

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	川口 紘平		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	駒田雅之	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor (sub)	加藤明	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

ユビキチン化修飾はタンパク質の運命や機能を制御し、様々な細胞内イベントを制御する翻訳後修飾である。ユビキチンは 7 つのリジンと N 末端メチオニンを介して 8 種類の連結パターン(連結型とよぶ)のユビキチン鎖を作り、それぞれが異なる機能を発揮する。また、ユビキチン化修飾は可逆的な翻訳後修飾であり、脱ユビキチン化酵素は基質タンパク質からユビキチン化修飾を取り外すことで、そのユビキチン化修飾によって引き起こされる細胞内イベントを停止させる役割をもつ。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。本研究は 2 つの脱ユビキチン化酵素 USP25 と USP8 について解析を行った。

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・モチーフの性質が重要であることがわかっている。USP25 には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するドメイン・モチーフである UBA (ubiquitin-associated) ドメインと 2 つの UIM (ubiquitin-interacting motif) が隣り合って存在している。これらのドメイン・モチーフの意義を解析するため、UBA と UIM を不活性化させた変異体を作製し解析を行った。共免疫沈降実験や GST ブルダウン実験などから、USP25 は 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選択的に結合することが明らかになった。精製ポリユビキチン鎖を用いた *in vitro* の脱ユビキチン化実験から、USP25 は Lys63 連結型よりも Lys48 連結型ポリユビキチン鎖に高いイソペプチダーゼ活性を持つことを見出した。さらに、USP25 の UIM の性質を Lys63 連結型に選択的に結合するよう改変したところ、Lys63 連結型ポリユビキチン鎖に選択的な酵素活性をもつようになったため、UIM 領域のユビキチン鎖結合選択性が、USP25 による Lys48 連結型ユビキチン鎖の効率的分解を可能にしていることが明らかとなった。

これまで 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。

細胞外マトリックスやホルモンなどの分泌タンパク質は小胞体でリソソームにより合成された後、ゴルジ体を經由する分泌経路を介して輸送される。小胞体中の分泌タンパク質は COPII コートタンパク質によって小胞体から出芽する小胞に取り込まれて輸送される。コラーゲンは細胞外マトリックスを構成する 300-400 nm の棒状の巨大タンパク質である。コラーゲンの分泌には COPII コートの Sec31 タンパク質のモノユビキチン化による巨大 COPII 小胞の形成が必要であるが、Sec31 の脱ユビキチン化酵素の重要性は解明されていない。

USP8 はエンドソーム上の EGF 受容体を脱ユビキチン化することが知られていたが、USP8 はエンドソームだけでなく細胞質全体に局在しており、ミトコンドリア上の Parkin を脱ユビキチン化することなども知られていたため、エンドソーム以外でも重要な働きをしているのではないかと考えた。そこで、USP8 の新規基質タンパク質を同定するために、USP8 の基質認識に重要な STAM1 の結合タンパク質を調べたところ、COPII コートタンパク質 Sec31A が STAM1 と結合することがわかった。USP8 と STAM1 の機能抑制/過剰発現実験から、USP8 は STAM1 を介して Sec31A を基質として認識し、脱ユビキチン化することが明らかになった。興味深いことに、STAM1 は EGF 受容体を N 末端領域を介してユビキチン化に依存して結合するが、Sec31A とは C 末端領域を介してユビキチン化に依存せずに結合していた。また、USP8 による EGF 受容体の基質認識には STAM1/2 が共に使われるものの、Sec31A の基質認識には STAM1 のみが使われていた。

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 は阻害した。さらに、USP8 はコラーゲンの ER からゴルジ体への輸送を抑制した。これらの結果から、USP8 は EGF 受容体を認識する時とは異なるユニークな分子機構によって Sec31A を基質として認識し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荷タンパク質の細胞外への分泌を抑制するという全く新しい機能を持つと結論した。

脱ユビキチン化酵素は 1) 分子内ドメインや相互作用タンパク質を介した基質タンパク質とそこに付加されたユビキチン鎖の複合的な認識、2) 相互作用タンパク質の使い分け、などのメカニズムによって基質を見分け、これにより多様であり、かつ分子種特異的な基質認識機構を獲得していると考えられる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名 : Student's Name	川口紘平		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	駒田雅之	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	加藤明	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Ubiquitination is a reversible post-transcriptional modification that regulates various cellular events. Deubiquitinating enzyme cancels these events by removing the ubiquitin modification of substrate proteins. This study focuses on two deubiquitinases, belong to ubiquitin-specific protease (USP) family, USP25 and USP8.

USP25 harbors two ubiquitin-interacting motifs (UIMs), a ~20-amino-acid α -helical stretch that binds to ubiquitin. However, the role of the UIMs in USP25 remains unclear. This study shows that the UIM region binds to Lys48-, but not Lys63-, linked ubiquitin chains, where the two UIMs played a critical and cooperative role. USP25 exhibited higher ubiquitin isopeptidase activity to Lys48-, than to Lys63-, linked ubiquitin chains. Moreover, when mutations that convert the binding preference from Lys48- to Lys63-linked ubiquitin chains were introduced into the UIM region, the USP25 mutants acquired elevated and reduced isopeptidase activity toward Lys63- and Lys48-linked ubiquitin chains, respectively. These results suggested that the binding preference of the UIMs toward Lys48-linked ubiquitin chains contributes to the ubiquitin chain substrate preference of USP25.

USP8 is implicated in the regulation of EGFR. However, the function of USP8 has not been fully elucidated. To identify novel substrates of USP8, mass-spectrometric analysis of proteins binding to STAM1 through which USP8 recognizes substrates was performed. This analysis identified that STAM1 binds to a Sec31A, COPII coat protein. Although EGFR binds to the N-terminal domain of STAM1/2 in an ubiquitination-dependent manner, Sec31A bound to the C-terminal domain of STAM1 in an ubiquitination-independent manner. USP8 bound to Sec31A through STAM1. Overexpression of STAM1 and USP8 decreased the amount of ubiquitinated Sec31A. USP8 knockdown increased the amount of ubiquitinated Sec31A. USP8 knockdown increased the amount of secreted collagen IV. Taken together, we conclude that USP8 suppresses collagen secretion by deubiquitinating Sec31.

These two studies provide the new insight into the mechanisms of substrate recognition by deubiquitinases.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).