

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	脱ユビキチン化酵素の分子種特異的な基質認識機構と小胞輸送制御における新機能
Title(English)	
著者(和文)	川口紘平
Author(English)	Kohei Kawaguchi
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10741号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:加藤 明,岩崎 博史,太田 啓之,中戸川 仁,中村 信大
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10741号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

<平成29年度博士論文>

脱ユビキチン化酵素の分子種特異的な
基質認識機構と小胞輸送制御における
新機能

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

指導教官 駒田雅之 教授

副指導教官 加藤明 准教授

川口紘平

目次

序章	3
第一章 USP25 の基質認識機構.....	8
緒言	8
実験材料と手法	9
結果	13
考察	19
第二章 USP8 の基質認識と小胞輸送における新機能	24
緒言	24
材料と手法	28
結果	32
考察	37
総合討論	42
引用文献	49
報文目録	59
謝辞	60
Figures	61

序章

第一節 ユビキチン鎖の構造と機能

ユビキチンは、真核生物で高度に保存された76アミノ酸のタンパク質であり (Fig. 1-1A)、C末端のカルボキシル基を介して細胞内タンパク質のリジン残基のε-アミノ基にイソペプチド結合する。さらに、ユビキチンは他のユビキチンの7つのリジン残基もしくはN末端メチオニンのα-アミノ基に共有結合することができ、これにより基質となるタンパク質に複数のユビキチンが連なったポリユビキチン鎖が形成される。この翻訳後修飾は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (E3)による連続的な反応によって触媒される (Fig. 1-1B) (Glickman & Ciechanover, 2002)

ポリユビキチン鎖はユビキチンの7つのリジン残基もしくはN末端メチオニンの8種類のアミノ基を用いて異なる連結パターン(連結型と呼ばれる)をとるが、形成されるポリユビキチン鎖はそれぞれ異なる立体構造をとっている。異なる連結型のポリユビキチン鎖は標的タンパク質の運命や機能に異なった影響を与える (Fig. 1C、Rape and Komander, 2012)。例えば、48番目のリジン残基を介して形成されたポリユビキチン鎖 (Lys48連結型ポリユビキチン鎖) は標的タンパク質のプロテアソームによる分解を誘導するシグナルとして働くことがよく知られている。プロテアソームによる分解は、フォールディングに失敗した不良タンパク質の除去や (Stewart *et al.*, 2006)、Hypoxia-inducible factor (HIF1a) やp53といった細胞応答に重要な転写因子や細胞周期制御因子などを細胞の状況に応じて速やかかつ選択的に分解するのに重要である (Stewart *et al.*, 2006)。63番目のリジン残基を介して形成されたポリユビキチン鎖 (Lys63連結型ポリユビキチン鎖) はDNA修復、シグナル伝達、細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスやリソソーム分解などの細胞内イベントを制御している。例えば、サイトカイン受容体やパターン認識受容体のアダプタータンパク質である TRAF (TNF receptor-associated factor) はユビキチンリガーゼ活性を持ち、自身にLys63連結型ユビキチン鎖を付けることによって他のシグナル分子が集まる足場となり、免

疫応答シグナルの伝達を仲介する (Barbara & Averil, 2010)。また、上皮増殖因子受容体 (EGF受容体) はリガンドであるEGFの結合に応答してモノユビキチン化もしくはLys63連結型のポリユビキチン化を受け、これに応じてエンドサイトーシスされてリソソームへ輸送され、分解される (Tanno & Komada, 2013)。Lys48連結型、Lys63連結型以外のポリユビキチン鎖も細胞内に存在していることが明らかになっており、近年ではそれらの機能についても報告がある (Kulathu & Komander, 2012)。

第二節 ユビキチン結合ドメイン/モチーフの機能と役割

基質タンパク質に付加されたモノユビキチンもしくはポリユビキチン鎖が機能を発揮するためには、そのユビキチン化修飾を認識し情報を伝達する因子が必要になる。ユビキチン結合能をもつタンパク質は構造的に異なる様々なユビキチン結合ドメイン/モチーフを持っており、ユビキチン結合ドメイン/モチーフはこれまで9種類発見されている (Hicke *et al.*, 2005)。最も多くのタンパク質がもつユビキチン結合ドメイン/モチーフはubiquitin-interacting motif (UIM) と ubiquitin-associated domain (UBA) である。UIMは最大20アミノ酸からなるモチーフで、UBAは45-55アミノ酸からなるドメインである。このようなユビキチン結合ドメイン/モチーフはユビキチン化修飾を認識することで、様々な細胞内イベントを引き起こす (Fig.1-1D)。例えば、プロテアソームサブユニットS5aのUIMや、プロテアソームのシャトル因子として知られるHHR23A/B (human homolog of Rad23 A/B) やUbiquilin-1/2のUBAドメインは、タンパク質に付加されたユビキチン鎖を認識して、そのタンパク質をプロテアソームへと輸送する (Hicke *et al.*, 2005)。エンドサイトーシスにおいては ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) 複合体のサブユニット Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) のUIMがLys63連結型ポリユビキチン化された細胞膜受容体を認識し、リソソーム分解へと導くことが知られる (Hirano *et al.*, 2006)。RAP80 (Receptor-associated protein 80) のUIMはDNA損傷サイトにおけるヒストンH2AのLys63連結型ユビキチン鎖を認識し、DNA修復因子をリクル

ートする働きを有している (Sato *et al.*, 2009)。しかし、多くのタンパク質においてユビキチン結合ドメイン/モチーフの役割は解明されていない。さらに、ユビキチン鎖は種類によって異なる機能を発揮することから、ユビキチン結合ドメイン/モチーフもユビキチン鎖の種類を識別し、特定の種類のユビキチン鎖に特異的もしくは選択的に結合していると考えられているが、多くのユビキチン結合モチーフ/ドメインにおいてユビキチン鎖への特異性や選択性は決定されていない。

第三節 脱ユビキチン化酵素の種類と役割

ユビキチン化修飾は可逆的な翻訳後修飾である。脱ユビキチン化酵素は基質タンパク質とユビキチンの間のイソペプチド結合、およびポリユビキチン鎖の中のユビキチン同士のイソペプチド結合を加水分解し、ユビキチン化修飾を除去する役割を担う。ヒトのゲノムにはおよそ 90 種類の脱ユビキチン化酵素がコードされており (Fig. 1-1D)、酵素活性部位のアミノ酸配列に基づいて USP (ubiquitin-specific protease)、UCH (ubiquitin C-terminal hydrolase)、OTU (ovarian tumor-related protease)、ataxin-3/Josephin、JAMM (Jab1/MPN/Mov34)の 5 つのファミリーに分類される (Komander *et al.*, 2009)。メタロプロテアーゼである JAMM を除いて、その他の 4 つのファミリーの脱ユビキチン化酵素はシステインプロテアーゼである。

多くの脱ユビキチン化酵素は、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖を分解することによって、ユビキチン化修飾に応答して進行する細胞内イベントを停止する役割を果たすと考えられる。例えば、USP7 は p53 に付加された Lys48 連結型ユビキチン鎖を除去することで、p53 のプロテアソームによる分解を防ぐ (Li *et al.*, 2002)。USP8 (ubiquitin specific peptidase 8) や AMSH (associated molecule with the SH3 domain of STAM) は EGF 受容体に付加されたモノユビキチンもしくは Lys63 連結型ポリユビキチン鎖を除去することで、EGF 受容体のリソソームによる分解を防いでいる (McCullough *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2005)。CYLD (cylindromatosis tumor suppressor protein) は TRAF6/7 の Lys 63 連結型ユビキチン

鎖を除去することで免疫応答シグナルを抑制している (Yoshida *et al.*, 2005)。前述のように異なる連結型のポリユビキチン鎖は基質タンパク質の運命や機能に異なった影響を与えるので、脱ユビキチン化酵素のイソペプチダーゼ活性にポリユビキチン鎖の連結型に対する特異性がある場合は、脱ユビキチン化酵素が特定の連結型のポリユビキチン鎖を選択的に分解して他の連結型のポリユビキチン鎖を残すことにより、基質タンパク質の機能をより緻密に制御することが可能となる。実際、いくつかの脱ユビキチン化酵素は特定の連結型のポリユビキチン鎖を選択的に分解することが報告されている (Fig. 1-2A, Komander *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2008; Winborn *et al.*, 2008; Mevissen *et al.*, 2013)。その他に、脱ユビキチン化酵素は新規に合成されたユビキチン前駆体や細胞内に存在している遊離ユビキチン鎖（標的タンパク質に共有結合していないユビキチン鎖）を分解することにより、単量体ユビキチンを作り出す役割を果たすことなども知られている (Reyes-Turcu *et al.*, 2006)。しかし、多くの脱ユビキチン化酵素の細胞内における役割は、明らかとなっていない。

第四節 脱ユビキチン化酵素の基質認識機構

脱ユビキチン化酵素が基質タンパク質を認識する分子機構は、1) 脱ユビキチン化酵素分子内の基質認識ドメイン（あるいはモチーフ）を用いる場合と、2) 基質認識を担う他のタンパク質との相互作用を介する場合に分けることができる (Fig. 1-2B)。1) の例として、USP7 は N 末端に存在する p53 結合ドメインを介して p53 と結合することで、p53 に対する基質特異性を獲得している (Sheng *et al.*, 2006)。また、OTUD1 (OTU deubiquitinase 1) や ataxin-3 の UIM はこれらの脱ユビキチン化酵素が Lys63 連結型ポリユビキチン鎖を特異的に分解する上で必要である (Winborn *et al.*, 2008; Mevissen *et al.*, 2013)。2) の例として、USP8 や AMSH はユビキチン結合タンパク質 STAM1/2 (signal transducing adaptor molecule 1/2) を介してユビキチン化した EGF 受容体を基質として認識し、EGF 受容体に付加されたユビキチン鎖を分解している (Mizuno *et al.*, 2005)。しかし、脱ユビキチン化酵素がそれぞれに特異的な基質をどのように認識しているのか、その

分子機構のほとんどが明らかになっていないのが現状である。

第五節 本論文の構成

ここまで述べたように脱ユビキチン化酵素の研究は我々のグループを含む多数の研究グループにより鋭意進められてきたが、未だに不明な点が多い。特に、脱ユビキチン化酵素のそれぞれについての特異的な基質タンパク質の同定、基質認識機構の解明は急務である。本論文の第一章では、分子内にユビキチン結合モチーフを有する脱ユビキチン化酵素 USP25 を例にとり、USP25 の基質認識機構について詳細な解析を行った。その結果、USP25 の N 末端領域に存在する UIM が USP25 の Lys48 連結型ポリユビキチン鎖に対する選択的な酵素活性に重要であることが明らかとなった。第二章では、ユビキチン結合タンパク質 STAM1/2 と相互作用して働く脱ユビキチン化酵素 USP8 に焦点をあて、USP8 の新規基質タンパク質の同定を試みた。その結果、USP8 は STAM1 を介して COP II コートタンパク質 Sec31A を認識・脱ユビキチン化することでタンパク質分泌を制御していることが明らかとなった。総合討論では、これらの成果を他の脱ユビキチン化酵素の知見と比較しながら脱ユビキチン化酵素の分子種特異的な基質認識機構や生理的意義に関して議論し、最後に今後の展望を述べたい。

第一章 USP25 の基質認識機構

緒言

脱ユビキチン化酵素のポリユビキチン鎖に対する特異性の獲得には、脱ユビキチン化酵素内の酵素活性ドメインや、ユビキチン結合ドメイン、もしくはモチーフの性質が重要であることが分かっている。いくつかの脱ユビキチン化酵素において Lys63 連結型ポリユビキチン鎖に対する特異性獲得メカニズムが明らかになっているのに対して (Komander *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2008; Winborn *et al.*, 2008; Mevissen *et al.*, 2013)、細胞内で最も豊富に存在する Lys48 連結型ポリユビキチン鎖に対する特異性獲得メカニズムはあまり知られていない。

TRAF3は、様々なサイトカインやパターン認識受容体の下流の獲得免疫もしくは自然免疫シグナルを制御するE3ユビキチンリガーゼである。TRAF3のシグナル活性は異なる種類のユビキチン鎖で異なった制御を受ける (Hacker *et al.*, 2011)。E3ユビキチンリガーゼcIAP (cellular inhibitor of apoptosis) によって付加されるLys48連結型のポリユビキチン鎖はTRAF3のプロテアソームにおける分解シグナルとして働き、これによってレセプターに相互作用していたMEKK1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1) が細胞質に解放され、MAPキナーゼ経路の活性化し、炎症性サイトカインの産生を促す (Matsuzawa *et al.*, 2008)。一方、TRAF3自身のユビキチンリガーゼ活性によるTRAF3のLys63連結型ポリユビキチン化はリン酸化酵素TBK1 (TANK-binding kinase1) と IKK ϵ (I-kappa-B kinase epsilon) を活性化することで、転写因子IRF3 (Interferon regulatory factor 3) をリン酸化依存的に活性化し、I型インターフェロンの産生を促す (Tseng *et al.*, 2010)。それゆえ、TRAF3のユビキチン依存的な活性が脱ユビキチン化による拮抗した制御を受けているとしたら、その脱ユビキチン化酵素が一方の経路のみを抑制するためには、Lys63もしくはLys48連結型のポリユビキチン鎖に対する特異性もしくは選択性が必要である。実際、脱ユビキチン化酵素OTUD5はTRAF3

のLys63連結型ポリユビキチン鎖を選択的に分解することで、TRAF3-TBK1間の相互作用を減弱させ、I型インターフェロンの産生を抑えることが示されている。更には、脱ユビキチン化酵素 OTUB1/2 (otubain-1/2) と UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1) もまた、TRAF3のLys63連結型ポリユビキチン鎖を除去することで、I型インターフェロンの産生を抑えることが示されている (Li *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2014; Karim *et al.*, 2013)。

一方で、USPファミリーに属する脱ユビキチン化酵素であるUSP25は、TRAF3のLys48連結型ポリユビキチン鎖を選択的に取り除き、そのプロテアソーム分解を阻害することで、TRAF3の分解によるMAPキナーゼ経路の活性化を抑制する (Zhong *et al.*, 2013a)。USP25には、USPファミリーに属する脱ユビキチン化酵素に保存されたCysボックスとHisボックスからなる酵素活性ドメインに加えて、N末端側にユビキチンに結合しうるドメインもしくはモチーフであるUBAドメインと2つのUIMが隣り合って存在している。UIMはおよそ20アミノ酸からなるユビキチン結合性の α ヘリックス配列であり、コンセンサス配列は -AcAcAc ϕ --Ala ϕ --Ser--Ac- (Ac: 酸性アミノ酸[AspもしくはGlu]; ϕ : 大きい疎水性アミノ酸 [LeuもしくはIle]) で表される。本研究は、USP25がLys48連結型ポリユビキチン鎖に対する選択性を獲得するためにはUIMが必要であることを示した。これは、脱ユビキチン化酵素がLys48連結ポリユビキチン鎖に対する特異性を獲得する上で、いままでにない新しいメカニズムである。

実験材料と手法

プラスミドの作製

N末端にFlagタグを付加したUSP25 (Flag-USP25) を哺乳動物細胞に発現するために、ヒトUSP25のcDNAを理化学研究所バイオリソースセンター(筑波)から入手し、pME-Flag (Kato *et al.*, 2000) に挿入した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)-UIM融合タンパク質を作製するために、野生型もしくは変異を導

入したUSP25のUIM1とUIM2を含む領域（タンデムUIM領域、アミノ酸番号94-144）をpGEX-6P-2 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) に挿入した。変異の導入はQuikChange site-directed mutagenesis system (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) もしくはPrimeSTAR Mutagenesis Kit (Takara, Tokyo, Japan) を用いて行った。Ankrd13A (ankyrin repeat domain-containing protein 13A) のUIM3とUIM4を含む領域とGSTとの融合タンパク質、および、USP37のUIM2とUIM3を含む領域とGSTとの融合タンパク質の作製には、以前作製した発現プラスミドを使用した (Tanno *et al.*, 2012; Tanno *et al.*, 2014)。HAタグを付加したK48R変異型ユビキチン (ユビキチンの48番目のLys残基をArgに置換した変異体)、およびK63R変異型ユビキチン (63番目のLys残基をArgに置換した変異体)の発現プラスミドは、HA-ユビキチン発現プラスミドpcDNA3.1-HA-Ub (東京都医学研究所鈴木博士より供与)に点変異を導入して作製した。

細胞培養およびDNAトランスフェクション

HEK293T細胞（ヒト胎児腎臓由来）は、10%ウシ胎児血清（FBS）を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて培養した。細胞へのDNAのトランスフェクションは、polyethylenimine (PEI) transfection reagents (Polyscience, Warrington, PA, USA) を用い標準的なプロトコールに従って行った。

免疫沈降およびイムノブロット

HEK293T 細胞をlysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, and 1 µg/ml pepstatin A) で溶解し、15,000 rpmで15分遠心後、上清を回収した。免疫沈降やイムノブロットは標準的なプロトコールで行った。免疫沈降には 抗Flag抗体 (1 µg; clone M2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) もしくは抗HA 抗体 (2.5 µg; clone 12CA5, Sigma-Aldrich) を使用した。イムノブロットに使用した抗体と希釈倍率は以下の通りである：

一次抗体

抗ubiquitin抗体 (clone P4D1; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) : 1,000倍希釈

抗Flag抗体 (clone M2) : 1 µg/ml

抗α-tubulin抗体 (Abcam, Cambridge, MA, USA) : 2,500倍希釈

二次抗体

ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 (GE Healthcare) : 10,000-20,000倍希釈

イムノブロットは、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて起こした化学発光を、ImageQuant LAS 4000mini chemiluminescence detection system (GE Healthcare) を用いて検出した。

プルダウンアッセイ

GST-UIIM融合タンパク質とユビキチン鎖の結合アッセイのため、GST-UIIM融合タンパク質を大腸菌 (BL-21) に発現させた後、glutathione-Sepharoseビーズ (GE Healthcare) を用いて精製した。このGST-UIIM融合タンパク質をglutathione-Sepharoseビーズに結合し、種々の濃度のLys48連結型4量体ユビキチン鎖 (Boston Biochem, Boston, MA, USA)、Lys63連結型4量体ユビキチン鎖 (Boston Biochem)、Lys48連結型オリゴマーユビキチン鎖 (2-7量体の混合物, Boston Biochem, 1 µg)、もしくはLys63連結型オリゴマーユビキチン鎖 (Boston Biochem, 0.2 µg) とlysis buffer中で混和し、4°Cで16時間インキュベートした。ビーズをlysis bufferで洗浄したのち、結合したユビキチン鎖をSDS-PAGEで分離し、イムノブロットにより検出した。

全長USP25とユビキチン鎖の結合アッセイのため、Flag-USP25をHEK293T細胞に発現させた。細胞を1% SDSを含むlysis bufferで溶解し、100°Cで10分加熱することによりUSP25と内在性ユビキチン鎖からなる複合体を乖離した (Hot-lysis法)。遠心後、上清をlysis bufferで5倍希釈し、抗Flag抗体が共有結合したビーズ (anti-Flag M2 affinity gel, Sigma-Aldrich) を加え、ビーズにFlag-USP25を結合させ

た。このビーズを用いて、GST-UIM融合タンパク質を用いたプルダウンアッセイと同様の方法で実験を行った。

in vitro 脱ユビキチン化アッセイ

Flag-USP25をHEK293T細胞に発現させた後、anti-Flag M2 affinity gelに結合させ、100 μ lのelution buffer (400 μ g 3xFlag peptide, 1 mM dithiothreitolを含むTris-buffered saline) で溶出した。得られたFlag-USP25タンパク質はSDS-PAGEで分離した後でCBB染色を行うことにより精製度を確認し、同時に泳動したウシ血清アルブミンとの比較によってタンパク濃度を測定した。免疫精製したFlag-USP25 (~50 ng; ~50 fmol) を0.5 μ g (14.7 pmol) のLys48連結型4量体ユビキチン鎖またはLys63連結型4量体ユビキチン鎖 (Boston Biochem) と混合し、1 mM dithiothreitolを含むTris-bufferd saline (6 μ l) 中で37°Cにて反応させた。反応後のサンプルをSDS-PAGEで分離後、銀染色によって検出した。

結果

UIMを欠失したUSP25の作製

ヒトUSP25のドメイン構造、および、USP25のUIM1およびUIM2のアミノ酸配列とUIMのコンセンサス配列の比較をFig. 2-1Aに示した。USP25のUIMの機能を調べるために、一方もしくは両方のUIMに点変異を導入した (Δ UIM1、 Δ UIM2、 Δ UIM1UIM2、Fig. 2-1B)。点変異ではUIMのコンセンサス配列に含まれるAla/Val残基とSer残基 (Fig. 2-1Aにおいてドット付きで表示) をそれぞれGlyとAlaに置換した。これらの変異によりUIMはユビキチンと結合できなくなることが知られている (Sato *et al.*, 2009; Tanno *et al.*, 2012; Tanno *et al.*, 2014)。次に、脱ユビキチン化酵素活性を欠失した変異体を作製するために、酵素活性中心のCysボックスの178番目のCysをSerに置換する変異 (C178S) を導入した (Fig. 2-1B)。さらに、UBAドメインを欠失した変異体も作製した (Fig. 2-1B)。

USP25のUIM1とUIM2は内在性のユビキチン化タンパク質と結合する

まず、各種の変異型USP25とユビキチン化タンパク質との細胞内における結合量を調べるために、N末端にFlagタグを付加したUSP25 (Flag-USP25) をHEK293T細胞に発現させ、USP25と共免疫沈降するユビキチン化タンパク質を抗ユビキチン抗体によるイムノブロットにより検出した。USP25の脱ユビキチン化酵素活性によるユビキチン鎖の加水分解を防ぐために、酵素活性を欠失したC178S変異体 (CS) を使用した。その結果、USP25^{CS}は内在性のユビキチン化タンパク質と共沈降した (Fig. 2-1C)。USP25^{CS}と比較して、USP25 ^{Δ UIM1+CS}もしくはUSP25 ^{Δ UIM2+CS}に共沈降するユビキチン化タンパク質は顕著に少なかった。USP25 ^{Δ UIM1UIM2+CS}は、USP25 ^{Δ UIM1+CS}と同程度の結合量を示した。USP25 ^{Δ UBA+CS}は、USP25^{CS}と比較してユビキチン化タンパク質の結合量に大きな違いは見られなかった。

