

博士論文

脱ユビキチン化酵素 USP7 による  
インスリン受容体基質 IRS の  
ユビキチン化制御機構の解明

吉原 英人

# 目次

要旨	・ ・ ・ 1
序章	・ ・ ・ 5
材料と方法	・ ・ ・ 18
第1章 緒言	・ ・ ・ 39
結果	・ ・ ・ 40
考察	・ ・ ・ 43
図表	・ ・ ・ 46
第2章 緒言	・ ・ ・ 54
結果	・ ・ ・ 57
考察	・ ・ ・ 61
図表	・ ・ ・ 65
第3章 緒言	・ ・ ・ 77
結果	・ ・ ・ 79
考察	・ ・ ・ 83
図表	・ ・ ・ 88
第4章 緒言	・ ・ ・ 98
結果	・ ・ ・ 101
考察	・ ・ ・ 105
図表	・ ・ ・ 108
総合討論	・ ・ ・ 118
参考文献	・ ・ ・ 128
謝辞	・ ・ ・ 135



## 要旨

インスリンとインスリン様成長因子 (IGF) は構造が類似したペプチドホルモンで、インスリンは糖をはじめとした物質代謝の恒常性維持などに、IGF は正常な発生や成長、老化などに重要な役割を担っている。一般にインスリン/IGF が細胞膜上に存在するそれぞれの受容体に結合すると、受容体チロシンキナーゼが活性化し、インスリン受容体基質 (IRS) がチロシンリン酸化される。これを引き金として phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路などの下流シグナル経路が活性化、インスリン/IGF の生理活性が発現する。これまで、生体のおかれた生理・栄養状態に応答して、標的細胞でのインスリン/IGF の細胞内シグナル・生理活性が修飾・調節されることが明らかにされており、この機構を介して生体の恒常性維持が可能となっている。一方、この制御が破綻しシグナルが長期にわたって抑制されると糖尿病や成長遅滞が、過剰に増強されると過成長や癌化など種々の疾病が発症する。したがって、これらの分子機構を明らかにすることは臨床の視点からも急務である。

これまで我々は、インスリン/IGF の細胞内シグナル・生理活性の修飾・調節機構を解析する過程で、IRS が他のタンパク質と相互作用して巨大なシグナル複合体を形成し、これにより IRS を介した細胞内シグナル・生理活性が修飾・調節されることを見出した。この複合体に含まれるタンパク質の網羅的解析を進めたところ、複数の脱ユビキチン化酵素が同定された。これまで、IRS が複数のユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) よってユビキチン化されるとプロテアソームで分解され、インスリン/IGF 応答性が低下することが報告されているが、IRS の脱ユビキチン化制御については全く解析が行われていない。そこで私は、同定された脱ユビキチン化酵素の中で IRS と特に強い相互作用が観察された USP7 に着目し、USP7 が IRS のユビキチン化、インスリン/IGF 応答性の調節に果たす役割の解明を目的として研究に着手した。

### 第一章 USP7 と IRS の相互作用の解析

まずヒト乳癌細胞 MCF-7 に USP7 を発現させ、共免疫沈降法により IRS の 2 つの分子種である IRS-1/2 との相互作用を検討した。その結果、IRS-2 とのみ相互作用が

検出された。また、ラット肝癌細胞 H4-IIE において、内在性の IRS-1/2 と USP7 との相互作用を共免疫沈降法で調べたところ、IRS-2 との相互作用が強く観察され、これらの結果から、USP7 は IRS-2 と高い親和性で相互作用すると考えられた。

次に、USP7 と IRS-2 複合体の細胞内局在を検討した。H4-IIE 細胞を定法どおり遠心分離法で細胞分画後、抗 IRS-2 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、USP7 と IRS-2 の複合体は細胞質に存在することがわかった。更に、IRS-2 に対する USP7 をプローブとした Far-Western blotting により、USP7 と IRS-2 が直接相互作用することが示された。種々の領域を欠失した USP7 変異体と IRS-2 変異体を用いた pull-down assay の結果も併せると、細胞質画分において、一分子の IRS-2 の種々の領域に、USP7 分子が複数相互作用していると考えられた。

## **第二章 USP7 が IRS-2 のユビキチン化および量に及ぼす影響の解析**

次に、USP7 が IRS-2 のユビキチン化に及ぼす影響を調べた。USP7 優性阻害変異体を過剰発現した HEK293T 細胞の IRS-2 のユビキチン化リジン残基を MS により解析した結果、80、811、1106、1134 番目のリジン残基のユビキチン化が対照細胞に比べて増加していた。更に、ユビキチン化 IRS-2 に含まれるユビキチン単体の量およびユビキチン同士の結合量を MS により定量したところ、対照細胞に比べてユビキチン同士の結合量は変化しないのに対して、ユビキチン単体の量は増加していた。これらの結果から、USP7 は IRS-2 のマルチプルモノユビキチン化を脱離させる活性を有することがわかった。

ユビキチン化された IRS は一般にプロテアソームを介して分解されることが知られている。そこで USP7 が IRS-2 の分解に及ぼす影響を解析した。USP7 を HEK293 細胞に過剰発現したところ、対照細胞に比べて IRS-2 量が増加したのに対し、RNAi 法によって内在性の USP7 を発現抑制した H4-IIE 細胞では、IRS-2 量が減少した。更に、USP7 優性阻害変異体を過剰発現した HEK293 細胞では、IRS-2 量の減少が観察された。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 の処理によりこの減少は抑制され、ユビキチン化 IRS-2 の蓄積が認められた。これらの結果を併せ、USP7 は IRS-2 を脱ユビキチン化し、IRS-2 のユビキチン-プロテアソーム系による分解を抑制していると結論した。

## **第三章 USP7 と IRS-2 の相互作用制御機構の解析**

次に、IRS-2 と USP7 の相互作用を変動させる細胞外因子を探索した。その結果、H4-IIE 細胞をインスリンで、あるいは MCF-7 細胞を IGF-I で短時間処理した際に、IRS-2 から USP7 が解離し、その後 IRS-2 が分解されることが明らかとなった。この

機構を介して、インスリン/IGF 刺激に応答して IRS-2 がユビキチン-プロテアソーム系により分解され、インスリン様シグナルが減弱する、いわゆる脱感作が起こることがわかった。

続いて、インスリン/IGF 刺激に応答して USP7 が IRS-2 から解離する機構を検討した。まず、大腸菌から精製した USP7 を用いて、インスリンで処理した H4-IIE 細胞の抽出液の pull-down assay を行った。その結果、インスリン刺激した細胞では IRS-2 との相互作用の減少が観察され、インスリン刺激依存的な IRS-2 の修飾が相互作用の減少に必要であることが示唆された。そこで、まず、IRS-2 のリン酸化に着目し、インスリン処理した H4-IIE 細胞の細胞抽出液中の IRS-2 を cell-free 系で CIAP により脱リン酸化し、これと USP7 の相互作用を解析した。その結果、IRS-2 の脱リン酸化により USP7 との相互作用減少の回復が認められた。一方、cell-free 系でインスリン受容体チロシンキナーゼによりリン酸化した IRS-2 と USP7 の相互作用は変化しなかった。次に、IRS 下流でインスリン/IGF 刺激に応答して活性化される PI3K の阻害剤存在下で H4-IIE 細胞をインスリン処理し、細胞抽出液中の IRS-2 と USP7 の相互作用を調べた。その結果、インスリン刺激依存的な IRS-2 と USP7 の相互作用の減少が回復した。IRS は PI3K 経路の活性化に応答したフィードバック機構によりセリン/スレオニンリン酸化されることを併せると、IRS-2 からの USP7 の解離には、インスリン/IGF 刺激に応答した PI3K 経路の活性化を介した IRS-2 のセリン/スレオニンリン酸化が重要と結論した。

#### **第四章 IGF 刺激に応答して変動するユビキチン化タンパク質の網羅的解析**

ここまでの結果から、インスリン様シグナル伝達経路の活性化により IRS のユビキチン化状態が変動することが明らかとなった。既にインスリン様シグナルを伝達する分子の多くはインスリン/IGF 処理により量変動が起こることも知られている。これらは、インスリン/IGF 刺激に応答して、IRS 以外のタンパク質のユビキチン化状態も変動する可能性を示している。そこで、IGF 刺激に応答して変動するユビキチン化タンパク質の網羅的解析を行った。IGF-I および MG132 で処理した MCF-7 細胞の抽出液から、Tandem Ubiquitin Binding Entity (TUBE) を用いた pull-down によりユビキチン化タンパク質を精製し、トリプシンで消化した。続いて、タンパク質をトリプシン消化した際に生成する、リジン残基にグリシン残基が2つ付加された特徴的な配列を認識する抗体、抗 diGly 抗体で消化物を免疫沈降した。沈降物を MS により分析した結果、約 700 種類のユビキチン化ペプチドが同定された。また、MG132 存在下において、IGF 刺激に応答して 125 種類のユビキチン化ペプチドの量が増加していた。こ

の中には、刺激に応答してユビキチン化、分解されることが知られている既知の分子以外に、転写阻害因子などをはじめとした 31 種類の新規タンパク質が含まれていた。これらの結果は、インスリン/IGF 刺激に応答して種々の分子のユビキチン化状態が変動し、少なくともその一部の量変動に関わっている可能性を示している。

本研究から私は、「基底状態では USP7 は IRS-2 と相互作用し、IRS-2 を脱ユビキチン化、分解を抑制している。一方、インスリン/IGF 刺激された細胞では、USP7 が IRS-2 から解離し、その結果、IRS-2 の分解が誘導され、インスリン様シグナルが減弱する」という脱感作の新しい機構が稼働していることを発見した。この研究成果は、IRS の量制御の研究領域で主流であった E3 リガーゼによるユビキチン化だけでなく、脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン化もインスリン/IGF の応答性の調節に重要な役割を果たしていることを初めて示した点で学術的意義が大きい。また、インスリン様シグナルを仲介する他の分子のユビキチン化制御も明らかにすることができた。今後、今回開発したユビキチン化修飾の新しい解析法を駆使してインスリン様シグナル伝達に関わる分子のユビキチン化制御の意義を総合的に検討していきたいと考えている。これらの研究成果は、新しいインスリン/IGF 応答性の調節機構の解明、ひいてはインスリン様シグナル伝達の異常が原因となる種々の疾病の治療法の開発に発展するものと期待している。

## 序章

### 序

生体内のすべてのタンパク質は、不断の合成と分解を繰り返しており、これらの速度が生体内外の刺激に応答して調節されることにより、生体が置かれた状況に応じたそれぞれのタンパク質の量調節が可能となっている。この仕組みは、生命維持に必須であることは言うまでもない。これまで、タンパク質の合成機構は、多くの研究者によって長年研究が精力的に続けられ、詳細なメカニズムが明らかにされている。これに対して、タンパク質の分解機構に関する研究は、1950年代にATP依存的なタンパク質分解という非リソゾーム経路の存在を示唆する発表がなされたが、長く日の目を見ることはなかった。その25年以上後、*in vitro*においてエネルギー依存的なタンパク質分解が再現され、にわかはこの現象が注目されるようになった。しかし、この現象に関わる酵素の発見は困難をきわめ、その15年後にやっとユビキチンとプロテアソームが発見され、これによりユビキチン-プロテアソーム系という新しいタンパク質分解系の分子機構の概要が明らかとなったと言える。また、もう一つの主要なタンパク質分解機構と考えられているオートファジーは、1960年代にはその存在が示されていたものの、オートファジーが細胞内において十数分でおこる一過的な現象であることから、生化学・分子生物学のアプローチが難しく、研究は停滞していた。しかし、近年になりその分子機構に関わる分子が発見されたことを契機に、分子生物学的アプローチが可能となり、分子機構の解明が進められてきている。このようにタンパク質分解系の分子機構が明らかとなったことから、個々のタンパク質が分解される分子機構の解明が進められているが、未だ不明な部分が多い。

これらの分子機構が解明されていく過程で、このタンパク質分解システムが細胞周期、アポトーシス、シグナル伝達、転写制御、免疫応答、タンパク質の品質管理など多様な生理現象に深く関わっていることが次々と明らかとなってきた。このようなタンパク質分解機構に関わる現象の全体像の解明を目指したプロテオーム解析は多くの研究者が試みてきたが、ほとんど成功していない。これは、タンパク質はDNAのように増幅して解析するこ



とができず、またタンパク質を構成する因子は、20種類という多数のアミノ酸であることから、プロテオーム解析では微量解析が難しかったためである。近年、ノーベル賞を受賞した田中耕一氏らの発明などで、微量解析の技術が飛躍的にあがったが、いまだ、スタンダードな方法は編み出されておらず、様々な解析法が検討されている段階である。そこで、今回、私は、次世代の質量分析計を用いてユビキチン化タンパク質を解析する新しい手法を開発することにした。

一方、我々が研究を進めているインスリン／インスリン様成長因子 (insulin-like growth factors: IGF) の生理活性発現に必須なタンパク質、インスリン受容体基質 (insulin receptor substrate: IRS) についても、最近になり、インスリン自身あるいは他のホルモンや成長因子の刺激によって、IRS がユビキチン化されプロテアソームに分解されることでインスリンシグナルを減弱させることが明らかとなってきた。我々は IRS を介したシグナル伝達機構を明らかにする過程で、IRS が他のタンパク質と相互作用して巨大なシグナル複合体を形成しており、IRS と複合体を形成するタンパク質 (インスリン受容体基質結合タンパク質、IRS-associated protein; IRSAP) の中に、タンパク質のユビキチン化を促進するユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) とともに、ユビキチンを解離させる脱ユビキチン化酵素が存在することを見出した。

E3 リガーゼに関してはすでに複数の E3 リガーゼが IRS と相互作用し、IRS をユビキチン化、分解を誘導するとの報告がある。これに対し、脱ユビキチン化酵素に関する研究は大きく遅れている。そこで私は、今回開発したユビキチン化タンパク質の解析法を用いて、脱ユビキチン化酵素が IRS 量の制御およびインスリン／IGF 応答性の調節に果たす役割の解明を目的に研究に着手した。

まず、序論では、インスリン／IGF、IRS、インスリン受容体基質結合タンパク質、タンパク質のユビキチン化、質量分析を用いたタンパク質解析について概説し、本研究の目的および本論文の構成を述べる。

## 第一節 インスリン／IGF

### 1. インスリン／IGF の生理活性

インスリンは血糖値の上昇を認識して膵臓のランゲルハンス島β細胞から分泌され、エンドクリン様式で全身の標的細胞で作用を発揮する。インスリンは、細胞レベルでは、肝臓における糖新生の抑制、骨格筋や脂肪におけるグルコース取り込みを促進し、個体レベルでは、インスリンは糖の恒常性維持に重要な役割を果たしている (Cheatham and Kahn,

1995)。一方、IGFにはIGF-IとIGF-IIの2つの分子種が存在し、多くの組織で産生され、オートクリン様式もしくはパラクリン様式で活性を発揮する。IGFの受容体が発現していない肝臓で産生され分泌されるIGFは、血中を運ばれ標的細胞で活性を発現するエンドクリン様式で全身にも作用していると考えられている(Daughaday and Rotwein, 1989; Rinderknecht and Humbel, 1976)。IGF-Iの産生は、成長ホルモン(GH)、インスリン、そしてバランスのとれた栄養供給によって増加し、IGF-IIの産生は組織の発達に応じて制御されていると考えられている。IGFは、細胞レベルでは、細胞の増殖や分化の誘導、細胞死の抑制、細胞遊走の促進、タンパク質同化を促進し異化を抑制するなど広範な生理活性を発現しており(Jones and Clemmons, 1995)、個体レベルでは、IGFは正常な発生や成長、代謝維持に重要な役割を担っている(Liu and LeRoith, 1999)。

## 2. インスリン/IGFの細胞内情報伝達機構

一般にインスリン/IGFは以下のような細胞内シグナル伝達経路を介して生理活性を発現していると考えられている(Fig. 0-1)(Butler *et al.*, 1998)。まず、インスリン/IGFが、細胞膜に存在するそれぞれの受容体に結合すると、受容体に内蔵されているチロシンキナーゼが活性化して、自身を自己リン酸化し、更にチロシンキナーゼ活性が上昇する。自己リン酸化した受容体を認識して phosphotyrosine binding (PTB) ドメインを有するチロシンキナーゼの基質、例えば、IRSやSrc homologous and collagen (Shc)などが、受容体と相互作用し、キナーゼによりチロシンリン酸化される。このリン酸化チロシン残基を含むモチーフに Src homology (SH) 2 ドメインを有するアダプター分子、例えば、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の p85 制御サブユニット (p85) や growth factor receptor-bound protein (Grb) 2 などが結合する。PI3Kは p85 と p110 触媒サブユニット (p110) が結合したもので構成されており、チロシンリン酸化された IRS に p85 が結合することによって p110 の触媒機能が活性化される。活性化された PI3K は、膜の phosphatidylinositol (PI) をリン酸化し、それをセカンドメッセンジャーとして 3-phosphoinositide-dependent protein kinase (PKC) が活性化、さらに下流の Akt などの活性化が誘導される。インスリン/IGF によって活性化された PI3K 経路は、glucose transporter (GLUT) 4 の膜移行やグリコーゲン合成、脂質合成、タンパク合成、DNA 合成、アポトーシスの制御などを仲介している(Saltiel and Kahn, 2001)。また、Grb2 は、チロシンリン酸化された IRS と結合することによって、低分子量 G タンパク質である Ras を活性化する。活性化 Ras は Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK)、MAPKK (MEK1/2)、MAPK (Erk1/2)、からなる MAPK 経路の活性化を促す。MAPK 経路は、主に、転写の制御を介した増殖誘導に関与していると考えられている(Myers *et al.*,

1994)。

### 3. インスリン様シグナルと他のシグナルのクロストーク

これらのインスリン様シグナルは、他の細胞外因子の刺激によって、シグナルが変動し、生理活性が変化することがよく知られている。例えば、インスリンのシグナルは、種々のサイトカインや GH などによって抑制され、インスリン活性が抑制される、いわゆる「インスリン抵抗性」が起こることが数多く報告されている(Hotamisligil *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 2001)。また、IGF は単独で生理活性が弱いにもかかわらず、他の成長因子・ホルモン、特にトロピックホルモンの存在下でその生理活性が増強されることが知られている。しかし、このクロストークの詳しい分子機構の解明は、現在鋭意進められている(Clemmons *et al.*, 1999; Stiles *et al.*, 1979)。

## 第二節 インスリン受容体基質

IRS は、インスリン受容体キナーゼや IGF-I 受容体キナーゼによってチロシンリン酸化されるタンパク質で、現在、IRS-1、IRS-2、IRS-3、IRS-4 の 4 種類の分子種の存在が報告されている(Cheatham and Kahn, 1995)。IRS ファミリータンパク質は、どの分子種も N 末端側に相同性の高い pleckstrin homology (PH) ドメインと PTB ドメインを有しているが、C 末端側のアミノ酸配列の相同性が低い。これらの分子種のうち IRS-1、IRS-2 が、インスリンの生理活性発現に重要と考えられているため(White, 2002)、本研究ではこの 2 つの分子種に注目した。IRS-1 や IRS-2 の C 末端領域にはリン酸化をうける可能性のあるチロシン残基が多数あり、これらの一部は SH2 ドメインと相互作用するモチーフである。IRS-1/2 は C 末端領域の構造が異なり、IRS-2 にのみ kinase regulatory loop binding (KRLB) domain と呼ばれるインスリン受容体と結合する domain が存在することから(Sawka-Verhelle *et al.*, 1996)、異なった機能を有していると考えられている。実際、IRS-1/2 のそれぞれのノックアウトマウスは異なる表現型を示すことがわかっている(Araki *et al.*, 1994; Withers *et al.*, 1998)。しかし、これら domain 構造などの違いがどのような分子機構を介して異なる機能を発現するのかは未だ明らかとされていない。

これまで、IRS は様々な細胞外因子の刺激により、セリン/スレオニンリン酸化修飾、ユビキチン化修飾、アセチル化修飾、メチル化修飾など様々な分子内修飾が起こる(Iwasaki and Yada, 2007; Kaiser and James, 2004; Lee *et al.*, 2000; Zick, 2003)、あるいは細胞内での局在の変化が、特定の生理活性発現、その調節に重要であることなどが報告されている(Clark *et al.*, 1998; Yoneyama *et al.*)。また、IRS の量は、インスリン/IGF 自身や、他の

細胞外因子の刺激により変動することが知られており、分解されるべき時に分解されないとシグナルの過剰な亢進やそれに伴い過増殖やがん化誘導が起こることも明らかにされている(Manning *et al.*, 2005)。また、分解されるべきでない場合に分解されるとシグナルの減弱とそれに伴うインスリン/IGF 抵抗性を引き起こすことが知られており(Lee *et al.*, 2000; Nakao *et al.*, 2009; Rui *et al.*, 2002)、その量の調節は緻密に制御される必要があると考えられるが、その量制御の詳細な分子機構は未だに不明な現状である。

### 第三節 インスリン受容体基質結合タンパク質

我々の研究グループでは、インスリン様シグナルの修飾機構における IRS の生理的意義の解明を進めてきたが、その過程で、IRS がチロシンリン酸化を介さずに様々なタンパク質 IRSAP と相互作用し、巨大な複合体 (IRSome と命名) を形成していることを発見した (Fukushima *et al.*, 2011)。更に、IRS と相互作用するタンパク質 IRSAP を酵母 two-hybrid スクリーニングや IRS との共免疫沈降物の質量分析などで探索したところ、40 種類以上のタンパク質が同定された。これらを予測される機能ごとに分類すると、シグナルを仲介するタンパク質、シグナルを増強あるいは減弱させるタンパク質、活性発現に関与するタンパク質、IRS の細胞内局在を制御するタンパク質、IRS の量を制御するタンパク質に大別された。IRS の量を制御する機能を有すると予測されるタンパク質として、複数の脱ユビキチン化酵素が同定された (Table. 0-1)。これまで、IRS の量制御に関しては、細胞外因子による刺激に応答して Cul7 複合体や Mdm2、SOCS 複合体などの E3 リガーゼが相互作用し、IRS がユビキチン化、プロテアソームに分解され、それに伴ってインスリンシグナルやインスリン様活性が減弱すると考えられてきた (Fig. 0-1) (Lee *et al.*, 2000; Rui *et al.*, 2002; Usui *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008)。しかし、これまで IRS が脱ユビキチン化される、言い換えれば、IRS の量制御に脱ユビキチン化酵素が重要であるという報告は全くない。

#### IRSAP として同定された脱ユビキチン化酵素の機能

今回 IRSAP として同定された USP7 は、転写因子 Forkhead box O (FOXO) 4 や脱リン酸化酵素 phosphatase and tensin homologue (PTEN) などのモノユビキチンをはずし核局在を制御する、あるいはがん抑制遺伝子 p53 や E3 リガーゼ Mdm2 のポリユビキチンを解離し分解を抑制するなどの報告があり、最も研究が進んでいる (Cummins and Vogelstein, 2004; Li *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2008; van der Horst *et al.*, 2006)。

一方、USP9X は、TGF $\beta$ シグナルに重要な Smad4 のモノユビキチンを解離させ、活性を制御することや、ストレス応答のシグナル伝達制御に関わる Apoptosis

Signal-regulating Kinase (ASK) 1 を脱ユビキチン化することで分解を抑制することが報告されている(Dupont *et al.*, 2009; Nagai *et al.*, 2009)。

更に、USP25 はスプライシングにより 3 つのアイソフォームを産生し、一番長いアイソフォームは筋組織特異的に発現している、そして、myosin binding protein C1 (MyBPC1) を脱ユビキチン化し、分解を抑制することが知られている(Bosch-Comas *et al.*, 2006; Valero *et al.*, 2001)。

USP33 は甲状腺ホルモンの T4 を T3 へと活性化する type 2 iodothyronine deiodinase (D2) を脱ユビキチン化することで活性化させることが報告されている(Curcio-Morelli *et al.*, 2003)。

また、USP34 は axin を脱ユビキチン化し、分解を抑制することで、Wnt シグナルを制御していることが報告されている(Lui *et al.*, 2011)。

しかし、これらの脱ユビキチン化酵素が IRS と相互作用する、あるいは IRS の脱ユビキチン化に寄与するという報告は全くない。

## 第四節 タンパク質のユビキチン化

### 1. ユビキチン-プロテアソーム系分解

ユビキチンは 真核生物において高度に保存されたタンパク質である。ユビキチンがタンパク質に付加されることをユビキチン化と呼び、リン酸化やアセチル化と同様、タンパク質の翻訳後修飾のひとつである。典型的なユビキチン化反応では、ユビキチンの C 末端と標的タンパク質内のリジン残基の間でアミド結合が形成され、更に結合したユビキチン内のリジン残基に別のユビキチンが結合していくことでユビキチン鎖が形成される。このポリユビキチン化が起こると、ユビキチン鎖を特異的に認識するプロテアソームと呼ばれる分解酵素複合体により、ポリユビキチン化されたタンパク質が特異的に分解される(Hershko and Ciechanover, 1998)。

### 2. ユビキチン化付加反応

一般に、ユビキチンはユビキチン活性化酵素 (E1) と ATP によって活性化され、この活性化ユビキチンがユビキチン結合酵素 (E2) に転移する。さらに、ユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) によって認識された標的タンパク質にユビキチンの C 末端にあるカルボキシル基と対象タンパク質のリジン残基にあるアミド基とが結合、タンパク質にユビキチンが結合すると考えられている。続いて、結合したユビキチン内のリジン残基に別のユビキチンの C 末端が結合していくことでユビキチン鎖ができる(Smalle and Vierstra, 2004)。現在、

ヒトでは 1,000 種類以上の E3 リガーゼが存在することが分かっており、これらを介して標的タンパク質の分解等を特異的に制御することが可能となっていると考えられている。

### 3. 脱ユビキチン化反応

標的タンパク質に付加されたユビキチンをすべて、あるいは部分的に除去することで、E3 リガーゼと拮抗的に働く活性をもつ脱ユビキチン化酵素も存在することが、最近明らかになってきた (Fig. 0-2)。現在、脱ユビキチン化酵素は酵母において 17 種類、ヒトにおいては 100 種類近く発見されている。これらの脱ユビキチン化酵素は触媒領域の相同性から ubiquitin specific proteases (USP)、ubiquitin C-terminal hydrolases (UCH)、otubain proteases (OUT)、Machado–Joseph disease proteases (MJD)、JAMM の 5 つのファミリーに大別される (Amerik and Hochstrasser, 2004; Nijman *et al.*, 2005)。これらのうち JAMM ファミリー以外はすべてシステインプロテアーゼであり、システインもしくはヒスチジン、アスパラギン、アスパラギン酸を活性中心としている。一方 JAMM ファミリーは  $Zn^{2+}$  依存性のメタロプロテアーゼである。これら脱ユビキチン化の活性領域は保存されているが、それ以外の領域における共通性はほとんどない (Amerik and Hochstrasser, 2004)。今回 IRSAP として同定された脱ユビキチン化酵素はすべて USP ファミリーに属している。USP ファミリーは活性領域以外の共通性はほぼないことから、規則性がある可能性は低く、これまでに同定されていないが、USP ファミリー以外の脱ユビキチン化酵素が IRS と相互作用する可能性もある。

### 4. ユビキチンの結合様式と発揮される機能

近年、ユビキチン化はユビキチン鎖ができるポリユビキチン化以外にも、ユビキチンが 1 つだけ結合するモノユビキチン化や標的タンパク質の複数の部位がモノユビキチン化されるマルチプルユビキチン化などもあり、これらのユビキチン化はエンドサイトーシスの誘導や局在の制御、あるいはタンパク質の機能修飾などタンパク質分解誘導と異なる様々な生理的意義があることが明らかになりつつある (Chen and De Camilli, 2005; Hicke, 2001)。一方、ポリユビキチン化に関しても、プロテアソームによる分解を誘導するユビキチン鎖はユビキチン内の 48 番目のリジン (K48) を介したユビキチン鎖であり、63 番目のリジンなど K48 以外のリジンを介したユビキチン鎖は異なる機能を発揮することがわかってきている (Fig. 0-2) (Clague and Urbe, 2006; Pickart, 2004; Spence *et al.*, 1995)。この他にも、付加される基質のリジン残基やユビキチン鎖の長さなどによって、付加されたユビキチンの機能が異なると考えられているが、付加されるユビキチンの様式の差異がどのような分子メカニズムを介して異なる機能を発揮するのかは未だ明らかにされていない。その

理由の一つとして、それらを解析する手法が確立されていないことが挙げられる。近年、技術の発達が著しく、今まで行えなかった解析が可能になってきている。今回は、最新の質量分析計を用いて、ユビキチン化タンパク質の解析法の確立を目指した。

## 第五節 質量分析計を用いたタンパク質の解析

質量分析計を用いた解析には、様々な目的がある。しかし、ほとんどの場合、サンプルを直接質量分析に供することはなく、サンプルを分離し、含まれるタンパク質やペプチドの種類を極力減らしてから質量分析に供するのが一般的である。これは、「イオンサプレッション」とよばれる、存在量が多いものやイオン化しやすいものにイオン化のエネルギーがとられてしまい、そのために存在量が少ないものやイオン化し難いものが検出されにくくなってしまうという質量分析の特性があるからである。サンプルの分離によく用いられる方法として、SDS-PAGE 後に目的のバンドを切り出す手法や、高速液体クロマトグラフィーを質量分析計に取り付けるいわゆる LC-MS と呼ばれる手法がある。また、質量分析の方法にも四重極 (Quadrupole: Q) 型やイオントラップ (Ion Trap: IT) 型、飛行時間 (Time-of-Flight: TOF) 型など様々あり、これらを複数つなげたタンデム質量分析 (MS/MS) が広く使われている。今回用いた質量分析計は、Q Exactive と呼ばれる LC-MS/MS で、Q 型と Orbitrap という非常に分解能が高い検出器から構成されている。Orbitrap は新しい原理に基づく IT 型質量分析計で、イオンを静電場により質量電荷比 ( $m/z$ ) に応じて異なる軌道でトラップし、その軌道の差異により、イオンの質量電荷比を計測する。これにより、従来よりも高感度、高精度、高分解能を実現しており、また、同時に複数のイオンの計測も可能である。

これまで質量分析計を用いた解析で多く行われてきたのは、LC-MS/MS によりタンパク質の混合物をそのまま網羅的に解析するショットガン・プロテオミクスである。この方法は当初タンパク質の同定が目的であり、定量的な情報は得ることができなかった。この欠点は、しばらく後、安定同位体による標識などにより解消されてきた。しかし、この定量情報は、あくまで同定結果に付随して取得されるものであるため、サンプル内の微量タンパク質を定量することは難しかった。そこで近年になって登場したのがターゲット・プロテオミクスである。これによく用いられる方法が、プレカーサーイオン (MS) を通すフィルターとプロダクトイオン (MS/MS) を検出する機器を組み合わせることで特定の物質を特異的に検出し、そのシグナル強度から定量を行う多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM) 法である。この方法はフィルターによる選択性により、ショットガン解析よりもはるかに複雑なサンプルから目的のペプチドを検出することが可能に

なる(Gupta *et al.*, 2009; Lange *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2008; Yang and Lazar, 2009)。また、今回用いた Q Exactive はこの方法をさらに進展させた Parallel reaction monitoring (PRM) 法を用いている。従来の MRM 法では、プロダクトイオンを 1 種類ずつ定量するのに対し、PRM 法では、プロダクトイオンの検出に Orbitrap を用いることで、全プロダクトイオンを同時に定量できるため、1 オーダー検出感度が上昇している(Doerr)。

今回、このような高性能の質量分析計を用い、ユビキチン化リジン残基の同定法、タンパク質に付加されたユビキチンの結合様式の解析法、ユビキチン化タンパク質の網羅的解析法を確立した。

## 第六節 本研究の目的と本論文の構成

以上の背景から、本研究では、IRSAP として同定された脱ユビキチン化酵素が IRS の量とインスリン/IGF 応答の制御に果たす役割の解明を目的とした。

### 第一章

まず、これまで yeast-two hybrid 法と共免疫沈降法で IRSAP として同定された脱ユビキチン化酵素が細胞内で IRS と相互作用しているかを検討した。検討した脱ユビキチン化酵素のうち、USP7 と IRS-2 との相互作用が強く検出されたため、USP7 と IRS-2 に焦点を絞り、USP7 と IRS-2 複合体の細胞内局在の解析、USP7 と IRS の相互作用領域の決定、IRS と USP7 が直接相互作用するかの検討を行った。

### 第二章

次に、脱ユビキチン化酵素である USP7 が IRS-2 のユビキチン化に及ぼす影響を解析した。まず、ユビキチン化リジン残基の同定法および基質に付加されたユビキチンの結合様式の解析法を開発した。これら解析法を使い、USP7 の優性阻害変異体を過剰発現した際の IRS-2 のユビキチン化リジン残基の同定および付加されたユビキチンの結合様式を解析した。USP7 が IRS-2 を脱ユビキチン化することが示されたため、次に、IRS-2 量の制御における USP7 の役割を解析した。まず、USP7 の過剰発現や発現抑制、優性阻害変異体の過剰発現が IRS-2 量に及ぼす影響を解析した。USP7 の優性阻害変異体の過剰発現により IRS-2 量が減少したことから、ユビキチン-プロテアソーム系分解の関与を検討した。



