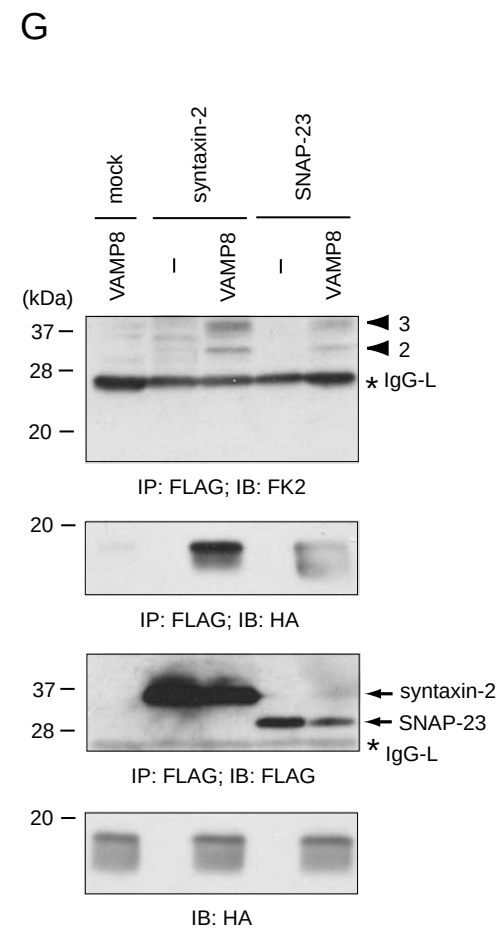
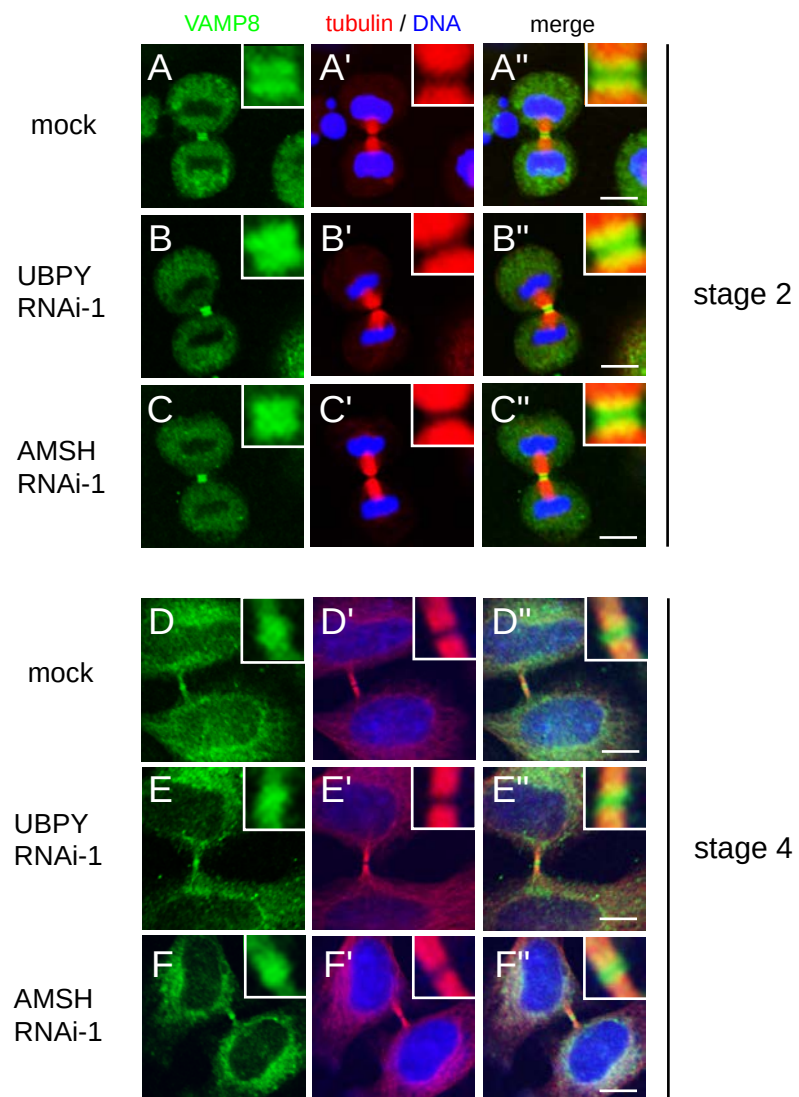


Fig. 3-10 VAMP8のユビキチン化の意味について

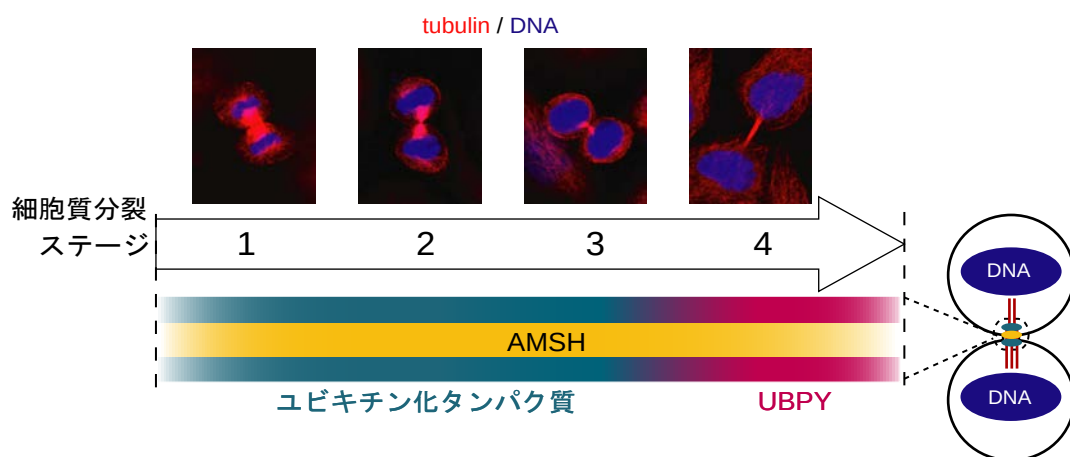


Fig. 3-11 細胞質分裂における
ユビキチン化タンパク質・UBPY・AMSHの局在のまとめ

謝辞

本研究を行うにあたり、研究全般において御指導頂きました東京工業大学大学院生命理工学研究科准教授、駒田雅之先生に篤く御礼申し上げます。また、御助言を頂きました喜多村直実教授に深く感謝致します。

本研究の第 1 章は、三菱化学生命科学研究所糖鎖制御学グループ後藤チームおよび変異ハエバンクで行われました。御指導いただいた後藤聡先生をはじめ、多大な御助言御支援いただいた栗野若枝さん、日野美紀博士、後藤チームと変異ハエバンクの皆様に深く感謝申し上げます。また第 1 章の **BioExpress** データベースを用いた解析は、田辺三菱製薬株式会社先端医療研究所の渡部和加子博士との共同研究、第 2 章の **LC-MS/MS** による解析には九州大学の中山敬一先生、松本雅記先生との共同研究で行われたものです。この場を借りて深く感謝申し上げます。

また本研究の基礎を築き、第 2 章のプロテオーム解析を行った研究室の先輩である水野英美博士、公私にわたりお世話になりました喜多村・駒田研究室の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、学生生活全般にわたり様々な支援を頂いた家族に心から感謝致します。

平成 20 年 12 月 向井明子