USP25はUIM1とUIM2が協調的に働くことによりLys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合する

USP25のユビキチン鎖に対する結合特性を調べるために、HAタグを付加した変異型ユビキチン (K48R, Lys48をArgに置換したもの; K63R, Lys63をArgに置換したもの) をHEK293T細胞に発現した。これらの変異型ユビキチンを発現することにより、それぞれLys48連結型あるいはLys63連結型のユビキチン鎖の形成を抑制することができる。これらの変異型ユビキチンを発現した細胞の抽出液とFlag-USP25^{CS}を発現した細胞の抽出液を混合し、抗Flag抗体でFlag-USP25^{CS}を免疫沈降した後、共沈降するユビキチン化タンパク質を抗HA抗体を用いたイムノブロットによって検出した。その結果、USP25^{CS}はユビキチン化タンパク質と結合したが、HA-Ub^{K48R}の発現によりLys48連結型ユビキチン鎖の形成を抑制したサンプルではユビキチン化タンパク質の結合量が顕著に減少した (Fig. 2-1D)。HA-Ub^{K63R}を発現したサンプルではユビキチン化タンパク質の結合量に大きな影響は見られなかった。次に、同様の細胞抽出液を用いて、抗HA抗体を用いた免疫沈降および抗Flag抗体を用いたイムノブロットを行ったところ、ユビキチン化タンパク質と共にUSP25^{CS}が沈降したが、HA-Ub^{K48R}を発現したサンプルではUSP25^{CS}の共沈降は見られず、HA-Ub^{K63R}を発現したサンプルではUSP25^{CS}の共沈降が見られた (Fig. 2-1E)。これらの結果は、USP25がLys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合する性質を持つことを示している。

続いて、USP25のUIMのユビキチン鎖に対する結合特性を調べるために、USP25のUIM1とUIM2を含む領域 (タンデムUIM領域と呼称する; アミノ酸番号94-144; UIM間のスペーサー配列も含む) にGSTタグを付加した融合タンパク質を大腸菌に発現し、精製した (Fig. 2-2A, GST-WT)。また、Fig. 2-1Bと同じ変異を持つGST-UIM融合タンパク質も作製した (Fig. 2-2A, GST-ΔUIM1, ΔUIM2, ΔUIM1UIM2)。種々の濃度のLys48連結型もしくはLys63連結型のユビキチン鎖 (4量体) を用い、GST-WTとユビキチン鎖の*in vitro*における結合を調べたところ、Lys48連結型ユビキチン鎖は強く結合したが、Lys63連結型ユビキチン鎖はほとんど結合しなかった (Fig. 2-2B)。同様の実験を2-7量体のユビキチン鎖の混合物

を用いて行った場合でも、GST-WT はLys48連結型ユビキチン鎖とは強く結合したが、Lys63連結型ユビキチン鎖にはほとんど結合しなかった (Fig. 2-2C)。USP25のUIM1とUIM2のどちらか一方に変異を導入すると、Lys48連結型ユビキチン鎖に対してほとんど結合しなくなったことから、タンデムに並んだ2つのUIMが協調して働くことでLys48連結型ユビキチン鎖に強く結合することが可能となっていると考えられる。コントロールとして用いたUSP37のUIMを含む領域は、既報の通り、Lys48連結型ユビキチン鎖とLys63連結型ユビキチン鎖の両方に結合した(Tanno *et al.*, 2014)。

GSTは単独でホモ2量体を形成することが知られている (Fabrini *et al.*, 2009)。GSTの2量体化がUIMのユビキチン鎖への結合能に影響を与えている可能性を否定するために、Flag-USP25^{CS}を用いて同様の解析を行った。まず、Flag-USP25^{CS}を発現したHEK293T細胞を1% SDSを含むlysis bufferで溶解、加熱することにより、USP25^{CS}に結合するタンパク質を乖離させた。続いて、SDSを含まないlysis bufferで希釈することにより非変性条件下に戻したのち、抗Flag抗体でFlag-USP25^{CS}を免疫沈降し、ユビキチン鎖 (2-7量体の混合物) との*in vitro*における結合を調べた。その結果、Flag-USP25^{CS}はLys48連結型ユビキチン鎖により選択的に結合した (Fig. 2-2D)。さらに、UIM1もしくはUIM2のどちらか一方に変異を導入すると、USP25のLys48連結型ユビキチン鎖に対する結合能は顕著に減少した (Fig. 2-6B)。他のタンパク質のUIMにも見られる共通の特徴として(Hurly *et al.*, 2006)、USP25のUIMは2-3量体のユビキチン鎖には結合せず、4-7量体の長いユビキチン鎖に対して強く結合した (Fig. 2-2C, 2-2D, 2-2E)。

以上の結果から、USP25はLys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合するタンパク質であり、その結合にはUIM1とUIM2が協調的に働くことが重要であることが明らかとなった。

USP25はLys48連結型ユビキチン鎖に対してより高いイソペプチダーゼ活性を示す

次に、USP25のユビキチン鎖に対するイソペプチダーゼ活性について調べた。野生型および変異型のFlag-USP25をHEK293T細胞に発現させ、抗Flag抗体で免疫沈降し、Flagペプチドを加えることによりUSP25を抗体から溶出した。溶出物の一部をSDS-PAGEによって分離しCBB染色を行い、USP25が高い精製度で回収されていることを確認した (Fig. 2-3A)。免疫精製した野生型のUSP25とLys48連結型あるいはLys63連結型の4量体ユビキチン鎖を37°Cで種々の時間インキュベートし、反応物をSDS-PAGEで分離したのち、銀染色を行った。その結果 (Fig. 2-3B)、USP25をLys48連結型ユビキチン鎖と反応させた場合、10分以内にほとんどの4量体ユビキチン鎖が消滅し、2量体と単量体が出現した。30分では、4量体および2量体はさらに減少し、単量体が増加した。一方、Lys63連結型ユビキチン鎖と反応させた場合は、10分の時点で3量体、2量体および単量体が出現したが、ある程度の量の4量体が残っていた。30分の時点では4量体は消滅したが、3量体は残っていた。これらの結果は、USP25はLys63連結型ユビキチン鎖に比べてLys48連結型ユビキチン鎖を効率的に分解できることを示している。また、両方の連結型のユビキチン鎖において、30分後も2量体ユビキチン鎖が多く残っていた。これは、USP25は2量体ユビキチン鎖よりも3量体以上のユビキチン鎖に対して強いイソペプチダーゼ活性を発揮することを示している。

UIM 1とUIM2はUSP25がユビキチン鎖に対して高い酵素活性を発揮するために必要である

USP25のイソペプチダーゼ活性におけるUIM1とUIM2の必要性を調べるため、これらに変異を導入したUSP25とLys48連結型あるいはLys63連結型の4量体ユビキチン鎖を反応させた。この解析では、Lys63連結型ユビキチン鎖も十分に分解が進行するように、反応時間を30分間とした。Lys48連結型ユビキチン鎖と反応させた場合、USP25^{ΔUIM1}とUSP25^{ΔUIM2}の両者ともUSP25^{WT}に比べて4量体および3量体ユビキチン鎖の量が多く、イソペプチダーゼ活性が低下していた。USP25^{ΔUIM1UIM2}は4量体および3量体ユビキチン鎖の量がさらに多く、単量体が減少していたことから、さらに酵素活性が低下していると考えられた。一方、Lys63

連結型ユビキチン鎖と反応させた場合、USP25^{ΔUIM1}はUSP25^{WT}に比べて4量体および3量体ユビキチン鎖が多く、イソペプチダーゼ活性が低下していた。USP25^{ΔUIM2}はUSP25^{WT}と同程度の活性であった (Fig. 2-3C)。

USP25のタンデムUIM領域は改変によりユビキチン鎖結合選択性を変換することができる

ここまでの解析から、USP25のタンデムUIM領域がLys48連結型ユビキチン鎖に対して選択的に結合すること、USP25がLys48連結型ユビキチン鎖に対してより高いイソペプチダーゼ活性を示すことがわかった。私は、このUSP25のイソペプチダーゼ活性の性質は、タンデムUIM領域の結合選択性に依存している可能性があると考えた。

この可能性を検証するために、USP25のタンデムUIM領域にいくつかの種類の変異を加えることで、ユビキチン鎖に対する結合選択性を変換できるか検討した (Fig. 2-4A)。UIMを持つ他のタンパク質の研究により、2つのUIMの間のアミノ酸の数がLys48連結型あるいはLys63連結型のユビキチン鎖に対する結合選択性を決める上で重要であり、2つのUIMの間が7アミノ酸であるときにLys63連結型ユビキチン鎖に対する結合能が最大になることが報告されている (Sato *et al.*, 2009; Sims *et al.*, 2009)。そこで、USP25のUIM1とUIM2の間のスペーサー配列 (NRAFRETGI, 9アミノ酸) を、7つアラニンが連続した配列 (AAAAAAA, “Ala x7変異” と呼称する)、もしくは同じ配列の最後の2アミノ酸を除いた配列 (NRAFRET, “-2変異” と呼称する) に交換した。また、スペーサー配列を含むタンデムUIM領域全体を、Lys63連結型ユビキチン鎖に対して選択的に結合することが知られているAnkrd13Aタンパク質のC末端側のタンデムUIM領域 (UIM3とUIM4, スペーサー配列は7アミノ酸) に交換したものも作製した (“Ank13変異” と呼称) (Tanno *et al.*, 2012)。これらの変異型タンデムUIM領域をGSTに融合して、プルダウンアッセイによりLys48連結型あるいはLys63連結型のユビキチン鎖への結合能を調べたところ、予想通り、すべての変異体においてLys48連結型ユビキチン鎖への結合能は低下し、Lys63連結型ユビキチン鎖への結合能は上昇した

(Fig. 2-4B)。これは、導入した変異によって結合選択性が変換されたことを示している。

タンデムUIM領域のユビキチン鎖結合選択性はUSP25がLys48連結型ユビキチン鎖を効率的に分解することを可能にしている

最後に、タンデムUIM領域に上記の変異を導入したFlag-USP25をHEK293T細胞に発現させ、抗Flag抗体で免疫精製し (Fig. 2-5A)、Lys48連結型あるいはLys63連結型の4量体ユビキチン鎖と反応させた。Lys63連結型ユビキチン鎖と反応させた場合、4量体ユビキチンの減少量と単量体の増加量から判断すると、野生型USP25に比べて7xAla変異体および-2変異体はイソペプチダーゼ活性がわずかに上昇、Ank13変異体は大きく上昇することがわかった (Fig. 2-5B)。この結果は、これらの変異型タンデムUIM領域のLys63連結型ユビキチン鎖への結合能とよく相関している (Fig. 2-4B)。一方、Lys48連結型ユビキチン鎖と反応させた場合、4量体と3量体の減少量、および2量体と単量体の増加量から判断すると、Lys48連結型に対するイソペプチダーゼ活性は3つの変異体で減少、特に、7xAla変異体と-2変異体では顕著に減少することがわかった。以上から、タンデムUIM領域のユビキチン鎖への結合選択性が、USP25がLys48連結型ユビキチン鎖を効率的に分解することを可能にしていると結論した。

考察

本章の実験結果から、以下のことが明らかとなった。

- ・ 脱ユビキチン化酵素USP25は、Lys48連結型ユビキチン鎖に結合する一方、Lys63連結型ユビキチン鎖にはほとんど結合しないという結合選択性を持つ。
- ・ USP25のユビキチン鎖との結合にはUIM1とUIM2の両方が必要であり、これらおよびスペーサー配列を含めた“タンデムUIM領域”の配列特性によってLys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合することが可能となっている。
- ・ USP25は、Lys63連結型ユビキチン鎖に比べてLys48連結型ユビキチン鎖に対してより高いイソペプチダーゼ活性を示す。
- ・ タンデムUIM領域のユビキチン鎖結合選択性が、USP25がLys48連結型ユビキチン鎖を効率的に分解することを可能にしている。

序論で述べたように、UIMはユビキチン結合能を有する約20アミノ酸のモチーフであり、様々なタンパク質に見出すことができる。およそ90種あるヒトの脱ユビキチン化酵素の中では、6つがUIMを持っている (Komander *et al.*, 2009)。以下の考察では、他のUIMを有するタンパク質と比較することによりUSP25のUIMの特徴を明らかにし、このタンデムUIM領域がUSP25の基質認識機構において果たす役割について議論したい。

タンデムUIM領域のユビキチン鎖に対する結合能

UIMはしばしば最大10アミノ酸のスペーサー配列を挟んだタンデムな形でみつか。USP25の2つのUIM領域は、どちらか一方を不活性化するだけで、USP25とユビキチン化タンパク質および精製ユビキチン鎖との結合が顕著に減少した (Fig. 2-2C, 2-2E)。Rap80 (Sato *et al.*, 2009; Sims *et al.*, 2009)、Ataxin-3 (Song *et al.*, 2010)、Ankrd13 (Tanno *et al.*, 2012)、USP37 (Tanno *et al.*, 2014)などのタンパク質もUIMをタンデムな形で有しているが、これらのタンパク質でもUIMが協調的に働くことによりユビキチン鎖に結合することがわかっている。さらに、USP25

のUIMは3量体以上の長いユビキチン鎖に対して強い結合能を示したが (Fig. 2-2C, 2-2D, 2-2E)、この性質も他のタンパク質のUIMと共通している。

一方、結合できるユビキチン鎖の連結型に着目すると、USP25のタンデムUIM領域には他ではあまり見られない特徴がある。本研究ではUSP25のタンデムUIM領域を用いたユビキチン鎖のプルダウンアッセイを行い、Lys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合することを示した (Fig. 2-2B, 2-2C)。また、K48RまたはK63R変異型ユビキチンを発現させた細胞を用いた共免疫沈降を行い、細胞内においてもUSP25はLys48連結型ユビキチン鎖が付加したタンパク質により強く結合することを示した (Fig. 2-1D, 2-1E)。これまでに、Lys63連結型ユビキチン鎖に選択的に結合するUIMを持つタンパク質としてHrs (Barriere *et al.*, 2007)、Rap80 (Sato *et al.*, 2009; Sims *et al.*, 2009)、Ankrd13 (Tanno *et al.*, 2012) が報告されている。また、Lys48連結型ユビキチン鎖とLys63連結型ユビキチン鎖に同程度の結合能を示すUIMを持つタンパク質としてはAtaxin-3 (Winborn *et al.*, 2008)、USP37 (Tanno *et al.*, 2014) が報告されているが、Lys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合するUIMの報告は少なく、USP25のタンデムUIM領域の大きな特徴と言える。

Lys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合するUIMの数少ない他の例としては、酵母の転写因子Met4に単独で存在するUIM (Flick *et al.*, 2006) と、プロテアソームに相互作用するタンパク質AIRAPL (Arsenite-inducible RNA-associated protein-like protein) に存在するタンデムUIM (Rahighi *et al.*, 2016) が知られている。AIRAPLのUIMについてはX線結晶構造が解かれており、タンデムUIMの片方が2分子のユビキチンと同時に結合できるタイプのUIM (double-sided UIM) であり、このdouble-sided UIMがLys48連結型ユビキチン鎖の中の2つのユビキチン分子の間に入り込むことが、選択性を生み出す上で重要であることが示されている (Hirano *et al.*, 2006)。興味深いことに、USP25のUIM1のアミノ酸配列はdouble-sided UIMに共通する配列上の特徴を持っていることから、USP25もAIRAPLと似た機構によってLys48連結型ユビキチン鎖に選択的に結合している可能性が考えられる。USP25のLys48連結型ユビキチン鎖への選択的な結合メカ

ニズムを原子レベルで解明するために、今後、USP25とLys48連結型ユビキチン鎖の複合体の構造生物学的な解析を進める必要がある。

タンデムUIM領域が脱ユビキチン化反応に果たす役割

USP25のUIMに不活性化変異を導入すると、ユビキチン鎖に対するイソペプチダーゼ活性が低下したことから (Fig. 2-3C)、UIMが脱ユビキチン化反応を促進する役割を果たすことがわかった。OTUD1 (Mevissen *et al.*, 2013) やUSP37 (Tanno *et al.*, 2014) などの他のUIMをもつ脱ユビキチン化酵素の解析でもUIMが脱ユビキチン化反応を促進することが知られており、今回の結果とよく一致している。

USP25がどの連結型のユビキチン鎖を分解するかに関して、これまでに、Lys48連結型ユビキチン鎖とLys63連結型ユビキチン鎖の両方を分解するという報告 (Zhong *et al.*, 2013b) があったが、本研究における詳細な解析から、USP25はLys63連結型よりもLys48連結型ユビキチン鎖を効率的に分解することが明らかとなった (Fig. 2-3B)。さらに、2つのUIM間のスペーサー配列に変異を導入したり、タンデムUIM領域全体をAnkrd13Aのものに交換することによりLys63連結型ユビキチン鎖に結合しやすくなるようにUSP25を改変すると、USP25はLys63連結型ユビキチン鎖を効率的に分解できるようになることがわかった (Fig. 2-5B)。これらの結果から、タンデムUIM領域がLys48連結型ユビキチン鎖を酵素活性中心近傍に引き寄せることで、USP25がLys48連結型ユビキチン鎖を効率的に分解できるようになっているというモデルが考えられる (Fig. 2-5C)。このモデルを検証するためにも、USP25とLys48連結型ユビキチン鎖の複合体の結晶構造解析は重要である。

既に述べたが、およそ90種のヒトの脱ユビキチン化酵素のうち、6つがUIMを持っている (Komander *et al.*, 2008)。Ataxin-3/Josephinファミリーに属する脱ユビキチン化酵素Ataxin-3は3つのUIMをもっており、そのうち2つはタンデムにらんだUIMである。Ataxin-3はLys63連結型ユビキチン鎖を選択的に分解するが、3つのUIMをすべて不活性化する変異を導入するとLys48連結型とLys63連結型ユ

ビキチン鎖の両方を同程度分解するようになる (Winborn *et al.*, 2008)。従って、Ataxin-3のUIMはLys63連結型ユビキチン鎖を選択的に分解する反応に重要な役割を果たしていると考えられるが、このUIMはLys48連結型ユビキチン鎖とLys63連結型ユビキチン鎖の両方に同程度に結合することから、選択的分解の詳細な分子機構は不明である (Winborn *et al.*, 2008)。OTUファミリーに属する脱ユビキチン化酵素OTUD1は、酵素活性ドメインのC末端側に単一のUIMをもち、Lys63連結型ユビキチン鎖を選択的に分解する。OTUD1のUIMがどの連結型のユビキチン鎖に結合するかは報告がないが、OTUD1のUIMを欠失させると酵素活性が低下するばかりか、Lys63連結型ユビキチン鎖に対する特異性も失われる (Mevissen *et al.*, 2013)。従って、OTUD1のUIMもLys63連結型ユビキチン鎖を選択的に分解する反応に重要な役割を果たしていると言える。

このように、UIMを持つ脱ユビキチン化酵素に関するこれまでの研究では、UIMがLys63連結型ユビキチン鎖の選択的な分解を可能にする例は報告されてきたが、UIMがLys48連結型ユビキチン鎖の選択的な分解に寄与する例は知られていなかった。本研究は、Lys48連結型ユビキチン鎖に対して選択的に結合するユビキチン結合モチーフが、脱ユビキチン化酵素にLys48連結型ユビキチン鎖を選択的に分解する能力を与えていることを示す初めての報告である。

今後の課題

本研究ではUSP25のイソペプチダーゼ活性に関して*in vitro*系の解析を行ったが、USP25が細胞内でもタンデムUIM領域を介してLys48連結型ユビキチン鎖を選択的に分解しているのか調べるのは重要な課題である。USP25の細胞内における基質タンパク質としてはTRAF3/5/6などが知られている (Zhong *et al.*, 2013a; Lin *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2013a; Zhong *et al.*, 2012)。これまでの他のグループの研究によると、USP25はTRAF3のLys48連結型ユビキチン鎖を分解する一方 (Zhong *et al.*, 2013a; Lin *et al.*, 2015)、TRAF5/6についてはLys63連結型ユビキチン鎖を分解するという報告がある (Zhong *et al.*, 2013a; Zhong *et al.*, 2012)。本研究の成果から、私は、USP25のタンデムUIM領域は、USP25によるTRAF3の脱ユビキ

チン化では重要な役割を果たす一方、TRAF5/6の脱ユビキチン化への寄与は小さいだろうと予想している。

さらに、USP25がタンデムUIM領域を使ってLys48連結型ユビキチン鎖を選択的に分解することの生理的意義についても明らかにしていく必要がある。興味深いことに、USP25はタンデムUIM領域の特定のリジン残基がSUMO化を受けるとUIMのユビキチンに対する結合が阻害され、USP25の酵素活性が阻害されることが示されている (Denuc *et al.*, 2006)。また、同じリジン残基のユビキチン化がUSP25の酵素活性を上昇させることも示されている (Meulmeester *et al.*, 2008)。私は、細胞内でタンデムUIM領域がSUMO化やユビキチン化を受けると、USP25の酵素活性のユビキチン鎖連結型に対する選択性が変化する可能性は高いと考えている。そして、そのような機構を介してUSP25の基質タンパク質のユビキチン化量が連結型ごとに調節され、結果としてTRAFタンパク質を介した自然免疫シグナルなどが緻密に制御されている可能性があると考えており、このような方向でさらなる研究を進めたいと考えている。

第二章 USP8 の基質認識と小胞輸送における新機能

緒言

第一章では、USP25 の内部に存在する 2 つの UIM 配列が脱ユビキチン化酵素の基質選択性を決定している例について示した。一方、序章で記したように、脱ユビキチン化酵素には内部の基質認識モチーフ/ドメインを持たず、ユビキチン結合能を有する他のタンパク質と相互作用することにより基質認識を行うものも存在する。第二章では、そのような脱ユビキチン化酵素の一つ USP8 に着目し、USP8 がユビキチン結合タンパク質 STAM1/2 と相互作用してどのようなタンパク質を脱ユビキチン化するか新規基質の同定を試みた。その結果、新たな基質タンパク質として COPII コートタンパク質 Sec31 を見出し、これをもとに USP8 の新たな細胞内機能を解明した。