### 第三章

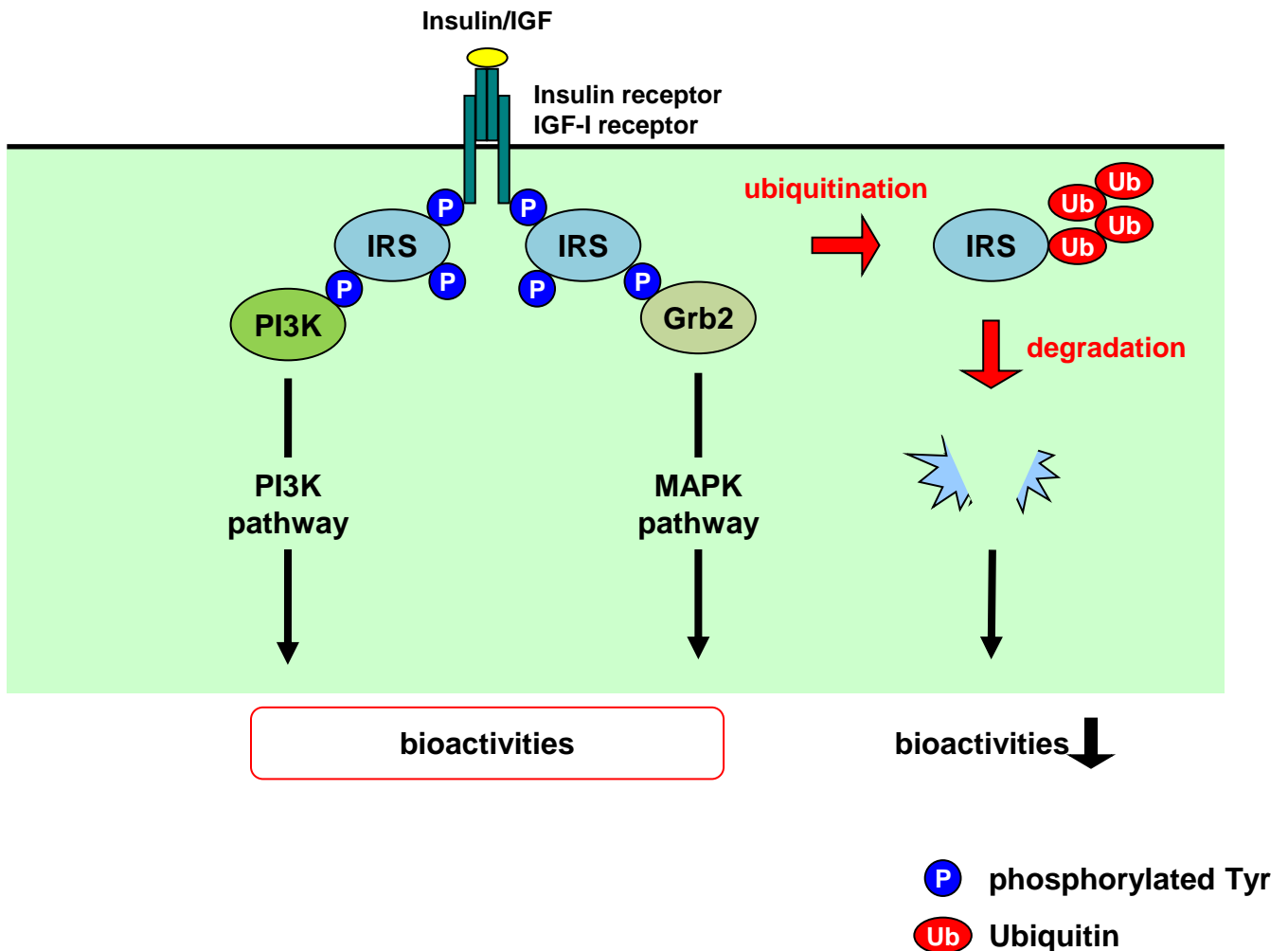
第二章より、USP7 が IRS-2 量の制御に関わることが示された。また、基質タンパク質に対する USP7 の脱ユビキチン化活性は、相互作用している基質の量と良く相関することが報告されていることから(Li *et al.*, 2004) USP7 と IRS の相互作用を変動させる細胞外因子を探索した。その結果、インスリン/IGF 刺激依存的に USP7 が IRS-2 から解離することが明らかとなった。この解離が引き金となり、IRS-2 の分解が誘導、インスリン/IGF のシグナルや生理活性が減弱するという「脱感作機構」が稼働していると結論した。この脱感作機構において、IRS-2 からの USP7 の解離が重要と考えられたため、インスリン刺激に応答した IRS-2 と USP7 の解離の分子機構を検討した。まず、インスリン刺激依存的な IRS-2 の分子修飾が USP7 との相互作用に及ぼす影響を検討したところ、IRS-2 の分子修飾が相互作用の減少に重要であることが示唆された。そこで、IRS-2 のリン酸化や下流シグナル経路活性化が IRS-2 と USP7 の相互作用に及ぼす影響を解析した。

### 第四章

これまでの結果から、インスリン様シグナル伝達経路の活性化により IRS のユビキチン化状態が変動することが明らかとなった。既にインスリン様シグナルを伝達する分子の一部はインスリン/IGF 処理により量変動が起こることも知られている(Haruta *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2008)。これらは、インスリン/IGF 刺激に応答して、IRS 以外のタンパク質のユビキチン化状態も変動する可能性を示している。そこで、ユビキチン化基質の網羅的同定法を開発、IGF 刺激に応答して変動するユビキチン化基質の同定を行った。

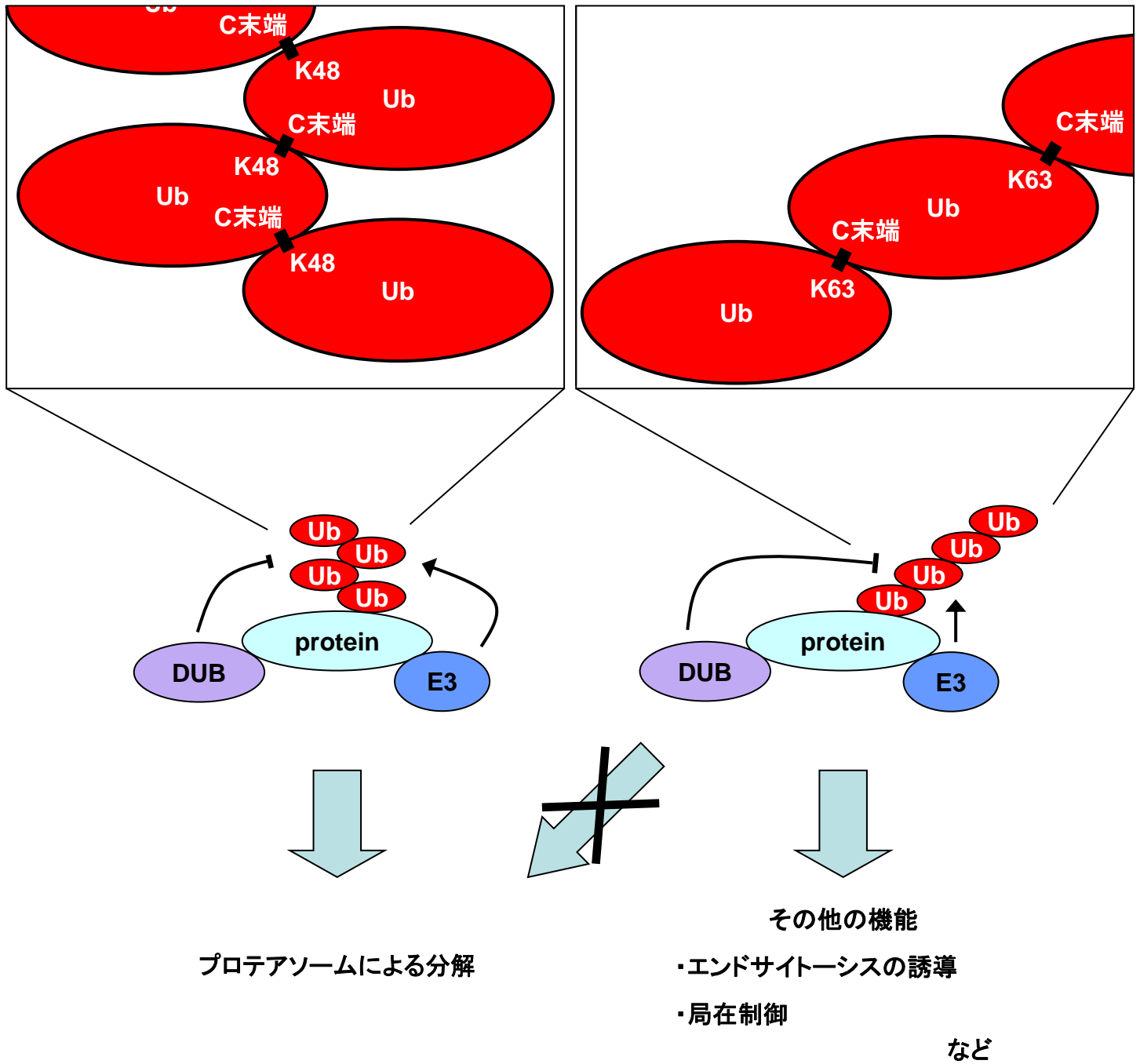
### 総合討論

総合討論では、本研究により得られた結果と、これまでの他の報告を合わせて、IRS のユビキチン化および、インスリン様シグナル分子のユビキチン化の生理的意義について総合的に討論し、最後に、今回確立した解析法や本研究で得られた成果の今後の展開を述べた。



**Fig. 0-1 IRSの分解とインスリン様活性**

インスリン／IGFが膜受容体に結合すると膜受容体チロシンキナーゼが活性化し、IRSがチロシンリン酸化される。このリン酸化チロシン残基にPI3KやGrb2といった下流シグナル分子が結合し、PI3K経路やMAPK経路といった下流シグナル経路が活性化することでインスリンの生理活性が発現する。また、IRSがユビキチン化され、プロテアソームによって分解されると、インスリン様活性が減少することが知られている。IRSをユビキチン化する酵素であるユビキチンリガーゼに関しては研究が進められてきたが、ユビキチンをはずす酵素である脱ユビキチン化酵素に関しては全く検討されていなかった。



**Fig. 0-2 タンパク質ユビキチン化**

タンパク質はユビキチンリガーゼによってユビキチン化されると、プロテアソームによって分解されることが広く知られている。ユビキチンは自身のC末端と標的タンパク質のリジン残基が結合し、結合したユビキチンのリジン残基にさらにユビキチンが結合することで鎖状に結合する。近年、ユビキチン化には分解以外にもエンドサイトーシスの誘導やタンパク質の局在制御などの機能があることがわかってきている。さらに、分解を誘導するユビキチン化はユビキチン内の48番目のリジンを介して結合しており、63番目のリジンを介した結合の場合は分解とは異なる意義を持つこともわかってきている。また、ユビキチンリガーゼと拮抗的に働き、ユビキチンはずす脱ユビキチン化酵素によってもユビキチン化は制御されていると考えられているが、脱ユビキチン化酵素に関してはあまり研究が進んでいない。

**Table 0-1 IRSAP候補として単離された脱ユビキチン化酵素**

IRSをbaitとして、酵母two-hybrid法(Y2H)やIRSと共免疫沈降されたタンパク質を質量分析法(IP-MS)によって単離した。これらの脱ユビキチン化酵素はそれぞれ異なる分子量、ドメインをもち、標的となる基質も異なる。

	長さ (a.a.)	ドメイン	方法	報告がある基質
USP7	1102	MATH, Peptidase_C19	IRS-2とのIP-MS	p53 (Li <i>et al.</i> , 2004) PTEN (Song <i>et al.</i> , 2008)
USP9X	2554	Peptidase_C19	IRS-2とのIP-MS	Smad4 (Dupont <i>et al.</i> , 2009) ASK1 (Nagai <i>et al.</i> , 2009)
USP25	1055	UBA, UIM, Peptidase_C19	IRS-4とのIP-MS	MyBPC1 (Bosch-Comas <i>et al.</i> , 2006)
USP33	942	znf_UBP, Peptidase_C19	IRS-1をbaitとしたY2H	D2 (Curcio-Morelli <i>et al.</i> , 2003)
USP34	3546	Peptidase_C19	IRS-2とのIP-MS	axin (Liu <i>et al.</i> , 2011)

IP-MS: 共免疫沈降物の質量分析 Y2H: yeast two-hybrid

# 材料と方法

## 第一節 材料

### 1. 細胞

本研究では以下の細胞を用いた

- ヒト上皮様細胞癌由来細胞 A431 は矢花直幸博士（東京大学医科学研究所）より御恵与頂いた。
- ラット甲状腺濾胞由来正常株化細胞 FRTL-5 (ATCC No. CRL8305) は、Dr. Leonard Kohn (National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Disease; NIDDK, NIH, MD, USA、現在、Edison Biotechnology Institute and College of Osteopathic Medicine, Ohio University, OH, USA) より御恵与頂いた。
- ラット肝臓癌由来細胞 H4-IIE (ATCC NO. 1600 の H4-IIE-C3 株) は、伊藤芳明博士（岩手大学農学部、岩手）より御恵与頂いた。
- HEK293 細胞 (Human Embryonic Kidney cell) は、鈴木幸一博士（国立感染症研究所ハンセン病研究所、東京）より御恵与頂いた。
- HEK293T 細胞 (SV40 large T antigen を高発現した 293 細胞) は、塩田邦郎博士（東京大学大学院農学生命科学研究科）より御恵与頂いた。
- ヒト乳腺癌由来上皮細胞 MCF-7 (ATCC No. HTB-22) は早川洋一博士（東京大学分子細胞生物学研究所、現在、東京理科大学薬学部、千葉）より御恵与頂いた。
- NIR 細胞はヒトインスリン受容体を高発現したマウス NIH-3T3 繊維芽細胞。Dr. Derek LeRoith (NIDDK, 現 Division of Endocrinology, Metabolism, and Bone Diseases, Mount Sinai School of Medicine, NY, U.S.A.) より御恵与頂いた。
- ヒト前立腺癌細胞 PC3 は福嶋俊明博士（広島大学大学院医歯薬保健学研究院、広島）より御恵与頂いた。

## 2. 抗体

免疫沈降 (IP)、immunoblotting (IB) には以下の抗体を用いた

- ・抗 adaptin 抗体 ( $\alpha$  adaptin): SANTA CRUZ, sc-17771 [1: 1,000 diluted with blocking buffered solution (以下 BBS、組成後述) for IB]
- ・抗 Akt 抗体 ( $\alpha$  Akt): Cell Signaling (Beverly, MA, USA), 9272 (1: 1,000 diluted with BBS for IB)
- ・抗 phospho-Akt (Ser 473) 抗体 ( $\alpha$  pAkt): Cell Signaling, 9271 (1: 1,000 diluted with BBS for IB)
- ・抗  $\beta$ -actin 抗体 ( $\alpha$   $\beta$ -actin): Sigma (MO, USA), A5441 (1  $\mu$ l/ml in BBS for IB)
- ・抗 p44 /42 MAPK 抗体 ( $\alpha$  Erk): Cell Signaling, 9102 (1: 1,000 diluted with BBS for IB)
- ・抗 phospho-p44 /42 MAPK 抗体 ( $\alpha$  pErk): Cell Signaling, 9101 (1: 1,000 diluted with BBS for IB)
- ・抗 FLAG 抗体 ( $\alpha$  FLAG): Sigma, F3165 (1  $\mu$ l/ml in BBS for IB)
- ・抗 green fluorescent protein (GFP, B-2) 抗体 ( $\alpha$  GFP): SANTA CRUZ (CAL USA), sc-9996 (1: 2,000 diluted with BBS for IB)
- ・抗 glutathione S-transferase (GST) 抗体 ( $\alpha$  GST): SANTA CRUZ, sc-138 (1: 200 diluted with BBS for IB)
- ・抗 HSP90 抗体 ( $\alpha$  HSP90) : Santa Cruz, (BA, USA), sc-13119 (1  $\mu$ l/ml in BBS for IB)
- ・抗 IRS-1 抗体 ( $\alpha$  IRS-1): NH<sub>2</sub>-PRSSDLSNYASINFQKQPEDRQ-COOH (IRS-1 の C 末端ペプチド配列) を合成し、N 末端にシステイン残基を加え、MBS (*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester) を用いてキャリアタンパク質 KLH (keyhole limpet hemocyanin) に結合した。これを定法どおりウサギに免疫し、抗血清を取得した。(1: 1,500 diluted with BBS for IB, 3  $\mu$ l for IP)
- ・抗 IRS-2 抗体 ( $\alpha$  IRS-2): NH<sub>2</sub>-TYASIDFLSHHLKEATVVKE-COOH (IRS-2 の C 末端ペプチド配列) を IRS-1 C 末端ペプチドと同様の方法でキャリアタンパク質に結合した。これを定法通りウサギに免疫し、抗血清を取得した (3  $\mu$ l for IP)。
- ・抗 IRS-2 抗体 ( $\alpha$  IRS-2): Upstate Biotechnology (NY, USA), #06-506 (1: 2,000 diluted with BBS for IB)
- ・抗 IRS-2 (H-205) 抗体 ( $\alpha$  IRS-2 H-205): SANTA CRUZ, sc-8299 (1: 1,000 diluted with BBS for IB)
- ・抗 lamin B1 抗体 ( $\alpha$  Lamin B1) : Biovision, (CA, USA), #3046-100 (1  $\mu$ l/ml in BBS for IB)
- ・抗 Myc 抗体 ( $\alpha$  Myc): Upstate Biotechnology, #05-419 (1  $\mu$ l/ml in BBS for IB)

- ・抗リン酸化チロシン抗体 ( $\alpha$  pY): Millipore, (MA, USA), # P4110 (1: 1,000 dilution with BBS for IB)
- ・抗 ubiquitin (FK2)抗体 (FK2): ENZO, BML-PW8810 (1: 1,000 dilution with BBS for IB)
- ・抗 ubiquitin (P4D1)抗体 (P4D1): SANTA CRUZ, sc-8017 (1: 100 dilution with BBS for IB)
- ・抗 ubiquitin K11 linkage 抗体 (K11): Millipore, MABS107 (1: 1,000 dilution with BBS for IB)
- ・抗 ubiquitin K48 linkage 抗体 (K48): Cell Signaling,#4289 (1: 1,000 dilution with BBS for IB)
- ・抗 ubiquitin K63 linkage clone Apu3 抗体 (K63 Apu3): Millipore, 05-1308 (1: 1,000 dilution with BBS for IB)
- ・抗 ubiquitin K63 linkage (HWA4C4) 抗体 (K63 HW):ENZO, BML-PW0600 (1: 1,000 dilution with BBS for IB)
- ・抗 USP7 抗体 ( $\alpha$  USP7): BETHYL, (TX, USA), A300-033A (1:3,000 dilution with BBS for IB)
- ・抗 USP9X 抗体 ( $\alpha$  USP9X) : Dr. Stephen A. Wood (National Centre for Adult Stem Cell Research, Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies, Griffith University, Queensland, Australia) より御恵与頂いた (1:1,000 dilution with BBS for IB)。
- ・mouse Immunoglobulin G (IgG): MP Biomedicals, (OH, USA), #55553 [1: 10,000 diluted with Tris buffered saline +Tween20 (TBS-T, 組成後述) for IB]
- ・rabbit Immunoglobulin G (IgG): MP Biomedicals, #55678 (1: 10,000 diluted with TBS-T for IB)

### **3. 用いたプラスミド**

- ・ pCMV-Myc-USP7  
rat USP7 の N 末端に Myc を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- ・ pCMV-Myc-USP7 C224S  
USP7 C224S の N 末端に Myc を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。  
USP7 C224S は USP7 の活性中心である 224 番目の Cys (TGT)を Ser (AGT)に置換した不活性型変異体である。
- ・ pCMV-Myc-USP7 MATH domain  
rat USP7 [アミノ酸番号 (a.a.) 68-203] の N 末端に Myc を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。

- pEGFP-IRS-1  
rat IRS-1 の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-1 PH PTB domain  
rat IRS-1 (a.a. 1-256) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-1 PH domain  
rat IRS-1 (a.a.1-112) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-1 PTB domain  
rat IRS-1 (a.a.113-256) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-1 C-terminal  
rat IRS-1 (a.a.256-1,235) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-2  
human IRS-2 の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-2 PH PTB domain  
human IRS-2 (a.a.1-329) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-2 PH domain  
human IRS-2 (a.a.1-131) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-2 PTB domain  
human IRS-2 (a.a.137-393) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pEGFP-IRS-2 C-terminal  
human IRS-2 (a.a.324-1,338) の N 末端側に GFP を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pFLAG-IRS-1  
rat IRS-1 の N 末端側に FLAG を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pFLAG-IRS-2  
human IRS-2 の N 末端側に FLAG を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。



- pFLAG-USP7  
rat USP7 の N 末端側に FLAG を融合したタンパク質を発現させるプラスミドである。
- pGEX-USP7 N-terminal  
rat USP7 (a.a.1-57) の N 末端に GST を融合したタンパク質を大腸菌に発現させるプラスミドである。
- pGEX -USP7 MATH domain  
rat USP7 (a.a.68-203) の N 末端に GST を融合したタンパク質を大腸菌に発現させるプラスミドである。
- pGEX -USP7 Peptidase\_C19 domain  
rat USP7 (a.a.204-548) の N 末端に GST を融合したタンパク質を大腸菌に発現させるプラスミドである。
- pGEX -USP7 C-terminal  
rat USP7 (a.a.548-1,103) の N 末端に GST を融合したタンパク質を大腸菌に発現させるプラスミドである。
- pCMV5-Myc  
Myc を発現させるベクターである。
- pFLAG-4-5  
FLAG を発現させるベクターである。
- pGEX-4T-1  
GST を大腸菌で発現させるベクターである。

#### **4. ホルモン、酵素阻害剤**

- Bovine insulin, human insulin; Sigma, diluted with 0.3M CH<sub>3</sub>COOH
- human IGF-I : 大熊利明氏 (藤沢製薬株式会社、現在、アステラス株式会社、東京) より御恵与頂いた (diluted with 0.3 M CH<sub>3</sub>COOH)
- MG132 (Z-L-L-L-CHO); Biomol. Res. Labs., diluted with DMSO
- LY294002; Sigma, diluted with DMSO
- P5091; Progenra より御恵与頂いた (diluted with DMSO)
- PD98059; New England BioLabs, diluted with DMSO
- Bt<sub>2</sub>cAMP (N<sup>6</sup>, 2'-o-Dibutyryladenosine-3': 5' cyclic monophosphate sodium salt); Nacalai tesque, diluted with BSA/F12 培地 (組成後述)

## 5. siRNA

・ control siRNA: 5'-GUACCGCACGUCAUUCGUAUC-3' RNAi 株式会社 (東京) より購入した。

・ USP7 siRNA: 5'-CCAAGAAGAUGAACUAUATT-3' NIPPON EGT (富山) より購入した。

## 6. その他の試薬

なお、以下の記述で、一般的な購入方法で入手できる試薬等に関しては、購入元の記載を省略した。

# 第二節 方法

## 1. 細胞培養

### FRTL-5 細胞

培養にあたり、以下の培地を要時調製し、0.45  $\mu$ m membrane filter (Advantec, 東京) で滅菌ろ過後、恒温槽で 37°C にしたのち使用した。

### 培地

- ・ NBS 培地 : Coon's modified Ham's F12 medium (Sigma)+ new born bovine serum (日水製薬, 東京, 5%) , bovine TSH (Sigma, 1 mU/ml), bovine insulin (Sigma, 10  $\mu$ g/ml), human transferrin (Sigma, 5  $\mu$ g/ml), NaHCO<sub>3</sub> (2.785 mg/ml), glutamine (0.333 mg/ml), 1 $\times$ MEM non-essential amino acids (日水製薬) , 抗生物質 4 種 [penicillin (萬有製薬, 大阪, 50 IU/ml) , streptomycin (Nacalai tesque, 50  $\mu$ g/ml, fungizone (Bristol-Myers, 5 mg/ml), kanamycin (Nacalai tesque, 100  $\mu$ g/ml)]
- ・ BSA/F12 培地 : Coon's modified Ham's F12 medium + bovine serum albumin (BSA) (Nacalai tesque, 0.1%), NaHCO<sub>3</sub> (2.785 mg/ml), glutamine (0.333 mg/ml), 1 $\times$ MEM non-essential amino acids, 前述した抗生物質 4 種
- ・ HBSS : Hanks' balanced salt solution (日水製薬)+ NaHCO<sub>3</sub> (0.2 mg/ml), 前述した抗生物質 4 種
- ・ 細胞剥離溶液 (Sodium citrate solution: SCS): phosphate buffered saline (日水製薬) + trisodium citrate dihydrate (0.08M), 前述した抗生物質 4 種

### 培養法

150 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (IWAKI, 東京) を用い、37°C、湿度 100%、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーターで培養を行った。培地は、NBS 培地を用い、2~3 日おきに交換した。継代は、約 2 週間おきに細胞が subconfluent な状態になった際に次のような方法で行った。まず、5 ml の HBSS で細胞を 1 回洗浄し、5 ml の SCS に数分間浸した後、フラスコをたたき細胞を剥離した。さらに、5 ml の NBS 培地を加え、数回ピペッティングしたのち回収後遠心し、上清を除去し細胞塊を集めた。その後、ピペッティングにより細胞塊をほぐし、新たに NBS 培地を加えて細胞を希釈した。トリパンブルー染色により生細胞数を計数し、 $2.5 \times 10^5$  cells/ml となるよう播種した。なお、実験には、継代回数 30 回以下の細胞を用いた。

実験に用いた FRTL-5 細胞は、まず、100 mm dish (IWAKI) に  $3.0 \times 10^6$  cells/dish の密度で播種し、上記の細胞培養法に従って培養した。5~6 日後、subconfluent な状態に達したところで、細胞を HBSS で 2 回洗浄した後、BSA/F12 培地を用いて 24 時間培養し、血清飢餓により静止期に同調した。次に、cAMP アナログである dibutyryl cAMP (Bt<sub>2</sub>cAMP) を 1 mM 含む、もしくは、含まない BSA/F12 培地で 24 時間前培養した。

### A431 細胞、H4-IIE 細胞、HEK293 細胞、HeLa 細胞、MCF-7 細胞、NIR 細胞、PC3 細胞

培養にあたり、以下の培地を要時調製し、0.45 μm membrane filter (Advantec) で滅菌ろ過後、恒温槽で 37°C に温め使用した。

### 培地

- FBS 培地: Dulbecco's modified Eagle Medium (日水製薬, 東京, 日本) + fetal bovine serum (日水製薬, 10%), NaHCO<sub>3</sub> (3 mg/ml), 前述した抗生物質 4 種
- BSA 培地: Dulbecco's modified Eagle Medium (日水製薬) + bovine serum albumin (Nacalai tesque, 0.1%), NaHCO<sub>3</sub> (2 mg/ml), 前述した抗生物質 4 種
- HBSS: FRTL-5 細胞の場合と同じ
- 細胞剥離溶液 (Trypsin-EDTA/PBS, 以下 Trypsin): phosphate buffered saline (PBS, 日水製薬), 0.25% trypsin, 0.02% EDTA, 前述した抗生物質 4 種

### 培養法

FBS 培地を用い、FRTL-5 細胞と同様に培養した。3 日ごとに培地交換を行い、約 1 週間ごとに継代した。なお、実験には、継代回数 20 回以下の細胞を用いた。なお、細胞剥離

溶液として Trypsin-EDTA/PBS を用いた。

### HEK293T 細胞

HEK293T 細胞の培養は、CS 培地（組成後述）を用い、HEK293 細胞と同様に培養した。また、細胞の継代についても HEK293 細胞と同様に行った。

- ・ CS 培地: Dulbecco's modified Eagle Medium（日水製薬）+ calf serum（日水製薬, 10%）,  $\text{NaHCO}_3$  (3 mg/ml), 抗生物質 4 種

## 2. 動物実験および初代培養肝細胞の調製

### (1) 動物と飼育条件

5 週齢の Wistar 系雄ラット（130～150 g、SPF、日本チャールスリバー、横浜）を最初の 7 日間予備飼育した。すなわち、食餌としてペレット（ラボブリーダーMR、日本農産工業、横浜）を 3 日間自由摂食させた後、食餌を 12%カゼイン食 (12C)に替えて 4 日間 10 時から 18 時まで給餌した。飼育期間中、水は自由摂取できるようにした。なお、飼育室は明期 (8:00～20:00)、暗期 (20:00～8:00)の 12 時間サイクルで管理した。予備飼育後、ラットを 12C、無タンパク質食 (PF)の 2 群に分けて実験を開始した。各食餌組成は、Table. 0-2 に示した。実験期間中も各食餌を 10 時から 18 時まで給餌した。一日の平均摂食量は、12C で 23.2 g、PF で 11.7 g であった。また、実験開始時の体重は 12C で 172 g、PF で 169g、最終日体重は 12C で 224 g、PF で 151g であった。

### (2) 肝細胞培養法

肝実質細胞の分離法は (Seglen, 1979) の方法をもとに伊藤らによって改良された灌流法に従って行った。

#### a) 肝実質細胞の分離法

実験 8 日目に 10 時から 1.5 時間給餌した後、雄ラットに 100  $\mu\text{l}$ /100 g 体重のネンブタール（大日本製薬）を腹腔に注射して麻酔した。手術台にのせ、皮膚、腹筋の順に開腹し、腹腔を露出させ、門脈を十分に露出させた。門脈下に縫合糸（手術用結紮糸 4 号、夏目製作所）を通しループを作った後、門脈を半切し、すばやくカニューレ [あらかじめヒビキポリエチレン細管 PE9 号 (Hibiki, 東京) を加工したもの] を門脈に挿入し縫合糸で縛った。直ちに肝臓下の下大動脈を切断し、マイクロチューブポンプ (MP-4, 東京理科器械, 東京) により約 30 ml/min の流速で 37°C に保温した前灌流液（組成後述）を流し続け、脱血

を行った。この間に胸郭部を開き心臓を露出させ、右心房を開切し、先に切断した肝臓下の下大静脈の肝臓側を結紮し、肝門脈から心臓下の下大静脈に前灌流液が流れることを確認してから、前灌流液を 37°C に保温したコラゲナーゼ溶液（組成後述）に切り替えた。その後しばらく灌流を続け、十分肝臓が消化されてから肝臓を切り取り、氷冷した HBSS（組成前述）に移した。肝臓をはさみで細分し、先太の駒込ピペットで軽くピペッティングを行って細胞を分散させた後、4 重に重ねたガーゼ（日本薬局方ガーゼ 1 号，白十字，東京）で細胞懸濁液をろ過した。この細胞懸濁液を 50 ml のポリエチレン製の遠沈管（Iwaki Houseware, 千葉）に移し、50×g、室温で 2 分間遠心分離を行い、得られた沈殿をさらに 2 回氷冷 HBSS で洗浄し、肝実質細胞の分画を得た。

得られた肝実質細胞について、トリパンブルー染色により細胞数および生存率の計算を行い、生存率 80% 以上のものについてのみ以下の実験に供した。

#### 使用した溶液

- ・前灌流液: 8 g/l NaCl, 0.4 g/l KCl, 0.078 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.151 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2.38 g/l HEPES, 0.001 g/l phenol red, 0.35 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 0.19 g/l EGTA, 0.9 g/l glucose
- ・コラゲナーゼ溶液: 8 g/l NaCl, 0.4 g/l KCl, 0.078 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.151 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2.38 g/l HEPES, 0.001 g/l phenol red, 0.35 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 0.56 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 0.030 g/l コラゲナーゼ (282 U/mg, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA), 0.015 g/l trypsin inhibitor (soy bean, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)

#### b) 初代培養肝細胞培養および Cell lysate の調製

単離調製した肝細胞を細胞数  $5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> になるように、コラーゲンコートされた 60 mm dish (Iwaki Houseware) に播種し、無血清 Williams'E 培地 (Sigma) で 3 時間培養した。その後、終濃度 50 nM となる human insulin を添加し、インスリン添加 0、1、5、15 分後に培地を吸引し、氷冷 PBS で細胞を 2 回洗浄後、液体窒素で反応を停止させた。さらに、500 μl の細胞溶解液（組成前述）を加えて細胞を可溶化し、30 分間遠心分離 (12000 ×g, 4°C) 後、上清を回収し、これを細胞抽出液とした。以降は immunoblotting 分析の項で述べた方法に従った。

### 3. 培養細胞への遺伝子および siRNA 導入法

#### (1) リポフェクション

HEK293 細胞および H4-IIIE 細胞におけるプラスミドあるいは siRNA の導入には Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を利用した。遺伝子あるいは siRNA の導入はサブコンフ

ルエントな状態の細胞に行い、詳細は、添付されていたプロトコールに従った。

## (2) リン酸カルシウム法

293T 細胞を 100 mm dish に  $1 \times 10^6$  個播種し、培養した。翌日、DNA 溶液 440  $\mu$ l (プラスミド DNA 10  $\mu$ g を含む)、70 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10  $\mu$ l、 $2 \times$ Hebs (42 mM HEPES, 290 mM NaCl, pH 7.1) 500 ml を混ぜ合わせた。この溶液をおだやかに混ぜながら、2.5 M  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu$ l をゆっくり加えた後、室温で 1 分間インキュベートした。次に、この溶液を、293T 細胞全体にゆっくり加え、37°C で 3 時間培養した。3 時間後、培地交換して一晩培養し、続いて上記の方法で細胞を静止期に同調して実験に用いた。

## (3) Polyethylenimin (PEI) 法

細胞を 100 mm dish に翌日 50-70% コンフルエントになるよう播種し、一晩培養した。翌日、OPTI-MEM 700  $\mu$ l、DNA 溶液 7  $\mu$ l (プラスミド DNA を 7 mg 含む)、PEI solution (polyethylenimin Linear MW -25 kDa, Polyscience Lnc) 21  $\mu$ l を混ぜ合わせた。この溶液を vortex により攪拌後、室温で 15 分間インキュベートした。次にこの溶液を細胞全体にゆっくり加え、37°C で培養、48 時間後に回収した。

## 4. Immunoblotting 分析

### (1) 細胞抽出液の調製

Immunoblotting 分析に用いる細胞は、dish から培地を除去した後、氷上で細胞溶解液 (組成後述) を 400  $\mu$ l (または 200  $\mu$ l) 加え、細胞を溶解し、cell scraper (Nunc, NY, USA) を用いてかき集め、細胞抽出液とした。その後、エッペンドルフチューブに移し、パスツールピペットを用いて 30 回ピペッティングし、-80°C で保存した。

### 使用した溶液

- 細胞溶解液: Tris-HCl (pH7.4, 50 mM), Triton X-100 (1%), NaCl (150 mM), NaF (1 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1 mM), ethyleneglycol bis (2-aminoethyl ether)tetraacetic acid (EGTA, 1 mM),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (500  $\mu$ M), leupeptin (10  $\mu$ g/ml), pepstatin (5  $\mu$ g/ml), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, 20  $\mu$ g/ml), aprotinin (100 KIU/ml), *p*-nitrophenylphosphate (PNPP, 10 mg/ml) なお、 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , leupeptin, pepstatin, PMSF, aprotinin, PNPP は使用する直前に細胞溶解液に加えた。また、leupeptin, pepstatin は、青柳高明博士 (微生物化学研究所、東京、現在、昭和薬科大学) より御供与頂いた。

## (2) 細胞抽出液のタンパク質濃度定量

凍結保存した細胞抽出液を融解後、遠心分離 ( $3,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) し、上清を分取した。Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, CA, USA) を用い、ブラッドフォード法によって、 $595\text{ nm}$  の吸光度を測定し、タンパク質濃度を算出した。詳細は、添付されていたプロトコールに従った。

## (3) 免疫沈降

免疫沈降を行う場合は、タンパク質濃度定量後、すべてのサンプルのタンパク量が等しくなるよう細胞溶解液で希釈して容量を揃えたのち、抗体を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。その後、予め細胞溶解液で平衡化しておいた Protein A-Sepharose (GE Healthcare) を  $5\ \mu\text{l}$  添加し、さらに  $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、遠心分離 ( $3,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) を約 1 分間行い、上清を吸引除去し、細胞溶解液で沈降物を 3 回洗浄した。

また、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行う際には、タンパク質濃度定量後、すべてのサンプルのタンパク量が等しくなるよう細胞溶解液で希釈して容量を揃えたのち、抗体の代わりにあらかじめ細胞溶解液で平衡化しておいた ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) を  $5\ \mu\text{l}$  添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させた。反応後、遠心分離 ( $3,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) を約 1 分間行い、上清を吸引除去し、細胞溶解液で沈降物を 3 回洗浄した。

## (4) Pull-down

Pull-down を行う場合は、タンパク質濃度定量後、すべてのサンプルのタンパク量が等しくなるよう細胞溶解液で希釈して容量を揃えたのち、抗体の代わりにあらかじめ精製した GST 融合タンパク質と Glutathione-Sepharose (GE Healthcare)  $5\ \mu\text{l}$  を添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させた。反応後、遠心分離 ( $3,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) を約 1 分間行い、上清を吸引除去し、細胞溶解液で沈降物を 3 回洗浄した。

## (5) SDS-PAGE、膜への転写

前述の方法でタンパク質濃度を測定し、試料間のタンパク質濃度が等しくなるよう希釈した試料、あるいは、前述の免疫沈降で得た沈降物を細胞溶解液で希釈した試料に、 $3\times$  Laemmli's buffered solution (組成後述) を加えて 5 分間煮沸し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供する試料とした。

SDS-PAGE は、AE-6500 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO, 東京) を用いて、 $25\text{mA}$  の定電流下で約 2 時間泳動を行った。分離ゲルの acrylamide 濃度は、 $50\text{ kDa}$  以下のタンパク質を検出する場合で  $12\%$ 、 $50\sim 100\text{ kDa}$  では  $10\%$ 、 $100\text{ kDa}$  以上のタンパク質

では 7%とした。

SDS-PAGE の終了後、PVDF 膜 (Immobilon-P、Millipore) への転写は Trans Blot Cell (Bio-Rad)を用い、200 mA の定電流下で 5.5 時間行った。

#### 使用した溶液

- ・ 3×Laemmli's buffered solution: Tris-HCl (pH7.8, 30 mM), SDS (9%), glycerol (15%), 2-mercaptoethanol (2-ME, 6%), bromophenol blue (0.05%)
- ・ 泳動用バッファー: Tris-NaOH (pH8.75, 50 mM), glycine (380 mM), EDTA (2 mM), SDS (0.1 %)
- ・ 転写用バッファー: Tris (25 mM), glycine (192 mM), methanol [20% (v/v)]

### **(6) Immunoblotting**

転写終了後、PVDF 膜を、Tris buffered saline (TBS; 組成後述) で洗浄した後、blocking buffered solution (BBS; 組成後述) に浸し、室温で 30 分間ブロッキングした。

ブロッキングした後、PVDF 膜を一次抗体とともにパッキングし、4°Cで一晩インキュベートした。続いて、Tris buffered saline-Tween20 (TBS-T; 組成後述) で 10 分間 1 回、5 分間 2 回洗浄した。次に、二次抗体とともにパッキングし、室温で 1 時間インキュベートした後、TBS-T で 15 分間 1 回、10 分間 2 回洗浄した。なお、室温での場合はベリータンサー上で行った。

発光反応は Enhanced chemiluminescence kit (ECL kit, Perkin elmer, MA, USA) を用い、添付されたプロトコールに従って行い、X 線フィルム (X-Omat, Kodak, CT, USA) に露光し、現像した。分子量マーカーとの位置関係から目的のバンドを特定した。

膜から抗体をはがす場合は、PVDF 膜を stripping buffer (組成後述) で 15 分間 2 回洗浄し、さらに TBS-T で 10 分間 2 回洗浄した。再度 immunoblotting 分析に供する場合は、上記のブロッキングの操作より行った。

#### 使用した溶液

- ・ TBS: Tris-HCl (pH7.6, 20 mM), NaCl (137 mM), EDTA (1 mM)
- ・ BBS: TBS + bovine serum albumin (3%), NaN<sub>3</sub> (0.025%)
- ・ TBS-T: TBS + Tween 20 (0.1%)
- ・ stripping buffered: glycine (pH2.8, 200 mM), NaCl (500 mM)



## 5. GST 融合タンパク質の精製

### (1) GST 融合タンパク質の発現誘導

GST 融合タンパク質を発現するプラスミドを大腸菌 BL21 株 [遺伝子型; *hadS gal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene1)*] に形質転換し、生育したコロニーを 1.5 ml の LB 培地で一晚培養した。この培養液を 150 ml の LB 培地の入ったフラスコに加えて、更に 37°C で 4 時間培養した。培養液を 10 分間遠心 (7,500×g, 4°C) し、大腸菌を回収した。

### (2) GST 融合タンパク質の精製

回収した大腸菌を 10 ml の PBS-T buffer (組成後述) で懸濁した。次に、この懸濁液を氷上で超音波処理することにより大腸菌を破砕し、10 分間遠心 (7,500×g, 4°C) した。回収した上清に、予め PBS-T buffer で平衡化しておいた Glutathione-Sepharose を 10 μl 加え、4°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、遠心分離 (3,000×g, 4°C) を約 1 分間行い、PBS-T buffer で沈降物を 3 回洗浄した。洗浄した沈殿物に elution buffer [10 mM 還元型 glutathione, Tris-HCl (pH8.0)] を加え、4°C でさらに 1 時間インキュベートした後、遠心分離 (3,000×g, 4°C) を約 2 分間行い、溶出された GST 融合タンパク質を含む上清を回収した。回収した上清の一部について、1/3 量の 3×Laemmli's buffered solution を加えて 5 分間煮沸し、SDS-PAGE に供した。泳動後、ゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) 溶液 (水:メタノール:酢酸=9:9:2 の組成の溶液に Coomassie Brilliant Blue R-250 0.25g を加えて混合した) で 1 時間浸透し、続いて脱色液 (水:メタノール:酢酸=50:49:1 の組成で混合した) で浸透してバンドを検出、GST 融合タンパク質の発現確認を行った。

#### 使用した溶液

- ・ PBS-T buffer: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% TritonX-100, 100KIU/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml pepstatin, 20 μg/ml PMSE, pH7.4

## 6. 細胞内分画法

### (1) 単離核調製法

細胞を PBS buffer で 2 回洗浄後、1 dish あたり 500 μl の buffer A を加えて細胞をかきとった。続いて 25 gage の針を付けた注射筒を用いて 4 回ピペッティングし、細胞を破砕した。4,000 ×g, 4°C で 15 分間遠心して上清と沈殿物を分取し、上清を細胞質画分とした。沈殿物を buffer A で 3 回洗浄後、300 μl の buffer A を加えてソニケーターにより 5 秒間 3 回破砕した。破砕液を 15,000×g, 4°C で 10 分間遠心し、上清を核画分とした。

使用した溶液

- buffer A: 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µg/ml calpain inhibitor, 0.5% Triton X-100, 100 KIU/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, pH 7.4

**(2) LDM 分画法**

細胞を TES buffer で 2 回洗浄後、1 dish あたり 500 µl の TES buffer を加えて細胞をかきとった。続いて 27 gage の針を付けた注射筒を用いて 20 回ピペッティングし、細胞を破碎した。10,000 ×g、4°C で 15 分間遠心して上清を取得した。行った。上清を超遠心機 Optima TLX (BECKMAN COULTER) とローター TLA-55 (BECKMAN COULTER) を用いて、186,000 ×g、4°C で 80 分間遠心し、沈殿物として low density microsome (LDM) 画分を得た。この際、回収した上清を細胞質画分とした。

使用した溶液

- TES buffer: 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 255 mM sucrose, 500 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 KIU/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, pH 7.4

**7. cell-free phosphorylation assay****(1) インスリン受容体の粗精製**

静止期に同調した NIR 細胞を、100 nM インスリンで 1 分間刺激した。刺激後、培地を吸引し、氷上にて harvesting buffer (組成後述) 500 µl を添加し cell scraper を用いてかき集め、Dounce 型ホモゲナイザーで 30 回ストロークし可溶化した。細胞質画分を除去するため、10 分間遠心分離 (3,000×g, 4°C) し、沈殿物に Tris-Triton X buffer (組成後述) 500 µl を添加し、ホモゲナイザーで 30 回ストロークした。その後、10 分間遠心分離 (3,000×g, 4°C) し、上清を粗膜画分とし、-80°C で保存した。

次に、wheat germ agglutinin-agarose (WGA-agarose、生化学工業) 1 ml を Tris-Triton X buffer で 3 回洗浄後、粗膜画分を加え、4°C で 2 時間インキュベートした。その後、Tris-Triton X buffer で 3 回洗浄し、カラムに充填した。溶出用 buffer (組成後述) を添加し、溶出を開始した。インスリン受容体の含まれる溶出容量 0.5~1.0 ml の溶出液を分取した。以下に、本項目で使用した溶液の組成を記す。ただし、いずれの溶液についても、使用する直前に、immunoblotting 分析の項で述べた阻害剤 6 種を加えた。

### 使用した溶液

- Harvesting buffer: 10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA , pH7.4
- Tris-Triton X buffer: 50mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 5mM EDTA, pH7.4
- 溶出用 buffer: Tris-Triton X buffer + 0.3M *N*-acetylglucosamine

## **(2) cell-free phosphorylation 反応**

リン酸カルシウム法により FLAG-IRS-2 を発現するプラスミドを導入した HEK293T 細胞を無血清培地で 24 時間処理後、培地を吸引し、細胞溶解液 500  $\mu$ l を氷上で加え、溶解した。その後、10 分間遠心分離 (3,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C) し、上清を分取、予め細胞溶解液で平衡化しておいた ANTI-FLAG M2 Affinity Gel を 5  $\mu$ l 添加し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。反応後、遠心分離 (3,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C) を約 1 分間行い、上清を吸引除去し、細胞溶解液で沈降物を 3 回洗浄した。

一方で、前述のように取得したインスリン受容体画分 25  $\mu$ l に MgCl<sub>2</sub> (終濃度 5 mM)、MnCl<sub>2</sub> (終濃度 5 mM)、ATP (終濃度 500  $\mu$ M)、インスリン (終濃度 100 nM) を加え、reaction buffer (組成後述) で 50  $\mu$ l とし、上記の沈降物に添加、タッピングしたのち、ヒートブロックを用い 25  $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。なお、対照にはインスリン受容体画分ではなく、溶出 buffer のみを加えた。その後、細胞溶解液 1 ml を添加し、氷上に置くことで反応を停止し、細胞溶解液で沈降物を 3 回洗浄した。以下に、reaction buffer の組成を記す。

### 使用した溶液

- reaction buffer: 50 mM Tris-HCl, 0.025% Triton X-100, pH7.4

## **8. Beads からの溶出法**

### **FLAG 溶出**

沈降物に 100  $\mu$ g/ml の 3 $\times$ FLAG peptide (Sigma) を 40  $\mu$ l 加え、4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、遠心分離 (3,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C) を約 1 分間行い、上清を分取した。以降は immunoblotting 分析の項で述べた方法に従った。

## **9. 質量分析計を用いた解析**

### **(1) 質量分析計の装置**

装置は、液体クロマトグラフィー (Easy nLC 1000, Thermo Fisher Scientific) を Q Exactive MS (Thermo Fisher Scientific) に接続し、ナノスプレー (EASY-Spray Sources,

Thermo Fisher Scientific) を用いたエレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization, ESI) 法によりイオン化を行った。液体クロマトグラフィーのカラムはC18 analytical column (Reprosil-Pur 3  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  id x 12 cm packed tip column, Nikkyo Technos Co. Ltd.) を用い、0.1% 蟻酸 (Solvent A) と100% ACN/0.1% 蟻酸(Solvent B) の2種類のバッファーを流速300 nl/minで用いた。イオン化は1.8 kV、250°Cの条件下で行った。ペプチドの開裂は、高エネルギー衝突解離 (HCD: Higher-energy collisional dissociation) により行った。

## (2) 質量分析計の設定：ショットガンプロテオミクス

MSおよびMS/MSスペクトルの測定はペプチド測定に適した設定にした。具体的には、装置にイオンが飛んできた際にMSスペクトルを測定するトリガーとして、イオンの量 (AGC target) を $3 \times 10^6$ に、経過時間 (Maximum IT) を60 msに設定した。これにより、装置にイオンが $3 \times 10^6$ たまる、あるいは、60 ms経過するとMSスペクトルを測定するようにした。分解能 (Resolution) を70,000とし、測定する質量電荷比 (Scan range) は350-1300とした。また、MS/MSスペクトルの測定 (loop count) は、MSの測定ごとに存在量の最も多い10種類のイオンをMS/MSに供する設定にした (top10)。

MS/MSスペクトル測定は、AGC targetを $1 \times 10^5$ 、Maximum ITを60 msに設定した。また、一度MS/MSスペクトルを測定したプレカーサーイオンに関しては、90秒間MS/MSスペクトルの測定は行わないようにした (Dynamic exclusion)。Resolutionを17,500とし、プレカーサーイオンを単離する質量幅 (Isolation window) を2.0 m/z、電荷 (Charge excl unassigned) が2-4、質量電荷比 (Fixed first mass) が100.0以上のイオンのみを測定、開裂させる際のエネルギー (NCE; normalized collision energy) を28.0、に設定した (Table. 0-3-1)。

これらの設定により、理論上、最低でも1秒間に一度、MSスペクトル測定とそれに続く10回のMS/MSスペクトル測定が行えるようにした。

## (3) 質量分析計の設定：parallel reaction monitoring (PRM) 法

MSスペクトルの質量電荷比と電荷を設定し、その設定に合致するMSスペクトルのみのMS/MSスペクトルを測定した。MS/MSスペクトル測定は、AGC targetを $1 \times 10^6$ 、Maximum ITを200 msに設定した。Resolutionを70,000とし、Isolation windowを2.0 m/z、Fixed first massは120.0、NCEを27に設定した (Table. 0-3-2)。

#### (4) 結果解析

タンパク質、ペプチドの同定を目的とした測定の結果解析には、解析ソフトとしてProtein Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) を、データベースとしてMascotを用いた。ペプチド同定の際の偽陽性率 (false discovery rate: FDR) は1%以下とした。また、ユビキチン化ペプチドの同定を目的とした結果解析には、Protein Discovererと平行して、Protein Pilot (AB SCIEX) も用いた。ペプチドの定量を目的とした測定の結果解析には、解析ソフトとしてPinpoint version 1.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

### 10. 質量分析用サンプルの調製

#### (1) ゲル内トリプシン消化

SDS-PAGE終了後、ゲルを脱色液 (50% MeOH、10% AcOH) に浸し、室温で10分間インキュベートした。続いて、Milli-Qで10分間3回洗浄した。次に、染色液 (Bio-sage Coomassie G-250 Stain, Bio-Rad) に浸し、室温で30分間インキュベートした後、milli-Qで一晩洗浄した。なお、インキュベートはベリータンサー上で行った。

目的のゲルを切り出し、1 mm四方程度に切り、低吸着エッペンドルフチューブ (LoBind チューブ, eppendorf) に回収した。30% ACN, 50 mM AMBC溶液を1 ml添加し、最低1時間vortexにより攪拌した後、bufferをピペットマンで廃棄した。次に、50% ACN, 50 mM AMBC溶液を1 ml添加し、最低1時間vortexにより攪拌、bufferを同様に廃棄した。さらに、100% ACNを100  $\mu$ l添加し、5分間vortexにより攪拌した後、bufferを廃棄、5分間風乾させた。ゲル片がすべて浸かる量のトリプシン溶液 (20 ng/ $\mu$ l trypsin, 5% ACN, 50mM AMBC) を添加し、37°Cで12-15時間インキュベートした。ここまでの操作は、すべてクリーンベンチ内で行った。

ゲル片に50% ACN, 0.1% TFA溶液を50  $\mu$ l添加し、1時間vortexにより攪拌、上清を回収した。さらに、ゲル片に70% ACN, 0.1% TFA溶液を50  $\mu$ l添加し、30分間vortexにより攪拌、上清を回収した。回収した上清を混合し、遠心濃縮により9  $\mu$ l以下まで濃縮、Milli-Qで適宜希釈した。終濃度0.1% となるよう1% TFAを添加し、質量分析用のサンプルとした。

#### (2) on beadsでのトリプシン消化

沈降物にトリプシン溶液 [10 ng/ $\mu$ l trypsin (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega), 5% ACN, 50mM AMBC] を100  $\mu$ l添加し、37°Cで12時間、ローテーターで攪拌しながらインキュベートした。遠心分離 (3,000 $\times$ g, 4°C) を1分間行い、上清を分取した。上清に1% TFAを100  $\mu$ l添加し、チップカラムを用いてペプチドの脱塩および濃縮を行った (後述)。次に、遠心濃縮により10  $\mu$ l以下まで濃縮、0.1% TFAで適宜希釈し、質量分析用

のサンプルとした。

### (3) ペプチドの脱塩・濃縮

疎水性のペプチドを吸着しやすいスチレンジビニルベンゼンポリマーを200  $\mu$ lのチップに充填したGL-Tip SDB (GL Sciences)、および親水性のペプチドを吸着しやすいグラファイトカーボンを充填したGL-Tip GC (GL Sciences) の両方を用いた。詳細は、添付されていたプロトコールに従い、それぞれ80% ACN, 0.1% TFA溶液30  $\mu$ lで溶出した。

### (4) 抗diGly抗体による免疫沈降

トリプシンで消化し、チップカラムにより脱塩・濃縮したペプチドをIAP Buffer (Cell signaling, #9993) で希釈し、Ubiquitin Remnant Motif (diGly) antibody Bead Conjugate (Cell signaling, #1990) を加えた。4°Cで2時間インキュベートし、遠心分離 (3,000 $\times$ g, 4°C) を1分間行い、上清を吸引除去、沈降物をIAP Bufferで2回、水で3回洗浄した。沈降物に0.15% TFAを加え、室温で10分インキュベートした。上清を回収し、もう一度同様に0.15% TFAによる溶出を行った。回収した溶出液をチップカラムにより脱塩・濃縮し、質量分析用のサンプルとした。

## 11. クラスタリング解析

クラスタリング解析は、クラスタリング解析ソフトCluster3.0を用い、average法により行った。また、ヒートマップはJAVA TreeViewを用いて作図した。

## 12. 統計処理

測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。各処理群間の有意差検定は、統計処理ソフト Stat view を用いた。

**Table 0-2 食餌組成**

12%カゼイン食(12C)と無タンパク質食(PF)の食餌組成

	12C	PF
Casein	14	0
$\beta$ -Corn starch	65.6	79.8
Soybean oil	10	10
Cellulose	5	5
Mineral mixture	1	4
Vitamin mixture	1	1
Choline chloride	0.2	0.2
Methionine	0.2	0

(g/100 g diet)

**Table 0-3-1 質量分析計の設定**

ショットガンプロテオミクスにおける質量分析計の設定

Properties of Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)

<b>General</b>	
User Role	Standard
Runtime	0 to 150 min
Polarity	positive
Default charge state	2
Inclusion	—
Exclusion	—
Tags	—
<b>Full MS</b>	
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	60 ms
Scan range	350 to 1300 m/z
<b>dd-MS<sup>2</sup> / dd-SIM</b>	
Resolution	17,500
AGC target	1e5
Maximum IT	60 ms
Loop count	10
TopN	10
Isolation window	2.0 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
NCE	28.0
<b>dd Settings</b>	
Underfill ratio	0.1 %
Intensity threshold	1.7e3
Apex trigger	—
Charge exclusion	unassigned, 1, 5 - 8, >8
Peptide match	on
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	90.0 s



**Table 0-3-2 質量分析計の設定**

PRM法における質量分析計の設定

### Properties of Targeted-MS<sup>2</sup>

<b>General</b>	
User Role	Standard
Runtime	0 to 90 min
Polarity	positive
Default charge state	2
Inclusion	on
<b>MS<sup>2</sup></b>	
Resolution	70,000
AGC target	1e6
Maximum IT	200 ms
Isolation window	2.0 m/z
Fixed first mass	120.0 m/z
NCE	27.0

# 第一章

## USP7 と IRS の相互作用の解析

### 緒言

序章で述べたとおり IRS を bait とした酵母 two-hybrid スクリーニングや IRS との共免疫沈降物中のタンパク質の質量分析により、IRS と結合するタンパク質として複数の脱ユビキチン化酵素が同定された。そこで本章では、まず同定されたそれぞれの脱ユビキチン化酵素が細胞内で IRS-1/2 と相互作用するかを HEK293 細胞の過剰発現系を用いた共免疫沈降法で検討した。その結果、特に IRS との相互作用が強く観察された USP7 に注目し、研究を進めた。USP7 は meprin and TRAF homology (MATH) domain と呼ばれる基質認識領域、Peptidase\_C19 domain という USP family に共通の酵素活性領域、酵素活性に必要とされる 5 つの ubiquitin like (UBL) domain を有している (Faesen *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2006)。本章の後半では、pull-down assay と共免疫沈降法を用いて、USP7 と IRS との複合体の細胞内局在の同定、USP7 と IRS の相互作用領域の決定を進め、更に、これらが直接相互作用するかを Far-Western 法で検討した。

# 結果

## 1. 過剰発現した IRS と種々の脱ユビキチン化酵素の相互作用の解析 (Fig. 1-1)

IRS 結合タンパク質として同定された脱ユビキチン化酵素 USP7、USP9X、USP25 が、細胞内で IRS と相互作用するかを共免疫沈降法で検討した。まず、FLAG-IRS-1 あるいは FLAG-IRS-2 を過剰発現した HEK293 細胞の細胞抽出液を抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。免疫沈降物を脱ユビキチン化酵素 USP7、USP9X に対する抗体を用いて immunoblotting し、IRS との相互作用を解析した。また、内在性の USP25 を検出できる抗体が存在しないため、HEK293 細胞に Myc-USP25 と FLAG-IRS-1 あるいは FLAG-IRS-2 を過剰発現し、細胞抽出液を抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。免疫沈降物を抗 Myc 抗体で immunoblotting し、IRS と USP25 の相互作用の検討を行った。その結果、USP7、USP9X は IRS-1/2 と、USP25 は IRS-2 とそれぞれ細胞内で相互作用することが明らかとなった。

今回の解析では、USP7 と IRS-1/2 の相互作用が強く観察されたため、以降 USP7 に着目することにした。

## 2. 脱ユビキチン化酵素 USP7 と IRS との相互作用の解析

### (1) MCF7 細胞に過剰発現系した USP7 と内在性 IRS-1/2 の相互作用の解析 (Fig. 1-2)

HEK293 細胞には内在性の IRS-1/2 があまり発現しておらず、検出が難しいため、内在性 IRS-1/2 の発現レベルが高く、遺伝子導入が容易な MCF-7 乳癌細胞を用いて相互作用の検討を行った。FLAG-USP7 を過剰発現した MCF-7 細胞の細胞抽出液を抗 FLAG 抗体により免疫沈降した後、免疫沈降物を内在性の IRS-1 あるいは IRS-2 に対する抗体を用いて immunoblotting し、USP7 との相互作用を調べた。その結果、IRS-1 との相互作用は検出されなかったが、IRS-2 との相互作用が観察された。

### (2) 内在性の USP7 と IRS-1/2 の相互作用の解析 (Fig. 1-3)

続いて、内在性の USP7 と IRS-1/2 の相互作用について解析した。H4-IIIE 肝癌細胞の細胞抽出液を抗 IRS-1 抗体、抗 IRS-2 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 USP7 抗体で

immunoblotting し、USP7 と IRS の相互作用を検討した。その結果、IRS-1 および IRS-2 とともに USP7 との相互作用が観察されたが、IRS-1 よりも IRS-2 との相互作用が顕著であった。

MCF-7 細胞に過剰発現した USP7 を免疫沈降した際の結果とあわせ、今後は相互作用がより強く観察された USP7 と IRS-2 について主に解析を進めることにした。

### **3. USP7 と IRS-2 の複合体の細胞内局在の同定**

#### **(1) 単離核調製法を用いた USP7 と IRS-2 の複合体の存在部位の検討 (Fig. 1-4)**

次に、USP7 と IRS-2 複合体の存在部位を検討した。主に USP7 は核に、IRS-2 は細胞質に存在することが、これまでに報告されているため(Everett *et al.*, 1997)、まず細胞を核と細胞質それ以外の画分に分画した。すなわち、H4-IIE 細胞を定法どおり遠心分離法で核とそれ以外の画分に分画後、抗 IRS-2 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、USP7 と IRS-2 の複合体は核画分には存在せず、それ以外の画分に存在した。

#### **(2) 細胞分画法を用いた USP7 と IRS-2 の複合体の細胞内局在の同定 (Fig. 1-5)**

チロシンリン酸化された IRS および IRS との結合により活性化された PI3K は、インスリン受容体が含まれる細胞膜画分ではなく、細胞質低密度 (low-density microsome: LDM) 画分という細胞内小器官を含む画分に多く存在し、この LDM 画分に存在する PI3K の活性化が、インスリン依存的な糖取り込みの促進に必須であることが示されている(Clark *et al.*, 1998)。核とそれ以外の画分の分画では、LDM 画分は核以外の画分に含まれていたため、さらに詳細に USP7 と IRS-2 複合体の細胞内局在を解析した。H4-IIE 細胞を定法どおり遠心分離法で細胞質画分と LDM 画分に分画後、抗 IRS-2 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、細胞質画分で USP7 は IRS-2 と相互作用しており、LDM 画分では USP7 と IRS-2 の相互作用が検出されなかった。

### **4. USP7 と IRS の相互作用領域の決定**

#### **(1) 種々の領域を欠失した USP7 変異体と IRS の相互作用の解析 (Fig. 1-6)**

続いて、USP7 の IRS との相互作用領域を同定した。種々の領域を欠失した USP7 変異体の GST 融合タンパク質を大腸菌に発現させ、Glutathione-Sepharose を用いて精製した。精製した変異体の GST 融合タンパク質を SDS-PAGE に供し、CBB 染色により発現を確認した。FLAG-IRS-1 または FLAG-IRS-2 を過剰発現した HEK293T 細胞の細胞抽出液とタンパク質の濃度を揃えた USP7 変異体の GST 融合タンパク質を用いて pull-down を行い、抗 FLAG 抗体により immunoblotting し、相互作用を検出した。その結果、IRS-1/2 と

に USP7 の MATH domain を含む変異体であるアミノ酸残基番号 (a.a.) 68-203 と相互作用し、それ以外の変異体とは相互作用しなかった。このことから、USP7 は MATH domain を介して IRS-1/2 と相互作用すると結論した。

## (2) USP7 と種々の領域を欠失した IRS 変異体の相互作用の解析 (Fig. 1-7, 8)

次に IRS 側の相互作用領域を解析した。種々の領域を欠失した IRS-1 および IRS-2 変異体の GFP 融合タンパク質を過剰発現した HEK293T 細胞の細胞抽出液と USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質を用いた pull-down を行った。その結果、IRS-1 に関しては、PH domain を含む変異体である a.a. 1-112、PTB domain を含む変異体である a.a. 113-256 では USP7 MATH domain との相互作用が検出されなかった。しかし、a.a. 1-256 からなる変異体で相互作用が検出され、その部分を欠いた変異体である a.a. 256-1,235 でも相互作用が検出された。一方、IRS-2 に関しては、すべての変異体で相互作用が検出された。これらの結果は、USP7 が IRS-1 と IRS-2 の複数の領域と相互作用できることを示している。

## 5. Far-Western blotting による IRS と USP7 の相互作用の解析 (Fig. 1-9)

最後に、USP7 と IRS-1 および IRS-2 が直接相互作用するかを検討するため、Far-Western blotting を行った。H4-IIE 細胞の細胞抽出液から IRS-1 および IRS-2 を免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜への転写を行った。転写した PVDF 膜に USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質を加えインキュベートし、その後、抗 GST 抗体を用いた immunoblotting を行った。その結果、IRS-1、IRS-2 とともにシグナルが検出できたことから、USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質は膜上の IRS-1/2 と直接相互作用することが明らかとなった。

## 考察

### 複数の脱ユビキチン化酵素が IRS と相互作用する意義

今回 HEK293 細胞に過剰発現した IRS と USP7 や USP9X、USP25 が相互作用することが明らかとなった (Fig. 1-1)。これにより、複数種の脱ユビキチン化酵素が IRS と相互作用することを初めて示すことができた。また、USP7 は MATH domain を介して IRS の種々の領域と相互作用することが今回明らかとなった (Fig. 1-6, 7, 8)。一方、IRS と相互作用する E3 リガーゼは、IRS のセリンリン酸化を認識して相互作用するものや、IRS の PH ドメインを認識して相互作用するものなど、IRS の様々な領域を認識して相互作用することが報告されている (Fukushima *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2008)。したがって、IRS と相互作用する E3 リガーゼはそれぞれ IRS の異なった領域にあるリジン残基をユビキチン化している可能性が考えられる。IRS の複数の領域と USP7 が相互作用するという今回の結果から、USP7 は IRS の色々な領域のリジン残基に結合しているユビキチンを脱離させることができると予想される。この点については、第二章で更に検討を加えた。

また、USP7 以外の脱ユビキチン化酵素には USP7 の IRS との相互作用領域である MATH domain がなく、当研究室の古田により、種々の領域を欠失した USP9X の変異体と IRS の相互作用の解析から、USP9X は Peptidase\_C19 domain を介して IRS と相互作用することが最近明らかとなった (古田遥, 私信)。したがって、脱ユビキチン化酵素は分子種により異なる領域を介して IRS と相互作用し、それぞれ異なるリジン残基に結合しているユビキチン鎖を脱離させるのではないかと考えている。このように、脱ユビキチン化酵素や E3 リガーゼが、それぞれが異なった機構を介して IRS と相互作用することで、特定のリジン残基のユビキチン化、脱ユビキチン化を制御し、IRS のユビキチン化状態を緻密に調節していると推定される。

### 脱ユビキチン化酵素の IRS の分子種に対する親和性の差異の意義

これまで、IRS-1 を介したシグナルと IRS-2 を介したシグナルでは発現される生理活性が異なることや (Araki *et al.*, 1994; Withers *et al.*, 1998)、臓器によってインスリン/IGF

の生理活性発現に重要な IRS の分子種が違うことが報告されている(Kerouz *et al.*, 1997; Kido *et al.*, 2000; Rome *et al.*, 2004)。今回の結果から、USP7、USP9X はともに IRS-1/2 双方の相互作用が認められたが、USP25 は IRS-2 とのみしか相互作用が観察されなかった (Fig. 1-1)。このことから、脱ユビキチン化酵素の分子種によって IRS の各分子種に対する親和性が異なると考えている。E3 リガーゼにおいても IRS の各分子種に対する親和性の違いが報告されており、MCF7 細胞において、Cul7 複合体は IRS-1 と相互作用しユビキチン化するが、IRS-2 とは相互作用しないことが明らかとなっている(Xu *et al.*, 2008)。一般に、脱ユビキチン化酵素および E3 リガーゼと基質の相互作用は、タンパク質のユビキチン化状態に良く反映されると考えられていることから(Li *et al.*, 2004)、このような親和性の違いにより、ある臓器では脱ユビキチン化酵素が IRS-1 には相互作用するが、IRS-2 には相互作用せず、E3 リガーゼも IRS-2 のみと相互作用することで IRS-2 を特異的にユビキチン化して、分解する。その結果、IRS-1 を介した生理作用のみが発現され、IRS-2 を介した生理作用は発現されないという機構が稼働する作業仮説が考えられる。脱ユビキチン化酵素と E3 リガーゼが IRS のユビキチン化状態を臓器特異的にかつその分子種によって変化させ、発現される生理活性を調節し IRS の分子種による生理的意義の差異を発揮する可能性が考えられ、今後の課題である。

## USP7 と IRS-2 の複合体の細胞内局在

細胞分画法を用いた解析から、USP7 と IRS-2 は細胞質画分で相互作用するが、LDM 画分では相互作用が見られなかった。IRS-2 が検出されなかった核画分と異なり、LDM 画分には USP7、IRS-2 両分子が存在することから、LDM 画分ではその相互作用が抑制されていると考えられた。抑制機構として、IRS-2 の分子修飾や LDM 画分特異的に USP7 と競合的に IRS-2 と相互作用するタンパク質が存在する可能性がある。USP7 と競合的に IRS-2 と相互作用するタンパク質として 2 つの候補を予想している。すなわち、1 つは今回明らかとした USP7 以外の IRS と相互作用する脱ユビキチン化酵素である。また、IRS-2 には移行シグナル配列や膜貫通ドメインがないため、我々は IRS-2 を LDM 画分に輸送するタンパク質や LDM 画分に留めておくタンパク質が存在すると考えており、これまで、IRS の輸送に AP 複合体が関与することを明らかとしてきた(Yoneyama *et al.*, 2013)。しかし、IRS を LDM 画分に留める機能を持つタンパク質は未だ見つかっていない。この IRS を LDM 画分に留める機能を持つタンパク質は LDM 画分において特異的に IRS と相互作用していると考えられるため、2 つ目の候補である。これらの候補については、今後、他の USP7 以外の脱ユビキチン化酵素と IRS 複合体の細胞内局在を検討する、各画分における IRS 結合タンパク質を質量分析計により同定し、各画分特異的に相互作用するタンパク質を解析す

ることで明らかにできると考えている。このことについては、第二章および総合討論において詳しく議論したい。

### USP7 の MATH domain を介した IRS との直接の相互作用

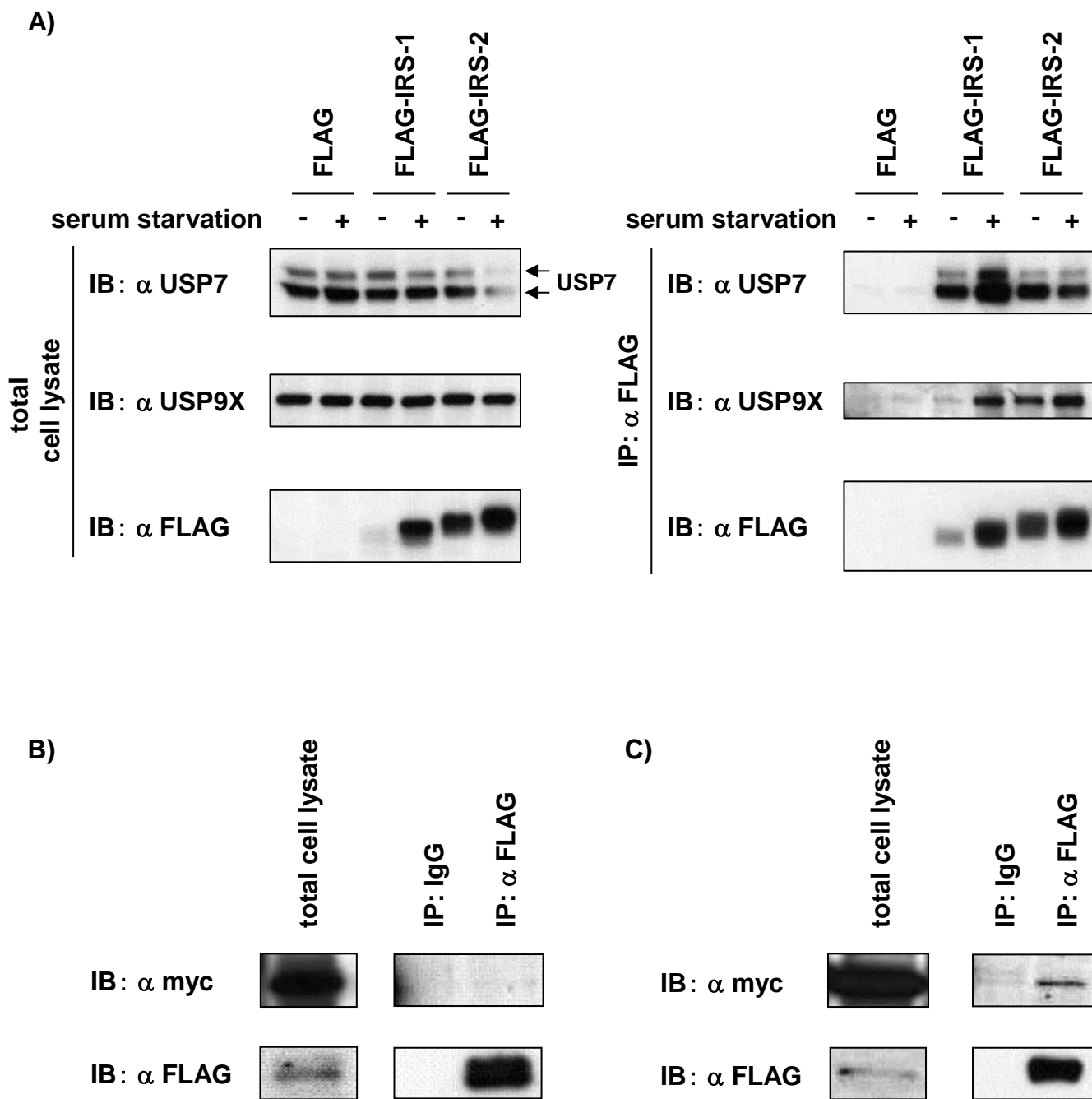
今回の結果から、USP7 と IRS が直接相互作用することがわかった (Fig. 1-6)。USP7 に存在する MATH domain は他の一般的な MATH domain と異なり P/A-x-x-S (x は任意のアミノ酸) というアミノ酸配列を認識してタンパク質に直接相互作用するという報告がある (Hu *et al.*, 2006; Saridakis *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 2006)。また、この認識配列にあるセリン残基が結合に重要であり、セリン残基がリン酸化されると、認識されなくなることが知られている (Sheng *et al.*, 2006)。この配列は IRS-1 には 33 ヶ所、IRS-2 には 34 ヶ所全体に点在している。このことから、USP7 は IRS-1/2 のこれらの配列のいずれかを介して直接相互作用することで、IRS-1/2 の複数の領域と相互作用できると考えている。このことについては、第三章において詳しく議論したい。