USP8 の機能とその制御

多くの細胞膜タンパク質がユビキチン化依存的に細胞内に取り込まれリソソームに運ばれて分解されるが、USP8 はエンドソームの近傍に存在し、ユビキチン化された EGF 受容体などを脱ユビキチン化することによってこれらの細胞内への取り込みや分解を抑制することはよく知られている (Mizuno *et al.*, 2005)。一方、USP8 はエンドソーム近傍に限らず細胞質全体に存在している (Reincke *et al.*, 2015)、USP8 はミトコンドリア膜上のタンパク質 Parkin を脱ユビキチン化することによりマイトファジーを制御する (Durcan *et al.*, 2014) などの報告があることから、私は USP8 がエンドソーム以外でも何らかの重要な働きをしている可能性が高いと考えている。

USP8 には、N 末端領域に Rhodanese ドメインと MIT ドメイン、中央領域に 3 つの SH3-binding motif (SBM) と 14-3-3 結合モチーフ (RSYpSSP, pS はリン酸化セリン)、C 末端領域に脱ユビキチン化酵素活性を担う USP ドメインが存在する (Fig. 3-1)。USP8 は Rhodanese ドメインを介してユビキチンリガーゼ RNF41 (RING finger protein 41) と (Wu *et al.*, 2004)、MIT (microtubule interacting and transport) ドメインを介して ESCRT-III 複合体の CHMP (charged multivesicular body protein) タンパク質と (Row *et al.*, 2007)、SBM を介してユビキチン結合能をもつタンパク質 STAM1/2 と (Kato *et al.*, 2000)、14-3-3 結合モチーフを介して 14-3-3 タンパク質と結合する。USP8 と RNF41 や CHMP タンパク質の相互作用の意義はよくわかっていない。USP8 と STAM1/2 との相互作用は USP8 の酵素活性を上昇させ (Row *et al.*, 2007, Berlin *et al.*, 2010)、この複合体の形成は USP8 が EGF 受容体を基質として認識するために必要であることが知られている (Mizuno *et al.*, 2005, Berlin *et al.*, 2010)。また、USP8 は 14-3-3 結合モチーフのリン酸化に依存して 14-3-3 と相互作用するとその酵素活性が抑制され、細胞分裂期 (M 期) にはこのモチーフのセリン残基が脱リン酸化されることにより 14-3-3 が解離して USP8 の酵素活性が上昇することが知られている (Mizuno *et al.*, 2007)。

COPII 小胞

小胞体内の新生タンパク質は COPII というコートタンパク質によって形成される COPII 小胞によってゴルジ体へと輸送される。COPII コートタンパク質は Sar1 GTPase、Sec23-Sec24 複合体、Sec13-Sec31 複合体の 3 つの因子で構成される。まず、小胞体上の膜タンパク質である Sec12 が GDP 結合型の Sar1 を GTP 結合型に変換する。GTP 結合型の Sar1 は Sec23-Sec24 複合体と結合する。Sec23-Sec24 複合体は、積み荷となる膜タンパク質や、小胞体内部のタンパク質を認識する積み荷受容体と結合する。異なる積み荷タンパク質/積み荷受容体と結合している Sec23-Sec24 複合体同士を Sec13-Sec31 複合体が架橋していくことで、小胞体膜の湾曲が起こり、COPII 小胞が形成される (Jensen & Schekman,

2011)。なお、Sar1 には A と B、Sec23 には A と B、Sec24 には A-D、Sec31 には A と B というアイソフォームが存在する。

コラーゲンの細胞内における小胞輸送

COPII 小胞の積み荷として重要なタンパク質のひとつは細胞外マトリックスのほとんどを占めるコラーゲンである。コラーゲンには骨や真皮に大量に含まれる I 型コラーゲンや基底膜を構成する IV 型、VII 型コラーゲンなどがあり、骨や臓器を形成するうえで細胞の足場として重要な役割を果たしている。コラーゲンの分泌の増減はさまざまな疾患につながるということが明らかになっており、Sec23A や Sec24D の遺伝子変異によりコラーゲンの小胞体からゴルジ体への輸送が損なわれ分泌が低下すると、骨形成の異常や顔面の異形成を伴う Cranio-lenticulo-sutural dysplasia や Cole-Carpenter 症候群が引き起こされる (Boyadjiev *et al.*, 2006; Grabes *et al.*, 2015)。逆に、コラーゲンの過剰な分泌は肝臓や腎臓の繊維化を引き起こすことが知られている (Wynn, 2009)。

一般に COPII 小胞の大きさは直径 60-70 nm であるのに対し、I 型コラーゲンは小胞体内部でおよそ 300 nm の繊維として、IV 型コラーゲンはおよそ 400 nm の繊維として合成されるため、コラーゲンを輸送するための大きな COPII 小胞を形成する未知の機構が存在すると古くから考えられていた (Fromme & Schekman, 2005; Chioran *et al.*, 2017)。近年、小胞体上の膜タンパク質 TANGO1 (Transport and Golgi organization protein 1) が、小胞体内腔側のドメインを介して VII 型コラーゲンを認識する積み荷受容体として働くと同時に、細胞質側のドメインを介して COPII 小胞と相互作用し、コラーゲンを輸送可能な大きな小胞の形成を促すことが示された (Saito *et al.*, 2009)。さらに最近になり、ユビキチンリガーゼの複合体である CUL3-KLHL12 (cullin 3 - Kelch-like protein 12) が Sec31 をモノユビキチン化もしくはマルチモノユビキチン化すると、I 型および IV 型コラーゲンを輸送する大きな COPII 小胞が形成されることが報告された (Jin *et al.*, 2012)。このユビキチンリガーゼ複合体はカルシウム依存的に形成され、これにより Sec31 のユビキチン化が促進することも明らかになっている (McGouty *et*

al., 2015)。しかし、これまでに、Sec31 を標的としコラーゲン分泌を負に制御する脱ユビキチン化酵素は同定されていない。

本章では、まず、USP8 の基質認識に重要なタンパク質である STAM1 の結合タンパク質の探索を基に、USP8 の新規基質として Sec31 を同定した。さらに、USP8 は CUL3-KLHL12 による Sec31 のユビキチン化に拮抗することで、コラーゲンの輸送を抑制することを明らかにした。

材料と手法

プラスミドの作製

myc-USP8を哺乳動物細胞に発現するためのプラスミドは、ヒトUSP8のcDNA (野生型、酵素活性欠失変異体C768A、活性化変異体P720R) をpME-Flag-USP8からpmyc-CMV5に移し替えて作製した (Reincke *et al.*, 2015)。GST-USP8⁷¹⁰⁻¹¹¹⁰の大腸菌発現用プラスミドは、USP8のアミノ酸番号710-1110の断片をpGEX-6P-2 (GE healthcare) に挿入して作製した。Flag-STAM1/2、Flag-STAM1ΔC (アミノ酸番号266-548の領域を欠いた変異体)、myc-STAM1/2の発現プラスミドは、マウスSTAM1およびマウスSTAM2のcDNAをpFlag-CMV2もしくはpmyc-CMV5 (Sigma-Aldrich) に組み込んで作製した。Flag-Sec31A、HA-Sec31AおよびVSVG-GFPを発現するプラスミドは、以前作製されたものを使用した (Yamasaki *et al.*, 2006)。GFP-KLHL12発現プラスミドは、ヒトKLHL12 cDNAをpEGFP-C1ベクター (Clontech, Palo Alto, CA, USA) に挿入して作製した。変異の導入はPrimeSTAR Mutagenesis Kit (Takara, Tokyo, Japan) を用いて行った。

細胞培養およびトランスフェクション

HEK293T細胞、HeLa細胞 (ヒト子宮頸癌由来)、COS7細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) は10% FBSを含むDMEMで培養した。細胞処理に用いたカルシウムイオノフォアA23187は、Sigma-Aldrich より購入した。DNAトランスフェクションはpolyethylenimine (PEI) transfection reagents (Polyscience, Warrington, PA, USA) を用いた。siRNAのトランスフェクションはLipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と Dharmacon ON-TARGET plus siRNA - SMARTpool (USP8に対するsiRNA, L-005203-00-0005; Sec13に対するsiRNA, L-012351-00-0005; ネガティブコントロール用のsiRNA, D-001810-10-50, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いて行った。

PFA処理細胞を用いた免疫沈降と質量分析

HEK293T細胞の培養液に0.1%のパラホルムアルデヒド (PFA) を加え、室温で10分間固定した。さらに、終濃度0.125 Mになるようにグリシンを加え、反応を停止した。この細胞をhigh-salt RIPAバッファー (1 M NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) で溶解した後、超音波破碎機で処理した。得られた細胞溶解液を15,000 rpmで15分遠心後、上清を回収した。この上清を抗Flag抗体が共有結合したビーズ (anti-Flag M2 affinity gel) によって免疫沈降し、150 mlの溶出バッファー (150 µg/ml Flag peptideを含むTris-buffered saline) によって溶出した。135 µlの溶出液に終濃度25 mMになるようにtris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, Thermo Fisher Scientific) を加え、15分間ボルテックスミキサーを用いて混合した。さらに、Iodoacetamide (IAA, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を加え、遮光した状態で45分間ボルテックスミキサーを用いて混合した。次に、500 µlのアセトンを加えて-20°Cで30分間沈殿させ、15,000 rpmで15分遠心後、上清を除いた。風乾したのち、100 µl suspension buffer (8 M urea, 100 mM Tris pH8.0, 1 mM CaCl₂) で溶解し、900 µl digestion buffer (100 mM Tris pH8.0, 1 mM CaCl₂) で希釈した。ここに、3 µgのTrypsin (Thermo Fisher Scientific, #90058) を加え、37°Cで16時間処理した。消化したサンプルに100 µlの10% trifluoroacetic acid (TFA) を加え、脱塩カラム (Sep-Pak C18 96-well plate, #186003966, Waters, Milford, MA, USA) で処理した。これを減圧乾燥し、12 µlの1%ギ酸に溶解し、9 µlをLC-MS/MS解析に用いた。LC-MS/MS解析はThermoScientific社のnano-LCとQ-Exactiveを組み合わせたシステムを用い、以前示されている方法で行った (Tsuchiya *et al.*, 2017)。得られたデータの解析はMaxQuant software (<http://www.biochem.mpg.de/5111795/maxquant>) を用いて行った。

免疫沈降およびイムノプロット

HEK293T細胞もしくはHeLa細胞をlysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, and 1 µg/ml pepstatin A) で溶解し、

15,000 rpmで15分遠心した後、上清を回収した。免疫沈降はこの上清と10 μ lの anti-Flag M2 affinity gelを90分間、4°Cでインキュベートし、1 ml lysis bufferで3回以上洗浄した後、SDS-PAGE sample bufferを加えて結合タンパク質を溶出した。得られたサンプルをSDS-PAGEにより分離し、イムノブロットによりタンパク質を検出した。イムノブロットに使用した抗体と希釈倍率は以下の通りである：

一次抗体

抗Flag抗体 (clone M2) : 1 μ g/ml

抗HA抗体 (clone 3F10, Sigma-Aldrich) : 0.2 μ g/ml

抗myc抗体 (clone 9E10) : ハイブリドーマ細胞の培養上清を1:100希釈

抗a-tubulin抗体 (#013-25033, Wako) : 2,000倍希釈

抗Sec31A抗体 (#612350, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) : 1,000倍希釈

抗Sec13抗体 (#A303-980A, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) : 1,000倍希釈

抗collagen IV抗体 (ab6586, Abcam, Cambridge, UK) : 1,000倍希釈

抗USP8ウサギ血清 (Kato *et al.*, 2000) : 100倍希釈

培養上清中に含まれるタンパク質の精製

細胞の培養液を、FBSを含まないDMEMに交換し24時間後回収した。この培養液を1,000 rpmで10分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。1/10の量の trichloroacetic acid (TCA) を加えてタンパク質を沈殿させた後、15,000 rpmで15分間遠心した。上清を除いた後、1 mlのアセトンを加えて、再度15,000 rpmで15分間遠心した。上清を除いた後、SDS-PAGE sample bufferを加えてタンパク質を溶解した。

免疫蛍光染色

HeLa細胞もしくはCOS7細胞を、4% PFA/PBSによって10分間室温で固定し、透過処理バッファー (0.2% Triton-X/PBS)で1分間処理後、ブロッキングバッファー (5% FBS/PBS) で1分間ブロッキングした。その後、ブロッキングバッファー

に希釈した1次抗体を1時間反応させ、続いてブロッキングバッファーに希釈した2次抗体を1時間反応、洗浄したのちベクターシールドで封入した。核の染色は二次抗体溶液にDAPI (1 µg/ml; Nacalai Tesque) を加えることで行った。蛍光画像は LSM 780 (Carl Zeiss)を用いて取得した。共局在係数 (Mander's colocalization coefficient) はNIH ImageJのcolocalization thresholdプラグインを用いて計測した。使用した抗体と希釈倍率は以下の通りである：

一次抗体

抗Flag抗体 (#F7425, Sigma-Aldrich) : 0.4 µg/ml

抗Myc抗体 (clone 9E10) : ハイブリドーマ細胞の培養上清を1:10希釈

抗Sec31A抗体 (BD Bioscience) : 1,000倍希釈

抗Sec24B抗体 (#12042, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) : 100倍希釈

抗collagen IV抗体 (Abcam) : 250倍希釈

抗GM130抗体 (#610822, BD Bioscience) : 250倍希釈

抗GFP抗体 (#A-11122, Thermo Fisher Scientific) : 100倍希釈

二次抗体

Alexa Fluor 488/594/633で標識した抗マウスIgG抗体および抗ラビットIgG抗体 (Thermo Fisher Scientific) : 1,000倍希釈

プルダウンアッセイ

GSTおよびGST-USP8融合タンパク質を大腸菌(BL-21)に発現させた後、glutathione-Sepharose ビーズ (GE healthcare) を用いて精製した。一方、myc-STAM1/2およびHA-Sec31Aを発現したHEK293T細胞をlysis bufferで溶解し、15,000 rpmで15分間遠心した。この上清とGST-USP8融合タンパク質 (4 µg) が結合したglutathione-Sepharoseビーズを90分間インキュベートし、lysis bufferで洗浄した後、結合したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、イムノブロットを行った。

コラーゲンおよびVSVGの輸送アッセイ

コラーゲンの輸送アッセイには、USP8に対するsiRNAをトランスフェクションしたHeLa細胞を40°Cで3時間培養した後、培養液を50 µg/ml cycloheximide, 10 mM HEPES, 2.5 µg/ml ascorbic acidを添加したものに交換し、32°CでFig. 3-6に示した時間培養した。抗collagen IV抗体と抗GM130抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

VSVGの輸送アッセイには、USP8に対するsiRNAおよびVSVG-GFPをコードするプラスミドをトランスフェクションしたCOS7細胞を40°Cで3時間培養した後、培養液を50 µg/ml cycloheximide, 10 mM HEPESを添加したものに交換し、32°CでFig. 3-7に示した時間培養した。抗GFP抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

結果

STAM1はSec31Aと結合し、STAM2はSec31Aと結合しない

まず、USP8の基質認識に重要なSTAM1に結合するタンパク質について未報告のものを探索した。HEK293T細胞にFlag-STAM1を発現し、弱く結合しているタンパク質を検出しやすくするために0.1% PFAでタンパク質複合体を架橋したのち、STAM1と共免疫沈降するタンパク質を質量分析で解析した。同定されたタンパク質には、エンドサイトーシスに関連するタンパク質であるクラスリン (CLTC, CLTCL1)、STAM1と結合してESCRT-0複合体を形成するHrs、ESCRT-I/III複合体の結合タンパク質Alixの他に、驚いたことに、COPIIコートタンパク質 (Sec31A、Sec24B、Sec13) が含まれていた (Fig. 3-2A)。

次に、HEK293T細胞にSec31AとSTAM1を発現し、免疫沈降-イムノブロット解析を行い、Sec31AとSTAM1の結合を確認した (Fig. 3-2B, 3-2C)。一方、同様の実験をSTAM1の代わりにSTAM2を用いて行ったところ、Sec31AはSTAM2には結合しないことがわかった (Fig. 3-2B, 3-2C)。

STAM1はC末端領域を介してSec31Aと結合する

STAM1とSTAM2のN末端領域 (STAM1, アミノ酸番号1-265; STAM2, 1-265) のアミノ酸配列の相同性は36.6%だが、C末端領域 (STAM1, 266-548; STAM2, 266-523) のアミノ酸配列の相同性は14.7%と比較的低い。そこで、C末端領域を欠失したSTAM1 (STAM1¹⁻²⁶⁵) を作製し共免疫沈降実験を行った結果、Sec31Aはこの変異体と結合しなかったことから (Fig. 3-2D)、STAM1はC末端領域を介してSec31Aと結合することがわかった。

USP8はSTAM1を介してSec31Aと結合できる

USP8がSTAM1を介してSec31Aと結合できるかどうか検証するため、プルダウンアッセイを行った。Sec31AとSTAM1もしくはSTAM2を発現させたHEK293T細胞の抽出液と、GSTもしくはGST-USP8⁷¹⁰⁻¹¹¹⁰ (STAMとの結合に必要なSBMと酵素活性ドメインを含む) が結合したビーズをインキュベートしたところ、STAM1を発現させた細胞抽出液を用いたときのみ、GST-USP8⁷¹⁰⁻¹¹¹⁰とSec31Aの結合が見られた (Fig. 3-2E)。この結果は、USP8はSTAM1を介してSec31Aと結合できることを示している。

USP8 は Sec31 を脱ユビキチン化する

USP8 が Sec31 を脱ユビキチン化するか検討するために、HEK293T 細胞に野生型 (WT)、酵素活性欠失型 (C678A, CA)、過剰活性化型 (P720R, PR) の USP8、および、HA-Ub と Flag-Sec31A を発現し、この細胞抽出液から抗 Flag 抗体を用いて Sec31A を免疫沈降し、抗 HA 抗体でイムノブロットすることにより Sec31A のユビキチン化量を調べた。その結果、Sec31A のユビキチン化量は、野生型 USP8 の過剰発現により低下し、酵素活性欠失型 USP8 の発現では変化せず、過剰活性化型 USP8 の発現では著しく低下した (Fig. 3-3A)。一方、siRNA 法を用いて USP8 を発現抑制すると、Sec31A のユビキチン化量は増加した (Fig. 3-3B)。USP8 の過剰発現や発現抑制で、Sec31A のタンパク質の量に大きな影響は観察されなかった (Fig. 3-3A, 3-3B, 3-3C)。

続いて、STAM が Sec31 のユビキチン化に及ぼす影響を調べるために、細胞

に STAM1 もしくは STAM2 を過剰発現したところ、予想通り、STAM1 を過剰発現した時のみ Sec31A のユビキチン化量が低下した (Fig. 3-3D)。以上から、USP8 は STAM1 を介して Sec31 と結合してこれを脱ユビキチン化すると結論した。

USP8 は COPII 小胞の大きさや局在を制御する

次に、USP8 が COPII 小胞の大きさを制御するか検討した。緒言で記したように、ユビキチンリガーゼ CUL3-KLHL12 が Sec31 をユビキチン化すると、大きな COPII 小胞が形成されることが報告されている (Jin *et al.*, 2012)。この報告とよく一致して、KLHL12 と Sec31A を COS7 細胞に過剰発現すると、細胞内に大きな Sec31A 陽性の小胞が観察され、巨大な COPII 小胞が形成されることが確認された (Fig. 3-4A 上段, Jin *et al.*, 2012)。この細胞にさらに USP8 を発現させると、巨大な COPII 小胞の数は 40%ほどに低下し、酵素活性欠失型の USP8 を発現させた細胞では数は変わらなかった (Fig. 3-4A, 3-4B)。この結果は、USP8 は脱ユビキチン化酵素活性を介して KLHL12 の過剰発現により誘導される巨大な COPII 小胞の形成を抑制することを示している。

CUL3-KLHL12 複合体はカルシウム依存的に形成され、これにより Sec31 のユビキチン化が促進、大きな COPII 小胞の形成が促されることが報告されている (McGouty *et al.*, 2016)。HeLa 細胞をカルシウムイオノフォア A23187 で処理すると、核周辺領域での Sec31A および Sec24B の蓄積が観察され、この場所で COPII 小胞が形成されていると考えられる (Fig. 3-5 下段)。興味深いことに、USP8 を発現抑制した細胞でも、同様に核周辺領域での Sec31A および Sec24B の蓄積が観察された (Fig. 3-5)。この結果は、細胞質のカルシウム濃度の上昇に伴い活性化する CUL3-KLHL12 複合体と、USP8 は、核周辺領域での COPII 小胞の形成に対して拮抗的に働いていることを示している。

USP8 はコラーゲンの分泌を抑制する

次に、USP8 がコラーゲンの分泌を制御するか調べるために、USP8 を発現抑

制した HeLa 細胞の培養上清に含まれるコラーゲンの量を調べた。HeLa 細胞は IV 型コラーゲンを分泌することが知られているが (Furth *et al.*, 1991)、USP8 の発現抑制によって培養上清中の IV 型コラーゲンが増加した (Fig. 3-6A)。

USP8 の発現抑制による IV 型コラーゲンの分泌の増加が COPII 小胞に依存したものか調べるため、USP8 と Sec13 のダブルノックダウン実験を行った。哺乳動物の COPII タンパク質の多くには類似した機能を持つアイソフォームが存在するが、Sec13 はアイソフォームが存在しないため、Sec13 の発現抑制によって COPII 小胞の形成を効率よく阻害できる。Sec13 は Sec31 と複合体を形成することにより Sec31 を安定化すると報告されているが (Townley *et al.*, 2008)、これと一致して、Sec13 の発現抑制により Sec31A が減少した (Fig. 3-6B)。USP8 の発現抑制による IV 型コラーゲンの分泌量の増加は、Sec13 の発現抑制により見られなくなったので (Fig. 3-6B)、USP8 は COPII 小胞に依存したコラーゲンの分泌を抑制していることが確かめられた。