### まとめ

今回の結果から、初めて IRS と脱ユビキチン化酵素が相互作用することが明らかとなった。中でも USP7 は細胞質画分において、MATH domain を介して IRS-1/2 の複数の領域と直接相互作用することが示された。

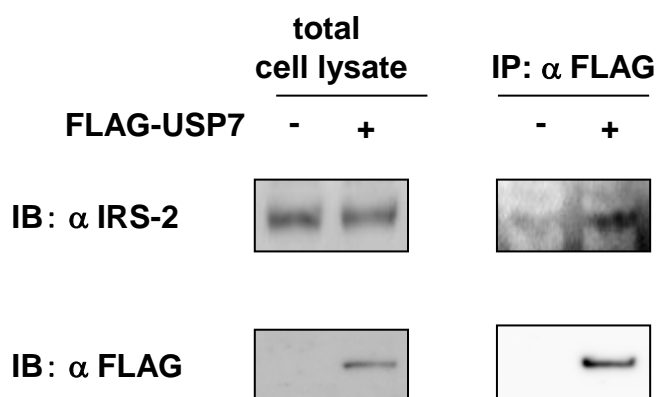
では IRS と相互作用する USP7 はどのような役割を担っているのだろうか。第二章では USP7 の IRS に対する機能について解析を進めた。





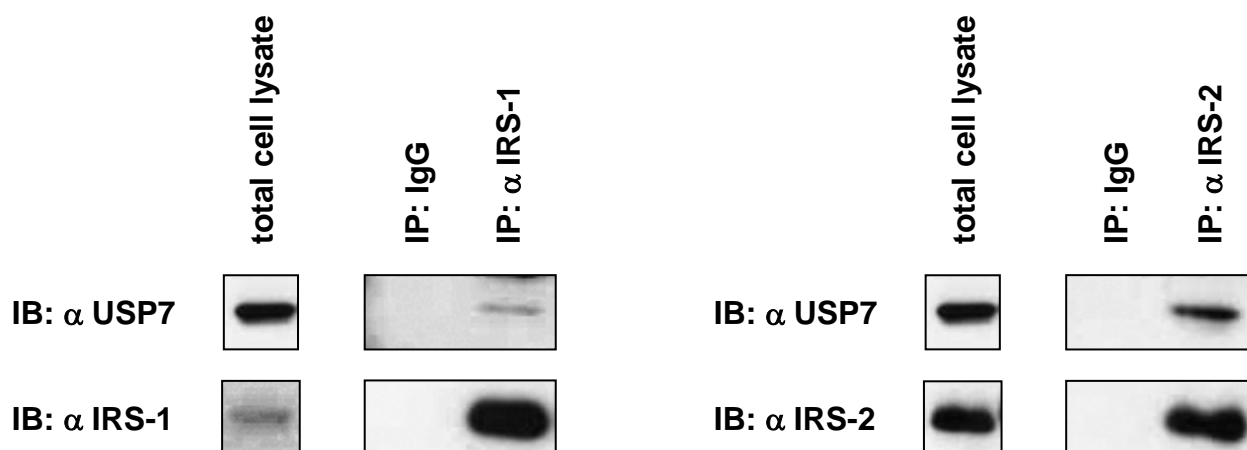
**Fig. 1-1 HEK293細胞に過剰発現したIRSと脱ユビキチン化酵素の相互作用の検討**

A) 293細胞にFLAG、FLAG-IRS-1、FLAG-IRS-2を発現するプラスミドをそれぞれ導入した。24時間培養後、血清存在下あるいは非存在下で24時間培養し、細胞抽出液を調製した。その後、抗FLAG抗体による免疫沈降を行い、SDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。なお、USP7は推定される分子量よりも大きいアイソフォームが存在し、抗USP7抗体でimmunoblottingを行うと2本のバンドが検出される。B) 293細胞にFLAG-IRS-1とmyc-USP25を発現するプラスミドを導入しA)と同様に免疫沈降、SDS-PAGE、immunoblottingを行った。なお抗IRS-1抗体の代わりに非特異的IgGを用いたものをネガティブコントロールとした。C) FLAG-IRS-1のかわりにFLAG-IRS2を発現するプラスミドを用いてA)と同様に免疫沈降、SDS-PAGE、immunoblottingを行った。



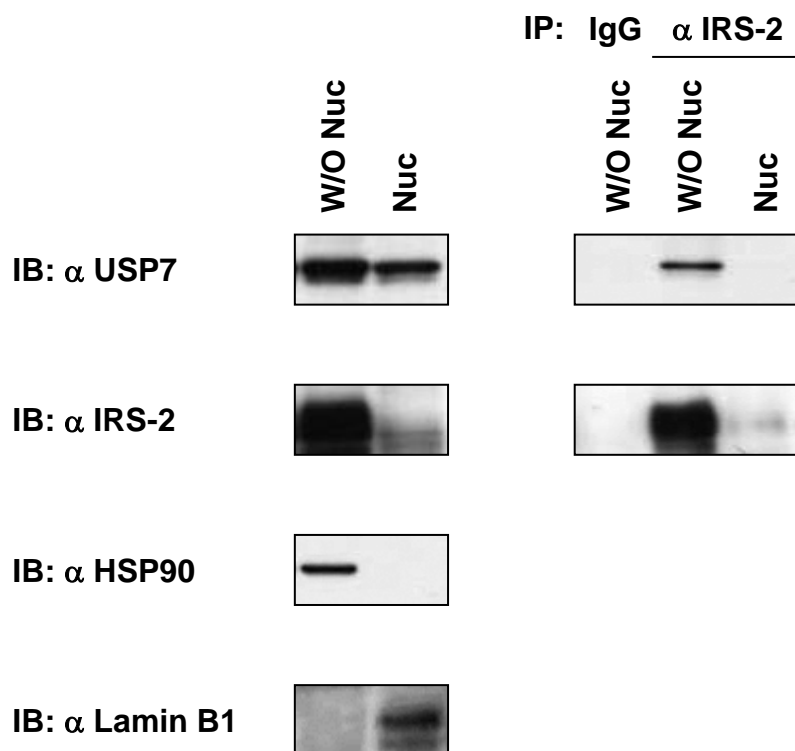
**Fig. 1-2 MCF-7乳癌細胞に過剰発現したUSP7とIRS-2の相互作用の検討**

MCF-7細胞にFLAGおよび、FLAG-USP7を発現するプラスミドをそれぞれ導入した。24時間培養後、血清非存在下で18時間培養し、細胞抽出液を調製した。その後、抗FLAG抗体による免疫沈降を行い、SDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。



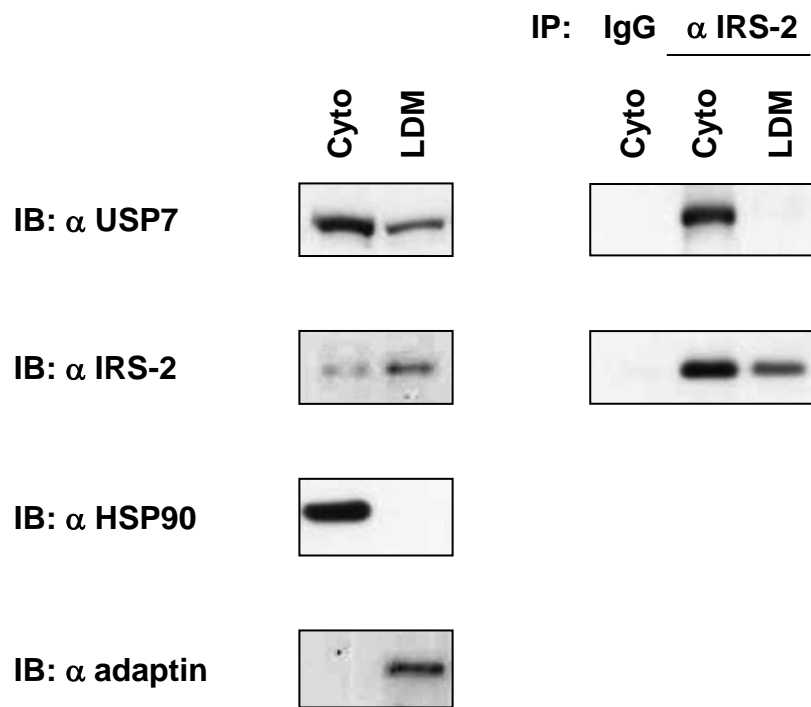
**Fig. 1-3 H4-IIE肝癌細胞における内在性のUSP7とIRS-1/2の相互作用の検討**

H4-IIE細胞を血清非存在下で24時間培養し、細胞抽出液を調製した。その後、抗IRS-1抗体、抗IRS-2抗体による免疫沈降を行い、SDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。なお、抗IRS-1抗体、抗IRS-2の代わりに非特異的IgGを用いたものをネガティブコントロールとした。



**Fig. 1-4 単離核抽出法を用いたUSP7とIRS-2の複合体の存在部位の検討**

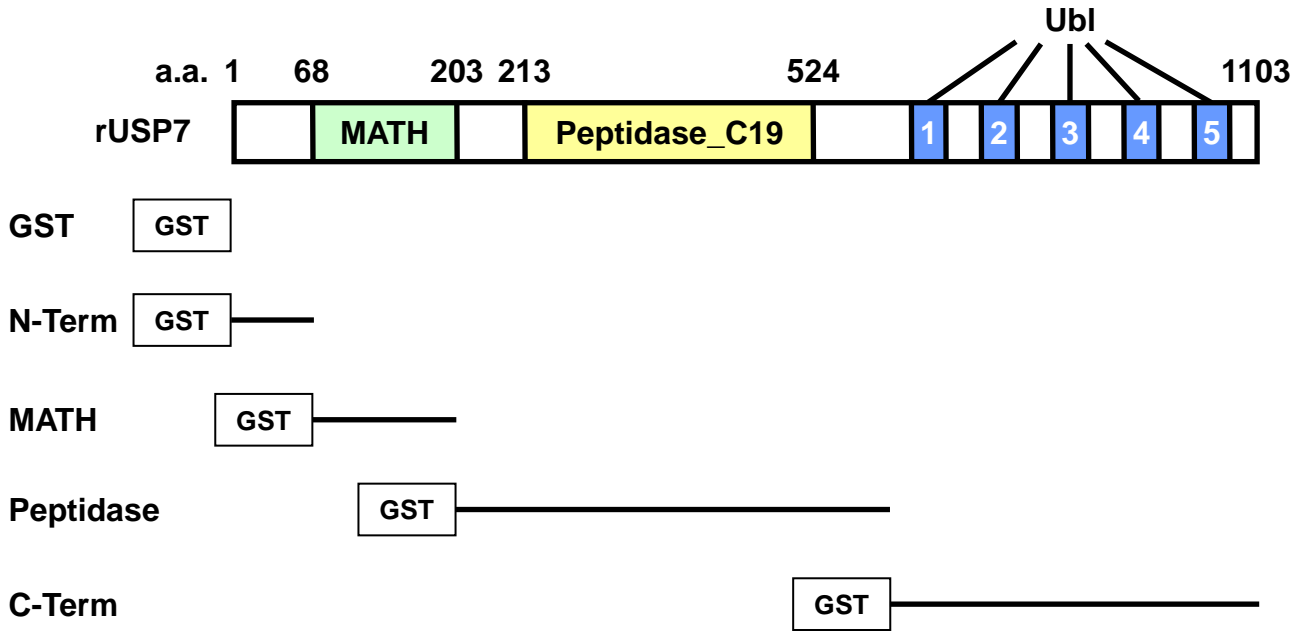
H4IIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、核画分 (Nuc) と核以外の画分 (W/O Nuc) へ分画した。各画分について、抗IRS-2抗体による免疫沈降を行った。沈降物をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体によるimmunoblottingを行った。抗HSP90抗体は核以外の画分、抗Lamin B1抗体は核画分のマーカーとして用いた。



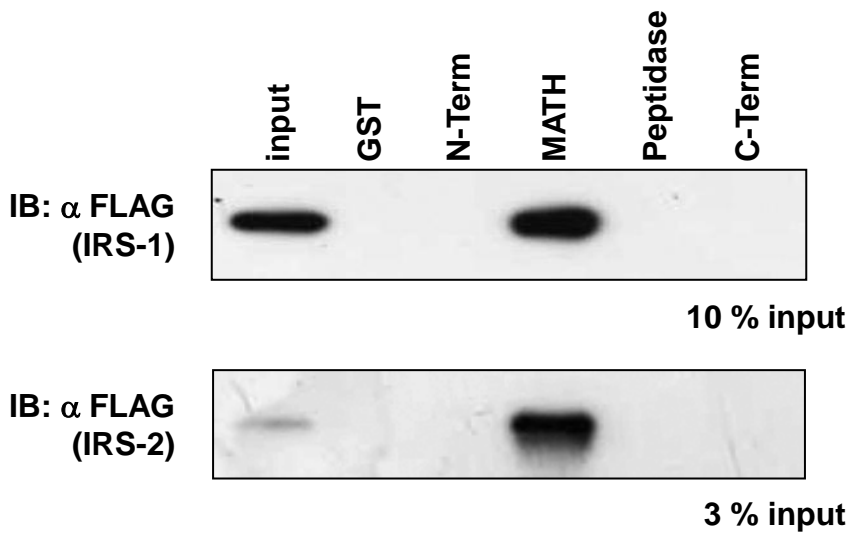
**Fig. 1-5 細胞質分画法を用いたUSP7とIRS-2の複合体の細胞内局在の同定**

H4IIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、細胞質画分 (Cyto) と細胞質低密度画分 (LDM) へ分画した。各画分について、抗IRS-2抗体による免疫沈降を行った。沈降物をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体によるimmunoblottingを行った。抗HSP90抗体は細胞質画分、抗adaptin抗体は細胞質低密度画分のマーカーとして用いた。

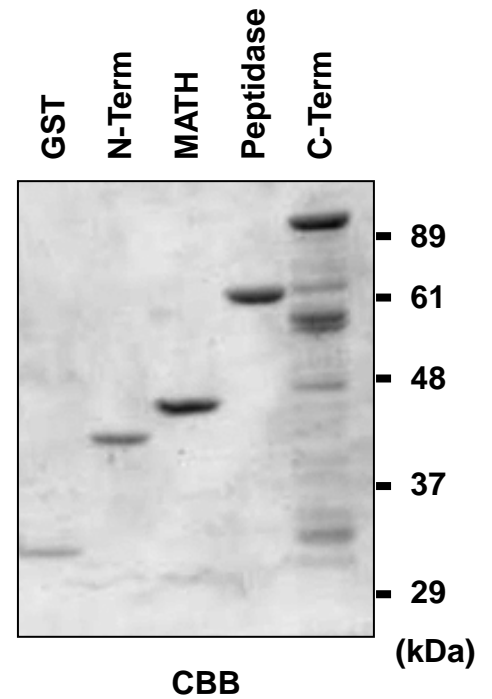
A)



B)

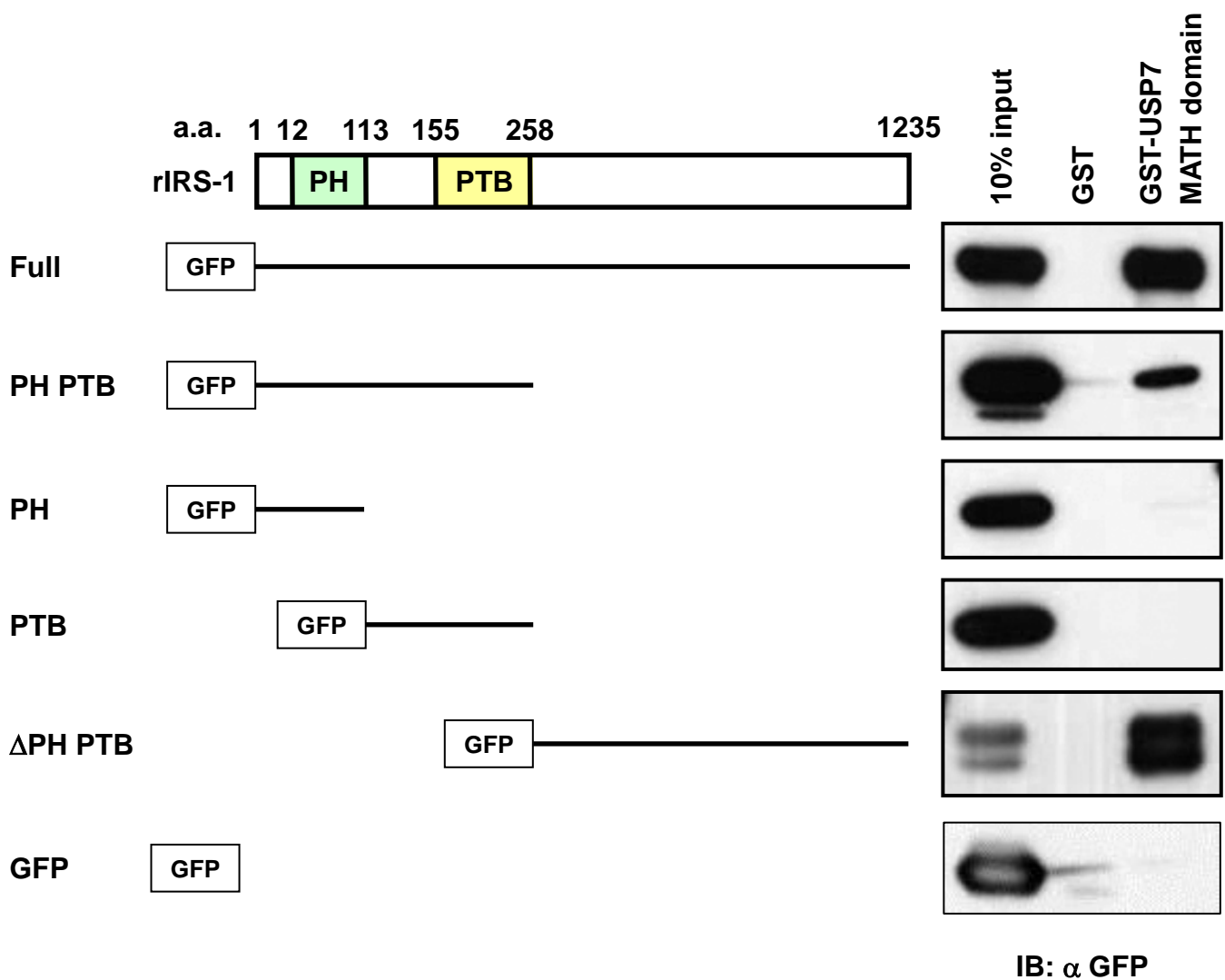


C)



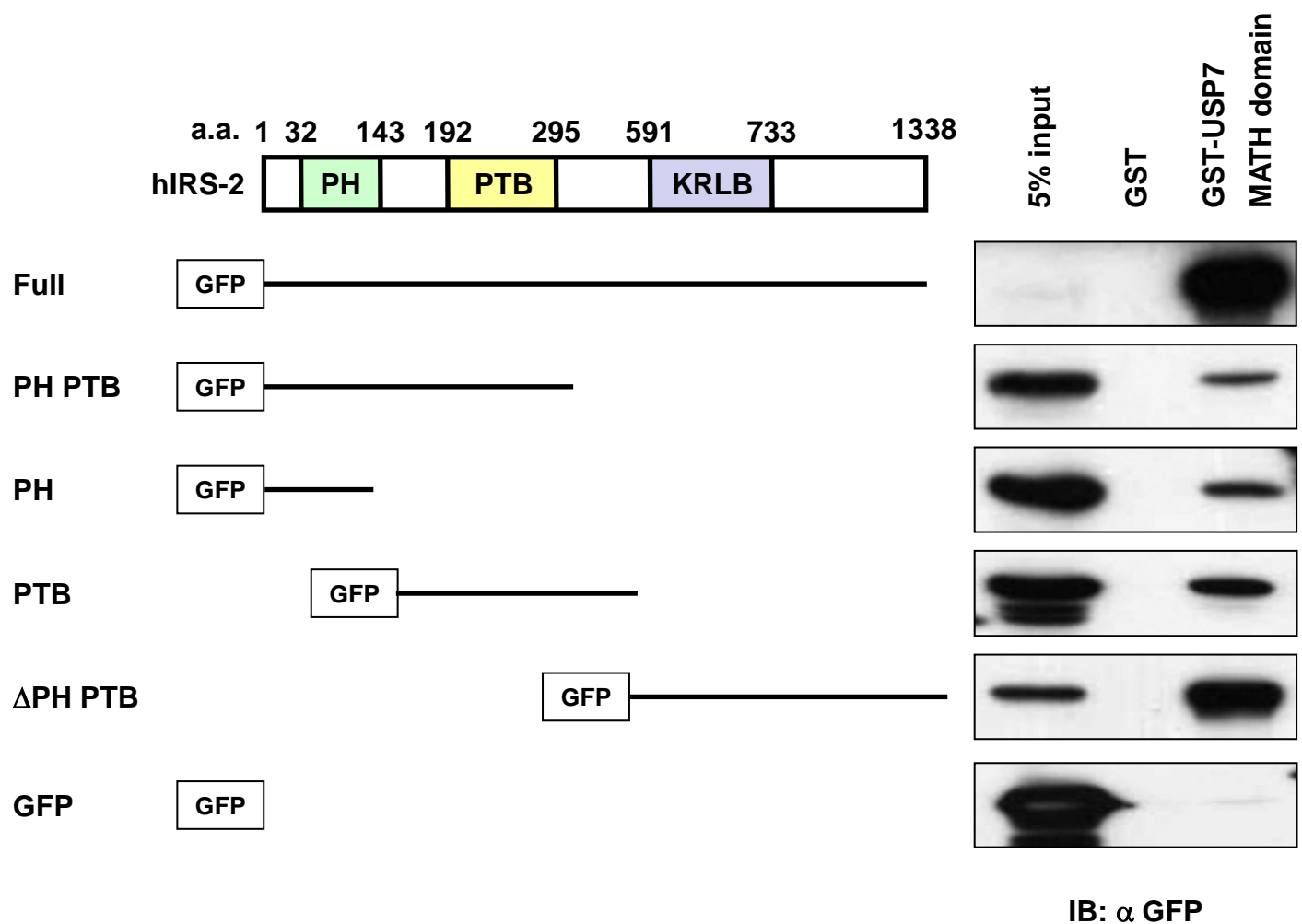
**Fig. 1-6 種々の領域を欠失したUSP7変異体とIRSの相互作用の解析**

A) USP7変異体のドメイン構造を示した。MATH domainはp53など多くの基質との結合ドメインである。Peptidase\_C19 domainはUSP familyの触媒領域でCysが活性中心となるアミノ酸残基である。5つのUbl domainは酵素活性を制御することが報告されている。N-terminal (N-Term, a.a. 1-57)、MATH domain (MATH, a.a. 68-203)、Peptidase\_C19 domain (Peptidase, a.a. 204-548)、C-terminal (C-Term, a.a. 548-1103)は用いたUSP7変異体のGST融合タンパク質。B) HEK293T細胞にFLAG-IRS-1もしくはFLAG-IRS-2を発現するプラスミドを導入した。24時間培養後、血清非存在下で24時間培養し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液に精製したGST融合タンパク質をそれぞれ加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、抗FLAG抗体を用いたimmunoblottingを行った。C)大腸菌から精製したUSP7変異体のGST融合タンパク質をSDS-PAGEに供し、CBBにより染色した。



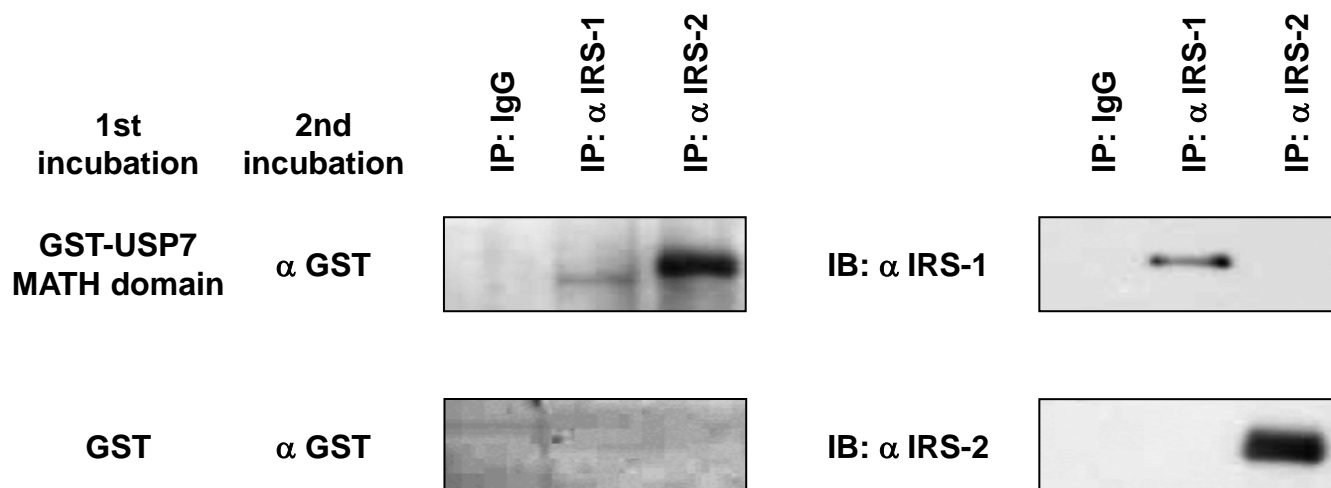
**Fig. 1-7 USP7と種々の領域を欠失したIRS-1変異体の相互作用の解析**

IRS-1変異体のドメイン構造を示した。Full length (Full, a.a. 1-1235)、PH PTB domain (PH PTB, a.a. 1-256)、PH domain (PH, a.a. 1-112)、PTB domain (PTB, a.a. 113-256)、C-terminal (ΔPH PTB, a.a. 256-1235)は用いたIRS-1変異体のGFP融合タンパク質。HEK293T細胞にGFP-IRS-1変異体を発現するプラスミドを導入した。24時間培養後、血清非存在下で24時間培養し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液に精製したGSTタンパク質をそれぞれ加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、抗GFP抗体を用いたimmunoblottingを行った。



**Fig. 1-8 USP7と種々の領域を欠失したIRS-2変異体の相互作用の解析**

IRS-2変異体のドメイン構造を示した。Full length (Full, a.a. 1-1338)、PH PTB domain (PH PTB, a.a. 1-329) PH domain (PH, a.a. 1-131)、PTB domain (PTB, a.a. 137-393)、C-terminal (ΔPH PTB, a.a. 324-1338)は用いたIRS-2変異体のGFP融合タンパク質。HEK293T細胞にGFP-IRS-2変異体を発現するプラスミドを導入した。24時間培養後、血清非存在下で24時間培養し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液に精製したGSTタンパク質をそれぞれ加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、抗GFP抗体を用いたimmunoblottingを行った。



**Fig. 1-9 Far Western blottingによるIRSとUSP7の相互作用の検討**

H4IIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、細胞抽出液を調製し、抗IRS-1抗体および抗IRS-2抗体による免疫沈降を行った。沈降物をSDS-PAGEに供し、PVDF膜への転写を行った。転写したPVDF膜に1  $\mu$ g/ $\mu$ lの精製したGSTタンパク質もしくはIRSとの相互作用部位であるUSP7 MATH domainのGST融合タンパク質をそれぞれ加え、4°Cで12時間インキュベートした。その後、抗GST抗体を用いたimmunoblottingおよび図に示した抗体によるimmunoblottingを行った。



## 第二章

# USP7 が IRS-2 のユビキチン化および量に 及ぼす影響の解析

## 緒言

第一章において、USP7 が IRS-2 と直接相互作用することが明らかとなった。そこで本章では、まず、脱ユビキチン化酵素である USP7 が IRS-2 のユビキチン化に及ぼす影響、すなわち脱ユビキチン化が起こるリジン残基を同定、またそのユビキチン化様式を解析した。USP7 の活性中心のシステインをセリンに置換した変異体が優性阻害変異体として機能することが知られているため、この変異体を用いて検討した。今回、これらを解析する手法がなかったため、新しい解析法を開発した。以下にその原理と手法を述べる。

まず、ユビキチン化リジン残基の同定法について記す。ユビキチンのモノマーをトリプシンで処理すると、トリプシンはリジン (K) とアルギニン (R) を認識して切断するため、ユビキチンは 12 種類のペプチドに分解される。ここで、ユビキチンの C 末端配列がアルギニン-グリシン (G)-グリシンであるため、C 末端配列由来のペプチドとして、GG の配列が産生される。一方、ユビキチン化タンパク質をトリプシンで処理すると、ユビキチン化リジン残基はユビキチンの C 末端と基質の K が結合しているため、トリプシンに認識されず切断されない。また、ユビキチンの C 末端配列の GG が K に付加されたままになるため、K

に GG が付加された特徴的な配列が産生される（以下、このように GG 配列が K に付加されたペプチドをユビキチン化ペプチドと呼ぶことにする）。質量分析計により、この GG 配列の結合したリジン残基の同定を試みた。

しかし、この方法では、IRS-2 やユビキチン由来のペプチドは同定されたが、IRS-2 由来のユビキチン化ペプチドは全く検出されなかったため、GG 配列の付加された K を特異的に認識する抗体、抗 Ubiquitin Remnant Motif (diGly) 抗体を用いて、ユビキチン化ペプチドを精製後、質量分析計で解析したところ、複数のリジン残基の同定に成功した。

次に、付加されたユビキチンの結合様式の解析法について述べる。タンパク質へ付加されたユビキチンの結合様式として、モノユビキチン化やマルチプルモノユビキチン化、ポリユビキチン化の可能性がある。更に、ポリユビキチン化は、ユビキチン同士が結合する際に使われるユビキチン自身のリジン残基および N 末端のメチオニン残基に応じて 8 種類の異なる連結様式が存在する (Behrends and Harper, 2011)。前述した通り、ユビキチンのモノマーをトリプシンで消化すると、12 個のペプチドが産生される。一方、ユビキチン同士が結合しているユビキチン鎖をトリプシンで消化すると、ユビキチン化タンパク質を消化した際と同様に、ユビキチンが結合していたリジン残基が切断されず、GG 配列が付加されたままになる。そのため、各連結様式に特異的な配列が産生される（以降これら特異的な配列をそれぞれ GG 配列が付加されるメチオニンおよびリジンの番号から M1、K6、K11、K27、K33、K48、K63 と呼ぶことにする）。これらの配列を質量分析計で検出、定量することで、各連結様式のユビキチンの結合量が定量できる (Tsuchiya *et al.*, 2013)。また、モノマーのユビキチンをトリプシンで消化した際に産生されるペプチドを検出、定量することで、ユビキチン単体の量も定量が可能である。さらに、定量の際には、絶対量が既知の同位体標識したペプチド、Absolute Quantification (AQUA) ペプチドを内部標準とし、MS スペクトルではなく複数の MS/MS スペクトルをモニターする PRM 法を用いることで、擬陽性を省き、50 amol ( $=50 \times 10^{-18}$ ) から絶対定量できる系が確立されている (Tsuchiya *et al.*, 2013)。この系を用いれば、基質に付加されたユビキチンの量および各連結様式の結合量を絶対定量することができる。絶対量を測定できるため、各連結様式の結合量を比較でき、どの連結様式のユビキチン鎖が多く基質に付加されているかが判断できる。また、各連結様式の結合量の和と付加されたユビキチンの量の比は、理論上、基質に 2 つ連結したユビキチン鎖が付加されている場合は 1:2 になり、3 つ連結したユビキチン鎖が付加されている場合 2:3 になる。つまり、付加されたユビキチン鎖の長さが長いほど各連結様式の結合量の和の比率が上がる。このため、この比を出すことで、基質が主にポリユビキチン化されているのか、モノユビキチン化されているのかが推定できる。今回、この手法を用いてユビキチンの量と各連結様式のユビキチンの結合量を測定するため、M1 から K63 までの各配

列、ユビキチンの量を測定するための3種類の配列（N末端配列からTITLE、TLS、ESTと呼ぶことにした）、およびそれらのAQUAペプチドの配列を解析した（Table 2-1）。また、細胞抽出液中のタンパク質を非変性条件下で免疫沈降すると、沈降物中には対象としたタンパク質以外に、共免疫沈降された相互作用タンパク質が存在する。従って、沈降物のユビキチン化状態は、対象としたタンパク質のユビキチン化状態ではなく、相互作用タンパク質を含めた複合体のユビキチン化状態が反映されている。そこで、細胞抽出液を1%SDS存在下で煮沸し、タンパク質を変性することで、相互作用タンパク質が共免疫沈降されず、対象タンパク質のみのユビキチン化状態を反映した条件で解析できる。

これらの解析の結果、USP7がIRS-2の特定のリジン残基に起こるマルチプルモノユビキチン化を脱ユビキチン化することが示された。

更に、序章で述べた通り、IRSは様々なE3リガーゼによりユビキチン化されると、プロテアソームで分解され、量が減少することが知られている（Lee *et al.*, 2000; Rui *et al.*, 2002; Usui *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008）。また、これまで、マルチプルモノユビキチン化されたタンパク質もプロテアソームにより分解されることが複数の基質において報告されている（Boutet *et al.*, 2007; Carvallo *et al.*, 2010; De Domenico *et al.*, 2006; Dimova *et al.*, 2012; Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2009; Shaeffer and Kania, 1995）。そこで、IRSの分解の制御にUSP7が関わっている可能性を検討するため、USP7の過剰発現、発現抑制、優性阻害変異体の過剰発現など、がIRS-2の量に及ぼす影響を解析した。IGFシグナルは、がん細胞の特徴的な形質の獲得・維持に重要であることが知られていることから（Belfiore *et al.*, 2009）、最後に、がん細胞におけるUSP7の脱ユビキチン化活性がIRS-2量に及ぼす影響をUSP7の阻害剤を用いて検討した。

## 結果

### 1. 抗 diGly 抗体を用いたユビキチン化リジン残基の同定

#### (1) USP7 C224S を過剰発現した細胞における IRS-2 のユビキチン化リジン残基の同定 (Fig. 2-1, 2)

USP7 の活性中心のシステインをセリンに置換した変異体 USP7 C224S が優性阻害変異体として機能するため、遺伝子の導入効率、タンパク質の発現効率が共に高い HEK293T 細胞に FLAG-IRS-2 と Myc-USP7 C224S を共発現した。ユビキチン化タンパク質を蓄積させるためプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理した後、細胞抽出液を調製し、抽出液中のタンパク質を変性後、抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。沈降物をトリプシンで消化し、チップカラムを用いて脱塩・精製後、質量分析に供した。その結果、この方法では IRS-2 やユビキチン由来のペプチドは同定されたが、IRS-2 由来のユビキチン化ペプチドは全く検出されなかった (data not shown)。

そこで、GG 配列の付加された K を特異的に認識する抗体、抗 Ubiquitin Remnant Motif (diGly) 抗体を用いて、ユビキチン化ペプチドを精製することにした。緒言で述べたように、ユビキチン鎖をトリプシン消化した際にもユビキチン化ペプチドが産生されるため、ユビキチン由来のペプチドを除く必要があった。そこで、ユビキチンは構造上、非変性状態ではトリプシンに消化されないため、タンパク質を変性させずに消化反応を行った。すなわち、FLAG-IRS-2 と Myc-USP7 C224S を共発現し、ユビキチン化タンパク質を蓄積させるため MG132 で処理した HEK293T 細胞から細胞抽出液を調製した (なお、Myc-USP7 C224S を発現するプラスミドの代わりに Myc を発現するプラスミドを導入したものを ctrl として用いた)。抽出液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、沈降物をトリプシンで消化した。消化産物を抗 diGly 抗体で免疫沈降し、沈降物を質量分析に供した。結果を解析ソフトである Protein discoverer および Protein Pilot により解析したところ、15 種類のユビキチン化ペプチドが同定された。同定されたペプチドについて、MS/MS スペクトルを観察し、解析ソフトの誤検出ではなく、実際に diGly 修飾の入った K のスペクトルがみられるかを確認した。

## (2) USP7 C224S を過剰発現した細胞における IRS-2 由来のユビキチン化ペプチドの定量 (Fig. 2-3)

次に、diGly 修飾の入った K のスペクトルが観察されたユビキチン化ペプチドについて解析ソフト Pin point で解析し、MS スペクトルのピーク面積を定量した。各ペプチドは 1-3 の電荷を持ってイオン化しており、またそれぞれが同位体ピークを持つため、ピークが複数観察された。検出された全ピークについてその面積を定量、合計値を定量結果とした。対照細胞と USP7 C224S を過剰発現した細胞での比を算出し、Fig. 2-3 にまとめた。ここに示したように、IRS-2 の 80、811、1106、1134 番目のリジン残基のユビキチン化を示すユビキチン化ペプチドが、USP7 C224S の過剰発現により対照細胞に比べて増加していた。

## 2. ユビキチンの結合様式の解析

### USP7 C224S を過剰発現した細胞内で IRS に付加されるユビキチンの結合様式の解析 (Fig. 2-4)

まず、FLAG-IRS-2 と Myc あるいは Myc-USP7 C224S を共発現し、ユビキチン化タンパク質を蓄積させるため MG132 で処理した HEK293T 細胞から細胞抽出液を調製した。抽出液中のタンパク質を変性させた後、抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。沈降物を SDS-PAGE に供し、CBB により染色、IRS-2 のバンドよりも移動度の低い部分のゲルを切り出し、トリプシンにより消化した。消化産物に AQUA ペプチド (安定同位体ラベル内部標準ペプチド) を添加し、PRM 法を用いた質量分析に供した。その結果、AQUA ペプチド由来の MS/MS スペクトル (Heavy) が検出され、それと同じ溶出時間にサンプル由来の MS/MS スペクトル (Light) のピークも観察された。このことは、この MS/MS スペクトルが目的のペプチド由来の MS/MS スペクトルであることを示している。そこで、各ペプチド由来の MS/MS スペクトルを Pin Point により定量し、ユビキチンの量および各連結様式の結合量を絶対定量した。その結果、USP7 C224S の過剰発現によって、IRS-2 と結合するユビキチンの量は約 5 倍に増加したが、各連結様式の結合量は変化が見られなかった。以上の結果から、USP7 は IRS-2 に付加されたモノユビキチンを解離する活性を有していると考えられた。

## 3. USP7 が IRS-2 の量制御に果たす役割の解析

### (1) USP7 野生型の過剰発現が IRS-2 量に及ぼす影響の解析 (Fig. 2-5)

一般にユビキチン化された IRS-2 はプロテアソームにより分解されることが報告されていることから、USP7 が IRS-2 の量制御に関わっている可能性を考えた。まず、USP7 を

過剰発現した際の IRS-2 量の変動を解析した。FLAG-IRS-2 と Myc-USP7 を過剰発現した HEK293 細胞の細胞抽出液を抗 IRS-2 抗体により immunoblotting し、IRS-2 量の変動を解析した。その結果、Myc-USP7 の過剰発現により対照細胞に比べ IRS-2 量が約 20%増加した。なお、Myc-USP7 を過剰発現し、抗 USP7 抗体で immunoblotting した際にバンドがあらたに検出されたのは、ヒト由来の HEK293 細胞に分子質量が異なるラット由来の USP7 を過剰発現したためである。

### (2) USP7 の発現抑制が IRS-2 量に及ぼす影響の解析 (Fig. 2-6)

続いて、内在性の USP7 を発現抑制した際の IRS-2 量の変動を解析した。RNAi 法によって H4-IIE 細胞の内在性の USP7 を発現抑制した。細胞抽出液を抗 USP7 抗体で immunoblotting した結果、siRNA の導入により USP7 量が減少することが確認できた。そこで、この細胞の IRS-2 量の変動を抗 IRS-2 抗体による immunoblotting により解析したところ、USP7 の発現抑制により IRS-2 量が約 40%に減少した。

### (3) 細胞質画分および LDM 画分において、USP7 の発現抑制が IRS-2 量に及ぼす影響の解析 (Fig. 2-7)

USP7 は細胞質画分において IRS-2 と相互作用している一方、LDM 画分では相互作用していないことから、USP7 を発現抑制した際の細胞質画分、LDM 画分において IRS-2 量の変動を解析した。RNAi 法によって H4-IIE 細胞の内在性の USP7 を発現抑制した後、定法どおり遠心分離法で細胞質画分と LDM 画分に分画した。抗 IRS-2 抗体により immunoblotting し、各画分における IRS-2 量の変動を解析した結果、細胞質画分だけでなく、LDM 画分でも IRS-2 量が減少していることがわかった。

### (4) USP7 の発現抑制が IRS-2 の分解に及ぼす影響の解析 (Fig. 2-8)

USP7 の発現抑制により、IRS-2 量の減少が認められたことから、次に、USP7 の発現抑制が IRS-2 の分解に及ぼす影響を解析した。RNAi 法によって H4-IIE 細胞の内在性の USP7 を発現抑制した後、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide (CHX) で処理し、細胞抽出液を調製した。抗 IRS-2 抗体により immunoblotting し、CHX 添加後からの経時的な IRS-2 量の減少を解析した。その結果、USP7 の発現抑制により、IRS-2 の分解速度が亢進していることが明らかとなった。

**(5) USP7 C224S の過剰発現が IRS-2 量に及ぼす影響の解析 (Fig. 2-9)**

次に、USP7 の優性阻害変異体である USP7 C224S を用いて、USP7 の脱ユビキチン化活性が IRS-2 量に及ぼす影響を検討した。HEK293 細胞に FLAG-IRS-2 と Myc-USP7 C224S を過剰発現し、細胞抽出液を抗 IRS-2 抗体で immunoblotting することにより、IRS-2 量を測定した。その結果、Myc-USP7 C224S の過剰発現により対照細胞と比べて IRS-2 量が約 40% に減少することが明らかとなった。

**(6) USP7 C224S を過剰発現した細胞においてプロテアソーム阻害剤処理が IRS-2 の量およびユビキチン化に及ぼす影響の解析 (Fig. 2-10)**

USP7 の脱ユビキチン化活性を阻害した結果、IRS-2 量が減少したことから、この IRS-2 量の減少はユビキチン-プロテアソーム系による IRS-2 の分解が原因と予想された。そこで、USP7 の優性阻害変異体の過剰発現時にプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理し、IRS-2 量を解析した。すなわち、HEK293 細胞に FLAG-IRS-2 と Myc-USP7 C224S を過剰発現し、MG132 で処理後、細胞抽出液を抗 IRS-2 抗体で immunoblotting した。USP7 C224S を過剰発現した際に MG132 を処理すると、処理しない場合に比べ IRS-2 量が増加した。

更に、MG132 を処理した際の IRS-2 のユビキチン化を解析した。HEK293T 細胞に FLAG-IRS-2 と Myc-USP7 C224S を過剰発現し、MG132 で処理した。細胞抽出液中のタンパク質を変性させた後、抗 FLAG 抗体により免疫沈降し、抗 ubiquitin 抗体を用いた immunoblotting を行った。その結果、USP7 C224S を過剰発現し、MG132 を処理すると IRS-2 のユビキチン化量が増加していた。このことは、優性阻害変異体を過剰発現した際の IRS-2 量の減少が、ユビキチン-プロテアソーム系による分解を介していることを示している。

**4. USP7 の阻害剤添加が IRS-2 量に及ぼす影響の解析 (Fig. 2-11)**

最後に、USP7 の活性阻害剤 P5091 を用いて、がん細胞における USP7 の脱ユビキチン化活性が内在性の IRS-2 量に及ぼす影響を検討した。A431 ヒト扁平上皮がん細胞、DU145 ヒト前立腺癌細胞、H4-IIE 細胞、HeLa ヒト子宮頸癌細胞、MCF-7 ヒト乳腺癌細胞、PC-3 ヒト前立腺癌細胞を用いた。種々の細胞に終濃度 25、50  $\mu$ M の P5091 を添加し 24 時間培養した。DU145 細胞および H4-IIE 細胞は、細胞が死滅してしまったため、解析ができなかった。一方その他の細胞については、細胞抽出液を調製し、抗 IRS-2 抗体で immunoblotting を行った。その結果、A431 細胞および MCF-7 細胞において、P5091 添加により IRS-2 量の減少が認められた。

## 考察

### 今回開発したユビキチン化リジン残基同定法の有用性

#### 1) 感度

今回行った抗 diGly 抗体を用いたユビキチン化リジン残基の同定法は、非常に感度よくユビキチン化ペプチドを検出できる方法である (Fig. 2-1, 2)。抗 diGly 抗体を用いない場合には、非常にノイズが高く、対象とするペプチドが微量であるため、対応するピークを識別、定量することは難しく、IRS-2 由来のユビキチン化ペプチドが全く検出されなかった。これに対して、抗 diGly 抗体を用いて免疫沈降することで、サンプルに含まれるペプチドの種類が非常に少なくなり、MS スペクトルが単純になるため、ノイズが低くなり、非常に鋭いピークの形状の MS スペクトルが検出され、定量も可能になった (Fig. 2-3)。

#### 2) input の量

また、抗 diGly 抗体を用いた方法では、解析するタンパク質の量も減らすこともできた。抗 diGly 抗体を用いない方法では、微量のユビキチン化ペプチドを検出するために多量の input が必要であり、定量ができないため ctrl との比較ができず、内在性のタンパク質や薬剤処理の影響を排除できない。一方で、今回の方法では、ユビキチン化ペプチドを精製するため、比較的少量の input で十分検出が可能であり、ctrl との比較定量により内在性のタンパク質や薬剤処理の影響を除外することができる点でも優れていると言える。実際、USP7 C224S を過剰発現した細胞における IRS-2 のユビキチン化リジン残基を同定する際には、抗 diGly 抗体を用いない方法では 10 枚分の 100 mm dish より回収した lysate を用いてもユビキチン化ペプチドが検出されなかったのに対し、今回の方法では、3 枚分の 100 mm dish より回収した lysate から複数種のユビキチン化ペプチドを検出できた。また、Myc-USP7 C224S を過剰発現したサンプルと同時に Myc を過剰発現したサンプルも解析し、ユビキチン化ペプチドの量を比較定量することで、プロテアソーム阻害剤 MG132 の処理や内在性の E3 リガーゼ、脱ユビキチン化酵素の影響を除き、USP7 C224S の過剰発現のみの影響によりユビキチン化が変動するリジン残基を同定することができた。



### 3) サンプル調製の手間

この同位体標識などを行わないラベルフリーの定量法は、安定同位体を用いた SILAC 法やユビキチンの結合様式を解析する際に用いた AQUA ペプチドを用いた絶対定量法と比べると、事前に特別な処理を必要としない、安価な優れた方法であると言える。

## USP7 が脱ユビキチン化する IRS-2 のリジン残基

抗 diGly 抗体を用いた解析により、USP7 C224S の過剰発現によって、IRS-2 の 80、811、1106、1134 番目のリジン残基のユビキチン化が亢進していることが明らかとなった (Fig. 2-2, 3)。この結果から、USP7 はこれらリジン残基に結合したユビキチン鎖を脱離する活性を有していると考えられた。第一章の結果から、USP7 は IRS-2 の複数の領域と相互作用することが明らかとなっているため、USP7 は IRS-2 の複数の領域と相互作用することでこれら複数のリジン残基の脱ユビキチン化を行っていると考えている。

一方、ユビキチン化が検出されたが、ctrl と比較して USP7 C224S の過剰発現ではユビキチン化ペプチドの量が変化しなかったリジン残基が複数存在した。これらのリジン残基は内在性に発現している E3 リガーゼによってユビキチン化されるが、USP7 の標的とならないリジン残基であると考えられる。あるいは、これらのリジン残基の脱ユビキチン化には、今回 IRS と相互作用することが示された USP9X や USP25 が関与している可能性も考えられる。今後は、これらの酵素による脱ユビキチン化リジン残基も同定し、USP7 の結果と比較し、同じリジン残基の脱ユビキチン化を担っているのか、それとも今回同定された USP7 の標的とならないリジン残基などの他のリジン残基の脱ユビキチン化を担っているのか解析していきたい。

また、序章でも述べた通り、これまで複数種の E3 が IRS をユビキチン化することが報告されている。今後、これらの E3 がユビキチン化する IRS のリジン残基を同定し、USP7 や USP9X, USP25 による脱ユビキチン化リジン残基と比較することで、これら脱ユビキチン化酵素と拮抗的に働く E3 をそれぞれ探索したいと考えている。

## USP7 によって脱ユビキチン化されるユビキチンの結合様式の意義

AQUA ペプチドを用いた絶対定量により、USP7 C224S の過剰発現によって、IRS-2 に付加されるユビキチンの量は約 5 倍に増加したが、各連結様式の結合量は変化が見られなかった (Fig. 2-4)。このことは、USP7 は IRS-2 のポリユビキチン鎖を脱離させるのではなく、モノユビキチンを脱離させることを示している。前述の結果と併せると、USP7 は少なくとも 80、811、1106、1134 番目のリジン残基を含む IRS-2 の複数のモノユビキチンを脱離する活性を持つと結論した。タンパク質のモノユビキチン化やマルチプルモノ

ユビキチン化はこれまでタンパク質の細胞内局在や転写の制御に関与していると考えられてきた(Hicke, 2001)。また、プロテアソームの構造解析から、プロテアソームは4つ以上のユビキチン鎖を認識に必要とすることが知られており(Thrower *et al.*, 2000)、これはモノユビキチン化やマルチプルモノユビキチン化が分解誘導に関与しないことを示唆していた。しかし、近年、モノユビキチン化はタンパク質の分解を誘導しうることが複数の基質で報告されており(Boutet *et al.*, 2007; De Domenico *et al.*, 2006; Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2009; Shaeffer and Kania, 1995)、現在、ユビキチン-プロテアソーム系分解機構における大きな謎とされている。また、150 アミノ酸以下の大きさのタンパク質はモノユビキチン化によっても分解が誘導されるが、それ以上の大きさのタンパク質はポリユビキチン化が必要であるという報告もある(Shabek *et al.*)。IRS-2は1,000アミノ酸を超えるタンパク質であり、この法則に外れているため、IRS-2を対象に研究を進めることで、この謎が解明できるのではないかと期待している。

### IRS 量の制御における USP7 の役割

USP7の過剰発現によりIRS-2量が増加し、USP7の発現抑制によりIRS-2量が減少した(Fig. 2-5, 6)。また、USP7の発現抑制によってIRS-2の分解が亢進されていた(Fig. 2-8)これらの結果は、USP7がIRSの分解を抑制する機能を発揮していることを示している。さらに、基底状態のHEK293細胞に、USP7の優性阻害変異体を過剰発現し、内在性のUSP7の脱ユビキチン化活性を阻害したところ、IRS-2量が減少し、この際にプロテアソームの阻害剤を処理すると、IRS-2のユビキチン化が増加し、IRS-2量の減少が抑制された(Fig. 2-9, 10)。このことから、優性阻害変異体を過剰発現した際のIRS-2量の減少は、ユビキチン-プロテアソーム系による分解を介していることが明らかとなった。一連の結果より、基底状態において、内在性のUSP7はIRS-2を脱ユビキチン化しており、IRS-2がユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されるのを抑制することでIRSの量を維持していると結論した。この結果から、IRS量の制御には、今まで信じられてきたE3リガーゼによる制御だけでなく、脱ユビキチン化酵素による制御も重要な役割を果たしており、E3リガーゼによるユビキチン化反応と脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン化反応のバランスによってIRS量が制御されていることを初めて明らかにすることができた。

## IRS-2 と USP7 複合体の細胞内局在と USP7 による IRS-2 量の制御

第一章において、USP7 は IRS-2 と細胞質画分では相互作用しているが、LDM 画分では相互作用していないことが明らかとなった。一方、USP7 の発現抑制によって、細胞質画分だけでなく、LDM 画分でも IRS-2 量の減少が見られた (Fig. 2-7)。このことは、USP7 が細胞質の IRS-2 だけでなく、LDM 画分の IRS-2 の量も制御していることを示している。これまで、AP-1 と呼ばれる輸送タンパク質によって、新規合成された IRS が LDM 画分へ輸送されることを我々は報告してきた (Yoneyama *et al.*, 2013)。また、インスリンで刺激した細胞において、IRS は LDM 画分から細胞質画分へ移行し、その後細胞質画分でプロテアソームによって分解されることも報告されている (Clark *et al.*, 1998)。このことは、LDM 画分の IRS はユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けないことを示唆している。しかし、刺激されていない細胞において、LDM 画分の IRS がどのように分解されるかなど、IRS の局在と量制御の関係は未だ明らかになっていない点が多い。したがって、USP7 を発現抑制した際に LDM 画分における IRS-2 量も減少する機構を調べることは、このような局在制御の解明に繋がる可能性がある。今後、USP7 を発現抑制した細胞における各画分の IRS の分解速度を測定する、プロテアソームをはじめとしたタンパク質分解系の種々の阻害剤を添加し、どの阻害剤を添加した際にどの画分で IRS が蓄積されるかを検討するなどにより、どの画分でどのような系を介して IRS が分解されているのかを明らかにしていきたい。

### まとめ

本章の結果より、USP7 が IRS-2 の 80、811、1106、1134 番目のリジン残基に付加されたモノユビキチンを解離することで IRS-2 の分解を抑制し、その量を維持していることが明らかとなった。このことから、IRS のユビキチン化およびそれに伴う量の制御は今まで一般的に受け入れられてきた E3 リガーゼによるユビキチン化反応だけでなく、USP7 による脱ユビキチン化も関わっており、その両反応のバランスによって制御されていると結論した。これにより、IRS の量制御に脱ユビキチン化が関わるということが初めて示された。

そこで、第三章では、IRS への脱ユビキチン化が変動する細胞外因子の刺激を探索した。

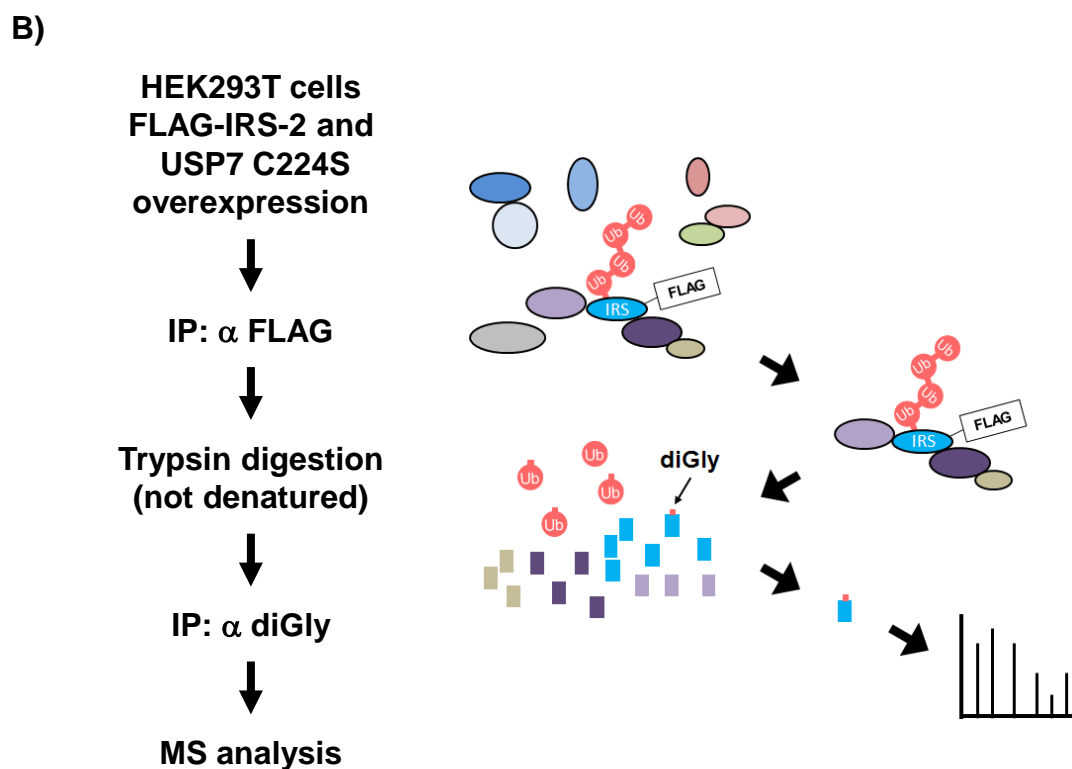
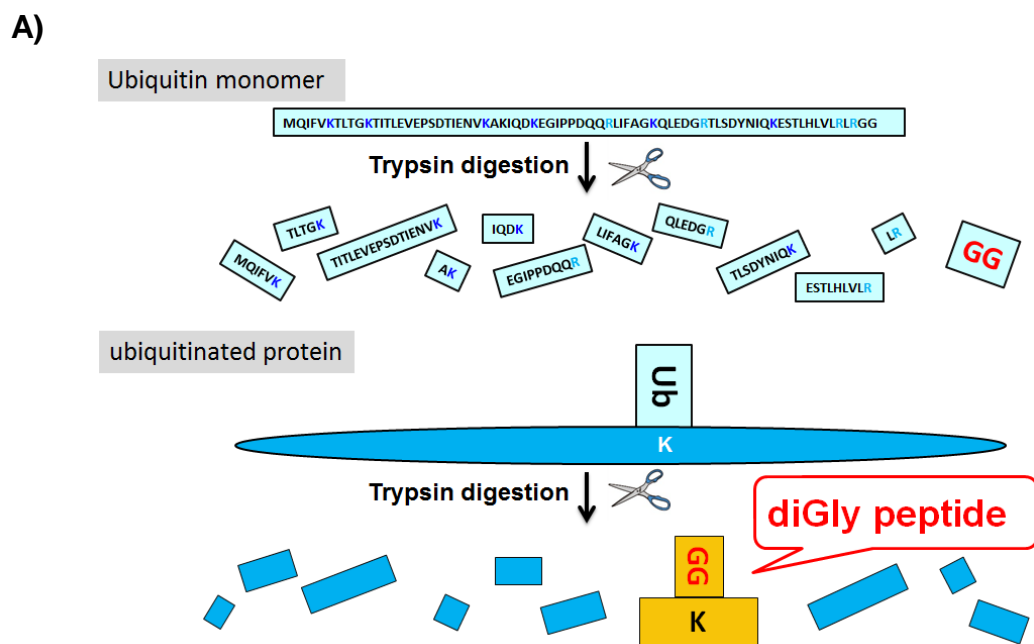
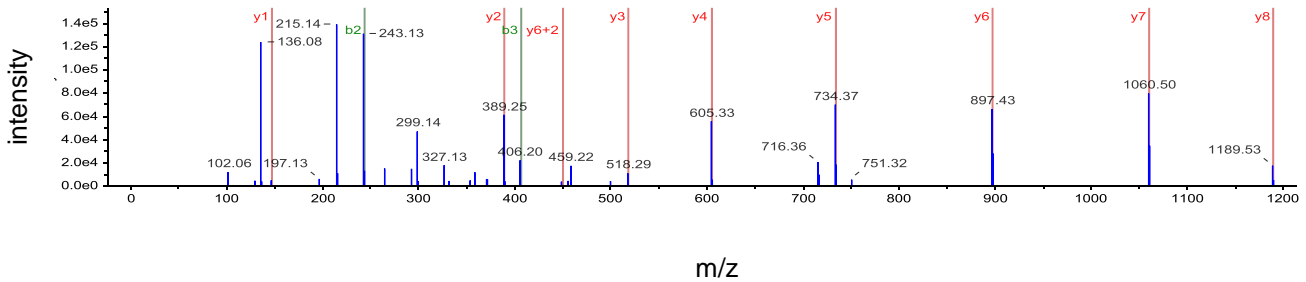


Fig. 2-1 ユビキチン化リジン残基同定法の模式図

A) ユビキチンをトリプシンにより消化すると、C末端由来の2つのグリシンが連なったペプチドが産生される。タンパク質がユビキチン化される際には、ユビキチンのC末端と基質タンパク質のリジンが共有結合するため、ユビキチン化タンパク質のトリプシン消化物にはリジンに2つのグリシンが結合した特異的なモチーフが産生される。B) USP7によるIRSの脱ユビキチン化リジン残基同定法の流れを模式図で示した。

A)

LEYYESEK(diGly)K



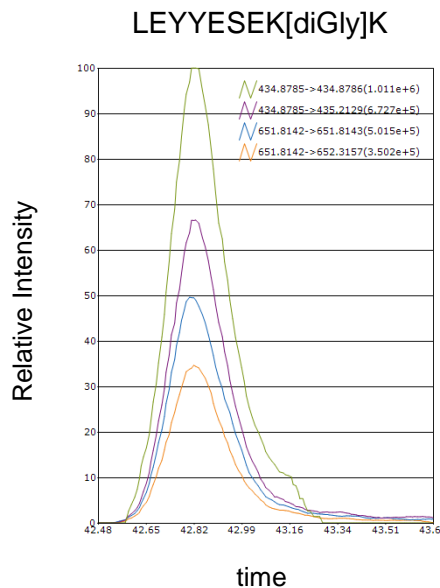
B)

K site	Protein Discoverer		Protein Pilot	
	ctrl	USP7 C224S	ctrl	USP7 C224S
K80	LEYYESEkK	LEYYESEkK	LEYYESEkK	LEYYESEkK
K80				YYESEkK
K85	SkAGAPK	SkAGAPK	SkAGAPK	SkAGAPK
K90	AGAPkR	AGAPkR	AGAPkR	AGAPkR
K103			VIALDCCLNINkR	VIALDCCLNINkR
K110	HkYLIALYTK	HkYLIALYTK	HkYLIALYTK	HkYLIALYTK
K203	EVWQVNLkPK	EVWQVNLkPK	EVWQVNLkPK	EVWQVNLkPK
K205	EVWQVNLKPkGLGQ SK	EVWQVNLKPkGLGQ SK	EVWQVNLKPkGLGQ SK	EVWQVNLKPkGLGQ SK
K205			LKPkGLGQSK	
K211	GLGQSkNLtGVYR	GLGQSkNLtGVYR	GLGQSkNLtGVYR	GLGQSkNLtGVYR
K295	ALKELFEFRPR	ALKELFEFRPR		
K305	SkSQSSGSSATHPIs VPGAR	SkSQSSGSSATHPIs VPGAR	SkSQSSGSSATHPIs VPGAR	SkSQSSGSSATHPIs VPGAR
K811				SYkAPY
K1106	VASPTSGVkR		VASPTSGVkR	
K1134	GAKVIR		GAKVIR	

Fig. 2-2 USP7の優性阻害変異体を過剰発現した細胞におけるIRS-2のユビキチン化リジン残基の同定

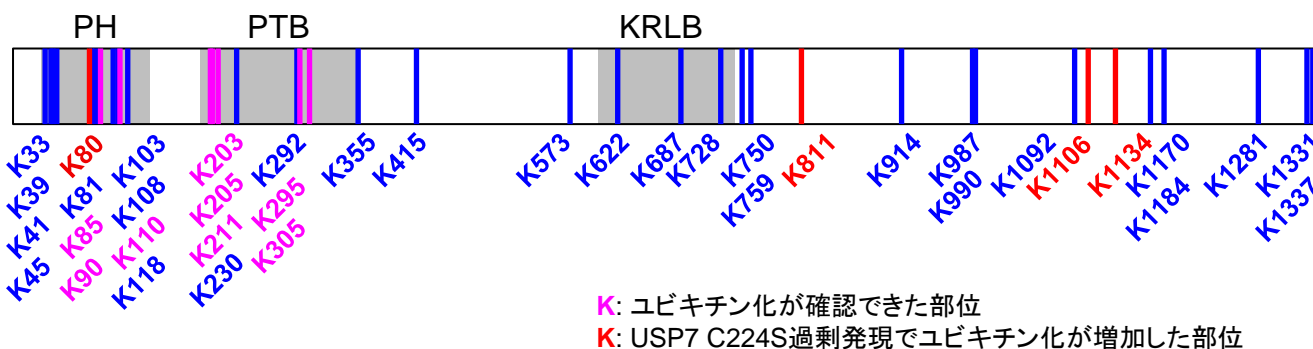
A) HEK293T細胞にFLAG-IRS-2を発現するプラスミドと共にUSP7の優性阻害変異体、Myc-USP7 C224Sを発現するプラスミドを導入した。24時間培養後、血清非存在下で18時間培養し、20 μMのMG132で2時間処理した。細胞抽出液を調製し、抗FLAG抗体で免疫沈降を行った。沈降物をトリプシンで消化し、消化産物をチップカラムで精製した。精製物を抗diGly抗体で免疫沈降し、0.15% TFAにより溶出、再度チップカラムで精製し、質量分析に供した。結果を解析ソフトProtein DiscovererおよびProtein Pilotで解析し、得られたIRS由来のユビキチン化ペプチドについて、MS/MSスペクトル上でdiGly修飾の入ったリジン残基のピークが観察されるか確認した。同定されたユビキチン化ペプチドのMS/MSスペクトルの一例を示した。なお、Myc-USP7 C224Sを発現するプラスミドの代わりにMycを発現するプラスミドを導入したものをctrlとして用いた。B) 同定されたユビキチン化ペプチドの一覧を示した。K siteはdiGly修飾の入ったIRSのリジン残基をN末端から数えた番号を示している。赤字はMS/MSスペクトル上でdiGly修飾の入ったリジン残基のピークが検出された配列、配列中の小文字のkはdiGly修飾がされているリジン残基を示している。

A) B)



K site	ctrl	USP7 C224S	USP7 C224S/ctrl
K80	3.84E+07	1.15E+09	29.79
K90	2.54E+06	2.53E+06	0.99
K110	5.34E+06	4.64E+06	0.87
K203	4.27E+07	3.67E+07	0.86
K205	2.51E+07	2.28E+07	0.90
K211	9.97E+07	7.04E+07	0.71
K811	1.40E+06	9.92E+06	7.09
K1106	1.26E+06	3.86E+06	3.06
K1134	6.16E+05	2.49E+06	4.04

C)



D)

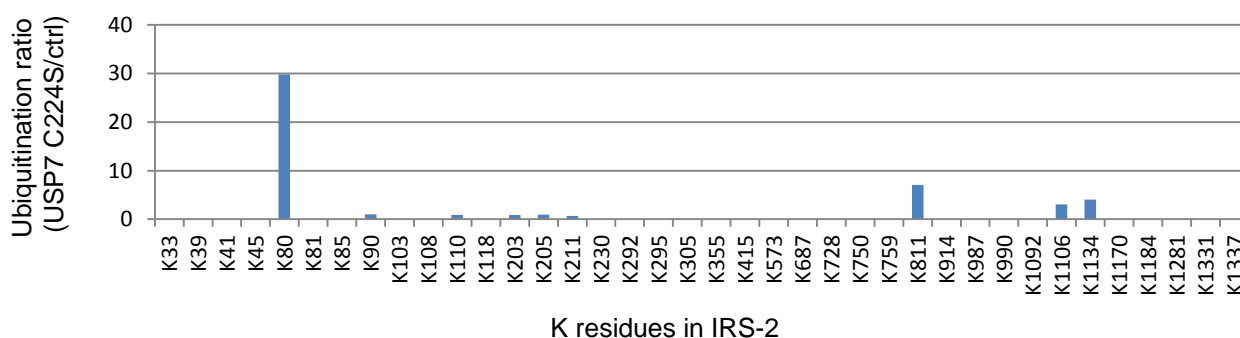


Fig. 2-3 USP7の優性阻害変異体を過剰発現した細胞におけるIRS-2由来のユビキチン化ペプチドの定量

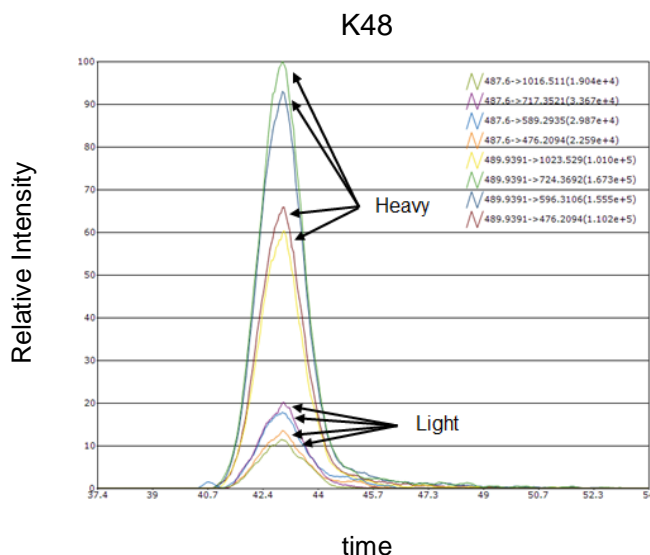
A) 同定されたユビキチン化ペプチドを解析ソフトPin pointで解析し、MSスペクトルのピークエリア面積を定量した。一例として、測定に用いたユビキチン化ペプチドのうち、80番目のリジン残基のユビキチン化を示すペプチドのMSスペクトルを示した。1種類のペプチドが2種類の異なる電荷を持ってイオン化し、更にそれぞれが同位体ピークを持つため、計4種類のピークが観察された。B) 検出されたピークの面積の合計を定量値とし、ctrlとUSP7 C224S過剰発現での比を表にまとめた。C) IRS-2のリジン残基および今回同定されたユビキチン化リジン残基の模式図を示した。D) ctrlとUSP7 C224S過剰発現での各リジン残基におけるユビキチン化ペプチドの量比をグラフ化した。

**Table 2-1 ユビキチンの結合様式の解析に用いたペプチド**

IRSに付加されたユビキチンの結合様式の解析に用いたペプチドの略称と電荷、配列の一覧。  
M1-K63は各連結様式の結合量、TITLE、TLS、ESTはユビキチンの量の定量に用いた。  
[Oxid]は酸化、[GG]はユビキチン化を示している。

略称	電荷 [z]	配列
M1	2	GGM[Oxid]QIFVK
K6	3	M[Oxid]QIFVK[GG]TLTGK
K11	3	TLTGK[GG]TITLEVEPSDTIENVK
K27	3	TITLEVEPSDTIENVK[GG]AK
K29	2	AK[GG]IQDK
K33	3	IQDK[GG]EGIPPDQQR
K48	3	LIFAGK[GG]QLEDGR
K63	3	TLSDYNIQK[GG]ESTLHLVLR
	4	
TITLE	2	TITLEVEPSDTIENVK
TLS	2	TLSDYNIQK
EST	2	ESTLHLVLR

A)