USP8 はコラーゲンの小胞体からゴルジ体への輸送を抑制する

細胞を 40°C で培養するとコラーゲンは可逆的な構造変化を起こしてゴルジ体への輸送が阻害されて小胞体に蓄積するようになり、その後、32°C で培養するとコラーゲンは正常な構造に戻り小胞体からゴルジ体へ輸送されるようになる (Mironov *et al.*, 2001; Venditti *et al.*, 2012; McGourty *et al.*, 2016)。実際、HeLa 細胞を 40°C で 3 時間培養すると IV 型コラーゲンはゴルジ体マーカー GM130 と共局在せず、その後 32°C で 1 時間培養すると共局在が観察されることから、コラーゲンのゴルジ体への輸送が温度に応じて停止/再開していることが確認された (Fig. 3-6C, コントロール RNA で処理した細胞)。この系を用いて USP8 の発現抑制の影響を調べたところ、40°C で 3 時間培養した後に 32°C で 1 時間培養した時点でゴルジ体に局在しているコラーゲンが、USP8 の発現抑制により増加した (Fig. 3-6C)。32°C で 3 時間培養した時点では、USP8 の発現抑制の有無にかかわらず細胞内のコラーゲンがほとんど見られなくなり、細胞外へ輸送されていると考えられた (Fig. 3-6C)。これらの結果は、USP8 は小胞体からゴルジ体へのコ

ラーゲンの輸送を抑制し、ゴルジ体から細胞外への輸送には大きな影響を与えないことを示している。

USP8 は VSVG-ts045 の輸送には関与しない

最後に、通常の大サイズの COPII 小胞積み荷タンパク質の輸送における USP8 の役割を検討した。水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ糖タンパク質 (vesicular stomatitis Indiana virus G protein, VSVG) の温度感受性変異体 VSVG-ts045 は、コラーゲンと同様に、細胞を 40°C で培養すると小胞体に蓄積し、その後、32°C で培養すると小胞体からゴルジ体へ輸送される (Mironov *et al.*, 2001; Venditti *et al.*, 2012)。COS7 細胞に USP8 に対する siRNA と VSVG-ts045-GFP をトランスフェクションし、40°C で 3 時間培養後、32°C で 15 分および 1 時間培養した。USP8 を発現抑制しない対照細胞では、VSVG は 32°C で 15 分培養した時点でゴルジ体に、1 時間培養した時点で細胞膜に局在した (Fig. 3-7)。USP8 の発現抑制によって各時点での VSVG の局在に大きな影響は観察されず (Fig. 3-7)、USP8 は通常の大サイズの COPII 小胞積み荷タンパク質の輸送には関与しないことが示された。

考察

本章の実験結果から、以下のことが明らかとなった。

- ・ ユビキチン結合ドメインを有するSTAM1は、C末端領域を介してCOPIIコートタンパク質Sec31Aに結合する。
- ・ 脱ユビキチン化酵素USP8は、STAM1を介してSec31Aを基質として認識してこれを脱ユビキチン化する。
- ・ ユビキチンリガーゼCUL3-KLHL12によって形成される大きなCOPII小胞の形成を、USP8は阻害する。
- ・ USP8はコラーゲンの小胞体からゴルジ体への輸送を抑制する。

これらをまとめ、私は、USP8はSec31Aを脱ユビキチン化することにより大きなCOPII小胞の形成を抑制し、コラーゲンなどのサイズの大きな積み荷タンパク質の細胞外への分泌を抑制する新機能を持つと結論した。以下では、この新機能が発揮される分子機構について詳細に考察し、このしくみの生理的意義と医学や産業における応用の可能性についても述べたい。

USP8がSec31Aを基質として認識する分子基盤

これまでに、USP8は、EGF受容体、ERBB2 (Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)、VEGF (vascular endothelial growth factor) 受容体、HGF (Hepatocyte growth factor) 受容体、Frizzled、Smoothenedなどの細胞膜タンパク質を脱ユビキチン化することによって、これらのユビキチン化依存的なエンドサイトーシスおよびリソソームへの輸送を阻害することが知られている (Mizuno *et al.*, 2005; Row *et al.*, 2006; Mukai *et al.*, 2010; Meijer *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2012)。USP8がEGF受容体を基質として認識する機構は最も詳細に解析されており、次のようなモデルが提唱されている (Mizuno *et al.*, 2005);

- ① リガンド依存的にユビキチン化されたEGF受容体がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。

- ② エンドソームに存在している Hrs と STAM1/2 からなる ESCRT-0 複合体が、複合体内に存在するユビキチン結合ドメイン/モチーフを介して、EGF 受容体のユビキチン鎖を認識する。
- ③ STAM1/2 の SH3 ドメインと USP8 の SBM の間の結合を介して ESCRT-0 複合体に USP8 が相互作用し、ESCRT-0 複合体に捕捉されている EGF 受容体を USP8 が脱ユビキチン化する。

USP8 が Sec31A を基質として認識する分子機構にも STAM1 が介在しており (Fig. 3-2E, 3-3D)、この点は上記の EGF 受容体の場合と類似している。しかし、Sec31A は STAM1 の C 末端領域と結合するが (Fig. 3-2E)、この領域には STAM1 のユビキチン結合ドメイン/モチーフは含まれておらず、ユビキチン鎖を介さない結合様式であると推定される。実際、STAM1 と共免疫沈降する Sec31A はその分子量から判断してユビキチン化修飾を受けておらず (Fig. 3-2C, 3-2E)、推定と一致している。USP8 はユビキチン化される前から Sec31A に相互作用しており、Sec31A がユビキチン化されるとすぐにこれを脱ユビキチン化できるようになっていると考えられる。

STAM1 と異なり STAM2 は Sec31A には結合できず (Fig. 3-2C)、この結果と一致して STAM2 の過剰発現は Sec31A のユビキチン化量に影響しなかった (Fig. 3-3D)。一方、EGF 受容体には STAM1 と STAM2 の両方が結合でき、USP8 による EGF 受容体のユビキチン化を仲介する機能に関して STAM1 と STAM2 の間で違いは見出されていない (Kanazawa *et al.*, 2003)。これらのことは、USP8 による EGF 受容体のエンドサイトーシスの制御は STAM1 と STAM2 のどちらかが存在すれば可能であるが、Sec31A を介した COPII 小胞輸送の制御は STAM1 のみに依存していることを意味している。この違いは、USP8 がエンドサイトーシスと COPII 小胞輸送という異なる現象を個別に制御するために役立つかもしれない (Fig. 3-8)。今後、USP8-STAM1-Sec31A の結合の分子機構とその意義をさらに詳細に解析する必要がある。

USP8によるCOPII小胞の大きさの制御機構

ユビキチンリガーゼ CUL3-KLHL12 が Sec31 をユビキチン化すると大きな COPII 小胞の形成が促進されるが (Jin *et al.*, 2012)、このユビキチン化に拮抗する脱ユビキチン化酵素は不明であった。今回、USP8 の過剰発現によって大きな COPII 小胞の数が減少し、酵素活性欠失型の USP8 変異体では影響が見られなかった (Fig. 3-4)。この実験で観察される巨大な COPII 小胞は、KLHL12 と Sec31A を過剰発現した細胞でのみ見られる異常な大きさの COPII 小胞だが、この結果は、USP8 が CUL3-KLHL12 に拮抗して Sec31 を脱ユビキチン化することにより、大きな COPII 小胞の形成を抑制している可能性を強く示唆している。

細胞質のカルシウム濃度が上昇すると CUL3-KLHL12 複合体の形成が促進し、Sec31 がユビキチン化されて大きな COPII 小胞が形成されると報告されている (McGourty *et al.*, 2016)。このような状態の細胞を共焦点蛍光顕微鏡で解析すると、直径 5-10 μm 程度の大きさの核周辺領域に Sec31A と Sec24B のシグナルが高い輝度で観察された (Fig. 3-5)。USP8 を発現抑制した細胞でも同じような染色像が観察され (Fig. 3-5)、この結果は、USP8 の発現抑制によりユビキチン化された Sec31 が増加して大きな COPII 小胞が形成されていることを強く示唆している。これとよく一致して、USP8 の発現抑制によりコラーゲンの小胞体からゴルジ体への輸送が促進し (Fig. 3-6C)、細胞外に分泌されるコラーゲンが増加した (Fig. 3-6A)。今後、USP8 を発現抑制した細胞を電子顕微鏡で解析し、コラーゲンを含んだ大きな COPII 小胞が形成されていることを確認する必要がある。

Sec31 のユビキチン化により大きな COPII 小胞が形成される分子機構はわかっていない。おそらく、ユビキチン化された Sec31 を認識して相互作用するタンパク質が存在し、小胞体膜上で形成途中にある出芽前の COPII 小胞の脂質膜の曲率を変えると予想している。加えて、COPII 小胞にコラーゲンを運び込む TANGO1 などのコラーゲン受容体がユビキチン化された Sec31 と直接的あるいは間接的に相互作用すれば、大きい COPII 小胞に選択的にコラーゲンを運び込むことが可能となり都合がよい。これらの理由から、ユビキチン化された Sec31 を認識して結合するタンパク質の同定は急務である。今回、Sec31 に STAM1 が結合することを見出したが、STAM1 はユビキチン結合ドメインを有するので、

ユビキチン化された Sec31 を認識することが可能である。STAM1（あるいは STAM1 に結合する他のタンパク質）が COPII 小胞膜の曲率を変えるか、コラーゲン受容体を COPII 小胞にリクルートするか検討することは重要である。

USP8による巨大タンパク質の分泌抑制とその生理的意義

今回、USP8 がコラーゲンの小胞体からゴルジ体への輸送を抑制していることをはじめて明らかにした (Fig. 3-6)。USP8 は通常の大きさの COPII 小胞積み荷タンパク質の輸送には関与しないことから (Fig. 3-7)、USP8 は大きな COPII 小胞の形成を抑制することにより、コラーゲンなどの大きな積み荷タンパク質の細胞内輸送を選択的に抑制していると考えられる。本研究では IV 型コラーゲンについて実験を行ったが、その他の種類のコラーゲンも小胞体で合成された段階で通常の大きさの COPII 小胞には入りきらないサイズである (Fromme & Schekman, 2005)。さらに、コラーゲン以外にも、リポタンパク質を構成する ApoB なども巨大な分泌タンパク質であり、大きな COPII 小胞で輸送されると考えられている (Butkinaree *et al.*, 2014)。今後、USP8 が IV 型コラーゲン以外の分泌タンパク質の輸送にも関与しているか確認する必要がある。

USP8が大きなCOPII小胞の形成を抑制する生理的意義は何だろうか。USP8は細胞分裂期に酵素活性が上昇することが知られている (Mizuno *et al.*, 2007)。一般に、分裂期にはタンパク質の分泌が抑制されることが知られているが (Yeong *et al.*, 2013)、そのメカニズムの一つとして分裂期に酵素活性が上昇したUSP8がSec31を効率的に脱ユビキチン化することで大きなCOPII小胞の形成を抑制し、コラーゲンなどの大きなタンパク質の分泌を抑制している可能性が考えられる。さらに、既に記したようにUSP8はエンドサイトーシスを抑制する機能も持つが、分裂期にはエンドサイトーシスも抑制されることが古くから知られており (Fielding and Royle, 2013)、この現象にも分裂期のUSP8の活性上昇が寄与している可能性がある。分裂期の細胞が、USP8を利用してCOPII小胞輸送とエンドサイトーシスを同じタイミングで抑制することにより、タンパク質の分泌と取り込みを一時的に停止しているとすれば、細胞生物学上非常に興味深い。

本研究の成果の医学や産業における応用の可能性

本研究の成果をもとに、コラーゲンの分泌異常を原因とする疾患の治療法を開発できる可能性がある。頭蓋-レンズ-縫合異形成 (Cranio-lenticulo-sutural dysplasia, CLSD)、Cole-Carpenter 症候群はそれぞれ Sec23A 遺伝子、Sec24D 遺伝子の変異により起こる先天性の形態異常である (Boyadjiev *et al.*, 2006; Grabes *et al.*, 2015)。これらの疾患で見られる形態異常は主にコラーゲンの分泌不全が原因であるが、Sec23A や Sec24D に遺伝子変異を持つ疾患 iPS 細胞等で USP8 の阻害がコラーゲンの分泌が亢進することを確認できれば、USP8 あるいは STAM1 を標的とする薬剤を開発することによりこれらの疾患の症状を緩和できる可能性がある。一方、コラーゲンの過剰産生は肝臓や腎臓の繊維化やケロイドの形成を引き起こすことが知られているが (Schaefer & Werner, 2008)、USP8 を活性化する手法を開発できれば、コラーゲンの分泌を抑制することにより繊維化やケロイド形成を抑えることが出来るかもしれない。また、コラーゲンは再生医療用の材料として非常に注目されており、動物細胞培養系を用いたコラーゲンの製造も試みられている。コラーゲン製造用の培養細胞に USP8 阻害剤を加えることでコラーゲンを効率的に分泌させ生産性を向上できれば、産業応用上の価値は高い。これらの応用に向け、COPII 小胞形成における USP8 の新機能を修飾する手法の開発を進めたい。

総合討論

第一節 本研究のまとめ

脱ユビキチン化酵素が基質タンパク質を認識する分子機構は、1) 脱ユビキチン化酵素の分子内の基質認識ドメイン/モチーフを用いる場合と、2) 基質認識を担う他のタンパク質との相互作用を介する場合に分けることができる。本論文の第一章では分子内にユビキチン結合モチーフを持つユビキチン化酵素 USP25 を例にとり、USP25 の基質認識機構について詳細な解析を行った。その結果、USP25 に存在するタンデム UIM 領域は Lys48 連結型ポリユビキチン鎖に選択的に結合し、これが USP25 の Lys 48 連結型ポリユビキチン鎖に対する選択的な酵素活性に重要であることを明らかにした。第二章では、ユビキチン結合タンパク質 STAM1/2 と相互作用して働く脱ユビキチン化酵素 USP8 に焦点を移し、USP8 の新規基質タンパク質の同定を試みた。その結果、STAM1 の結合タンパク質として Sec31A を同定し、USP8 は STAM1 を介して COPII コートタンパク質 Sec31A を認識・脱ユビキチン化することでコラーゲンの分泌を抑制していることが明らかとなった。総合討論では、これらの成果を他の脱ユビキチン化酵素の知見と比較しながら脱ユビキチン化酵素の分子種特異的な基質認識機構や細胞内における機能に関して議論し、最後に今後の展望を述べたい。

第二節 脱ユビキチン化酵素の基質認識機構

脱ユビキチン化酵素はヒトのゲノムにおよそ90種類存在するが (Komander *et al.*, 2009)、一方でユビキチンリガーゼはおよそ500-1000種類存在しているとされ (Nakayama KI & Nakayama K, 2006)、ユビキチンリガーゼの種類に対して、脱ユビキチン化酵素の種類は圧倒的に少ないといえる。そのため、1つの脱ユビキチン化酵素が複数のユビキチンリガーゼによるユビキチン化反応に拮抗し、多様な種類の基質を脱ユビキチン化していると予想される。一方、これまでに、培養細胞およびゼブラフィッシュやマウスなどのモデル動物における脱ユビキチン化酵素のノックダウン/ノックアウトの実験が行われ、単独の脱ユビキチン

化酵素の欠損により細胞生存や胚発生に重篤な影響が出るケースが多数報告されており (Niendorf *et al.*, 2007; Tse *et al.*, 2009, Tsou *et al.*, 2012)、ほとんどの脱ユビキチン化酵素は他の脱ユビキチン化酵素では補償できない分子種特異的な機能をもつことがわかっている。これらのことから、それぞれの脱ユビキチン化酵素は、多様であり、かつ分子種特異的な基質認識機構を有していると考えられる (Fig. 4-1)。このような基質認識を可能としている分子基盤とはどのようなものだろうか？

・脱ユビキチン化酵素の局在化による特異性獲得

まず、脱ユビキチン化酵素が特徴的な細胞内部位に局在することによりその部位に存在する基質タンパク質に特異的に作用するしきみを挙げることができる。膜貫通ドメインや特定の細胞小器官への局在化シグナルをもつ脱ユビキチン化酵素がこれに該当する。膜貫通ドメインをもつ脱ユビキチン化酵素には USP19 と USP30 が存在する。USP19 は小胞体に局在し、小胞体関連分解の基質を脱ユビキチン化することによりそれらの分解を防いでいる (Hassink *et al.*, 2009)。一方、USP30 はミトコンドリア外膜に局在し、そこに存在する複数のタンパク質を脱ユビキチン化することでミトコンドリアのオートファジーによる分解を抑制している (Bingol *et al.*, 2014)。局在化シグナルをもつ脱ユビキチン化酵素には核小体局在化シグナルを持つ USP36 があり、USP36 は核小体に局在する複数のタンパク質を脱ユビキチン化する (Endo *et al.*, 2009a; Endo *et al.*, 2009b; Richardson *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015; 川口 修士論文 2015)。また、既に記してきたように USP8 や AMSH はエンドソームに局在している ESCRT-0 複合体 (Hrs-STAM 複合体) と相互作用することによりエンドソームに濃縮されており、エンドソームに運ばれてきた複数の膜タンパク質を脱ユビキチン化する (McCullough *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2005)。このように、一部の脱ユビキチン化酵素は特定の細胞内部位に局在することにより、共局在している基質タンパク質への特異性が担保されている。

・ユビキチン化を受ける標的タンパク質自体への相互作用と、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖への相互作用との組み合わせによる特異性獲得

しかしながらほとんどの脱ユビキチン化酵素は細胞質か核質全体に存在しており (Urbé *et al.*, 2012)、これらの脱ユビキチン化酵素は分子内あるいは相互作用する他のタンパク質に含まれる基質認識ドメイン/モチーフの結合特性により基質特異性を獲得していると考えられる。これらの基質認識ドメイン/モチーフの多くは基質タンパク質に付加されたユビキチンを直接認識でき、本研究で取り上げたUSP25のタンデムUIM領域はこれに含まれる。しかし、一般に、ユビキチン結合ドメイン/モチーフとユビキチンの相互作用は弱く (Hicke *et al.*, 2005)、また、ユビキチンの認識だけで十分な基質特異性を獲得できるとは考えにくい。多くの場合、脱ユビキチン化酵素は基質タンパク質のユビキチン鎖とは異なる部位にも相互作用しており、これにより脱ユビキチン化反応の進行に必要な強度と特異性を備えた基質認識が可能となるのではないだろうか。

このような観点から、USP25の基質認識機構について再考してみたい。第一章では、*in vitro*の系を用いた実験から、USP25が分子内のUIMの働きによってLys48連結型ポリユビキチン鎖を選択的に認識・脱ユビキチン化することを示したが、細胞内におけるUSP25のユビキチン鎖への基質特異性はより複雑に制御されている。USP25は自然免疫シグナルを伝達するTRAF3/5/6を基質として認識するが、TRAF3との結合にはUSP25の脱ユビキチン化酵素ドメインが必要である一方、TRAF5/6との結合には脱ユビキチン化酵素ドメインは必要ではない (Zhong *et al.*, 2013a; Zhong *et al.*, 2012)。さらに、USP25はTRAF3のLys48連結型ユビキチン鎖を分解する一方 (Zhong *et al.*, 2013a; Lin *et al.*, 2015)、TRAF5/6についてはLys63連結型ユビキチン鎖を分解する (Zhong *et al.*, 2013a; Zhong *et al.*, 2012)。USP25はタンデムUIM領域と脱ユビキチン化酵素ドメイン内の未同定の領域を介して基質タンパク質を認識できるが、異なる基質タンパク質に対しては異なる結合様式が使われており、USP25-TRAF3複合体とUSP25-TRAF5/6複合体では脱ユビキチン化酵素ドメインとユビキチン鎖が構造的に異なる接し方をすることにより分解するユビキチン鎖の連結型が異なってくるのかもしれない。USP25については、今後、タンデムUIM領域以外の領域もあわせて総合的に基質認識機構を検討していく必要があるだろう。

・基質認識タンパク質の使い分けによる特異性獲得

第二章では、USP8 が STAM1 を介して Sec31A を認識・脱ユビキチン化することを明らかにした。一方、USP8 は STAM1/2 の両方を介して EGF 受容体を認識できる(Kanazawa *et al.*, 2003)。第二章の考察で述べたように、USP8 がこれらの異なる基質タンパク質を認識する上で、STAM1 と STAM2 を基質認識のアダプターとして使い分けることには重要な意義があるかもしれない。また、USP8 は rhodanese ドメインを介してユビキチンリガーゼ RNF41 と相互作用するが(Wu *et al.*, 2004)、RNF41 と USP8 は共通の基質タンパク質 parkin のユビキチン化と脱ユビキチン化を行っている (Zhong *et al.*, 2005; Durcan *et al.*, 2014)。このときの USP8 による parkin の脱ユビキチン化には STAM1/2 は関与せず (Durcan *et al.*, 2014)、USP8 は RNF41 と相互作用したときには STAM1/2 に依存しない未知の分子機構によって parkin を認識・脱ユビキチン化していると考えられる。これらのことは、USP8 が基質認識タンパク質を使い分けることにより異なる基質を認識していることを意味している。

USP8以外の脱ユビキチン化酵素においても、相互作用タンパク質の違いによって異なる基質を認識していると考えられる例が報告されている。USP7はp53の脱ユビキチン化酵素であるが (Li *et al.*, 2002)、UVSSA (UV stimulated scaffold protein A) との相互作用によってDNA損傷部位に局在化し、UV依存的にERCC6 (excision repair cross-complementation group 6) を脱ユビキチン化・安定化する (Zhang *et al.*, 2012; Schwertman *et al.*, 2012)。USP15はR-SMAD (receptor-regulated SMAD) を脱ユビキチン化しTGF β (transforming growth factor β) シグナルを制御する一方で (Inui *et al.*, 2012)、ユビキチンリガーゼの複合体であるCOP9シグナロソーム に相互作用する場合はCOP9シグナロソームにより進む様々なユビキチン化反応に拮抗している (Caily *et al.*, ; 2009; Schweitzer *et al.*, 2007)。

まとめると、脱ユビキチン化酵素は、① 特定の細胞内部位に局在化する、② 分子内の複数のドメインや相互作用タンパク質を介して基質タンパク質およびそこに付加されたユビキチン鎖を複合的に認識する、③ 相互作用する基質認識タンパク質を使い分ける、というメカニズムを介して基質を見分けている。こ

のような基質認識機構に基づいて、基質ごとにユビキチン鎖連結型に対する特異性や脱ユビキチン化酵素の反応性が調節され、多様でありつつ分子種特異的な基質の脱ユビキチン化反応が可能となっていると考えられる。