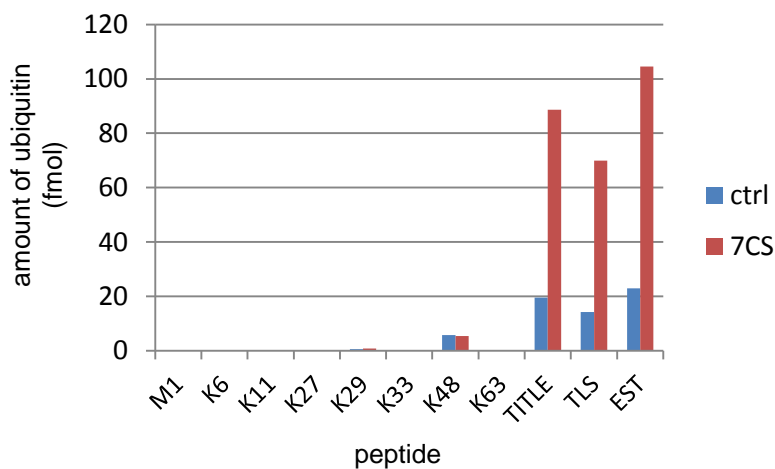


B)

	M1	K6	K11	K27	K29	K33	K48	K63	TITLE	TLS	EST
ctrl	0.00	0.00	0.06	0.00	0.57	0.02	5.82	0.03	19.53	14.25	22.95
7CS	0.00	0.00	0.06	0.00	0.87	0.09	5.49	0.02	88.65	69.93	104.5

単位: fmol

C)

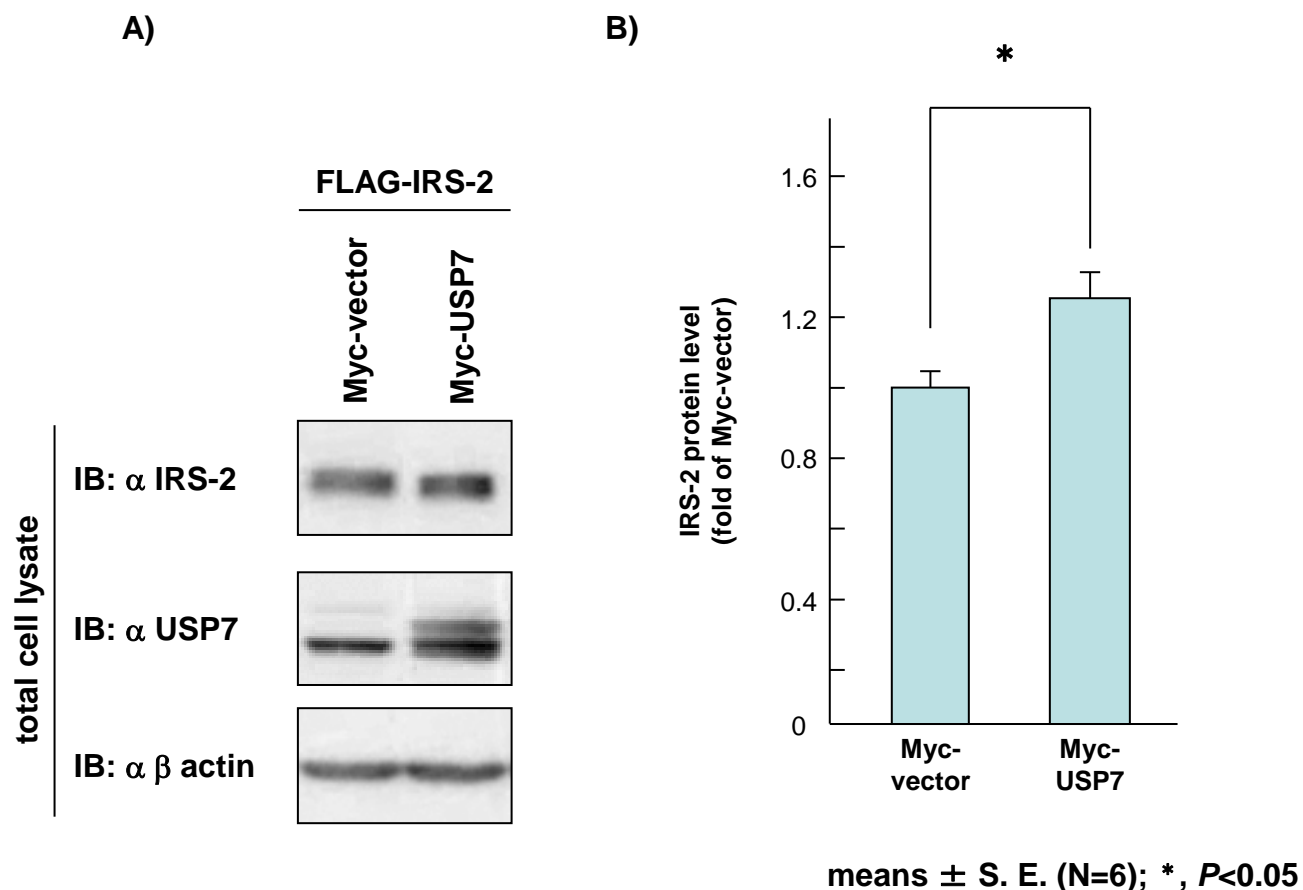


### Fig. 2-4 USP7の優性阻害変異体を過剰発現した細胞においてIRSに付加されるユビキチンの結合様式の解析

A) HEK293T細胞にFLAG-IRS-2を発現するプラスミドと共にMyc-USP7 C224Sを発現するプラスミドを導入した。24時間培養後、血清非存在下で18時間培養し、20  $\mu$ MのMG132で2時間処理した。処理後、細胞抽出液を調製し、終濃度1%となるようSDSを添加、70°Cで10分間インキュベートした。lysis bufferで20倍に希釈した後、抗FLAG抗体で免疫沈降を行った。沈降物をSDS-PAGEに供し、CBBにより染色、IRS-2のバンドよりも移動度の低い部分のゲルを切り出し、トリプシンにより消化した。消化産物にAQUAペプチドを添加し、質量分析に供した。なお、Myc-USP7 C224Sを発現するプラスミドの代わりにMycを発現するプラスミドを導入したものをctrlとして用いた。K48のMS/MSスペクトルを一例として示した。再現よく検出、定量できているMS/MSスペクトルをLightとHeavyそれぞれ4種類ずつ定量に用いている。

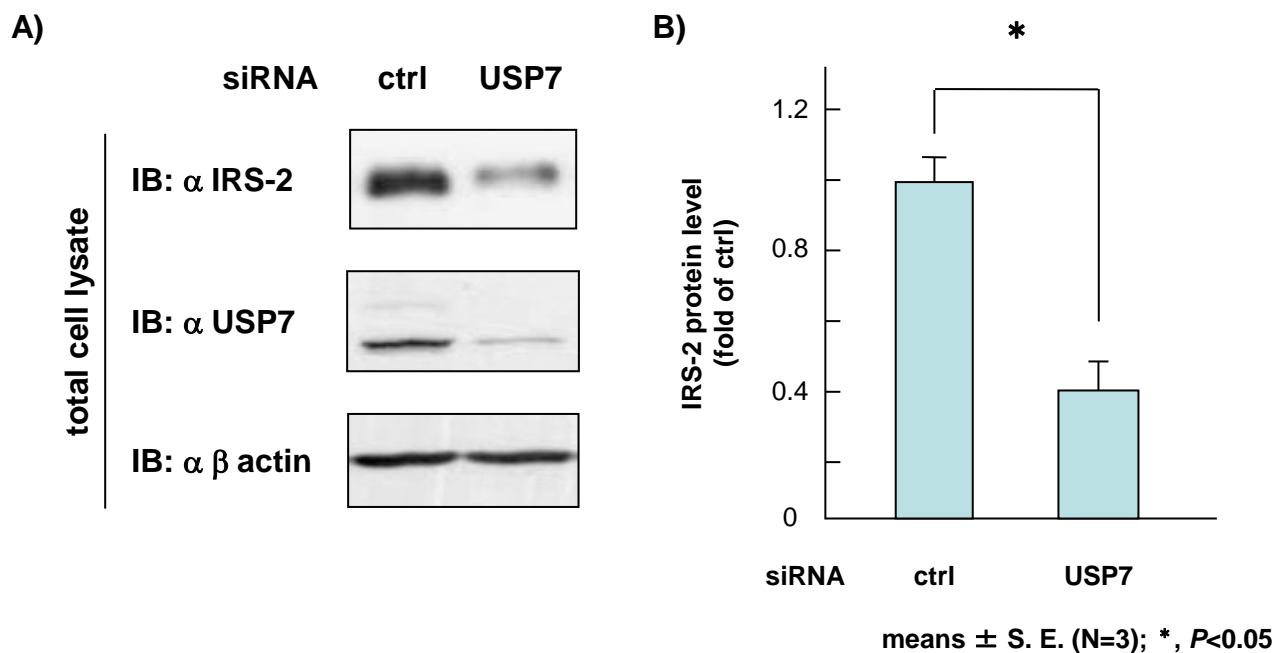
B) 各ペプチドのピーク面積をPin Pointにより定量し、ユビキチンおよび各連結様式の結合量を算出した。C) 定量結果をグラフで表した。





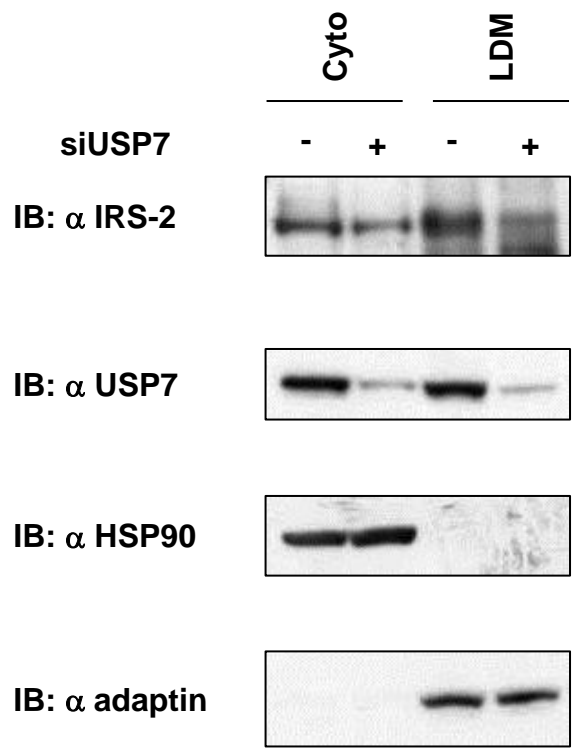
**Fig. 2-5 USP7の過剰発現がIRS-2量に及ぼす影響の解析**

A) HEK293細胞にFLAG-IRS-2を発現するプラスミドと共にMyc-vectorおよび、Myc-USP7を発現するプラスミドをそれぞれ導入した。24時間培養後、血清非存在下で24時間培養し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。B) 抗IRS-2抗体を用いてimmunoblottingを行った結果をImage Jで定量化し、Myc-vectorを導入した群を1としてグラフ化した。



**Fig. 2-6 USP7の発現抑制がIRS-2量に及ぼす影響の解析**

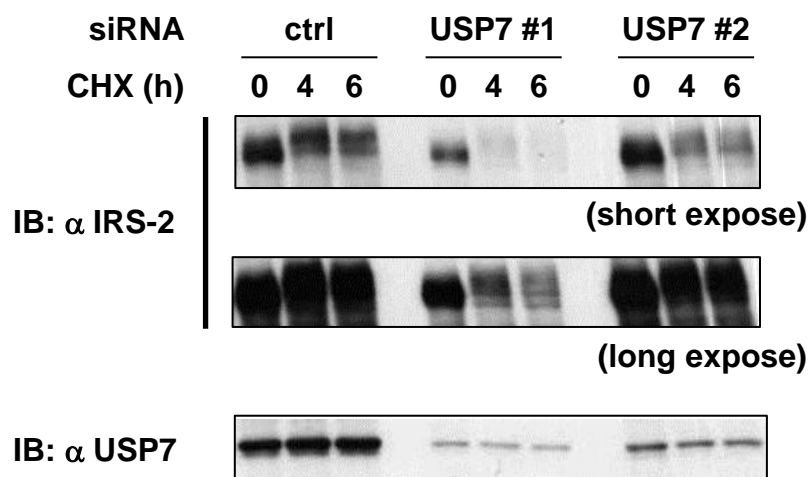
A) H4-IIIE細胞にUSP7に対するsiRNAおよびcontrol siRNAを導入した。48時間培養後、細胞抽出液を調製し、SDS-PAGEに供したのち、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。B) 抗IRS-2抗体を用いてimmunoblottingを行った結果をImage Jで定量化し、ctrl群を1としてグラフ化した。



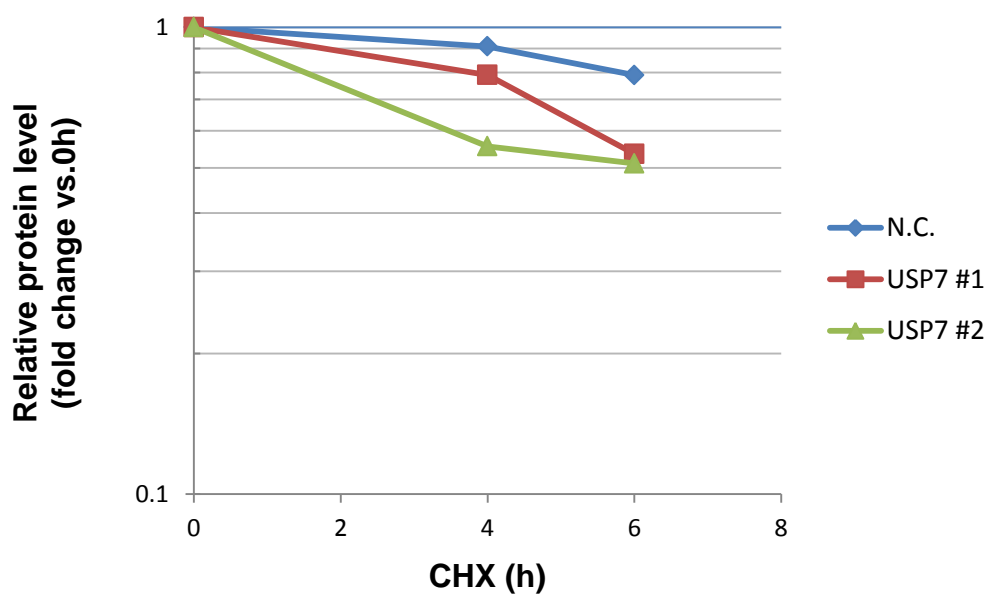
**Fig. 2-7 USP7の発現抑制が各画分のIRS-2量に及ぼす影響の解析**

A) H4-IIIE細胞にUSP7に対するsiRNAおよびcontrol siRNAを導入した。48時間培養後、細胞質画分 (Cyto) と細胞質低密度画分 (LDM) へ分画し、細胞抽出液を調製した。SDS-PAGEに供したのち、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。

A)



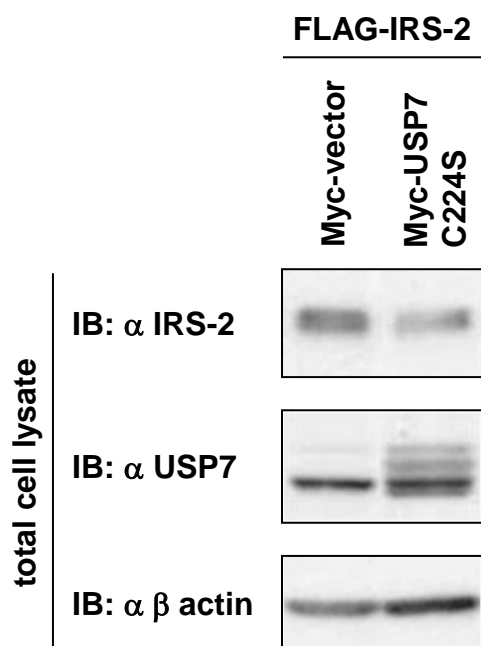
B)



**Fig. 2-8 USP7の発現抑制がIRS-2の分解速度に及ぼす影響の解析**

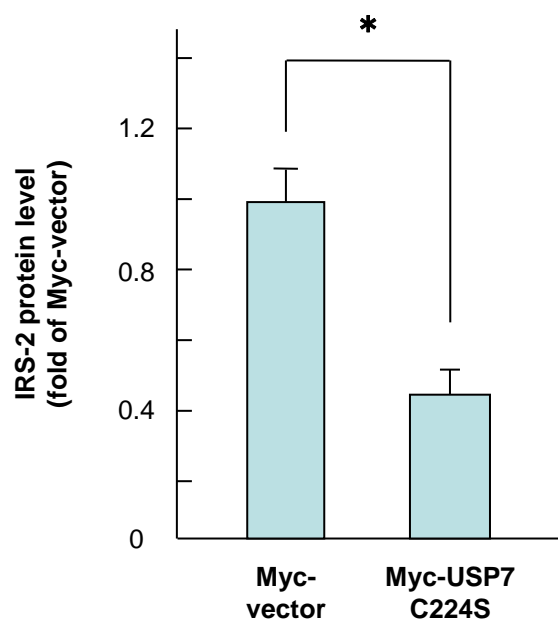
A) H4-IIIE細胞にUSP7に対するsiRNAおよびcontrol siRNAを導入した。48時間培養後、cycloheximide (CHX) で図に示した時間処理し、細胞抽出液を調製した。SDS-PAGEに供したのち、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。B) 抗IRS-2抗体を用いてimmunoblottingを行った結果をImage Jで定量化し、0hを1としてグラフ化した。

A)



Myc-USP7 C224S: 活性中心のcysをSerに置換した優性阻害変異体。

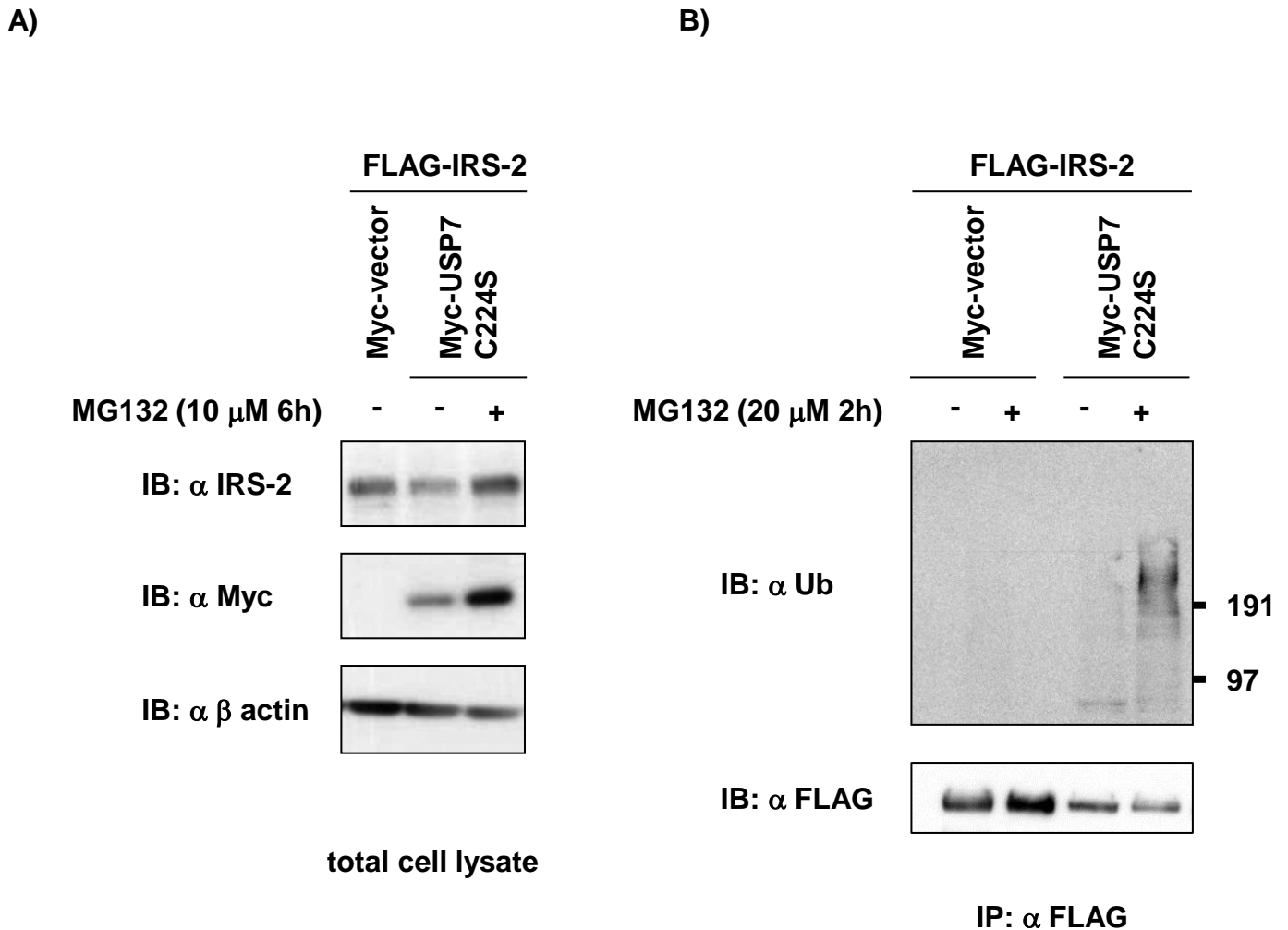
B)



means  $\pm$  S. E. (N=3); \*,  $P < 0.05$

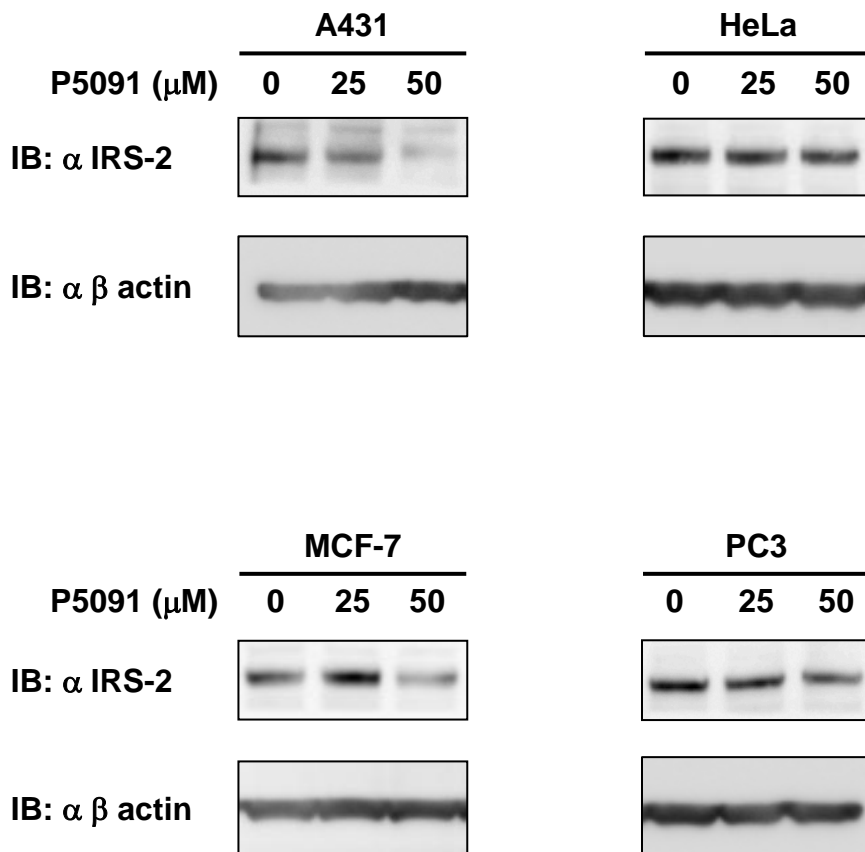
### Fig. 2-9 USP7の優性阻害変異体の過剰発現がIRS-2量に及ぼす影響の解析

A) HEK293細胞にFLAG-IRS-2を発現するプラスミドと共にMyc-vectorおよびMyc-USP7 C224Sを発現するプラスミドをそれぞれ導入した。24時間培養後、血清非存在下で24時間培養し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。B) 抗IRS-2抗体を用いてimmunoblottingを行った結果をImage Jで定量化し、Myc-vectorを導入した群を1としてグラフ化した。



**Fig. 2-10 プロテアソーム阻害剤の添加がUSP7C224Sを過剰発現した細胞におけるIRS-2の量およびユビキチン化に及ぼす影響の解析**

A) HEK293細胞にFLAG-IRS-2を発現するプラスミドと共にMycおよび、Myc-USP7 C224Sを発現するプラスミドをそれぞれ導入した。24時間培養後、血清非存在下で18時間培養し、10  $\mu$ MのMG132で6時間処理した。処理後、細胞抽出液を調製し、SDS-PAGEに供したのち、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。B) HEK293T細胞にFLAG-IRS-2を発現するプラスミドと共にMycおよび、Myc-USP7 C224Sを発現するプラスミドをそれぞれ導入した。24時間培養後、血清非存在下で18時間培養し、20  $\mu$ MのMG132で2時間処理した。処理後、細胞抽出液を調製し、終濃度1%となるようSDSを添加、70°Cで10分間インキュベートした。lysis bufferで20倍に希釈した後、抗FLAG抗体で免疫沈降を行った。沈降物をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。



P5091: USP7 inhibitor

**Fig. 2-11 USP7活性阻害剤の添加がIRS-2量に及ぼす影響の解析**

A) 図に示した細胞を、血清存在下で図に示した濃度のP5091を添加、24時間培養し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。

## 第三章

# USP7 と IRS-2 の相互作用制御機構の解析

## 緒言

第二章の結果より、USP7 が IRS-2 を脱ユビキチン化し、その分解を抑制することが示された。脱ユビキチン化酵素による基質タンパク質の脱ユビキチン化は、相互作用している基質の量と良く相関すると報告されている (Li *et al.*, 2004)。したがって、USP7 による IRS-2 の脱ユビキチン化は USP7 と IRS-2 の相互作用量を反映している可能性が高い。そこで本章では、IRS-2 量に変動するモデル細胞を用いて、USP7 と IRS-2 の相互作用を変動させる細胞外因子を探索し、この細胞外因子が相互作用を変動させる分子機構を明らかにすることにした。

IRS 量を低下させるモデル細胞として、インスリンや IGF で刺激した標的細胞を挙げることができる。特に、IRS-1 ではインスリン刺激に応じて E3 リガーゼが結合、ユビキチン化が起こり、分解が誘導されることが数多く報告されている。この IRS-1 の低下は、インスリンシグナル伝達経路におけるネガティブフィードバック制御と考えられており、インスリン/IGF のシグナルや生理活性が減弱するという「脱感作機構」の一つと言える。今回、IRS-2 発現量が高く、インスリン/IGF 活性発現に重要な役割を果たしていることがわかっている肝がん細胞 H4-IIIE、甲状腺細胞 FRTL-5 をモデル細胞として用い、インスリン、IGF-I 刺激に応じた USP7 と IRS-2 の相互作用、IRS-2 の分解につ



いて検討を加えた。

一方我々は、無タンパク質食を 1 週間給餌したラットから調製した初代培養肝細胞において、IRS-2 量が増加し、インスリンシグナルが亢進していることを見出している。その結果、肝臓では脂肪合成が増加し、脂肪が蓄積する。この肝臓への脂肪蓄積は、無タンパク質食では生体内でアミノ酸が不足し、タンパク質合成などの同化反応が行われず、余剰なエネルギーが生じるため、その余剰なエネルギーが肝臓へ蓄えられる仕組みと考えることができる。この動物では無タンパク質食給餌によって、血中インスリン濃度が有意に低下している。したがって、肝臓はインスリン濃度低下をモニターして、USP-7 と IRS-2 の相互作用を増加させ、IRS-2 の増加を引き起こしている可能性がある。本研究では、その可能性を検討した。

これらの解析から、IRS-2 の量の変動に、IRS-2 からの USP7 の相互作用の変動が重要であることが明らかになったので、次に、インスリン刺激に応答した解離がどのような分子機構を介して起こるかを検討した。IRS はインスリン/IGF 刺激依存的に受容体チロシンキナーゼによってリン酸化されるだけでなく、下流経路、序論でも説明したように MAPK 経路や PI3K 経路において複数のセリン/スレオニンキナーゼが活性化されると、それらキナーゼによってもリン酸化されることが知られている(Harrington *et al.*, 2005)。このリン酸化は、IRS の量や受容体チロシンキナーゼによるチロシンリン酸化を低下させる(Butler *et al.*, 1998; Mardilovich *et al.*, 2009)。これらはインスリン様シグナルにおけるフィードバック機構の一つと考えられている。これらのことから、まずインスリン刺激依存的な IRS-2 の分子内修飾が USP7 との相互作用に及ぼす影響を解析したところ、インスリン刺激依存的な IRS-2 の分子内修飾の変動により USP7 との相互作用が減少した。そこで、IRS-2 のリン酸化および下流シグナル経路のキナーゼの活性化が IRS-2 と USP7 との相互作用に及ぼす影響を検討した。

## 結果

### 1. USP7 と IRS-2 の相互作用を変動させる細胞外因子の探索

#### (1) インスリン/IGF 刺激依存的な USP7 と IRS-2 の相互作用の変動の解析 (Fig. 3-1)

まず、インスリン/IGF 刺激をした細胞について、IRS-2 と USP7 の相互作用が変化するかを検討した。種々の時間インスリンで処理した H4-IIIE 細胞、あるいは IGF-I で処理した FRTL-5 細胞の細胞抽出液を抗 IRS-2 抗体により免疫沈降を行い、抗 USP7 抗体で immunoblotting し、USP7 と IRS-2 の相互作用を解析した。その結果、USP7 はインスリン/IGF 刺激 1 分後に IRS-2 から解離することがわかった。その後 IRS-2 と USP7 の相互作用は回復せず、インスリン/IGF 刺激 1 時間後から IRS-2 量の低下が観察された。

#### (2) ラット初代培養肝細胞における無タンパク質食給餌およびインスリン刺激依存的な USP7 と IRS-2 の相互作用の変動の解析 (Fig. 3-2)

緒言で述べた通り、我々は、無タンパク質食 (PF) を 1 週間給餌したラットの初代培養肝細胞において、IRS-2 量が増加していること、血中のインスリン濃度が有意に低下していることを明らかとしていた。そのため、肝臓はインスリン濃度低下をモニターして、USP-7 と IRS-2 の相互作用を増加させ、IRS-2 の増加を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、このようなラットより調製した初代培養肝細胞における USP7 と IRS-2 の相互作用を解析した。日本医科大学老人病研究所 鈴木由香博士にお願いして、以下の動物実験を行ってもらい、免疫沈降物を immunoblotting 用の PVDF 膜に転写していただいた。すなわち、5 週齢の Wistar 系雄ラットを 12%カゼイン食 (12C) を給餌する群、PF を給餌する群の 2 群に分けて実験食を 1 週間給餌、8 日目に肝実質細胞を分離した (詳細な実験方法は材料と方法に記した)。分離した肝実質細胞を無血清培地で 3 時間培養し、インスリンで処理した。処理後、抗 IRS-2 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 USP7 抗体で immunoblotting することで USP7 と IRS-2 の相互作用を解析した。その結果、PF の給餌によって USP7 と IRS-2 の相互作用が増加していた。また、いずれの群においてもインスリンの処理により、USP7 と IRS-2 の相互作用が低下した。

これらの結果から、インスリン/IGF 刺激に応答して USP7 が IRS-2 から解離することが明らかとなり、この機構を介して、インスリン/IGF 刺激に応答して IRS-2 がユビキチン-プロテアソーム系により分解され、インスリン様シグナルが減弱する、いわゆる脱感作が起こると考えた。

## **2. インスリン刺激依存的な IRS-2 の分子修飾が USP7 との相互作用に及ぼす影響の解析 (Fig. 3-4)**

この脱感作機構において、インスリン/IGF 刺激依存的な IRS-2 からの USP7 の解離が重要と考えられたため、次に、この IRS-2 からの USP7 の解離がどのような分子機構で起こるかを検討することにした。まず、インスリン刺激依存的な IRS-2 の分子修飾が USP7 との相互作用に及ぼす影響を解析した。インスリンで処理した、あるいは処理しない H4-IIE 細胞の細胞抽出液と、大腸菌から精製した USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質を用いて pull-down assay を行った。沈降物を抗 IRS-2 抗体で immunoblotting することにより、IRS-2 と USP7 MATH domain の相互作用を検出した。その結果、インスリンで刺激した細胞の抽出液中の IRS-2 はインスリン刺激をしていない細胞の IRS-2 と比べて USP7 MATH domain との相互作用が減少していた。つまり、インスリン刺激依存的な分子修飾を受けた IRS-2 は、修飾されていない IRS-2 と比べて USP7 MATH domain との相互作用が低下した。このことから、インスリン刺激依存的に IRS-2 が受ける分子修飾が USP7 との相互作用に抑制的に働くことが示唆された。

## **3. IRS-2 のリン酸化が USP7 との相互作用に及ぼす影響の解析**

### **(1) CIAP による IRS-2 の脱リン酸化が USP7 との相互作用に及ぼす影響の解析 (Fig. 3-5)**

緒言で述べた通り、IRS はインスリン刺激依存的にインスリン受容体によるチロシンリン酸化や下流シグナル経路からのフィードバック機構を介したセリン/スレオニンリン酸化をうけることが知られている。そこで、IRS-2 のリン酸化が USP7 との相互作用に及ぼす影響を解析した。FLAG-IRS-2 を過剰発現した HEK293T 細胞の細胞抽出液を抗 FLAG 抗体により免疫沈降した沈降物あるいは、インスリン処理した H4-IIE 細胞の細胞抽出液に、非特異的に基質を脱リン酸化することが知られている calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) を添加し、cell-free 系で脱リン酸化反応を行った。反応産物と、大腸菌から精製した USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質を用いた pull-down を行い、抗 IRS-2 抗体による immunoblotting により IRS-2 と USP7 MATH

domain の相互作用を解析した。その結果、CIAP による脱リン酸化反応により IRS-2 と USP7 の相互作用が増加することがわかった。

## (2) インスリン受容体キナーゼによる IRS-2 のチロシンリン酸化が USP7 との相互作用に及ぼす影響の解析 (Fig. 3-6)

次に、IRS-2 と USP7 の相互作用を低下させるリン酸化の種類を特定するため、インスリン受容体キナーゼによる IRS-2 のチロシンリン酸化が USP7 との相互作用に及ぼす影響を解析した。まず、ヒトインスリン受容体を高発現した NIH-3T3 細胞である NIR 細胞より活性型インスリン受容体を粗精製した。次に、FLAG-IRS-2 を過剰発現した HEK293T 細胞の細胞抽出液を抗 FLAG 抗体により免疫沈降し、これに粗精製したインスリン受容体と ATP、インスリンを加え、cell-free 系でリン酸化反応を行った。対照群としてインスリン受容体を加えないものを用いた。Cell-free 系でチロシンリン酸化させた FLAG-IRS-2 を SDS-PAGE に供し、抗リン酸化チロシン抗体で immunoblotting したところ、受容体を加えた群では FLAG-IRS-2 はチロシンリン酸化されており、対照群ではチロシンリン酸化が認められなかった。そこで、cell-free 系で反応させたこれらの FLAG-IRS-2 と、大腸菌から精製した USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質を用いて pull-down を行い、抗 IRS-2 抗体による immunoblotting により IRS-2 と USP7 MATH domain の相互作用を解析した。その結果、チロシンリン酸化された IRS-2 とされていない IRS-2 の間に USP7 との相互作用の差は認められなかった。このことから、IRS-2 のチロシンリン酸化は IRS-2 と USP7 の相互作用に影響しないことが明らかとなった。

これらの結果は、活性化した下流経路のフィードバック制御による IRS-2 のセリン/スレオニンリン酸化がインスリン刺激依存的な IRS-2 と USP7 の相互作用減少に重要であることを示唆している。

## 4. インスリンシグナル伝達下流経路の活性化が USP7 と IRS-2 の相互作用に及ぼす影響の解析

### (1) インスリン刺激依存的な MAPK 経路の活性化の阻害が USP7 と IRS-2 の相互作用に及ぼす影響の解析 (Fig. 3-7, 9)

そこで、下流経路の活性化による IRS のセリン/スレオニンリン酸化が USP7 と IRS-2 の相互作用に及ぼす影響を解析した。緒言で述べた通り、インスリンシグナルの下流経路には主に MAPK 経路と PI3K 経路が存在することから、それぞれの経路について、阻害剤を用いて活性化を阻害した細胞における USP7 と IRS-2 の相互作用を検討した。まず、MAPK 経路について解析を行った。MAPK 経路の下流のシグナル分子 MEK の阻害剤

PD98059 を種々の濃度で前処理後、5 分間のインスリン刺激でインスリンシグナル伝達経路が活性化した H4-IIE 細胞の細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE に供した後、抗リン酸化 Erk 抗体で immunoblotting を行い、MAPK 経路の活性化を確認した。その結果、阻害剤を処理していない細胞に比べ、PD98059 の処理では Erk のリン酸化が減少していたことから、PD98059 の処理で MAPK 経路の活性化が抑制されていることが判明した。そこで、抗 IRS-2 抗体による免疫沈降および、大腸菌から精製した USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質を用いた pull-down を行い、それぞれ抗 USP7 抗体あるいは抗 IRS-2 抗体による immunoblotting により USP7 と IRS-2 の相互作用を測定した。その結果、PD98059 を用いた MAPK 経路の活性化の抑制はインスリン刺激依存的な USP7 と IRS-2 の相互作用減少に影響を与えないことが明らかとなった。

## (2) インスリン刺激依存的な PI3K 経路の活性化の阻害が USP7 と IRS-2 の相互作用に及ぼす影響の解析 (Fig. 3-8, 9)

次に、PI3K 経路について検討を加えた。H4-IIE 細胞を種々の濃度の PI3K の阻害剤 LY294002 で前処理後、インスリンで刺激した。その後、細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE に供した後、抗リン酸化 Akt 抗体で immunoblotting を行うことで、PI3K 経路の活性化を解析した。その結果、阻害剤を処理していない細胞に比べ、LY294002 の処理では Akt のリン酸化が減少していたことから、LY294002 の処理で PI3K 経路の活性化が抑制されていることが明らかとなった。そこで、抗 IRS-2 抗体による免疫沈降および、大腸菌から精製した USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質を用いた pull-down を行い、それぞれ抗 USP7 抗体あるいは抗 IRS-2 抗体による immunoblotting により USP7 と IRS-2 の相互作用を測定した。その結果、LY294002 を用いて PI3K 経路の活性化を抑制すると、インスリン刺激依存的な USP7 と IRS-2 の相互作用の減少が回復した。

このことは、活性化した PI3K 経路の活性化に応答した IRS-2 の分子修飾がインスリン刺激依存的な USP7 と IRS-2 の相互作用の低下に重要であることを示している。

## 考察

### インスリン／IGF 刺激依存的な IRS-2 と USP7 の相互作用の変動

インスリン／IGF 刺激によって IRS-2 と USP7 の相互作用が変動するかを解析した結果、USP7 はインスリン／IGF-I 刺激 1 分後に IRS-2 から解離し、これを反映して、インスリン／IGF-I 刺激 1 時間後から IRS-2 量の低下が観察された (Fig. 3-1)。IRS をユビキチン化し、分解を誘導することが報告されている E3 リガーゼ Cul7 複合体は、インスリン刺激にตอบสนองして S6K によって IRS がセリンリン酸化されると、IRS との相互作用が増加することが報告されている (Xu *et al.*, 2008)。また、同様に IRS をユビキチン化し、分解を誘導することが知られている E3 リガーゼである SOCS 複合体や Mdm2 もインスリン刺激によって IRS との相互作用が増加することが示されている (Lee *et al.*, 2000; Rui *et al.*, 2002; Usui *et al.*, 2004)。これらの報告に対し、今回の結果から、基底状態では USP7 が IRS と相互作用しているため、脱ユビキチン化活性が強く、IRS のユビキチン化が低く抑えられているが、インスリンに刺激されると IRS から USP7 が解離し、IRS のユビキチン化の抑制が解除される。同時に、刺激にตอบสนองして E3 リガーゼが IRS と相互作用し、IRS のユビキチン化が進む。その結果、急激に IRS がユビキチン化へとバランスが傾き、IRS のユビキチン化、分解が促進され、インスリンシグナルが減弱するという作業仮説が考えられた (Fig. 3-3)。このように、インスリン／IGF 刺激による IRS の分解は E3 リガーゼとの相互作用だけでなく、USP7 の IRS からの解離も重要な役割を果たしていることを初めて明らかとした。また、USP7 は刺激後 1 分で IRS から解離しており、刺激依存的に IRS をユビキチン化することが報告されている E3 リガーゼも刺激後数分で IRS と相互作用することが示されている (Lee *et al.*, 2000; Rui *et al.*, 2002; Usui *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008)。

### ラット初代培養肝細胞における無タンパク質食給餌による IRS-2 と USP7 の相互作用の変動

無タンパク質食を 1 週間給餌することにより、IRS-2 量が増加し、血中インスリン濃度が低下したラットから調製した初代培養肝細胞において、IRS-2 と USP7 の相互作用が増加

していることを見出した (Fig. 3-2)。このことから、無タンパク質食給餌による IRS-2 量の増加の少なくとも一部は USP7 で説明できると考えている。つまり、無タンパク質食給餌により USP7 と IRS-2 の相互作用が増加し、IRS-2 の分解が抑制された結果、IRS-2 量が増加したと考えられた。また、我々は、飼料中のアミノ酸量を減少させた低アミノ酸食を給餌したラット肝臓において、無タンパク質食給餌と同様に、IRS-2 量が増加し、インスリンシグナルが亢進することを明らかとしている。この肝臓においても、IRS-2 と USP7 の相互作用が増加していることが示されており (森友美, 修士論文 2013)、初代培養肝細胞と同様のことが起きていると結論した。当初これらの細胞における USP7 と IRS-2 の相互作用の増加は、培養細胞においてインスリン処理により USP7 が IRS-2 から解離することから、インスリン濃度の低下によるものだと考えられた。今回の結果では、無タンパク質食を給餌した群においてもインスリン刺激により USP7 が IRS-2 から解離したが、これは高濃度のインスリンで刺激した結果であり、*in vivo* の系においては、低下した給餌後のインスリン分泌による刺激では相互作用が変化せず、IRS の分解が誘導されない可能性が考えられた。一方、最近、ヒト肝がん細胞 HuH7 をアミノ酸を除去した培地で培養すると IRS-2 の量が増加することが明らかとなった (亀井宏泰 私信)。このことから、無タンパク質食や低アミノ酸食を給餌したラット肝臓において USP7 と IRS-2 の相互作用が増加するのは、血中アミノ酸低下の直接の効果である可能性も考えられた。今後、低アミノ酸食給餌の方が、ctrl との摂食量の差がなく、安定して給餌組成の差のみを比較できる優れた系だと考えられたため、低アミノ酸食給餌をモデルに、USP7 と IRS-2 の相互作用が増加する機構を明らかにしていきたい。また、IRS-2 量の増加における USP7 の役割や、低アミノ酸質食による肝臓でのインスリン感受性亢進に IRS-2 やその量が関与するかを解析する必要がある。

### USP7 と IRS-2 の相互作用に影響を及ぼす IRS-2 の分子内修飾

本章の結果から、インスリン刺激依存的な USP7 と IRS-2 の相互作用の減少にはインスリン刺激による IRS-2 の分子内修飾が重要であることが示された (Fig. 3-4)。さらに、CIAP により cell-free 系で脱リン酸化された IRS-2 は USP7 の相互作用が増加する一方、インスリン受容体による cell-free 系でのチロシンリン酸化は相互作用に影響を及ぼさなかったことから (Fig. 3-5, 6)、IRS-2 のセリン/スレオニンリン酸化が USP7 との相互作用に抑制的に働いていると結論した。USP7 と MATH domain を介して直接相互作用することが知られている Mdm2 は、DNA 損傷に応答して活性化する ATM と呼ばれるキナーゼにセリン残基がリン酸化されることで USP7 との相互作用が減少し、その後分解されることが報告されている (Vucic et al., 2011)。また、USP7 MATH domain とリン酸化ペプチドとの相互作

用を解析することにより、結合モチーフである P/A-x-x-S のうち 4 番目のセリン残基がリン酸化されると相互作用が減少することも示されている(Sarkari et al., 2010)。第一章の結果から、USP7 は IRS-2 と MATH domain を介して直接相互作用していることが示されていることも併せ、IRS-2 は、Mdm2 と USP7 の相互作用機構と同様に、相互作用領域にあるセリン残基のリン酸化により USP7 との相互作用が制御されると考えている。IRS-2 にはセリン残基が 178 残基存在し、質量分析計による解析により、その多くにリン酸化修飾が入ることが観察されている。また、第一章でも述べた通り、MATH domain の結合モチーフである P/A-x-x-S に該当する配列は IRS-2 上に 34 ヶ所存在しており、未だそれらのうちのセリン残基が USP7 との相互作用に重要なのかは明らかにできていない。今後、インスリン刺激した細胞から、セリンリン酸化の影響を受けないと考えられる抗 IRS-2 抗体により免疫沈降した IRS-2 と、目的のセリン残基がリン酸化した IRS-2 は除外されると考えられる USP7 MATH domain の GST 融合タンパク質で pull-down した IRS-2 のリン酸化状態を質量分析により比較解析することで、IRS-2 と USP7 の相互作用に重要なセリン残基の同定が可能になると考えている。

### インスリンシグナル伝達下流経路の活性化に応答した IRS 量低下の分子機構

PI3K シグナルの下流では、Akt や GSK-3、mTOR、S6K などのセリン/スレオニンキナーゼが活性化し、IRS-1 をリン酸化すること、このリン酸化により IRS-1 の分解が誘導されることが報告されている(Harrington et al., 2005)。また、IRS-1 の 307、527、636、639 番目のセリン残基のリン酸化がこの分解に重要だと考えられている(Xu et al., 2008)。一方、IRS-2 に関しては研究が進んでおらず、このようなセリン/スレオニンキナーゼやセリン残基の報告はない。今回、刺激依存的な USP7 と IRS-2 との相互作用の減少が PI3K の活性化阻害により抑制される、IRS-2 のセリン/スレオニンリン酸化が USP7 との相互作用に抑制的に働いているなどが示され、これらセリン/スレオニンキナーゼによるリン酸化が USP7 の IRS-2 からの解離の引き金になっていると考えられた。

第二章において、USP7 C224S の過剰発現により、少なくとも IRS-2 の 80、811、1106、1134 番目のリジン残基がモノユビキチン化されることが明らかとなった。インスリン刺激に応答した USP7 の IRS-2 からの解離により、IRS-2 が脱ユビキチン化されなくなり、ユビキチン化が亢進、プロテアソームに分解されるとすると、インスリン刺激に応答した IRS-2 のユビキチン化部位およびユビキチンの結合様式は、USP7 C224S を過剰発現した細胞と同様になると考えられる。今後は第二章において確立した手法を用いて、インスリン刺激に応答した IRS-2 のユビキチン化リジン残基および付加されるユビキチンの結合様式を解析、USP7 C224S 過剰発現時と比較することで、イン



スリン刺激に応答した IRS-2 のユビキチン化における USP7 の寄与を明らかとしたい。今回提案している分子機構の稼働を証明するためには、明らかとなった IRS-2 のリジン残基を置換した変異体を細胞に発現させ、インスリン刺激依存的な量の低下が起こらないことを示す必要がある。

### インスリンシグナル伝達下流経路の活性化に応答した IRS 量低下の生理的意義

インスリン長時間刺激に応答した IRS 量の低下を介したインスリンシグナルの減弱は、インスリンシグナル経路のネガティブフィードバック機構の一つと考えることができる。IRS の分解を抑制する USP7 がインスリン刺激に応答してすみやかに IRS から解離することはこのネガティブフィードバック機構の重要な過程であり、この解離が稼働しないとフィードバック機構が機能しなくなる。実際に、フィードバック機構が働かなくなると、PI3K 経路のシグナル分子である Akt が過増強され、悪性の血管腫が発現することや、多くの癌罹患患者や癌細胞において IGF シグナルが過剰に活性化していることが報告されている (Bjornsti and Houghton, 2004; Manning *et al.*, 2005; Mardilovich *et al.*, 2009)。このようながん細胞における IRS 量の意義については、総合討論において詳しく議論したい。

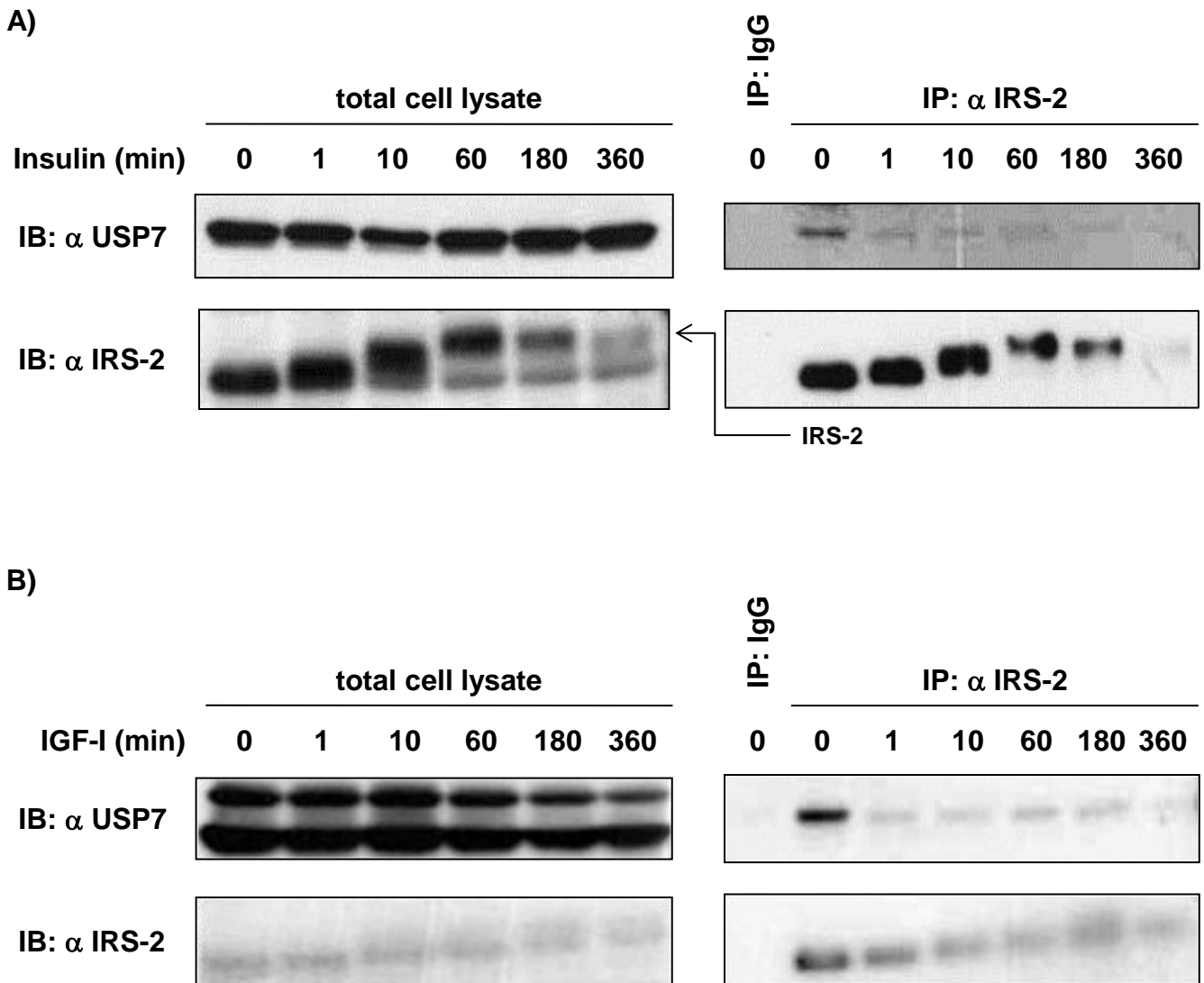
今回、USP7 の IRS からの解離には IRS のセリン/スレオニンリン酸化が重要であることを明らかとした。そこで、これらフィードバック機構に関わるセリン/スレオニン残基や、前述したようにインスリン刺激によってユビキチン化されるリジン残基を同定、その変異体を用いることで、インスリン刺激依存的な IRS-2 と USP7 の相互作用の低下が起こらない、あるいはユビキチン化が起こらない際のインスリン長時間処理による IRS-2 量やインスリン様シグナルや生理活性を解析していきたい。これにより、USP7 の重要性やインスリン刺激に応答した IRS から解離、IRS が分解することの意義が明らかにできると考えている。

### まとめ

これまでの結果から、「インスリン刺激に応答した PI3K 経路の活性化を介して IRS がセリン/スレオニンリン酸化されることで IRS から USP7 が解離する。その結果、IRS が脱ユビキチン化されなくなり、ユビキチン化が亢進、プロテアソームに分解され、インスリンシグナルが減弱する」というインスリン感受性低下の新しい脱感作機構が稼働していると結論した (Fig. 3-10)。このように IRS はインスリン様シグナル経路の活性化に応答してユビキチン化されることがわかった。

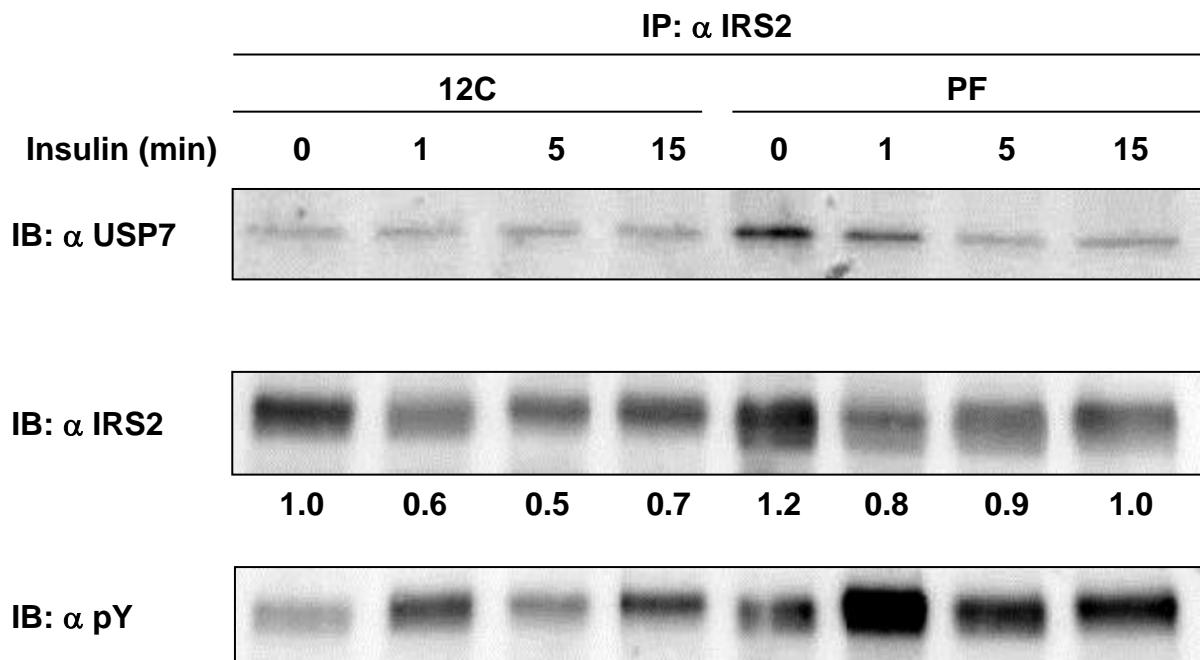
これまでインスリン/IGF 刺激に応答して量変動するタンパク質は複数報告されていることから (Haruta *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2008)、インスリン/IGF 刺

激に応答して、IRS 以外のタンパク質のユビキチン化状態も変動すると考えられた。そこで、次章では、IGF 刺激に応答してユビキチン化状態の変動するタンパク質の網羅的解析を行った。



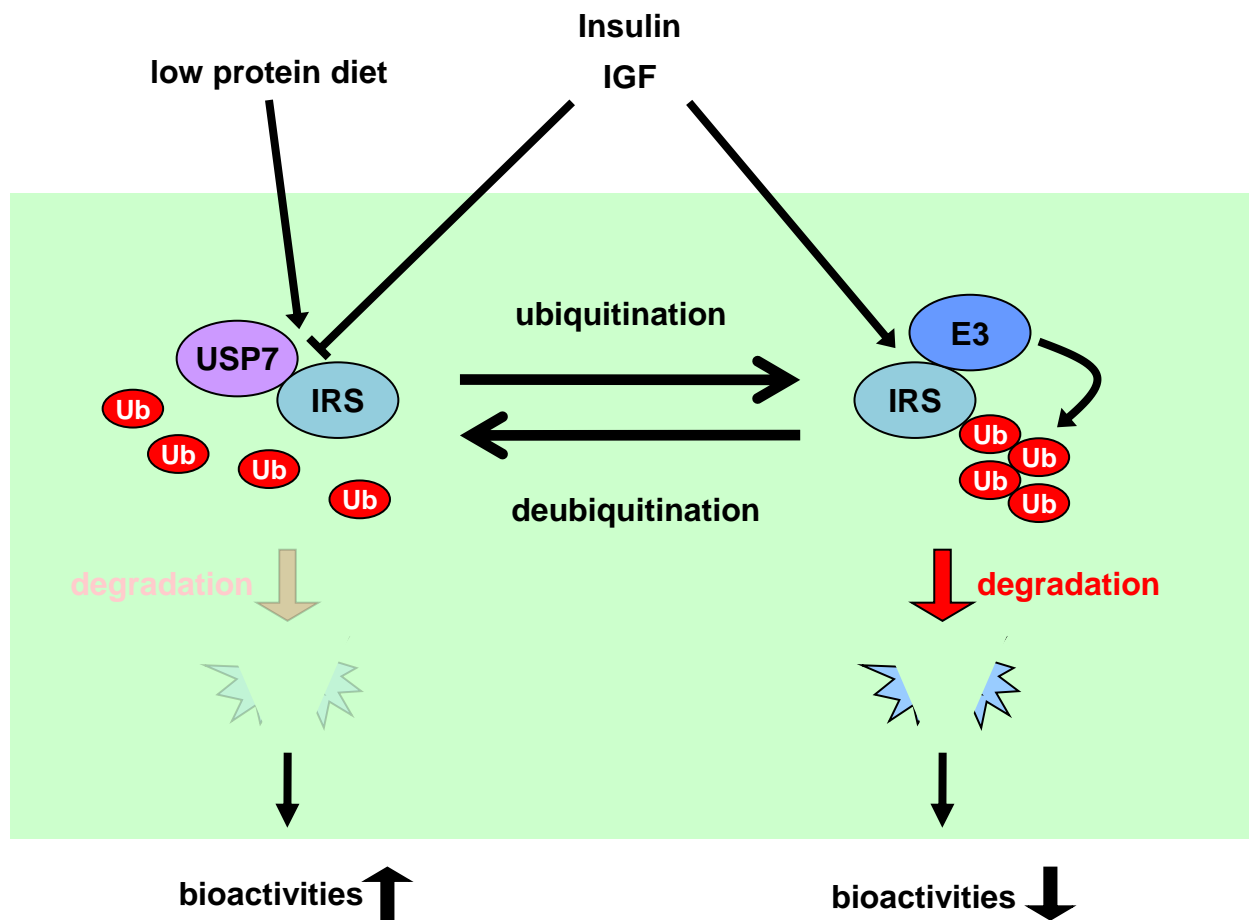
**Fig. 3-1 インスリン/IGF刺激依存的なUSP7とIRS-2の相互作用の変動の解析**

A) H4-IIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、100 nMのインスリンで図に示した時間処理し、細胞抽出液を調製した。抗IRS-2抗体により免疫沈降を行い、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。B) FRTL-5細胞を血清非存在下で24時間培養後、100 ng/mlのIGF-Iで図に示した時間刺激し、細胞抽出液を調製した。抗IRS-2抗体で免疫沈降を行い、図に示した抗体によるimmunoblottingを行った。



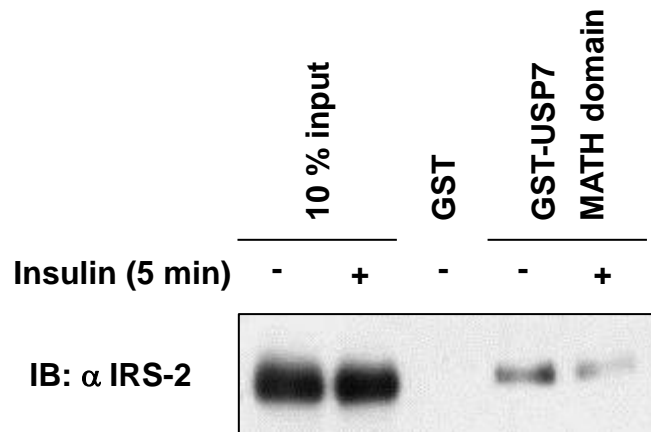
**Fig. 3-2 ラット初代培養肝細胞における無タンパク質給餌およびインスリン刺激依存的な USP7とIRS-2の相互作用の変動の解析**

5週齢のWistar系雄ラットを7日間予備飼育した。予備飼育後、ラットに12%カゼイン食(12C)もしくは、無タンパク質食(PF)を給餌した。実験8日目に10時から1.5時間給餌した後、肝実質細胞を分離した。分離した肝実質細胞を無血清培地で3時間培養し、50 nMのインスリンで図に示した時間処理し、細胞抽出液を調製した。抗IRS-2抗体により免疫沈降を行い、SDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。抗IRS-2抗体を用いてimmunoblottingを行った結果をImage Jで定量化し、その値を記載した。



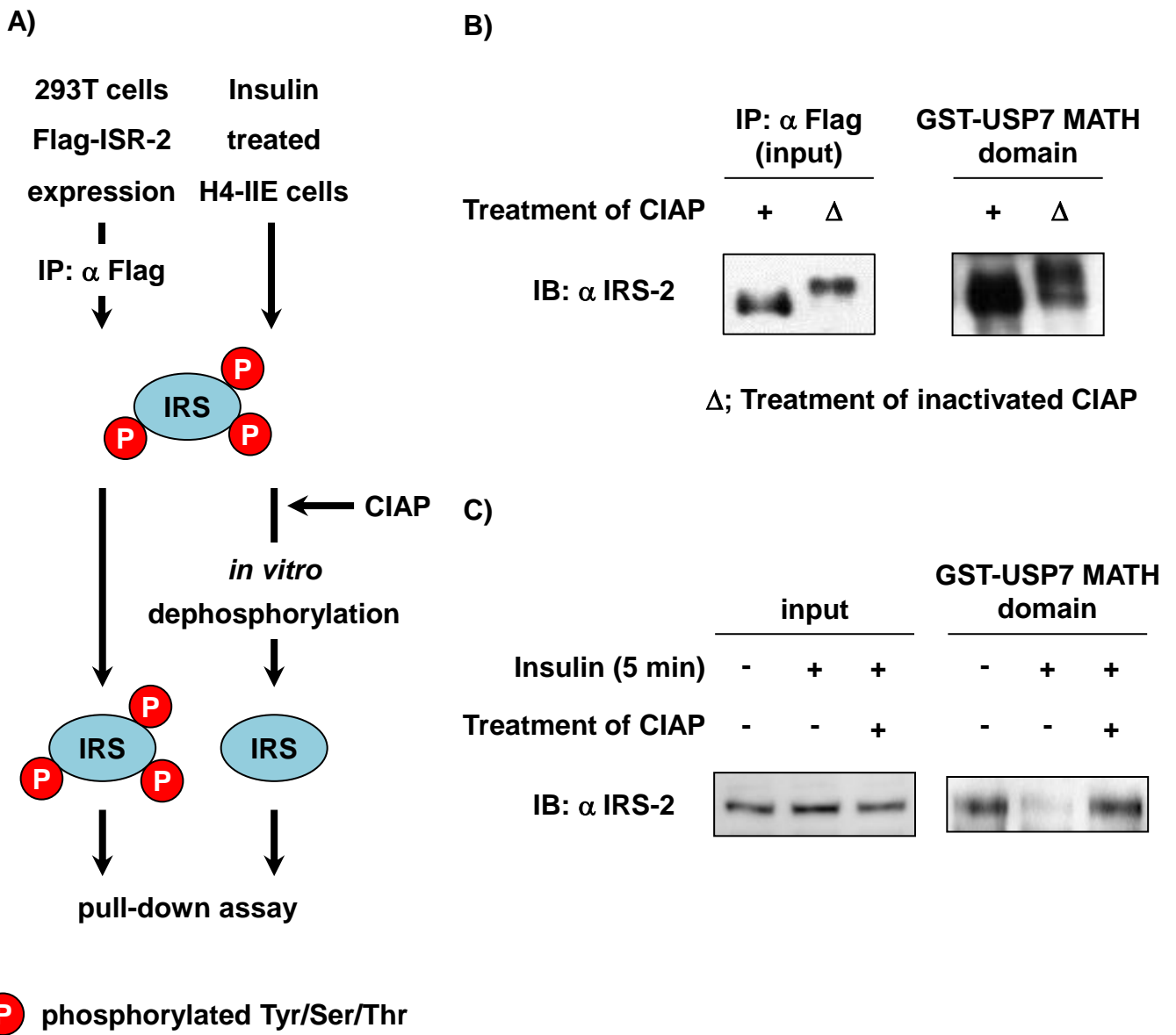
**Fig. 3-3 USP7とE3リガーゼによるIRSのユビキチン化および量の制御についての作業仮説**

ユビキチンはユビキチン活性化酵素 (E1)とATPによって活性化され、この活性化ユビキチンがユビキチン結合酵素 (E2)に転移し、更にユビキチンリガーゼ (E3)によって認識されたタンパク質に結合する。一方、脱ユビキチン化酵素はこのユビキチン付加反応に拮抗的に働き、ユビキチン鎖をはずす。このことからタンパク質のユビキチン化状態はユビキチン化反応と脱ユビキチン化反応の動的平衡によって制御されていると考えられる。IRSのユビキチン化およびそれに伴う量の制御も同様にE3リガーゼによるユビキチン化反応とUSP7による脱ユビキチン化のバランスによって制御されている。そして、インスリン刺激や無タンパク質食給餌などによりUSP7とIRS、E3リガーゼとIRSの相互作用が変動することでこのバランスが片側に傾き、その結果、IRSの量やそれに伴うインスリン様シグナル、インスリン様活性が変動すると考えられる。



**Fig. 3-4 インスリン刺激依存的なIRS-2の分子修飾がUSP7との相互作用に及ぼす影響の解析**

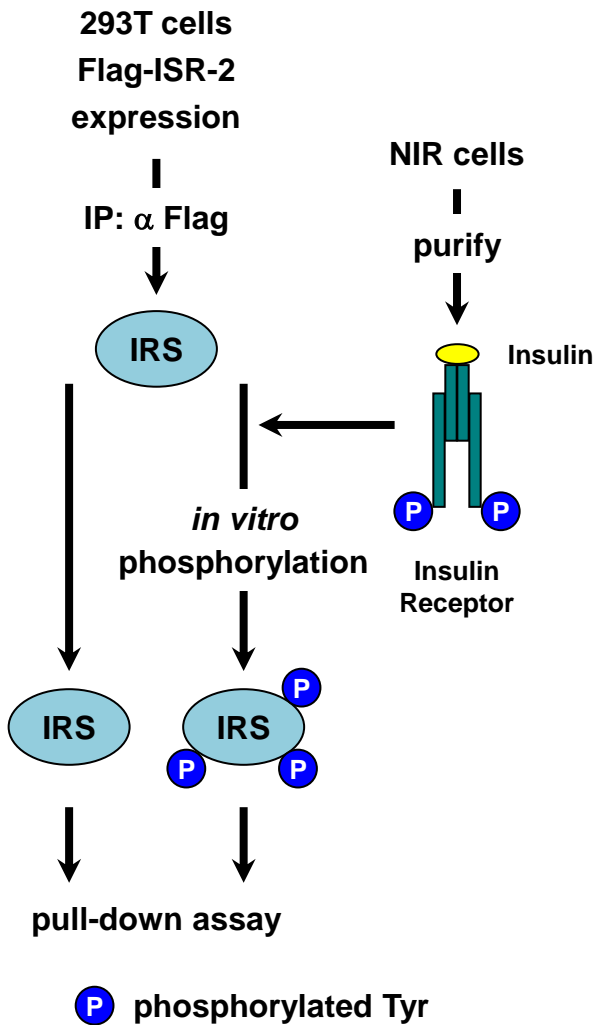
H4-IIIE細胞を血清非存在下で24時間培養し、100 nMのインスリンで5分間処理した。その後、細胞抽出液を調製し、調製した細胞抽出液に精製したGST融合タンパク質をそれぞれ加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、抗IRS-2抗体を用いたimmunoblottingを行った。



**Fig. 3-5 CIAPによるIRS-2の脱リン酸化がUSP7との相互作用に及ぼす影響の解析**

A) 本実験の流れを模式図で示した。B) HEK293T細胞にFlag-IRS-2を発現するプラスミドを導入し、24時間培養後、血清存在下でさらに24時間培養した。細胞抽出液を調製し、抗Flag抗体により免疫沈降した。沈降物にCIAPあるいはあらかじめ70°Cで10分間処理したCIAPを加え、5分間*in vitro*で脱リン酸化反応を行った。反応後、3×FlagによりFlag-IRS-2を溶出し、GST融合タンパク質を加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。C) H4-IIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、100 nMのインスリンで5分間処理し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液にCIAPを加え、30分間*in vitro*で脱リン酸化反応を行った。反応後、精製したGST融合タンパク質を加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、抗IRS-2抗体を用いたimmunoblottingを行った。

A)



B)