第三節 脱ユビキチン化酵素の新しい機能

序論で記したように、ユビキチン化が基質タンパク質のプロテオソーム依存的な分解を誘導することは古くから知られていたが、近年、膜タンパク質のエンドサイトーシスおよびリソソームにおける分解を誘導する、選択的オートファジーを誘導する、炎症性サイトカインなどのシグナル伝達や DNA 修復を仲介するなど、新規の役割を果たすことが次々と明らかとされてきた。90 種類ほど存在する脱ユビキチン化酵素の役割も徐々に解明されつつあり、ユビキチン化酵素に拮抗することにより上記の細胞内イベントの進行を抑制する他、間違っ形成されたあるいは不要となったユビキチン鎖を除去することによりこれらの細胞内イベントの適切な進行を可能とする機能や、ユビキチン前駆体や遊離ユビキチン鎖をプロセッシングして単量体ユビキチンの補給を行うなどの機能がわかってきた。今回、第二章において、脱ユビキチン化酵素の新たな機能として、巨大な COPII 小胞の形成が USP8 により抑制されていることを初めて示すことができた。

膜小胞の形成がタンパク質のユビキチン化/脱ユビキチン化で制御される他の例として、エンドサイトーシスが挙げられる。エンドサイトーシスが開始される際には、ユビキチン化を受けた積み荷タンパク質に Eps15 (Epidermal growth factor receptor substrate 15)や epsin などのユビキチン結合性のアダプタータンパク質が結合し、これらがクラスリンなどをリクルートするとともに細胞膜に作用して膜を陥没させ、クラスリン被覆小胞の形成を促進する (Hagland & Dikic, 2012)。Eps15 や epsin はそれ自体もモノユビキチン化を受けるが、これもエンドサイトーシスの進行に重要であり (Savio *et al.*, 2016)、積み荷タンパク質とアダプタータンパク質のユビキチン化を認識して、ユビキチン結合タンパク質が集積することによりクラスリン被覆小胞の形成が進むのである。別の例として、オ

ートファゴゾームの形成には、ユビキチン様タンパク質 MAP1LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) はホスファチジルエタノールアミンに共有結合した形で隔離膜に集積することが引き金となることはよく知られている (Mizushima & Komatsu, 2011)。小胞形成とは異なるが、オルガネラ膜のダイナミックな変化にユビキチン化/脱ユビキチン化が関わる例として、ミトコンドリアの外膜に存在する Mitofusin のユビキチン化/脱ユビキチン化に応答して、ミトコンドリア膜の融合が促進/抑制されることが知られている (Gegg *et al.*, 2010)。このように、細胞内の小胞やオルガネラ膜の形成の促進/抑制に、形成部位におけるユビキチン様タンパク質の集積/除去が重要となっている知見が集積している。想像力を逞しくすると、脂質膜に含まれるタンパク質や脂質にユビキチン様タンパク質が結合することにより膜が曲がるというシンプルな基本原理があり、さらにユビキチン結合タンパク質がそこに集積することによって湾曲効果が増幅され、様々な細胞内小胞/オルガネラの形成に生かされている可能性を考えることができる。これまで、細胞内小胞やオルガネラの形成には低分子量 G タンパク質や SNARE (SNAP [soluble NSF attachment protein] receptor) タンパク質が重要な役割を果たすことが解明されてきたが (Martens & McMahon, 2008, Hutagalung *et al.*, 2011)、それらに加えて、「膜の曲率にはその部位に存在するタンパク質のユビキチン化/脱ユビキチン化が強く影響し、ユビキチン化酵素/脱ユビキチン化酵素がこれを調節する」という新しい視点を提案したい。

第四節 今後の課題と展望

本研究では2つの脱ユビキチン化酵素について解析を行ったが、およそ90種類ある脱ユビキチン化酵素のうち機能がよくわかっているものは少ない。脱ユビキチン化酵素は非常に多様なドメイン構造をとっているが (Komander *et al.*, 2009)、まだ機能未知のドメイン/モチーフが多く残されており、これらが脱ユビキチン化酵素の基質認識や酵素活性にどのように関与するのか解明していく必要がある。また、基質が特定されていない脱ユビキチン化酵素も多く残されている。第二章では、脱ユビキチン化酵素の基質認識を担うアダプタータンパク

質と相互作用するタンパク質を細胞内で架橋し、形成された複合体の質量分析を行うことによって新規の基質の同定に成功したが、この手法を別の脱ユビキチン化酵素にも応用することで未知の基質を同定できると考えている。このような研究を通じて、ユビキチン化/脱ユビキチン化に関わる広範な生命現象の解明に貢献していきたい。

近年、脱ユビキチン化酵素が種々の疾患の原因遺伝子として同定されてきており (Hidecker & Ingrid, 2015)、私たちのグループでも USP8 がクッシング病の原因遺伝子であることを報告した (Reincke *et al.*, 2015, Perez-Livas *et al.*, 2015, Hayashi *et al.*, 2016)。こうした状況のもと、脱ユビキチン化酵素は様々な疾患の治療薬の標的分子として注目されてきている (D'Arcy *et al.*, 2015)。本研究は脱ユビキチン化酵素の基質認識機構や細胞内機能の一端を明らかにしたものであるが、今後も研究を継続・発展することにより、ユビキチン鎖やユビキチン化タンパク質に対する新しい分子プローブ、脱ユビキチン化酵素に対する特異性の高い阻害剤、ドメインやモチーフの改変による脱ユビキチン化酵素の機能変換などを通じたユビキチン化タンパク質の制御法などの開発を進め、これらを基盤として関連する疾患の治療法の開発に繋がりたいと考えている。

引用文献

- Barriere, H., Nemes, C., Du, K., and Lukacs, G.L. (2007). Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Molecular Biology of the Cell* 18, 3952-3965.
- Berlin, I., Higginbotham, K.M., Dise, R.S., Sierra, M.I., and Nash, P.D. (2010a). The Deubiquitinating Enzyme USP8 Promotes Trafficking and Degradation of the Chemokine Receptor 4 at the Sorting Endosome. *Journal of Biological Chemistry* 285, 37895-37908.
- Berlin, I., Schwartz, H., and Nash, P.D. (2010b). Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Ubiquitination and Trafficking by the USP8.STAM Complex. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34909-34921.
- Bingol, B., Tea, J.S., Phu, L., Reichelt, M., Bakalarski, C.E., Song, Q.H., Foreman, O., Kirkpatrick, D.S., and Sheng, M.G. (2014). The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature* 510, 370-375.
- Butkinaree, C., Guo, L., Ramkhalawon, B., Wanschel, A., Brodsky, J.L., Moore, K.J., and Fisher, E.A. (2014). A Regulator of Secretory Vesicle Size, Kelch-Like Protein 12, Facilitates the Secretion of Apolipoprotein B100 and Very-Low-Density Lipoproteins-Brief Report. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 34, 251-254.
- Cayli, S., Klug, J., Chapiro, J., Frohlich, S., Krasteva, G., Orel, L., and Meinhardt, A. (2009). COP9 Signalosome Interacts ATP-dependently with p97/Valosin-containing Protein (VCP) and Controls the Ubiquitination Status of Proteins Bound to p97/VCP. *Journal of Biological Chemistry* 284, 34944-34953.
- D'Arcy, P., Wang, X., and Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics* 147, 32-54.
- Denuc, A., Bosch-Comas, A., Gonzalez-Duarte, R., and Marfany, G. (2009). The UBA-UIM Domains of the USP25 Regulate the Enzyme Ubiquitination State and Modulate Substrate Recognition. *Plos One* 4.
- Durcan, T.M., Tang, M.Y., Perusse, J.R., Dashti, E.A., Aguilera, M.A., McLelland, G.L., Gros, P., Shaler, T.A., Faubert, D., Coulombe, B., *et al.* (2014). USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *Embo Journal* 33, 2473-2491.

- Eletr, Z.M., and Wilkinson, K.D. (2014). Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1843, 114-128.
- Endo, A., Kitamura, N., and Komada, M. (2009a). Nucleophosmin/B23 Regulates Ubiquitin Dynamics in Nucleoli by Recruiting Deubiquitylating Enzyme USP36. *Journal of Biological Chemistry* 284, 27918-27923.
- Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N., and Komada, M. (2009b). Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *Journal of Cell Science* 122, 678-686.
- Fabrini, R., De Luca, A., Stella, L., Mei, G., Orioni, B., Ciccone, S., Federici, G., Lo Bello, M., and Ricci, G. (2009). Monomer-Dimer Equilibrium in Glutathione Transferases: A Critical Re-Examination. *Biochemistry* 48, 10473-10482.
- Fielding, A.B., and Royle, S.J. (2013). Mitotic inhibition of clathrin-mediated endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 3423-3433.
- Flick, K., Raasi, S., Zhang, H.W., Yen, J.L., and Kaiser, P. (2006). A ubiquitin-interacting motif protects polyubiquitinated Met4 from degradation by the 26S proteasome. *Nature Cell Biology* 8, 509-U144.
- Fromme, J.C., and Schekman, R. (2005). COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo? *Current Opinion in Cell Biology* 17, 345-352.
- Furth, J.J., Wroth, T.H., and Ackerman, S. (1991). GENES FOR COLLAGEN TYPE-I, TYPE-IV, AND TYPE-V ARE TRANSCRIBED IN HELA-CELLS BUT A POSTINITIATION BLOCK PREVENTS THE ACCUMULATION OF TYPE-I MESSENGER-RNA. *Experimental Cell Research* 192, 118-121.
- Garbes, L., Kim, K., Riess, A., Hoyer-Kuhn, H., Beleggia, F., Bevot, A., Kim, M.J., Huh, Y.H., Kweon, H.S., Savarirayan, R., *et al.* (2015). Mutations in SEC24D, Encoding a Component of the COPII Machinery, Cause a Syndromic Form of Osteogenesis Imperfecta. *American Journal of Human Genetics* 96, 432-439.
- Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.Y., Rojo, M., Schapira, A.H.V., and Taanman, J.W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human Molecular Genetics* 19, 4861-4870.
- Haecker, H., Tseng, P.-H., and Karin, M. (2011). Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nature Reviews Immunology* 11, 457-468.
- Haglund, K., and Dikic, I. (2012). The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of Cell Science* 125, 265-275.

- Hayashi, K., Inoshita, N., Kawaguchi, K., Ardisasmita, A.I., Suzuki, H., Fukuhara, N., Okada, M., Nishioka, H., Takeuchi, Y., Komada, M., *et al.* (2016). The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology* 174, 213-226.
- Heideker, J., and Wertz, I.E. (2015). DUBs, the regulation of cell identity and disease. *Biochemical Journal* 465, 1-26.
- Hetfeld, B.K.J., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P.M., and Dubiel, W. (2005). The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Current Biology* 15, 1217-1221.
- Hirano, S., Kawasaki, M., Ura, H., Kato, R., Raiborg, C., Stenmark, H., and Wakatsuki, S. (2006). Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIP1 in endosomal protein sorting. *Nature Structural & Molecular Biology* 13, 272-277.
- Hofmann, K., and Falquet, L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 347-350.
- Huang, X.H., Langelotz, C., Hetfeld-Pechoc, B.K.J., Schwenk, W., and Dubiel, W. (2009). The COP9 Signalosome Mediates beta-Catenin Degradation by Deneddylation and Blocks Adenomatous Polyposis coli Destruction via USP15. *Journal of Molecular Biology* 391, 691-702.
- Hurley, J.H., Lee, S., and Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochemical Journal* 399, 361-372.
- Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews* 91, 119-149.
- Inui, M., Manfrin, A., Mamidi, A., Martello, G., Morsut, L., Soligo, S., Enzo, E., Moro, S., Polo, S., Dupont, S., *et al.* (2011). USP15 is a deubiquitylating enzyme for receptor-activated SMADs. *Nature Cell Biology* 13, 1368-U1187.
- Jensen, D., and Schekman, R. (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *Journal of Cell Science* 124, 1-4.
- Jin, L.Y., Pahuja, K.B., Wickliffe, K.E., Gorur, A., Baumgartel, C., Schekman, R., and Rape, M. (2012). Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* 482, 495-U213.
- Kanazawa, C., Morita, E., Yamada, M., Ishii, N., Miura, S., Asao, H., Yoshimori, T., and Sugamura, K. (2003). Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309, 848-856.

- Karim, R., Tummers, B., Meyers, C., Biryukov, J.L., Alam, S., Backendorf, C., Jha, V., Offringa, R., van Ommen, G.-J.B., Melief, C.J.M., *et al.* (2013). Human Papillomavirus (HPV) Upregulates the Cellular Deubiquitinase UCHL1 to Suppress the Keratinocyte's Innate Immune Response. *Plos Pathogens* 9.
- Kato, M., Miyazawa, K., and 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. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37481-37487.
- Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O'Rourke, K.M., Eby, M., Pietras, E., Cheng, G., Bazan, J.F., *et al.* (2007). DUBA: A deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science* 318, 1628-1632.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbe, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 550-563.
- Komander, D., Lord, C.J., Scheel, H., Swift, S., Hofmann, K., Ashworth, A., and Barford, D. (2008). The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Molecular Cell* 29, 451-464.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 81 81, 203-229.
- Kulathu, Y., and Komander, D. (2012). Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 508-523.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Mitch, W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology* 17, 1807-1819.
- Li, M.Y., Chen, D.L., Shiloh, A., Luo, J.Y., Nikolaev, A.Y., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648-653.
- Li, S., Zheng, H., Mao, A.-P., Zhong, B., Li, Y., Liu, Y., Gao, Y., Ran, Y., Tien, P., and Shu, H.-B. (2010). Regulation of Virus-triggered Signaling by OTUB1-and OTUB2-mediated Deubiquitination of TRAF3 and TRAF6. *Journal of Biological Chemistry* 285, 4291-4297.
- Lin, D., Zhang, M., Zhang, M.-X., Ren, Y., Zhao, Q., Jin, J., Pan, Z., Wu, M., Shu, H.-B., Dong, C., *et al.* (2015). Induction of USP25 by viral infection promotes innate antiviral responses by mediating the stabilization of TRAF3 and TRAF6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 11324-11329.
- Liu, M., Feng, Z., Ke, H.M., Liu, Y., Sun, T.H., Dai, J.L., Cui, W.H., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Tango1 spatially organizes ER exit sites to control ER export. *Journal of Cell Biology* 216, 1035-1049.

- Malynn, B.A., and Ma, A. (2010). Ubiquitin Makes Its Mark on Immune Regulation. *Immunity* 33, 843-852.
- Martens, S., and McMahon, H.T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 543-556.
- Matsuzawa, A., Tseng, P.-H., Vallabhapurapu, S., Luo, J.-L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D.A.A., Gallagher, E., and Karin, M. (2008). Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* 321, 663-668.
- McCullough, J., Clague, M.J., and Urbe, S. (2004). AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *Journal of Cell Biology* 166, 487-492.
- McGourty, C.A., Akopian, D., Walsh, C., Gorur, A., Werner, A., Schekman, R., Bautista, D., and Rape, M. (2016). Regulation of the CUL3 Ubiquitin Ligase by a Calcium-Dependent Co-adaptor. *Cell* 167, 525-538.
- Meijer, I.M.J., and van Leeuwen, J.E.M. (2011). ERBB2 is a target for USP8-mediated deubiquitination. *Cellular Signalling* 23, 458-467.
- Meulmeester, E., Kunze, M., Hsiao, H.H., Urlaub, H., and Melchior, F. (2008). Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Molecular Cell* 30, 610-619.
- Mevisen, T.E.T., Hospenthal, M.K., Geurink, P.P., Elliott, P.R., Akutsu, M., Arnaudo, N., Ekkebus, R., Kulathu, Y., Wauer, T., El Oualid, F., *et al.* (2013). OTU Deubiquitinases Reveal Mechanisms of Linkage Specificity and Enable Ubiquitin Chain Restriction Analysis. *Cell* 154, 169-184.
- Mironov, A.A., Beznoussenko, G.V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H.S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R.S., Fusella, A., Lupetti, P., *et al.* (2001). Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *Journal of Cell Biology* 155, 1225-1238.
- Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N., and Komada, M. (2005). Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Molecular Biology of the Cell* 16, 5163-5174.
- Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N., and Komada, M. (2003). STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3675-3689.
- Mizuno, E., Kitamura, N., and Komada, M. (2007). 14-3-3-dependent inhibition of the deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase. *Experimental Cell Research* 313, 3624-3634.

- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147, 728-741.
- Mukai, A., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Watanabe, W., Komada, M., and Goto, S. (2010). Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wg/Wnt. *Embo Journal* 29, 2114-2125.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 369-381.
- Niendorf, S., Oksche, A., Kisser, A., Lohler, J., Prinz, M., Schorle, H., Feller, S., Lewitzky, M., Horak, I., and Knobloch, K.P. (2007). Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 27, 5029-5039.
- Peng, Y., Xu, R., and Zheng, X. (2014). HSCARG Negatively Regulates the Cellular Antiviral RIG-I Like Receptor Signaling Pathway by Inhibiting TRAF3 Ubiquitination via Recruiting OTUB1. *Plos Pathogens* 10.
- Perez-Rivas, L.G., Theodoropoulou, M., Ferrau, F., Nusser, C., Kawaguchi, K., Stratakis, C.A., Faucz, F.R., Wildemberg, L.E., Assie, G., Beschoner, R., *et al.* (2015). The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100, E997-E1004.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P.P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-455.
- Rahighi, S., Braunstein, I., Ternette, N., Kessler, B., Kawasaki, M., Kato, R., Matsui, T., Weiss, T.M., Stanhill, A., and Wakatsuki, S. (2016). Selective Binding of AIRAPL Tandem UIMs to Lys48-Linked Tri-Ubiquitin Chains. *Structure* 24, 412-422.
- Reincke, M., Sbiera, S., Hayakawa, A., Theodoropoulou, M., Osswald, A., Beuschlein, F., Meitinger, T., Mizuno-Yamasaki, E., Kawaguchi, K., Saeki, Y., *et al.* (2015). Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nature Genetics* 47, 31-38.
- Reyes-Turcu, F.E., Horton, J.R., Mullally, J.E., Heroux, A., Cheng, X.D., and Wilkinson, K.D. (2006). The ubiquitin binding domain ZnFUBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. *Cell* 124, 1197-1208.
- Richardson, L.A., Reed, B.J., Charette, J.M., Freed, E.F., Fredrickson, E.K., Locke, M.N., Baserga, S.J., and Gardner, R.G. (2012). A Conserved Deubiquitinating Enzyme Controls Cell Growth by Regulating RNA Polymerase I Stability. *Cell Reports* 2, 372-385.

- Rismanchi, N., Puertollano, R., and Blackstone, C. (2009). STAM Adaptor Proteins Interact with COPII Complexes and Function in ER-to-Golgi Trafficking. *Traffic* 10, 201-217.
- Row, P.E., Liu, H., Hayes, S., Welchman, R., Charalabous, P., Hofmann, K., Clague, M.J., Sanderson, C.M., and Urbe, S. (2007). The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation. *Journal of Biological Chemistry* 282, 30929-30937.
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., and Urbe, S. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *Journal of Biological Chemistry* 281, 12618-12624.
- Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S.H., Zhou, H.L., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R., and Malhotra, V. (2009). TANGO1 Facilitates Cargo Loading at Endoplasmic Reticulum Exit Sites. *Cell* 136, 891-902.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., and Fukai, S. (2009). Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *Embo Journal* 28, 2461-2468.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 455, 358-U319.
- Schafer, M., and Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 628-638.
- Schweitzer, K., Bozko, P.M., Dubiel, W., and Naumann, M. (2007). CSN controls NF-kappa B by deubiquitylation of I kappa B alpha. *Embo Journal* 26, 1532-1541.
- Schwertman, P., Lagarou, A., Dekkers, D.H.W., Raams, A., van der Hoek, A.C., Laffeber, C., Hoeijmakers, J.H.J., Demmers, J.A.A., Fouteri, M., Vermeulen, W., *et al.* (2012). UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nature Genetics* 44, 598-602.
- Sheng, Y., Saridakis, V., Sarkari, F., Duan, S.L., Wu, T.N., Arrowsmith, C.H., and Frappier, L. (2006). Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nature Structural & Molecular Biology* 13, 285-291.
- Shibata, H., Suzuki, H., Yoshida, H., and Maki, M. (2007). ALG-2 directly binds Sec31A and localizes at endoplasmic reticulum exit sites in a Ca²⁺-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353, 756-763.

- Sims, J.J., and Cohen, R.E. (2009). Linkage-Specific Avidity Defines the Lysine 63-Linked Polyubiquitin-Binding Preference of Rap80. *Molecular Cell* 33, 775-783.
- Song, A.-X., Zhou, C.-J., Peng, Y., Gao, X.-C., Zhou, Z.-R., Fu, Q.-S., Hong, J., Lin, D.-H., and Hu, H.-Y. (2010). Structural Transformation of the Tandem Ubiquitin-Interacting Motifs in Ataxin-3 and Their Cooperative Interactions with Ubiquitin Chains. *Plos One* 5.
- Sun, X.X., He, X., Yin, L., Komada, M., Sears, R.C., and Dai, M.S. (2015). The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 3734-3739.
- Tanno, H., and Komada, M. (2013). The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway. *Journal of Biochemistry* 153, 497-504.
- Tanno, H., Shigematsu, T., Nishikawa, S., Hayakawa, A., Denda, K., Tanaka, T., and Komada, M. (2014). Ubiquitin-interacting Motifs Confer Full Catalytic Activity, but Not Ubiquitin Chain Substrate Specificity, to Deubiquitinating Enzyme USP37. *Journal of Biological Chemistry* 289, 2415-2423.
- Tanno, H., Yamaguchi, T., Goto, E., Ishido, S., and Komada, M. (2012). The Ankrd 13 family of UIM-bearing proteins regulates EGF receptor endocytosis from the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell* 23, 1343-1353.
- Townley, A.K., Feng, Y., Schmidt, K., Carter, D.A., Porter, R., Verkade, P., and Stephens, D.J. (2008). Efficient coupling of Sec23-Sec24 to Sec13-Sec31 drives COPII-dependent collagen secretion and is essential for normal craniofacial development. *Journal of Cell Science* 121, 3025-3034.
- Tseng, P.-H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D.A.A., and Karin, M. (2010). Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nature Immunology* 11, 1819.
- Tsou, W.L., Sheedlo, M.J., Morrow, M.E., Blount, J.R., McGregor, K.M., Das, C., and Todi, S.V. (2012). Systematic Analysis of the Physiological Importance of Deubiquitinating Enzymes. *Plos One* 7.
- Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2017). In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-Linked Chain Specificity of the Proteasome. *Molecular Cell* 66, 488-502.
- Urbe, S., Liu, H., Hayes, S.D., Heride, C., Rigden, D.J., and Clague, M.J. (2012). Systematic survey of deubiquitinase localization identifies USP21 as a regulator of centrosome- and microtubule-associated functions. *Molecular Biology of the Cell* 23, 1095-1103.
- Venditti, R., Scanu, T., Santoro, M., Di Tullio, G., Spaar, A., Gaibisso, R., Beznoussenko, G.V., Mironov, A.A., Mironov, A., Zelante, L., *et al.* (2012). Sedlin Controls the ER Export of Procollagen by Regulating the Sar1 Cycle. *Science* 337, 1668-1672.

- Winborn, B.J., Travis, S.M., Todi, S.V., Scaglione, K.M., Xu, P., Williams, A.J., Cohen, R.E., Peng, J., and Paulson, H.L. (2008). The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys(63) linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *Journal of Biological Chemistry* 283, 26436-26443.
- Wu, X.L., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C., and Carraway, K.L. (2004). Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7748-7757.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology* 214, 199-210.
- Xia, R.H., Jia, H.G., Fan, J.K., Liu, Y.J., and Jia, J.H. (2012). USP8 Promotes Smoothed Signaling by Preventing Its Ubiquitination and Changing Its Subcellular Localization. *Plos Biology* 10.
- Yamasaki, A., Tani, K., Yamamoto, A., Kitamura, N., and Komada, M. (2006). The Ca²⁺(+)-binding protein ALG-2 is recruited to endoplasmic reticulum exit sites by Sec31A and stabilizes the localization of Sec31A. *Molecular Biology of the Cell* 17, 4876-4887.
- Yau, R., and Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nature Cell Biology* 18, 579-586.
- Yeong, F.M. (2013). Multi-step down-regulation of the secretory pathway in mitosis: A fresh perspective on protein trafficking. *Bioessays* 35, 462-471.
- Yoshida, H., Jono, H., Kai, H., and Li, J.D. (2005). The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 and TRAF7. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41111-41121.
- Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., *et al.* (2012). Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nature Genetics* 44, 593-597.
- Zhong, B., Liu, X., Wang, X., Chang, S.H., Liu, X., Wang, A., Reynolds, J.M., and Dong, C. (2012). Negative regulation of IL-17-mediated signaling and inflammation by the ubiquitin-specific protease USP25. *Nature Immunology* 13, 1110-1117.
- Zhong, B., Liu, X., Wang, X., Liu, X., Li, H., Darnay, B.G., Lin, X., Sun, S.-C., and Dong, C. (2013a). Ubiquitin-Specific Protease 25 Regulates TLR4-Dependent Innate Immune Responses Through Deubiquitination of the Adaptor Protein TRAF3. *Science Signaling* 6.
- Zhong, H., Wang, D., Fang, L., Zhang, H., Luo, R., Shang, M., Ouyang, C., Ouyang, H., Chen, H., and Xiao, S. (2013b). Ubiquitin-Specific Proteases 25 Negatively Regulates Virus-Induced Type I Interferon Signaling. *Plos One* 8.

Zhong, L., Tan, Y., Zhou, A., Yu, Q.M., and Zhou, J.H. (2005). RING finger ubiquitin-protein isopeptide ligase Nrdp1/FLRF regulates parkin stability and activity. *Journal of Biological Chemistry* 280, 9425-9430.

川口紘平「核小体ストレス応答におけるユビキチン化修飾の機能解析」東京工業大学 生命理工学研究科 生体システム専攻、平成 26 年度 修士論文

報文目録

- Kawaguchi, K., Uo, K., Tanaka, T., and Komada, M. (2017) Tandem UIMs confer Lys48 ubiquitin chain substrate preference to deubiquitinase USP25. *Scientific Report* 7, 45037
- Hayashi, K., Inoshita, N., Kawaguchi, K., Ardisasmita, A.I., Suzuki, H., Fukuhara, N., Okada, M., Nishioka, H., Takeuchi, Y., Komada, M., Takeshita, A., and Yamada, S. (2016) The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology* 174, 213-226
- Reincke, M., Sbiera, S., Hayakawa, A., Theodoropoulou, M., Osswald, A., Beuschlein, F., Meitinger, T., Mizuno-Yamasaki, E., Kawaguchi, K., Saeki, Y., Tanaka, K., Wieland, T., Graf, E., Saeger, W., Ronchi, C.L., Allolio, B., Buchfelder, M., Strom, T.M., Fassnacht, M., and Komada, M. (2015) Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nature Genetics* 47, 31-38
- Perez-Rivas, L.G., Theodoropoulou, M., Ferrau, F., Nusser, C., Kawaguchi, K., Stratakis, C.A., Reuda Faucez, F., Wildemberg, L.E., Assie, G., Beschoner, R., Dimopoulou, C., Buchfelder, M., Popovic, V., Berr, C.M., Toth, M., Ardisasmita, A.I., Honegger, J., Bertherat, J., Gadelha, M.R., Beuschlein, F., Stalla, G., Komada, M., Korbonits, M., and Reincke, M. (2015) The gene of the ubiquitin-specific protease 8 is frequently mutated in adenomas causing Cushing's disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100, E997-E1004
- 川口紘平、駒田雅之 (2016) 「クッシング病の原因遺伝子と発症機構」 *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌* 2016, 180-186
- 川口紘平、駒田雅之 (2016) 「脱ユビキチン化酵素によるエンドサイトーシス制御と遺伝子疾患」 *医学のあゆみ* 256, 861-867
- 川口紘平、駒田雅之 (2015) 「難病 "クッシング病" 発症の分子メカニズム」 *バイオサイエンスとインダストリー* 73, 300-301
- 川口紘平、駒田雅之 (2015) 「見えてきたユビキチンを介した核小体の多彩な機能」 *ファルマシア* 51, 300-304

謝辞

本研究は東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター 駒田研究室で行われたものです。本研究の機会を賜り、研究全般において丁寧に御指導くださいました駒田雅之教授に深く感謝申し上げます。貴重なご助言、御指導を頂きました福嶋俊明助教、田中利明助教、伝田公紀助教、早川哲博士、水野英美博士、遠藤彬則博士、加藤明准教授に厚く御礼申し上げます。電子顕微鏡解析をしてくださった池田佳子博士、円由香博士に厚く御礼申し上げます。DNA シークエンスサービスをはじめとして様々な技術支援をしてくださった技術部バイオ部門の皆様に厚く御礼申し上げます。また、駒田研究室のすべての室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

平成 30 年 2 月 川口紘平

Figures

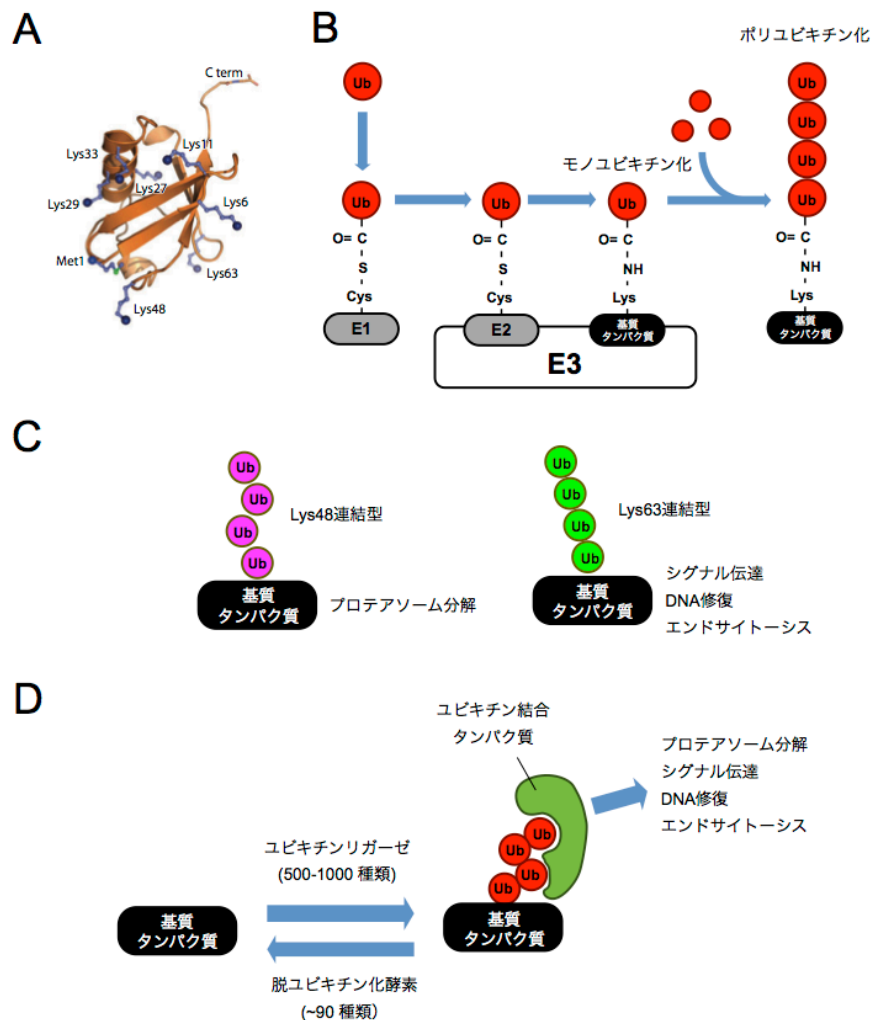


Fig. 1-1 ユビキチン化と脱ユビキチン化による制御

- (A) ユビキチンの立体構造。7つのリジン残基とN末端のメチオニン残基を介して立体構造の異なるポリユビキチン鎖を形成することができる。図は Rape & Komander, 2012 より引用した。
- (B) ユビキチン化反応。ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチン転移酵素(E3)による基質タンパク質のユビキチン化反応の概略図。
- (C) 代表的なポリユビキチン鎖の機能。代表的なポリユビキチン鎖である Lys48 連結型および Lys63 連結型ポリユビキチン鎖の機能。
- (D) ユビキチン化と脱ユビキチン化によるタンパク質の機能制御。ユビキチン化修飾はユビキチン結合タンパク質によって認識されることで機能を発揮し細胞内イベントを進行させる。

また、脱ユビキチン化酵素は、標的タンパク質に付加されたユビキチン鎖を分解することによって、ユビキチン化修飾に応答して進行する細胞内イベントを停止する役割を果たす。

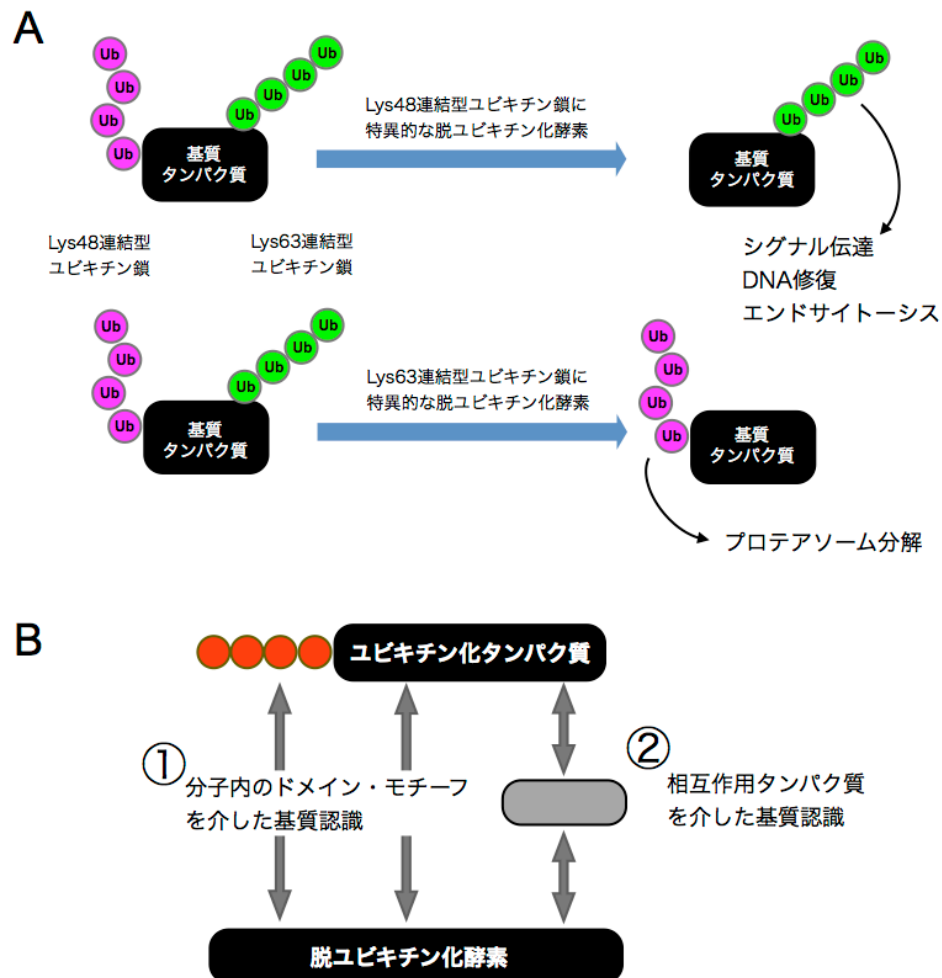


Fig. 1-2 脱ユビキチン化酵素による基質認識

- (A) ユビキチン鎖に対して特異性のある脱ユビキチン化酵素によるタンパク質機能の制御。特定の種類のユビキチン鎖に特異的な脱ユビキチン化酵素によるタンパク質機能制御の概略図。Lys48 連結型および Lys63 連結型ポリユビキチン化を共に受けるタンパク質を例にすると、Lys63 連結型に特異的な脱ユビキチン化酵素は Lys48 連結型ポリユビキチン鎖を残すことで、Lys48 連結型ポリユビキチン化によって発揮される機能を増強する。逆に、Lys48 連結型に特異的な脱ユビキチン化酵素は、Lys63 連結型ポリユビキチン化によって発揮される機能を増強する。
- (B) 脱ユビキチン化酵素の基質認識。脱ユビキチン化酵素が基質タンパク質を認識する分子機構は、① 脱ユビキチン化酵素の分子内の基質認識ドメイン（あるいはモチーフ）を用いる場合と、② 基質認識を担う他のタンパク質との相互作用を介する場合に分けることができる。

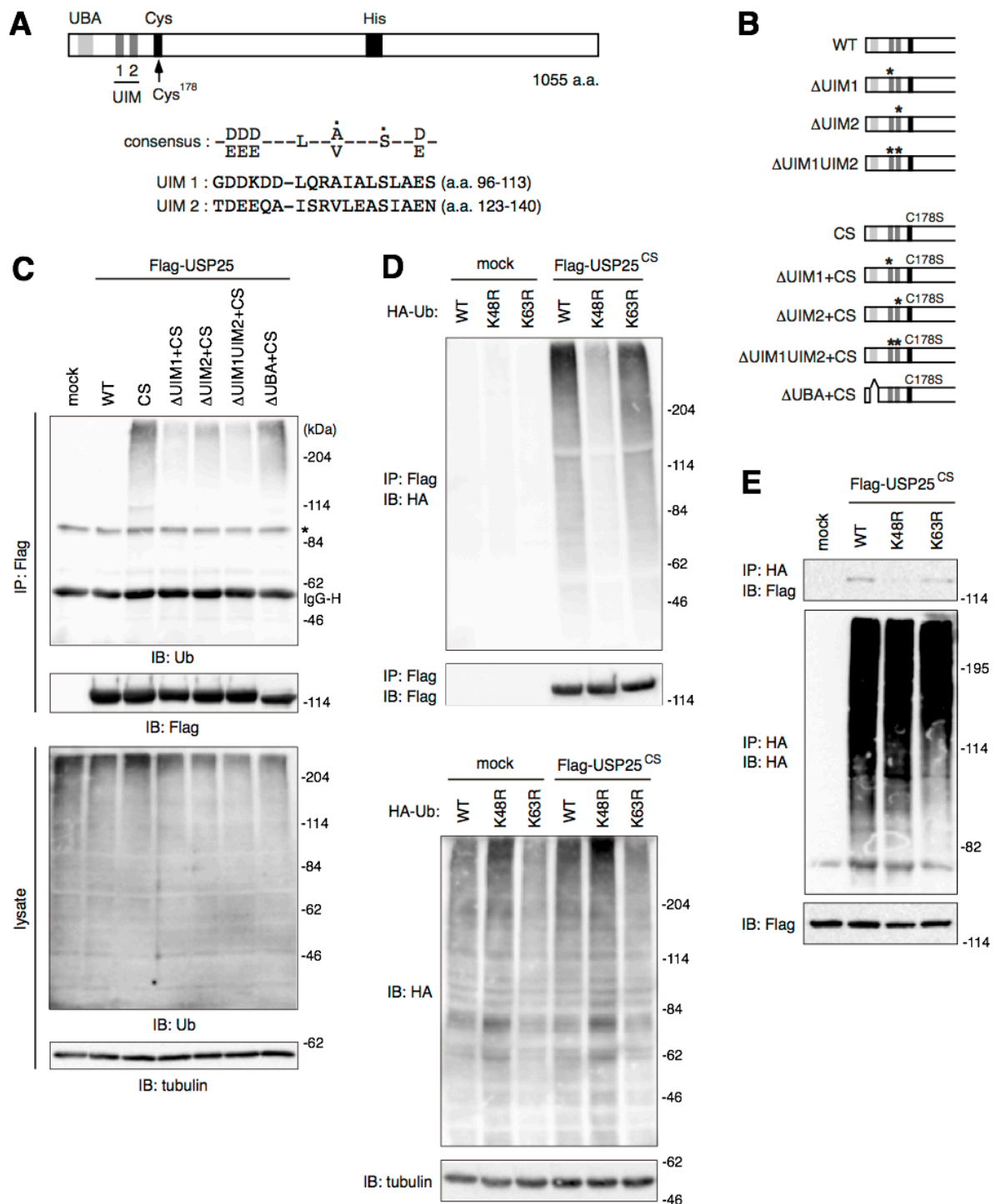


Fig. 2-1 USP25 の UIM のユビキチン結合

- (A) USP25 のドメイン構造の概略図、および、USP25 の UIM1 と UIM2 のアミノ酸配列と UIM のコンセンサス配列との比較。コンセンサス配列の中にドットで示されている Ala/Val 残基と Ser 残基をそれぞれ Gly と Ala に置換すると、ユビキチン結合能が失われる。
- (B) 実験に用いた USP25 の変異体。アスタリスクは、UIM の Ala/Val 残基と Ser 残基に点変異を導入しユビキチン結合能を失わせたことを表している。C178S は酵素活性中心の Cys178 を Ser に置換したことを表している。
- (C) HEK293T 細胞に図に示した Flag-USP25 発現プラスミドをトランスフェクションした。細胞抽出液を Flag 抗体で免疫沈降し、抗ユビキチン(Ub) 抗体と抗 Flag 抗体でイムノブロットした。IP, 免疫沈降; IB, イムノブロット; IgG-H, 免疫沈降に用いた IgG の重鎖; アスタリスク, 非特異的バンド
- (C,D) HA-UbK48R もしくは HA-UbK63R を発現した HEK293T 細胞の抽出液と Flag-USP25CS を発現した HEK23T 細胞の抽出液を混合し、抗 Flag 抗体 (A) もしくは抗 HA 抗体 (B) で免疫沈降し、図に示した抗体でイムノブロットした。

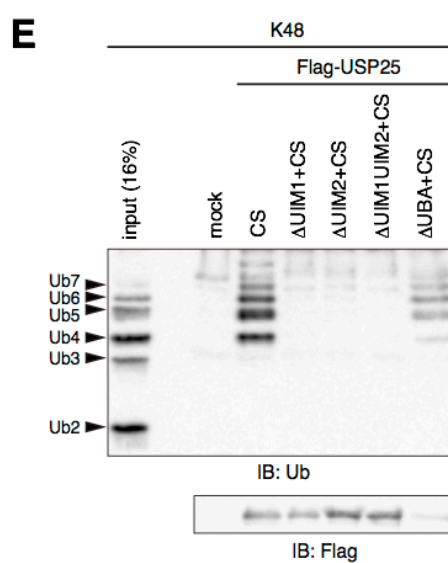
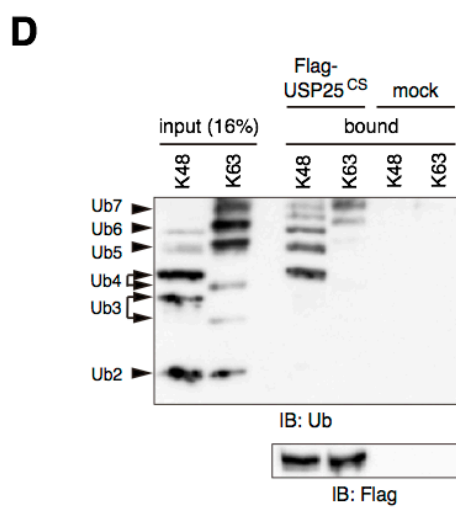
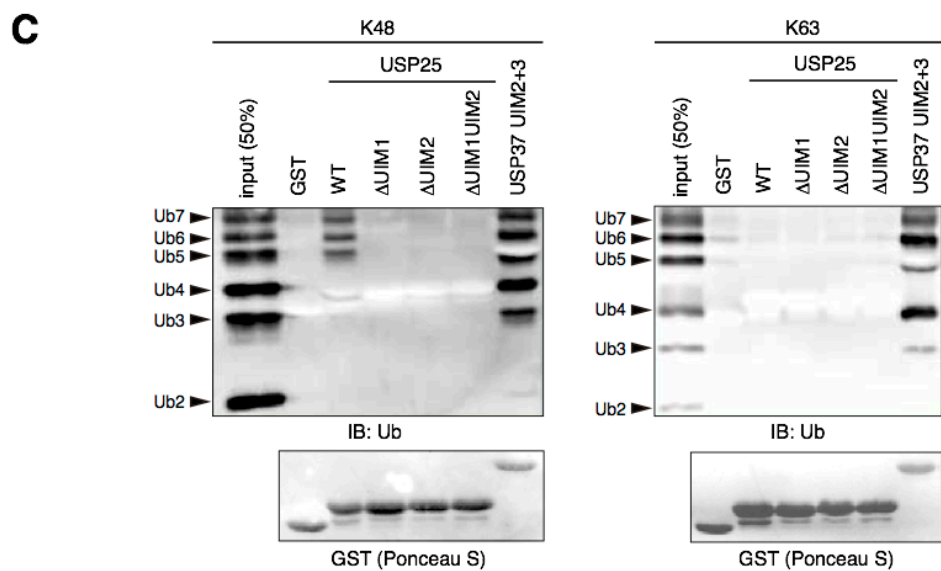
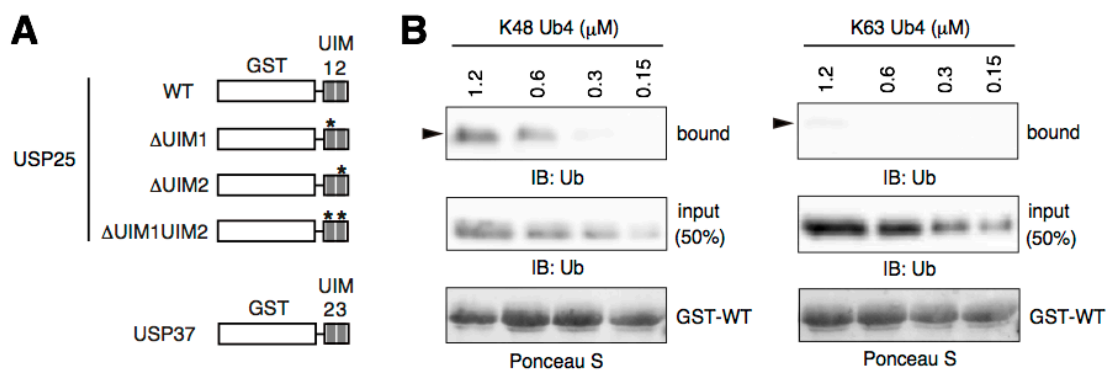


Fig. 2-2 GST融合USP25 UIMをもちいたユビキチン鎖のプルダウン実験

- (A) 実験に用いたGST-USP25 UIM融合タンパク質と、GST-USP37 UIM融合タンパク質 (ポジティブコントロール) の概略図。
- (B) GST-UIM WTをグルタチオンビーズに固定し、図に示した濃度のLys48連結型またはLys63連結型の4量体ユビキチン鎖とインキュベートした。ビーズを洗浄後、抗ユビキチン抗体でイムノプロットした (上)。GST融合タンパク質はメンブレンをPonceauSで染色し、ほぼ等量であることを確認した (下)。
- (C) 図に示したGST-UIM変異体を固定したグルタチオンビーズをユビキチン鎖 (2-7量体の混合物)とインキュベートし、その後 (B) と同様に解析した。
- (D) Flag-USP25を発現したHEK293T細胞をhot-lysis処理し、抽出液からFlag-USP25を免疫精製し、抗Flag抗体が共有結合したアガロースビーズに固定した。このビーズをLys48連結型またはLys63連結型のユビキチン鎖 (2-7量体の混合物)とインキュベートし、ビーズを洗浄後、結合したユビキチン鎖を抗ユビキチン抗体でイムノプロットした (上)。Flag-USP25を抗Flag抗体でイムノプロットし、ほぼ等量であることを確認した (下)。
- (E) 図に示した変異型のFlag-USP25を発現したHEK293T細胞をhot-lysis処理し、抽出液からFlag-USP25を免疫精製し、抗Flag抗体が共有結合したアガロースビーズに固定した。このビーズをLys48連結型ユビキチン鎖 (2-7量体の混合物)とインキュベートし、ビーズを洗浄後、結合したユビキチン鎖を抗ユビキチン抗体でイムノプロットした (上)。Flag-USP25を抗Flag抗体でイムノプロットし、ほぼ等量であることを確認した (下)。

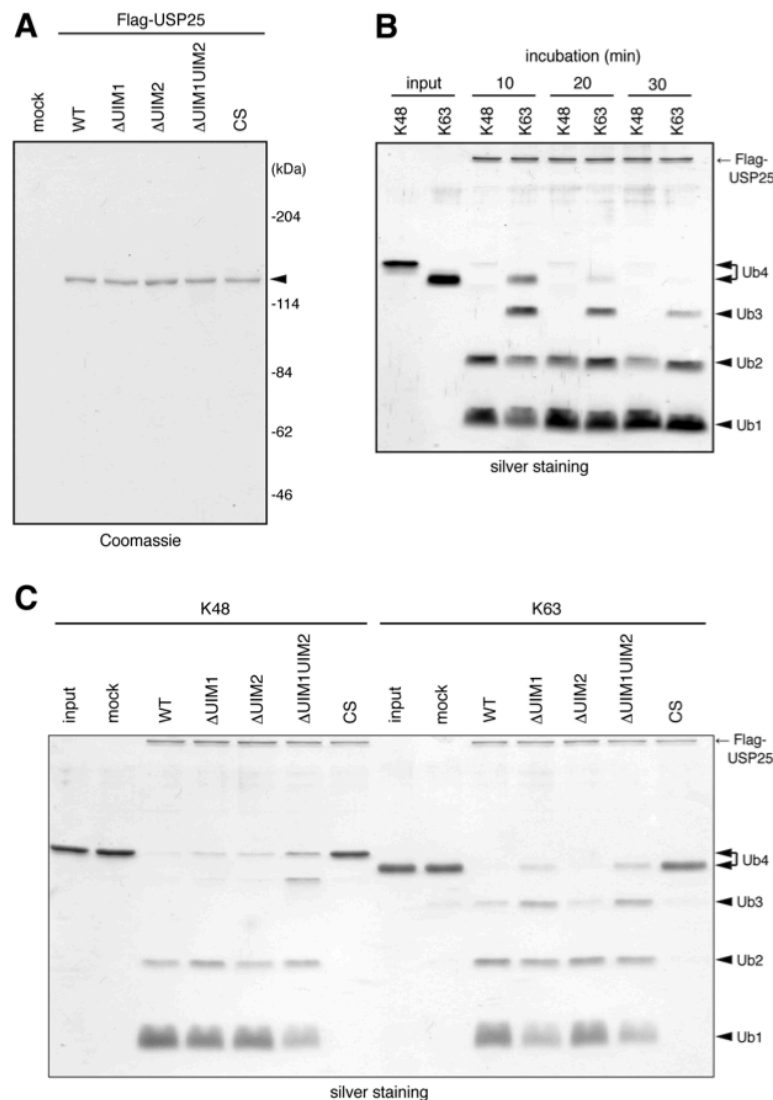


Fig. 2-3 USP25の酵素活性のユビキチン鎖基質選択性とUIM依存性

- (A) 図に示された Flag-USP25 を HEK293T 細胞に発現させ、その細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降した。ビーズから 3xFlag ペプチドを用いて Flag-USP25 を溶出し、SDS-PAGE で分離後、CBB 染色により検出した。矢じりは USP25 タンパク質を示している。
- (B) (A)で調製した Flag-USP25 と Lys48 連結型または Lys63 連結型の 4 量体ユビキチン鎖 (Ub4) を 10, 20 もしくは 30 分間インキュベートし、反応後の溶液を SDS-PAGE で分離後、銀染色により脱ユビキチン化反応によって生産されたユビキチンの 3 量体 (Ub3)、2 量体 (Ub2)、単量体 (Ub1) を検出した。矢印は Flag-USP25 を示している。
- (C) (A)で調製した野生型または変異型の USP25 と Lys48 連結型 4 量体ユビキチン鎖を 30 分間インキュベートし、反応後の溶液を用いて (B) と同様に解析した。

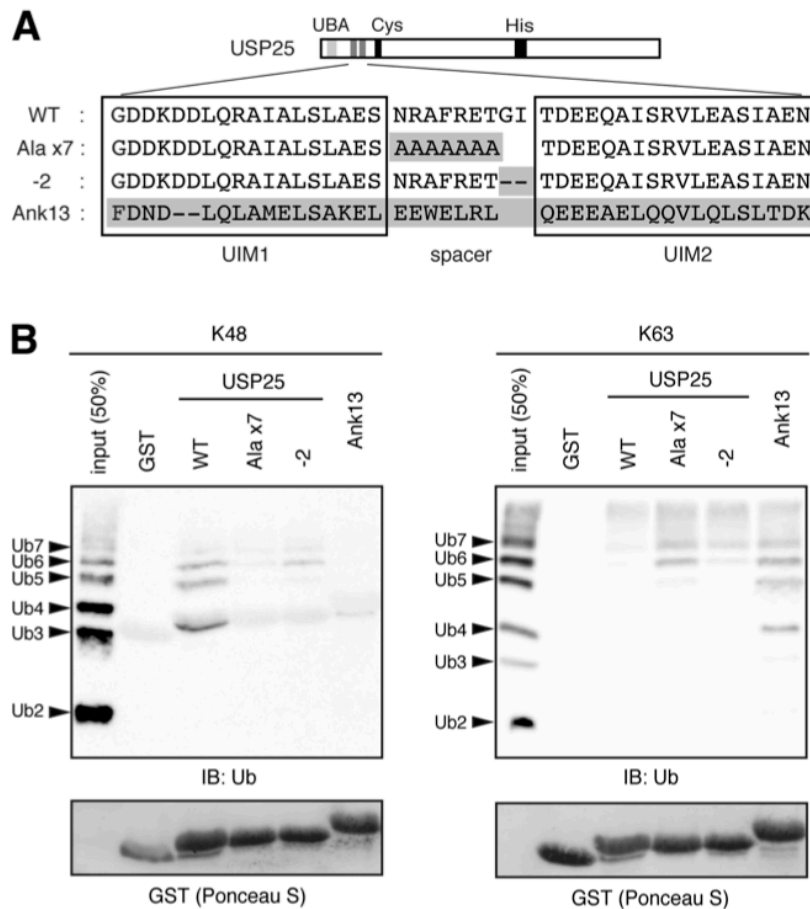


Fig. 2-4 タンデム UIM 領域の改編による USP25 のユビキチン鎖結合選択性の変換

- (A) USP25 のタンデム UIM 領域に導入した変異を図示する。野生型 USP25 と異なる部分もしくは Ankrd13A 由来の配列を灰色で示している。
- (B) (A)で示したように改変したタンデム UIM 領域を GST に融合し、グルタチオンビーズに固定し、Lys48 連結型あるいは Lys63 連結型のユビキチン鎖 (2-7 量体の混合物) とインキュベートし、結合したユビキチン鎖を抗ユビキチン抗体でイムノプロットした。実験に用いた GST 融合タンパク質は、メンブレンを PonceauS で染色して検出した。

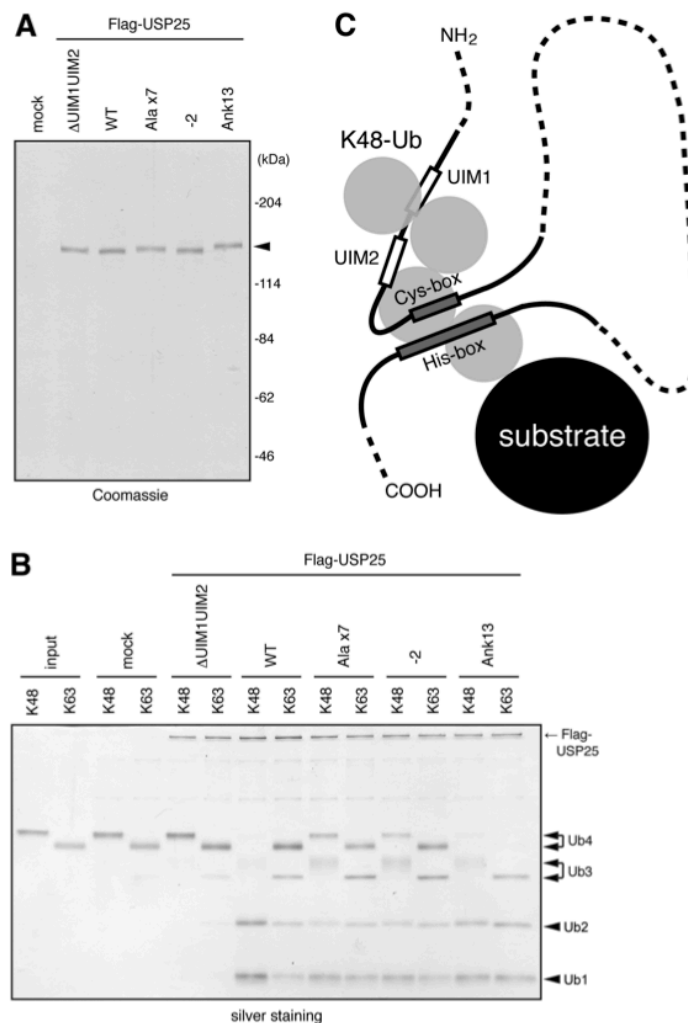


Fig. 2-5 UIMのユビキチン鎖結合選択性がUSP25の酵素活性のユビキチン鎖基質選択性を決定している

- (A) Flag-USP25 あるいは Fig.8A で示した変異型の Flag-USP8 を HEK293T 細胞に発現し、細胞抽出液から抗 Flag 抗体で Flag-USP25 を免疫沈降した。ビーズから 3xFlag ペプチドを用いて Flag-USP25 を溶出し、SDS-PAGE で分離後、CBB 染色により検出した。
- (B) (A)で調製した Flag-USP25 と Lys48 連結型あるいは Lys63 連結型の 4 量体ユビキチン鎖を 10 分間インキュベートし、反応後の溶液を SDS-PAGE で分離後、銀染色により脱ユビキチン化反応によって生産されたユビキチンの 3 量体 (Ub3)、2 量体 (Ub2)、単量体 (Ub1) を検出した。
- (C) USP25 のタンデム UIM 領域は、Lys48 連結型ユビキチン鎖に選択的に結合することによって、Lys48 連結型ユビキチン鎖の修飾を受けたタンパク質を酵素活性中心(His-box, Cys-box)の近傍に引き寄せる。このことにより、USP25 は Lys48 連結型のポリユビキチン化タンパク質を効率的に脱ユビキチン化する。

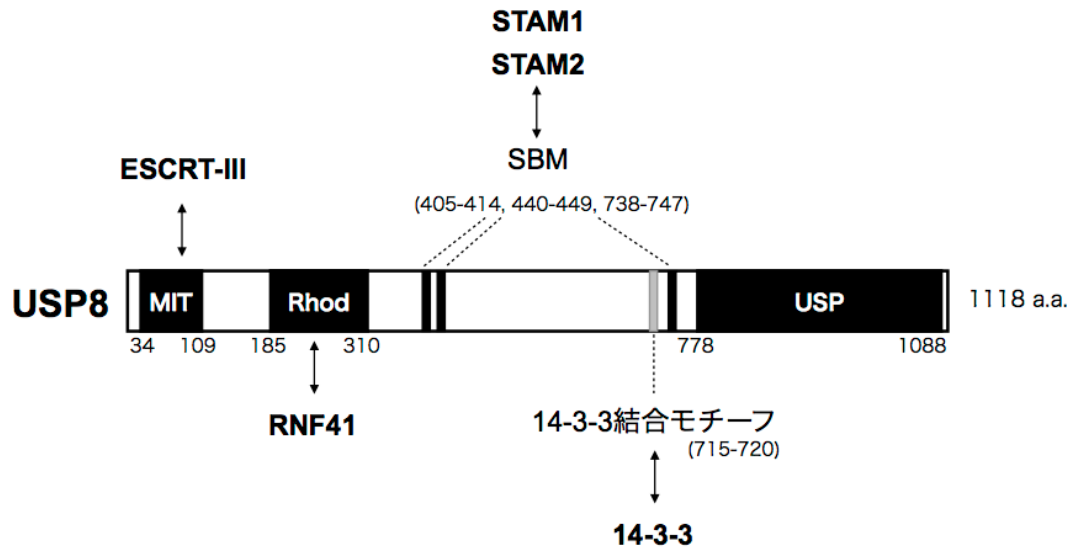


Fig. 3-1 USP8 のドメイン構造と結合タンパク質

ヒト USP8 のドメイン構造の模式図とそれぞれのドメイン/モチーフに結合するタンパク質を示している。USP8 には、N 末端領域に Rhodanese ドメイン(Rhod)と MIT ドメイン、中央領域に 3 つの SH3-binding motif (SBM) と 14-3-3 結合モチーフ (RSYpSSP, pS はリン酸化セリン)、C 末端領域に脱ユビキチン化酵素活性を担う USP ドメインが存在する。USP8 は Rhodanese ドメインを介してユビキチンリガーゼ RNF41 と、MIT ドメインを介して ESCRT-III 複合体の CHMP タンパク質と、SBM を介してユビキチン結合能をもつタンパク質 STAM1/2 と、14-3-3 結合モチーフを介して 14-3-3 タンパク質と結合する。ドメイン/モチーフの下にアミノ酸番号を表記している。

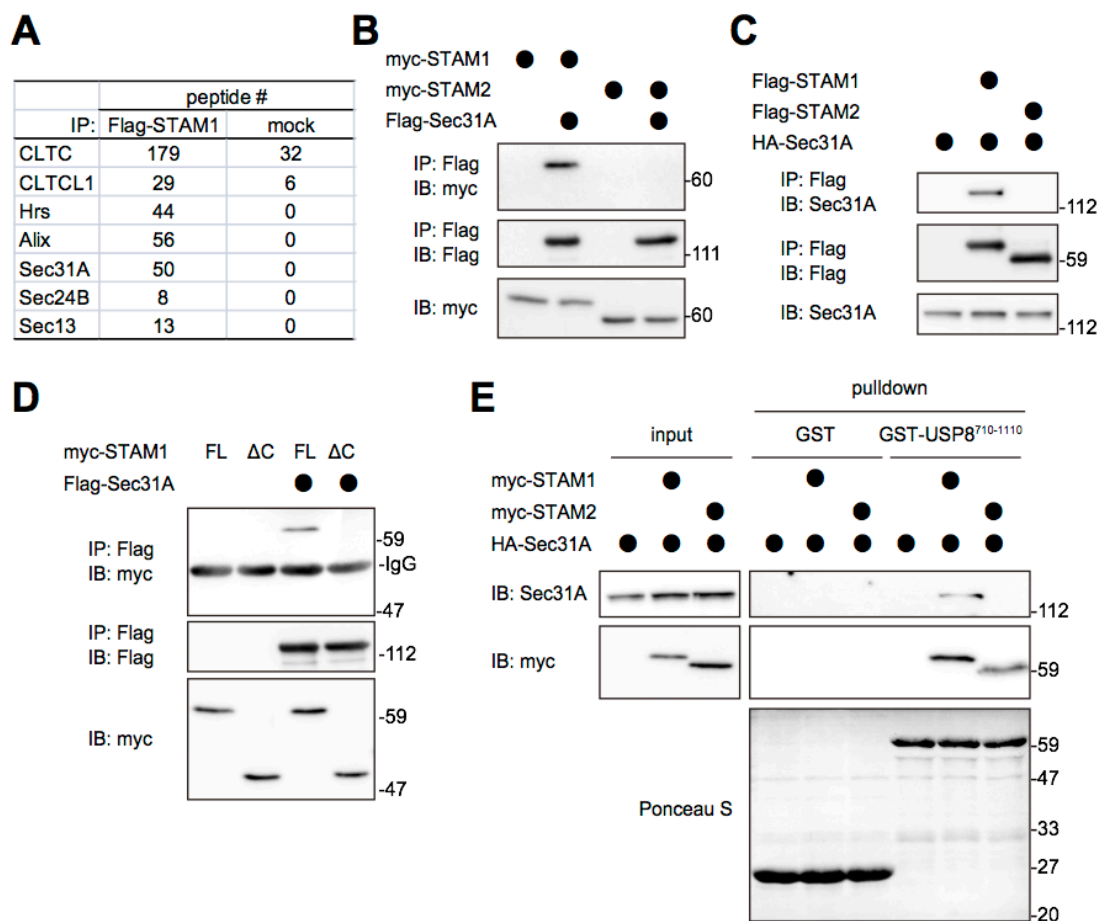


Fig. 3-2 STAM1 は Sec31A に結合し、STAM2 は結合しない

- (A) HEK293T 細胞に Flag-STAM1 を発現させ、0.1% PFA で処理した後、抗 Flag 抗体で免疫沈降した。この沈降物を LC-MS/MS 解析し、同定されたエンドサイトーシス関連タンパク質もしくは COPII コートタンパク質の検出されたペプチド数 (独立した 3 回の実験の合計) を図に示している。CLTC, clathrin heavy chain ; CLTCL1, clathrin heavy chain like 1
- (B) HEK293T 細胞に myc-STAM1 もしくは myc-STAM2 と Flag-Sec31A を発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降し、図中に示した抗体でイムノブロットした。
- (C) Flag-STAM1 もしくは Flag-STAM2 と HA-Sec31A を用いて B と同様の実験を行った。
- (D) Flag-STAM1 もしくは C 末端領域 (アミノ酸番号 266-548) を欠いた Flag-STAM1ΔC を用いて B と同様の実験を行った。
- (E) HEK293T 細胞に myc-STAM1 もしくは myc-STAM2 と Flag-Sec31A を発現させ、GST もしくは GST-USP8⁷¹⁰⁻¹¹¹⁰ を結合させたグルタチオンセファロースビーズを用いてプルダウン実験を行った。

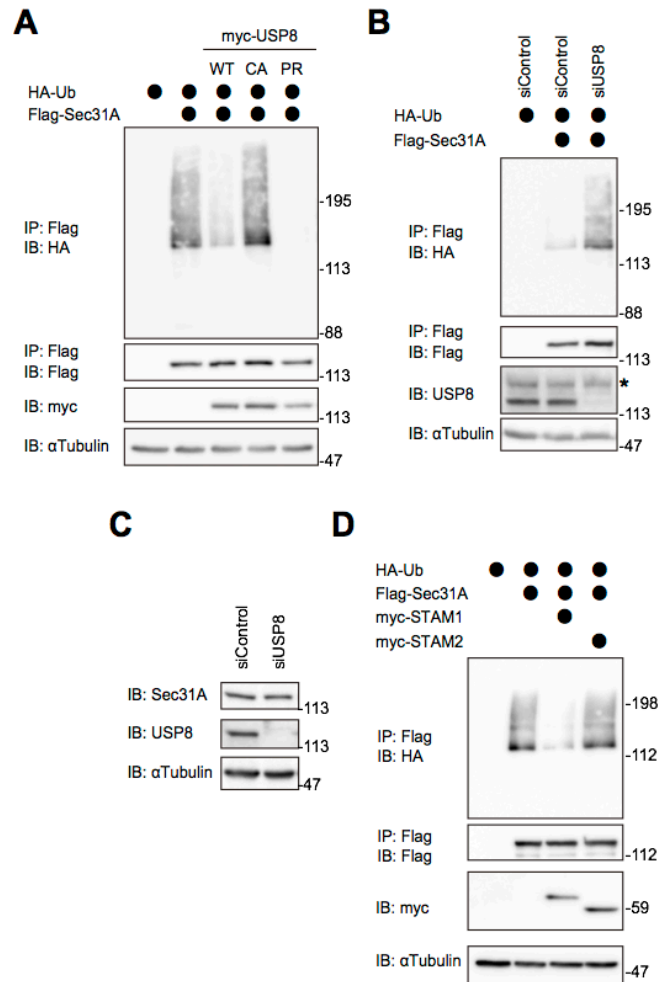


Fig. 3-3 USP8 は Sec31A を脱ユビキチン化する

- (A) HEK293T 細胞に HA-Ub、Flag-Sec31A、および myc-USP8 (野生型、WT)、酵素活性欠失型変異体 (CA) もしくは過剰活性化型変異体 (PR) を発現し、抗 Flag 抗体で免疫沈降後、図中に示した抗体でイムノブロットした。
- (B) HEK293T 細胞に HA-Ub、Flag-Sec31A をコードするプラスミド、および USP8 に対する siRNA (siUSP8) もしくはコントロール RNA (siControl) をトランスフェクションし、抗 Flag 抗体で免疫沈降後、図中に示した抗体でイムノブロットした。アスタリスク：非特異的なバンド
- (C) HeLa 細胞に siControl もしくは siUSP8 をトランスフェクションし、細胞抽出液を図中に示した抗体でイムノブロットした。
- (D) HEK293T 細胞に HA-Ub、Flag-Sec31A、および myc-STAM1 もしくは myc-STAM2 を発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降し、図中に示した抗体でイムノブロットした。

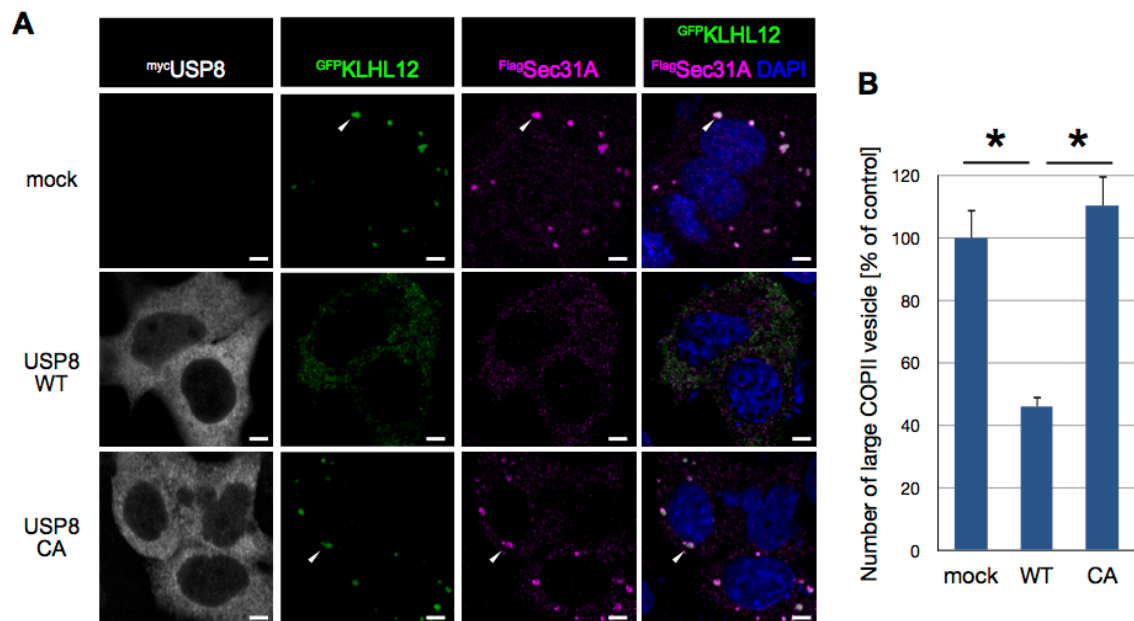


Fig. 3-4 USP8 の過剰発現は KLHL12 と Sec31A の過剰発現によって形成される巨大 COPII 小胞の形成を阻害する

- (A) COS7 細胞に GFP-KLHL12、Flag-Sec31A および myc-USP8 (野生型、WT)、酵素活性欠失型変異体 (CA) を発現し、抗 myc 抗体と抗 Flag 抗体で免疫蛍光染色した。核は DAPI で染色した。矢じりは巨大な COPII 小胞を示している。スケールバー：5 μ m
- (B) A の実験において、1 細胞あたりの巨大 COPII 小胞の数を計測した。独立した実験を 3 回行い、1 回の実験で 60 個以上の細胞を数え、対照細胞に対する割合 (%) の平均と標準偏差を棒グラフとエラーバーで表した。アスタリスク： $p < 0.05$ 。

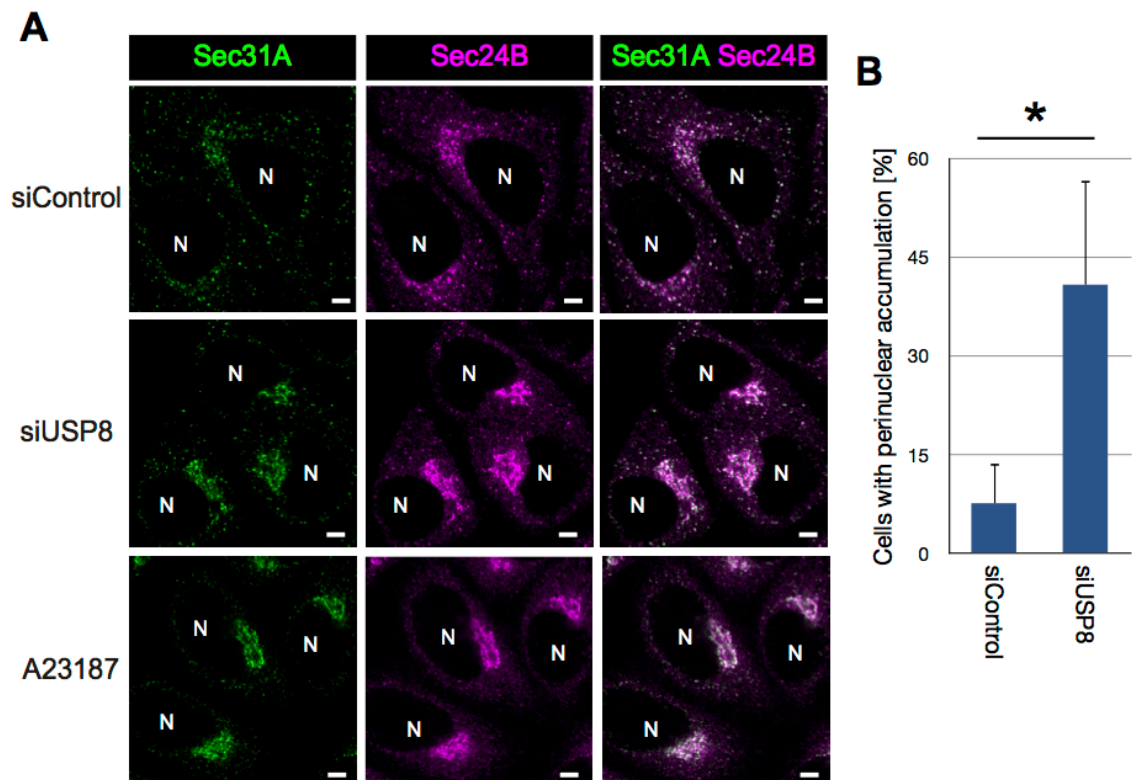


Fig. 3-5 USP8 の発現抑制は内在性 COPII コートタンパク質の局在を変化させる

- (A) HeLa 細胞に siControl もしくは siUSP8 をトランスフェクションし、抗 Sec31A 抗体と抗 Sec24B 抗体で免疫蛍光染色した。比較対象として、HeLa 細胞を 1 mM の A23187 で 15 分間処理し、同様に免疫蛍光染色した。N：核；スケールバー：5 μ m
- (B) A の実験において、核周辺領域に COPII コートタンパク質が蓄積した細胞数を計測した。1 回の実験で 200 個以上の細胞を数え蓄積が見られた細胞の割合を算出した。独立した実験を 3 回行い、その平均と標準偏差を棒グラフとエラーバーで表した。アスタリスク： $p < 0.05$

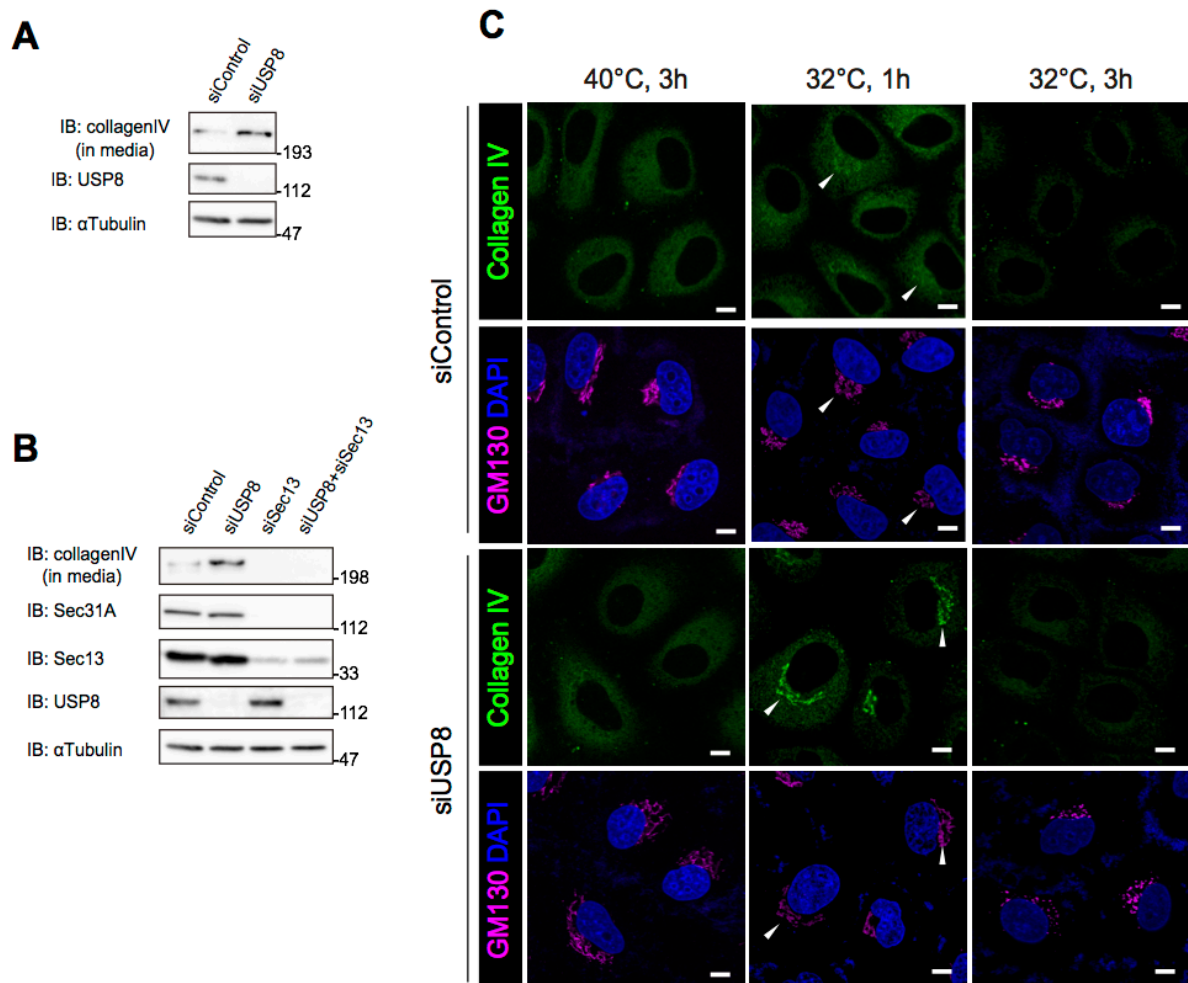


Fig. 3-6 USP8 の発現抑制はコラーゲンの ER からゴルジ体への輸送を促進する

(A, B) siControl, siUSP8 および siSec13 をトランスフェクションした HeLa 細胞を FBS を含まない培地で 24 時間培養した。培養上清から TCA とアセトンによってタンパク質を沈殿し、この沈殿物および細胞抽出液を図中に示された抗体でイムノプロットした。

(C) siControl, siUSP8 および siSec13 をトランスフェクションした HeLa 細胞を 40°C で 3 時間培養し (左列)、その後 32°C で 1 時間 (中列) もしくは 3 時間 (右列) 培養、抗 IV 型コラーゲン抗体とゴルジ体シス槽のマーカである抗 GM130 抗体で免疫蛍光染色した。核は DAPI で染色した。矢じりは GM130 と共局在した IV 型コラーゲンを示している。スケールバー：10 μm

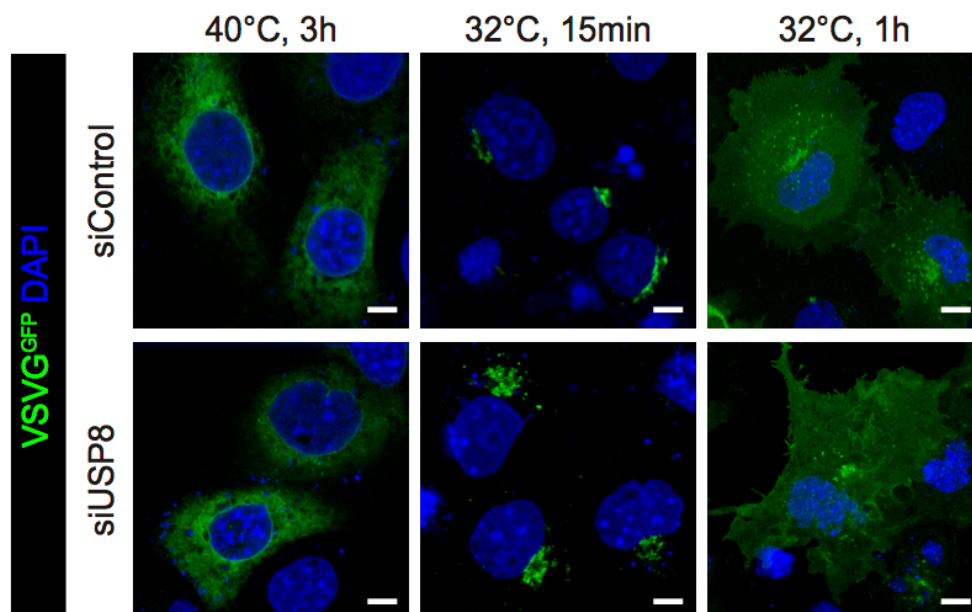


Fig. 3-7 USP8 の発現抑制は VSVG-ts045 の輸送に影響しない

siControl および siUSP8 をトランスフェクションした COS7 細胞を 40°C で 3 時間培養し (左列)、その後 32°C で 15 分 (中列) もしくは 1 時間 (右列) 培養し、抗 GFP 抗体で免疫蛍光染色した。核は DAPI で染色した。スケールバー : 5 μ m

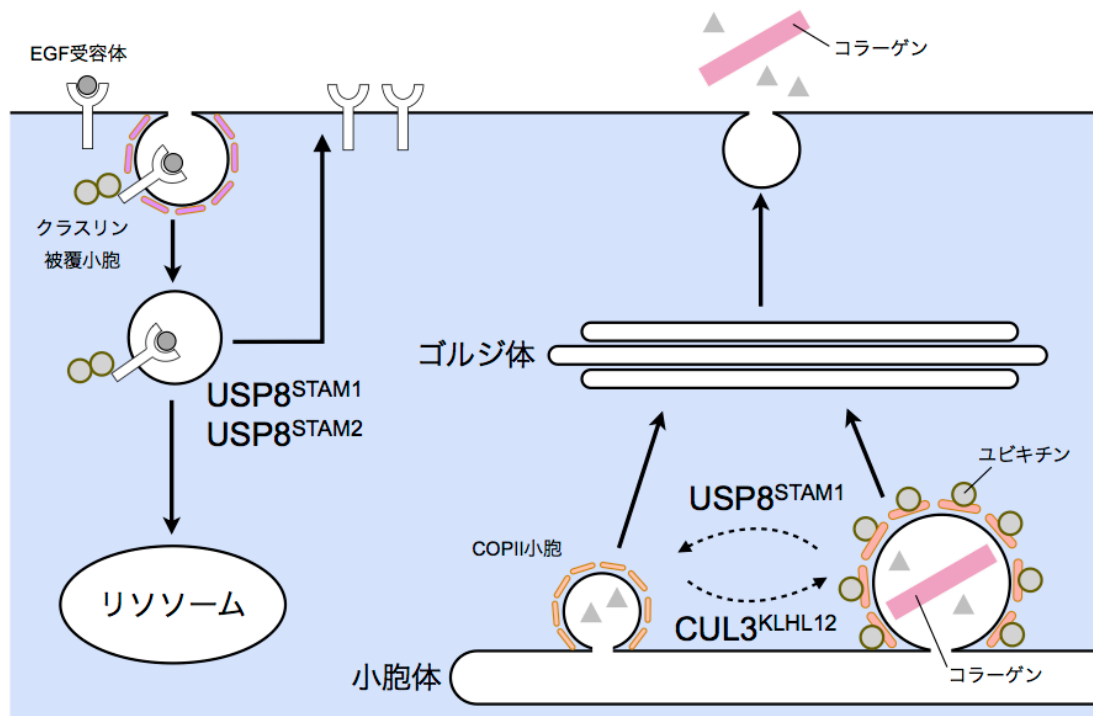


Fig. 3-8 USP8 によるエンドサイトーシスおよびタンパク質分泌経路の制御

USP8 はこれまで EGF 受容体などの細胞膜タンパク質の脱ユビキチン化により、これらのリソソーム分解を抑制することが知られていた。Cul3-KLHL12 による Sec31 のユビキチン化はコラーゲンなどの大きな積み荷を輸送することのできる大きな COPII 小胞の形成に必要であるが、本研究では USP8 が Cul3-KLHL12 と拮抗することで COPII 小胞の大きさを負に抑制することが明らかになった。これにより USP8 はコラーゲンの分泌を負に制御していると考えられる。USP8 は STAM1 と STAM2 を介して EGF 受容体を基質として認識するが、Sec31 の基質認識には STAM1 ののみが使われていた。このような違いはエンドサイトーシスとタンパク質分泌ということとなる機能を制御する上で役立っている可能性がある。

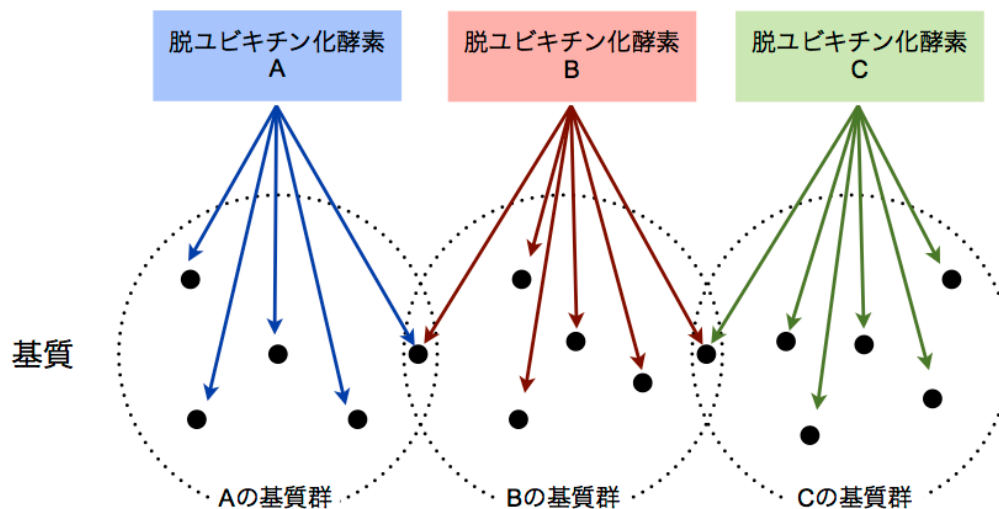


Fig. 3-8 脱ユビキチン化酵素の多様かつ分子種特異的な基質認識機構

脱ユビキチン化酵素はヒトのゲノムにおよそ 90 種類存在するが、ユビキチンリガーゼはおよそ 500-1000 種類存在しているとされ、ユビキチンリガーゼの種類に対して、脱ユビキチン化酵素の種類は圧倒的に少ないといえる。一方、これまでに、培養細胞およびゼブラフィッシュやマウスなどのモデル動物における脱ユビキチン化酵素のノックダウン/ノックアウトの実験が行われ、単独の脱ユビキチン化酵素の欠損により細胞生存や胚発生に重篤な影響が出るケースが多数報告されており、ほとんどの脱ユビキチン化酵素は他の脱ユビキチン化酵素では補償できない分子種特異的な機能をもつことがわかっている。これらのことから、1つの脱ユビキチン化酵素は複数のタンパク質を基質として認識するものの、それぞれの基質群には棲み分けが存在していると考えられる。