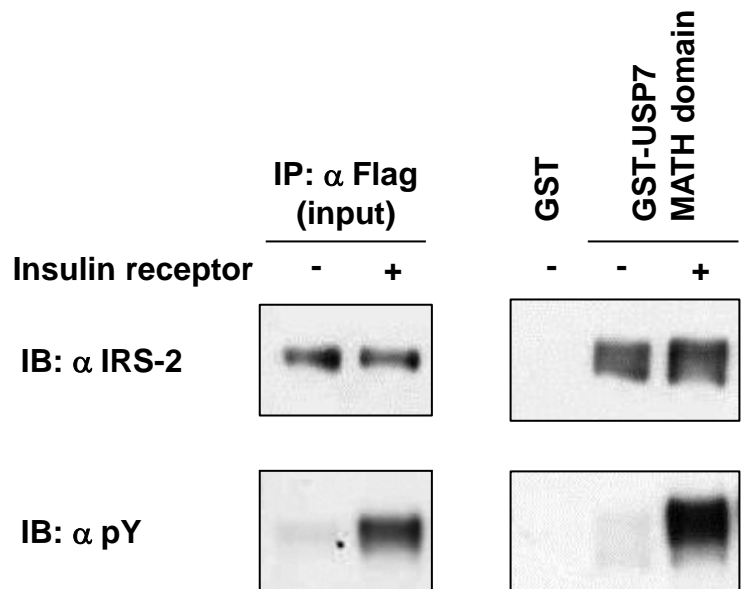
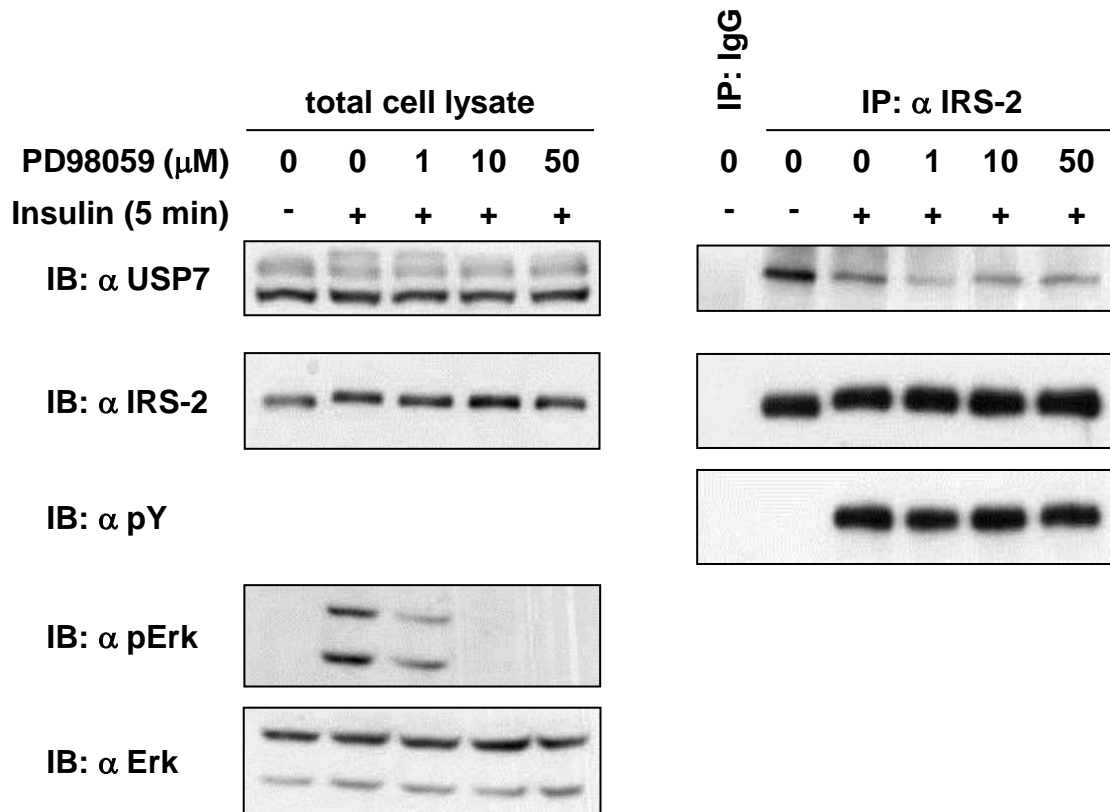


Fig. 3-6 インスリン受容体キナーゼによるIRS-2のチロシンリン酸化がUSP7との相互作用に及ぼす影響の解析

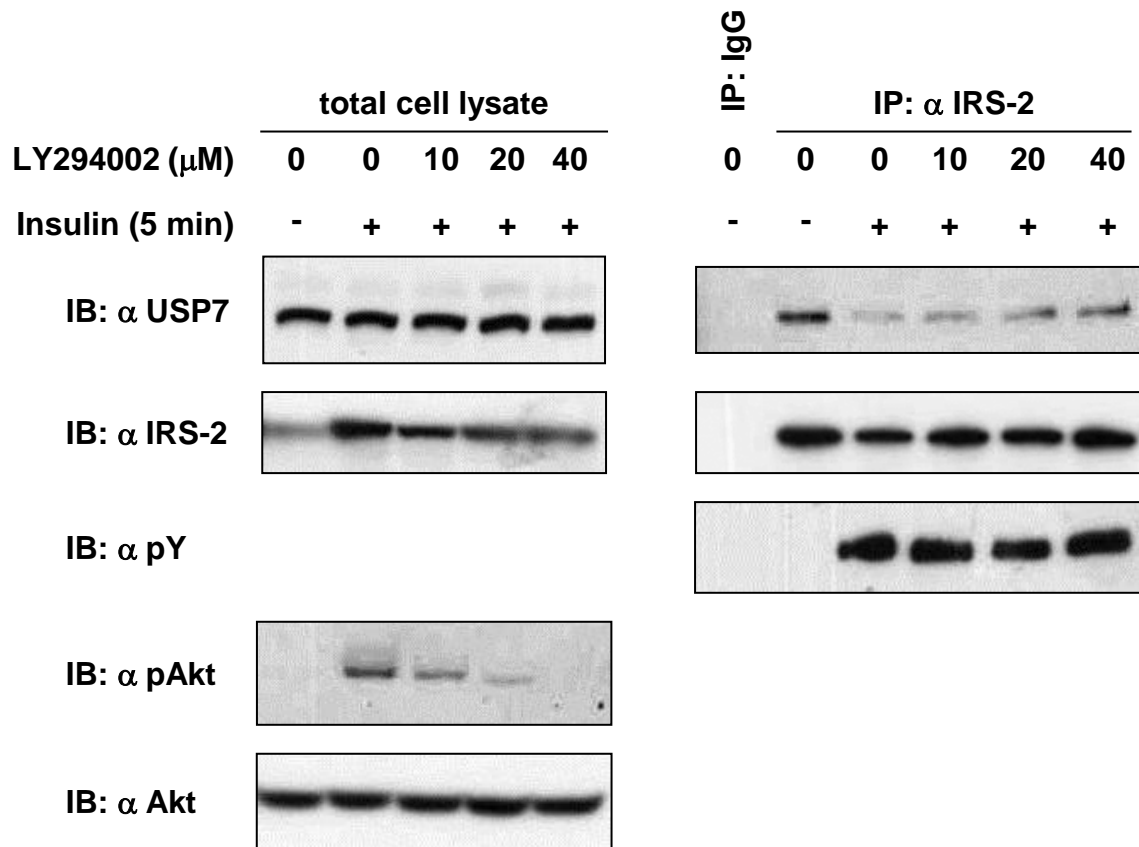
A) 本実験の流れを模式図で示した。B) HEK293T細胞にFlag-IRS-2を発現するプラスミドを導入し、24時間培養後、血清非存在下でさらに24時間培養した。細胞抽出液を調製し、抗Flag抗体により免疫沈降した。沈降物にNIR細胞から粗精製したInsulin receptorを加え、5分間*in vitro*でリン酸化反応を行った。反応後、3×FlagIによりFlag-IRS-2を溶出し、GST融合タンパク質をそれぞれ加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。なお、*in vitro*のリン酸化反応におけるネガティブコントロールとしてInsulin receptorを加えないものを用いた。





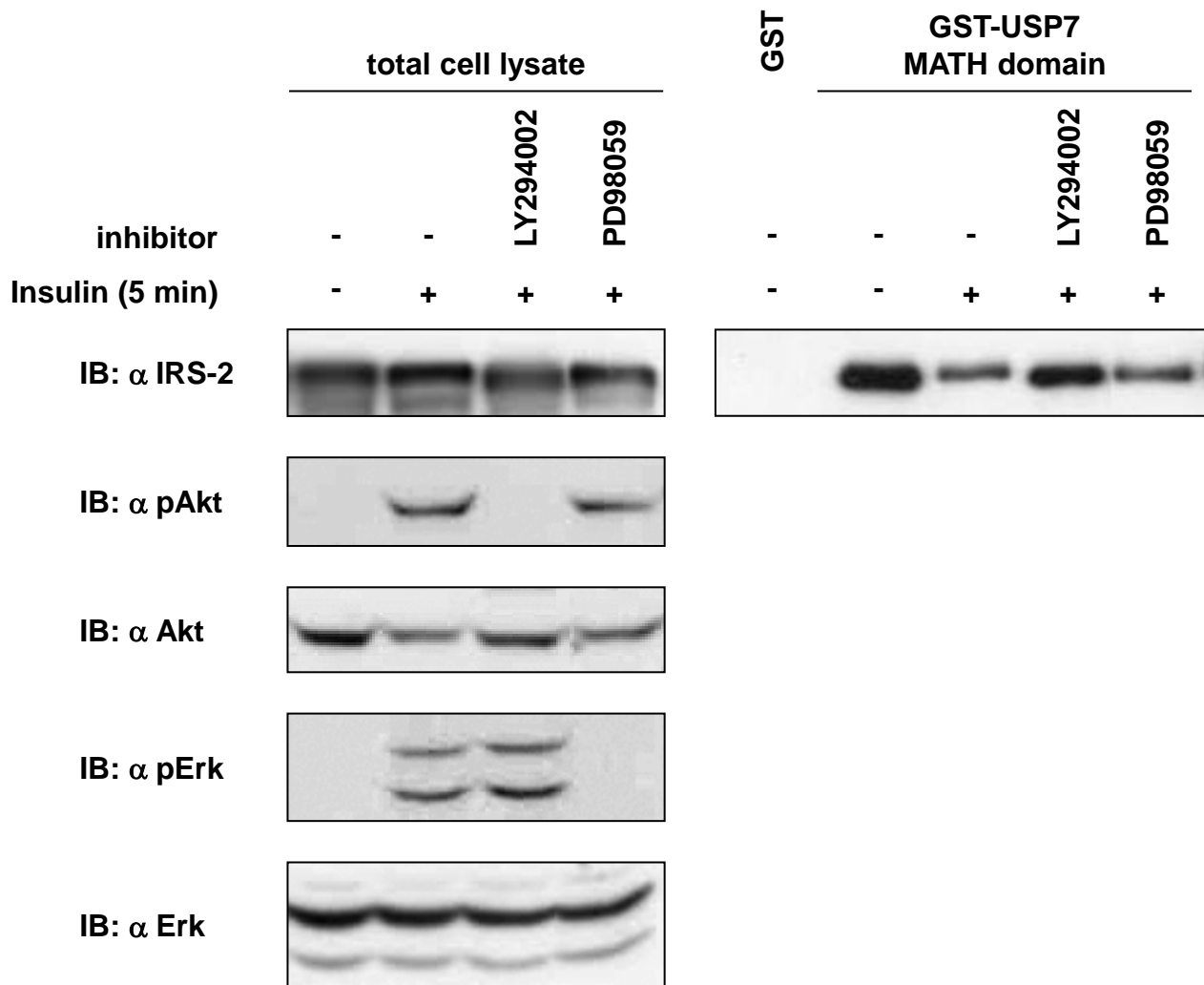
**Fig. 3-7 インスリン刺激依存的なMAPK経路の活性化の阻害がUSP7とIRS-2の相互作用に及ぼす影響の解析**

H4-IIIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、図に示した濃度のPD98059で30分処理した。その後、100 nMのインスリンで5分処理し、細胞抽出液を調製した。抗IRS-2抗体で免疫沈降を行い、沈降物をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。



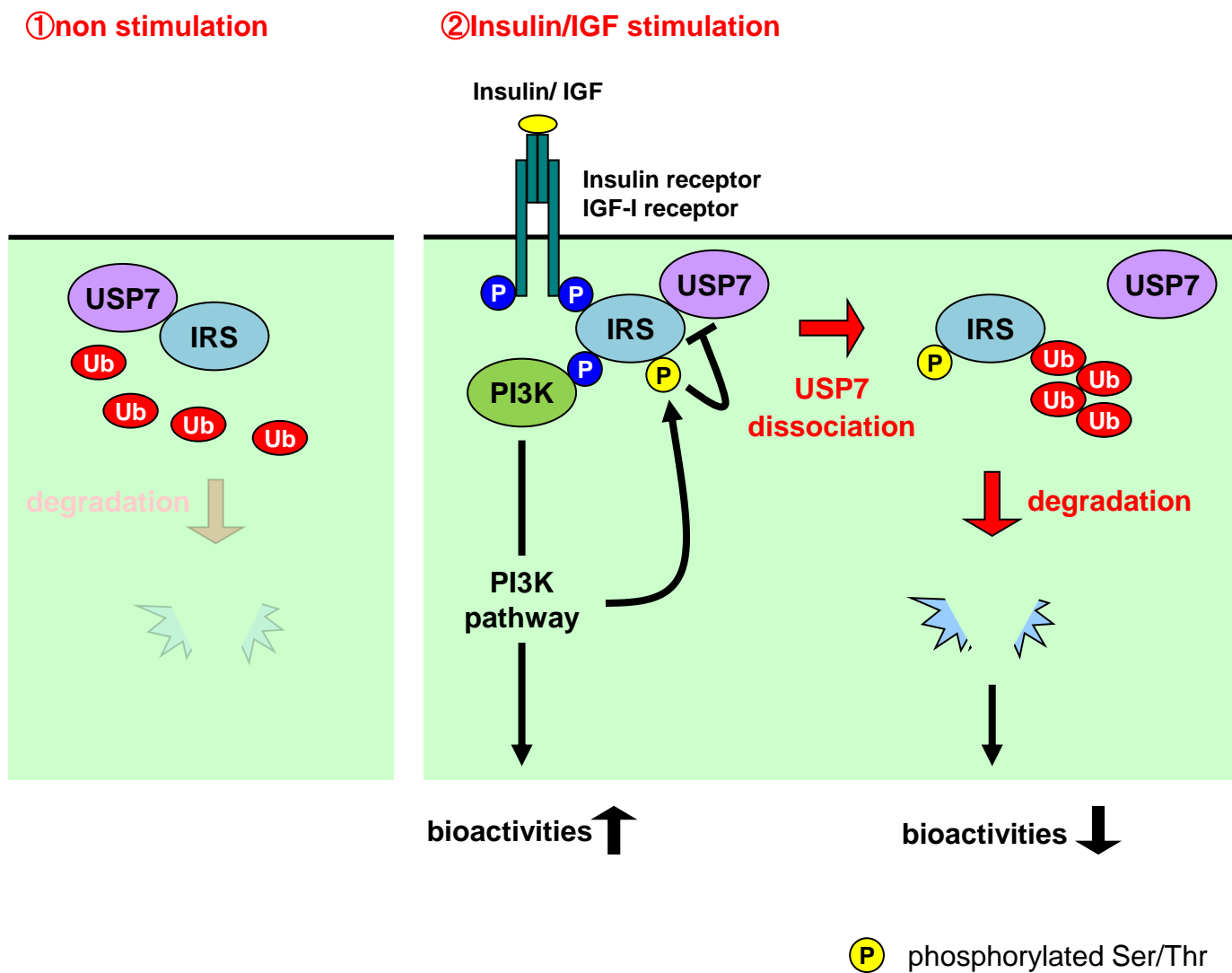
**Fig. 3-8 インスリン刺激依存的なPI3K経路の活性化の阻害がUSP7とIRS-2の相互作用に及ぼす影響の解析**

H4-IIIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、図に示した濃度のLY294002で30分処理した。その後、100 nMのインスリンで5分処理し、細胞抽出液を調製した。抗IRS-2抗体で免疫沈降を行い、沈降物をSDS-PAGEに供し、図に示した抗体を用いたimmunoblottingを行った。



**Fig. 3-9 活性化した下流シグナル経路からのフィードバックによるIRS-2の分子修飾がUSP7との相互作用に及ぼす影響の解析**

H4-IIIE細胞を血清非存在下で24時間培養後、40  $\mu$ MのLY294002および50  $\mu$ MのPD98059で30分処理した。その後、100 nMのインスリンで5分処理し、細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液に精製したGST融合タンパク質をそれぞれ加え、2時間インキュベートした。その後、沈降物をSDS-PAGEに供し、抗IRS-2抗体を用いたimmunoblottingを行った。



**Fig. 3-10 USP7によるIRSの量制御機構に関する作業仮説**

「基底状態ではUSP7はIRSと相互作用し、IRSを脱ユビキチン化することで分解を抑制している。一方、インスリン／IGF刺激に応答したPI3K経路の活性化を介してIRSがセリン／スレオニンリン酸化されることでIRSからUSP7が解離する。その結果、IRSが脱ユビキチン化されなくなり、ユビキチン化が亢進、プロテアソームに分解され、インスリンシグナルが減弱する」というインスリン感受性低下の新しい脱感作機構が稼働していると結論した。

## 第四章

# IGF 刺激に応答して変動する ユビキチン化タンパク質の網羅的解析

## 緒言

これまでの結果から、インスリン様シグナル伝達経路の活性化により IRS-2 のユビキチン化状態が変動することが明らかとなった。既にインスリン様シグナルを伝達する分子の一部はインスリン/IGF 処理により量変動が起こることが知られている。また、USP7 は IRS だけでなく、インスリン/IGF シグナルに関わる PTEN や FOXO を脱ユビキチン化することでその局在を制御することや、IGF-I 受容体の量制御にも関わることを示されている(Song *et al.*, 2008; van der Horst *et al.*, 2006)。更に、IRS と相互作用する USP9X は IRS だけでなく IGF-I 受容体のユビキチン化および量も制御することが明らかとなってきており(古田遥佳, 卒業論文 2012)、mTOR の活性を制御するという報告もある(Agrawal *et al.*, 2012)。IRS をユビキチン化、分解を誘導することが知られている Mdm2 は、IGF-I 受容体をユビキチン化、エンドサイトーシスを誘導することも明らかとなっている(Sehat *et al.*, 2008; Usui *et al.*, 2004)。このように、一部の E3 リガーゼと脱ユビキチン化酵素がインスリン様シグナルに関わる様々な分子のユビキチン化を制御しており、USP7 と IRS と同様にインスリン/IGF 処理により基質タンパク質との相互作用が変動すること

がいられているものも多い (Fig. 4-1)。これらのことから、USP7をはじめとした一部の E3 リガーゼと脱ユビキチン化酵素がインスリン/IGF 刺激に応答して相互作用するタンパク質を変化させることで、刺激依存的にタンパク質のユビキチン化状態がダイナミックに変動、それによりインスリン/IGF シグナルが制御されているのではないかと着想した。

このことを示すためには、まず、IGF 刺激に応答して変動するユビキチン化タンパク質を網羅的に同定する必要がある。しかし、現在ユビキチン化タンパク質を網羅的に同定、定量する手法は存在しないため、まずその手法の開発を行った。

最初に、細胞抽出液からユビキチン化タンパク質を濃縮・精製する方法を検討した。ユビキチンを認識する抗体には、ユビキチン同士の連結様式非特異的にユビキチンを認識する抗体が複数存在する。これらはクローン番号から P4D1 抗体、FK2 抗体と呼ばれている。また、ユビキチン同士の連結様式特異的にユビキチン鎖を認識する抗体も市販されている。これらは、認識する連結様式から K11 抗体や K48 抗体と呼ばれている。今回、入手可能な種々の抗ユビキチン抗体で免疫沈降を行い、ユビキチン化タンパク質の検出を試みたところ、FK2 抗体が効率良くユビキチン化タンパク質の濃縮・精製に利用できることがわかった。

IGF 刺激に応答して変動するユビキチン化タンパク質を網羅的に解析するためには、タンパク質の同定だけでなく、定量も行う必要がある。今回、stable isotope labeling using amino acids in cell culture (SILAC) 法を用いて定量を試みた。SILAC 法とは、それぞれ質量の異なる安定同位体標識したアミノ酸を細胞に取り込ませることで、細胞内の全タンパク質を安定同位体標識する。それらの細胞の片方について、解析目的の処理を行った後、サンプルを混合、LC-MS に供すると、質量以外の化学的な物性は保たれているため、同じ配列のペプチドは、同時に LC から溶出され、同時にスペクトルが解析される。各スペクトルは同位体標識の分、異なる質量電荷比で検出されるため、どちらのサンプル由来のペプチドか区別することができ、また、MS スペクトルのピーク面積を比較することで定量することが可能となる (Ong *et al.*, 2002)。今回は、IGF-I 処理を行った細胞と行わない細胞のユビキチン化タンパク質を FK2 抗体で精製し、SILAC 法で比較解析を試みた。

また、ユビキチン化タンパク質のみを精製し、定量するために、第二章で開発した手法を応用し、抗 diGly 抗によるユビキチン化ペプチドの精製、及び定量を行った。種々の検討から、ユビキチン化ペプチドの精製には、抗 diGly 抗体による免疫沈降の前にユビキチン化タンパク質の精製が必要であり、また、トリプシンによる消化産物中にユビキチン由来のペプチドが残らないよう工夫する必要があることがわかった。そこで、Tandem Ubiquitin Binding Entity (TUBE) を用いてユビキチン化タンパク質の精製を試みた。TUBE

はユビキチン結合ドメインがタンデムに結合された人工タンパク質で、連結様式非特異的にユビキチン鎖と非常に強く結合することが知られている。また、通常の TUBE ではなく、TUBE の配列中にあるアルギニンをすべてアラニンに置換することで、トリプシンで消化されなくした変異体、trypsin resistant (TR) -TUBE を用いた。この TR-TUBE は結合したユビキチン鎖をトリプシン消化から保護することがすでに確認されている。この TR-TUBE を用いた pull-down、トリプシン処理、抗 diGly 抗体による免疫沈降を組み合わせたユビキチン化ペプチドの精製法を開発した。この方法で精製したユビキチン化ペプチドを質量分析に供することで、ユビキチン化タンパク質の網羅的同定および定量が可能な手法を確立した。

最終的に、この手法を用いて IGF 刺激依存的にユビキチン化、プロテアソームにより分解されるタンパク質の網羅的解析を行った。

## 結果

### 1. 抗ユビキチン抗体を用いたユビキチン化タンパク質の精製法の検討 (Fig. 4-2)

ユビキチン化タンパク質の網羅的解析を行うためには、まず、細胞抽出液からユビキチン化タンパク質を濃縮・精製しなくてはならない。そこで、まず、市販されている各種の抗ユビキチン抗体（P4D1 抗体、FK2 抗体、K11 抗体、K48 抗体、K63 抗体）を用いて免疫沈降を行い、ユビキチン化タンパク質を精製できる抗体を探索した。また、質量分析を行う際に、サンプル中に多量の抗体があると、イオンサプレッションによりユビキチン化タンパク質が同定されにくくなると考えられたため、免疫沈降後に beads から抗体が溶出されないよう、抗体と beads を定法通りに cross-link させたものも用意し、比較解析した。すなわち、MCF-7 細胞の細胞抽出液を種々の抗ユビキチン抗体および抗ユビキチン抗体と beads を cross-link させたもので免疫沈降した。抗ユビキチン抗体である P4D1 抗体で immunoblotting し、免疫沈降されたユビキチン化タンパク質を検出した。その結果、FK2 抗体を用いた場合が最も強くユビキチンのシグナルが検出され、どの抗体においても、cross-link によりシグナルが減弱した。この結果より、以降は FK2 抗体を用いて cross-link せずにユビキチン化タンパク質を精製することにした。

### 2. SILAC 法を用いたユビキチン化タンパク質の網羅的解析 (Fig. 4-3)

IGF 刺激に応答して変動するユビキチン化タンパク質を網羅的に解析するためには、精製したタンパク質を同定するだけでなく、定量する必要がある。そこで、緒言にて原理を説明した SILAC 法を用いた。同位体標識を行っていない MCF-7 細胞 (Light) を 100 ng/ml の IGF-I および 10  $\mu$ M の MG132 で、リジンおよびアルギニンを同位体標識した MCF-7 細胞 (Heavy) を 10  $\mu$ M の MG132 のみで、それぞれ 6 時間処理し、細胞抽出液を調製した。同量タンパク量の細胞抽出液を混合し、FK2 抗体で免疫沈降後、SDS-PAGE に供した。1.5 cm 程度泳動した後、全ゲルを切り出し、トリプシンで消化後、質量分析計により解析した。その結果、350 種類を超えるタンパク質、2,000 種類を超えるペプチドの同定に成功



した。一種類のペプチドに対して Heavy および Light 双方のペプチドが検出された回数を示す H/L count は全体で 2000 であった。また、Heavy において、Light よりも量が半分以下のタンパク質が 36 種類同定され、逆に、量が 2 倍以上のタンパク質は検出されなかった。同定されたタンパク質について定量の精度を検討してみたところ、通常 3 以上あれば信頼性があるとされる H/L count が半分以上のタンパク質において 0 や 1 であったことから、大部分のタンパク質の定量結果の精度は低いと考えられる。また、1 つのタンパク質について、複数回ペプチドの量を定量していた場合に、定量結果を比較し、誤差を計算したところ、誤差が 100% を超えているタンパク質も多く認められた。また、この手法では、ユビキチン化タンパク質を免疫沈降した際に、ユビキチン化タンパク質と共免疫沈降されてくる相互作用タンパク質も同時に質量分析に供しているため、同定されたタンパク質がユビキチン化タンパク質なのか、共免疫沈降されてきた相互作用タンパク質なのかの区別がつけられなかった。これらの理由から、この手法は網羅的解析には用いることができないと判断した。

### **3. 抗 diGly 抗体を用いたユビキチン化ペプチドの網羅的解析 (Fig. 4-4)**

そこで、ユビキチン化タンパク質のみを精製し、定量するために、第二章で開発した手法を応用し、抗 diGly 抗体によるユビキチン化ペプチドの精製、及び定量を試みた。経時的に IGF-I で刺激した MCF-7 細胞の細胞抽出液をトリプシンで消化、消化産物を抗 diGly 抗体により免疫沈降し、沈降物を質量分析に供した。結果、各サンプルにおいて約 50 種類のタンパク質、100 種類以上のペプチドが同定された。しかし、同定されたペプチドのうち、ユビキチン化ペプチドは約 1 割のみであり、また、同定されたユビキチン化ペプチドのほとんどがユビキチン由来のペプチドであり、この抗体のみの精製ではユビキチン化タンパク質の網羅的な同定には至らないと判断した。

## **4. TR-TUBE および抗 diGly 抗体を用いたユビキチン化ペプチドの網羅的解析**

### **(1) TR-TUBE および抗 diGly 抗体を用いたユビキチン化ペプチドの網羅的同定 (Fig. 4-4)**

種々の検討から、ユビキチン化ペプチドの精製には、抗 diGly 抗体による免疫沈降の前にユビキチン化タンパク質の精製が必要であり、また、トリプシンによる消化産物中にユビキチン由来のペプチドが残らないよう工夫する必要があることがわかった。そこで、緒言で原理を述べた TR-TUBE を用いてユビキチン化タンパク質を精製した。すなわち、経時的に IGF-I で刺激した MCF-7 細胞の細胞抽出液と TR-TUBE を用いた pull-down を行い、沈降物をトリプシンで消化した。消化産物を抗 diGly 抗体で免疫沈降し、沈降物を質

量分析に供した。その結果、各サンプルにおいて、ユビキチン以外に 100 種類以上のタンパク質、約 300 種類のペプチドが同定された。また、同定されたペプチドのうち 9 割以上が diGly 修飾されたユビキチン化ペプチドであった。

## (2) TR-TUBE および抗 diGly 抗体を用いたユビキチン化ペプチドの網羅的定量 (Fig. 4-5)

同定されたユビキチン化ペプチドを定量するために SILAC 法を用いたが、同位体標識されたユビキチン化ペプチドはほとんど検出されなかった (data not shown)。解析ソフトは、データベース上にあるタンパク質配列から消化酵素で消化した際に産出されるペプチドを予測、そのペプチド配列から MS スペクトルと MS/MS スペクトルの質量電荷比を算出し、実測データと比較することでペプチドおよびタンパク質を同定する。また、diGly 修飾などの修飾や同位体標識がなされたペプチドは、質量電荷比が一定の割合で変動するため、その質量電荷比の変動から修飾や同位体標識が同定される。同位体標識されたユビキチン化ペプチドは、同位体標識と diGly 修飾が入ることにより、二重に質量電荷比が変動しているため、解析ソフトが認識できず、今回のようにほとんど検出されなかったと考えられる。

そこで、SILAC 法のように同位体標識はせずに、ラベルフリーの状態でも MS スペクトルのピーク面積を指標に定量することにした。同定されたユビキチン化ペプチドの MS スペクトルのピーク面積を Protein discoverer で定量した。定量結果を IGF 刺激 0 分のサンプルを基準に比較し、差のあったペプチドに関してクラスタリング解析を行った。結果、439 種類のユビキチン化ペプチドの量が IGF 刺激に応答して変動していた。

このことから、IGF 刺激依存的に変動するユビキチン化タンパク質の同定に成功したと考えられた。しかし、同定されたタンパク質のユビキチン化の意義については判断できず、今後の課題となった。このような意義についても解析するためには、注目している機能に合わせてサンプルを調製する必要があると考えられた。

## 5. IGF 刺激に応答してユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されるタンパク質の網羅的解析 (Fig. 4-6)

そこで、今回は、ユビキチン-プロテアソーム系分解に着目し、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて分解を抑制し、蓄積されるユビキチン化タンパク質を解析した。すなわち、MCF-7 細胞を MG132 で 30 分間前処理後、IGF で 30 分間刺激、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液と TR-TUBE を用いて pull-down を行い、沈降物をトリプシンで消化した。消化物を抗 diGly 抗体で免疫沈降し、沈降物を質量分析に供した。同定されたユビキチン化ペプチドの MS スペクトルのピーク面積を定量した。一般に、SILAC 法を用いた定量法は、

比較するサンプルを同時に質量分析に供するため、イオンサプレッションなど MS スペクトルのピーク面積が変動するような外的影響を受けないことから、精度の高い定量法と考えられている。一方、今回の網羅的解析法は、同位体で標識しない定量を行っているため、それぞれのサンプルを別々に質量分析に供している。そのため、外的影響を受ける可能性があり、定量の信頼性が低い。この点を改善するため、各サンプルについて3点ずつ計測し、誤差の大きいものを除くことでこの欠点を改善した。その結果、1,664種類のペプチドが同定され、3点間の標準誤差が平均値の半分以上であったペプチドを除くと、1,313種類に減少した。更に、MG132未処理、IGF刺激0分のサンプルを基準に比較したところ、793種類のペプチドがIGFあるいはMG132の処理により量に変動することがわかった。

定量結果をもとにそれら793種類のペプチドをクラスタリング解析したところ、125種類のユビキチン化ペプチドがMG132存在下でIGF刺激依存的にユビキチン化が増加していた。その中には、IGF刺激に応答して活性化するS6Kによるリン酸化を介してユビキチン-プロテアソーム系分解が誘導される Programmed cell death protein (PDCD) 4やIGF刺激に応答して発現が上昇する Hypoxia-inducible factor (HIF) 1 $\alpha$ などが存在した (Schmid *et al.*, 2008; Treins *et al.*, 2005)。なお、巻末に今回同定されたペプチドの一覧を掲載した。

## 考察

### ユビキチン化ペプチドの網羅的解析法の有用性

最初に、抗ユビキチン抗体によるユビキチン化タンパク質の精製と SILAC 法を用いた定量を組み合わせた網羅的解析法の確立を試みた。しかし、同定されるペプチド数が少ない上、精度の高い定量ができず、また、ユビキチン化タンパク質とユビキチン化タンパク質の共免疫沈降物を区別できないという大きな欠点があることが判明した。このため、次に TR-TUBE および抗 diGly 抗体を用いた方法を試みた。これらを組み合わせることにより、約 600 種類のユビキチン化ペプチドの同定および定量が可能となり、ユビキチン化タンパク質の網羅的解析法の確立に成功したと考えている。この方法は、100 mm dish 一枚分という少量の lysate から 300 種類以上という多数のユビキチン化ペプチドが同定できることから、感度の高い系だと言える。また、定量も行えることから、ネガティブコントロールとの比較が可能であり、第二章で開発したユビキチン化リジン残基の同定法と同様に、内在性のタンパク質や薬剤処理の影響を除くことができる点でも優れている。

### IGF 刺激に応答して変動するユビキチン化ペプチドの意義

経時的に IGF-I で刺激した MCF-7 細胞の細胞抽出液におけるユビキチン化ペプチドを定量したところ、IGF 刺激に応答して 400 種類以上のユビキチン化ペプチドの量が増減していることが明らかとなった。この結果は、IGF 刺激に応答して、多くのタンパク質のユビキチン化状態が変動していることを示している。しかし、ユビキチン化タンパク質を無条件に精製、同定しているため、同定されたタンパク質に付加されたユビキチンが分解誘導や局在制御、活性制御などのどの機能を有するのかは判断できなかった。また、IGF で 1 時間や 6 時間処理したサンプルについては、IGF 刺激依存的にタンパク質合成が増加し、全体量が増えた結果、ユビキチン化や分解の速度は変わらないにも関わらず、ユビキチン化されたタンパク質の量が増加するため、ユビキチン化が亢進しているタンパク質として同定されたタンパク質も存在すると考えられる。このように、ユビキチン化タンパク質の網羅的解析法の確立には成功したが、同定されたタンパク質のユビキチン化の意義について

では今後の課題である。このような意義についても解析するためには、分解誘導の場合は、分解を抑制し、蓄積されたユビキチン化タンパク質を解析する、局在制御の場合は、細胞を分画し、各分画について解析するなど、注目している機能に合わせてサンプルを調製する必要があると考えられる。

### IGF 刺激に応答してユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されるタンパク質の意義

今回、ユビキチン-プロテアソーム系分解に着目し、IGF 刺激に応答して分解の誘導されるタンパク質を網羅的に解析した。IGF 刺激依存的にユビキチン化、プロテアソームに分解されるタンパク質は MG132 存在下では IGF 刺激依存的にユビキチン化されたタンパク質が蓄積すると考えられるため、これら 125 種類のペプチドは IGF 刺激依存的に分解が誘導されていると考えられる。この群の中には、IGF 刺激依存的に活性化する S6K によってリン酸化されると、ユビキチン化、プロテアソームに分解されることが知られている PDCD4 が存在したことから (Schmid *et al.*, 2008)、確かに IGF 刺激に応答してユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されるタンパク質が同定できたと言えた。一方、IGF 刺激依存的にタンパク質合成が促進されることが知られている HIF1 $\alpha$  も存在したことから (Treins *et al.*, 2005)、分解が誘導されるタンパク質だけでなく、タンパク質合成が亢進されるタンパク質も一部同定されていると考えられた。また、一般にタンパク質合成が盛んになる際に合成が促進される種々の tRNA ligase などのタンパク質や細胞分裂が誘導される際に分解が誘導される cyclin B1 などのタンパク質も存在した。そこで、この群に存在するタンパク質をそれぞれ調べたところ、IGF シグナルとの関連が報告されていない 31 種類の未知タンパク質が存在した (table 4-2-1, 2)。これらのタンパク質は IGF 刺激に応答してユビキチン化、プロテアソームに分解される新規タンパク質と考えられる。これら新規基質は、肝細胞増殖因子 HGF の活性化因子を阻害するとして知られる Kunitz-type protease inhibitor (SPINT) 2、転写抑制因子である Max dimerization protein (MXD) 1、mRNA の分解を促進すると考えられている RNA-binding protein NOB1 など、細胞増殖へ抑制的に働くタンパク質が多く存在した (Ayer *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 2011; Lehner and Sanderson, 2004)。一連の結果から、IGF シグナルは、これまで知られていたような、細胞増殖を誘導するタンパク質の発現上昇や活性化を誘導するだけでなく、細胞増殖を抑制する多くのタンパク質の分解を誘導することで、細胞増殖を促進していると結論した。

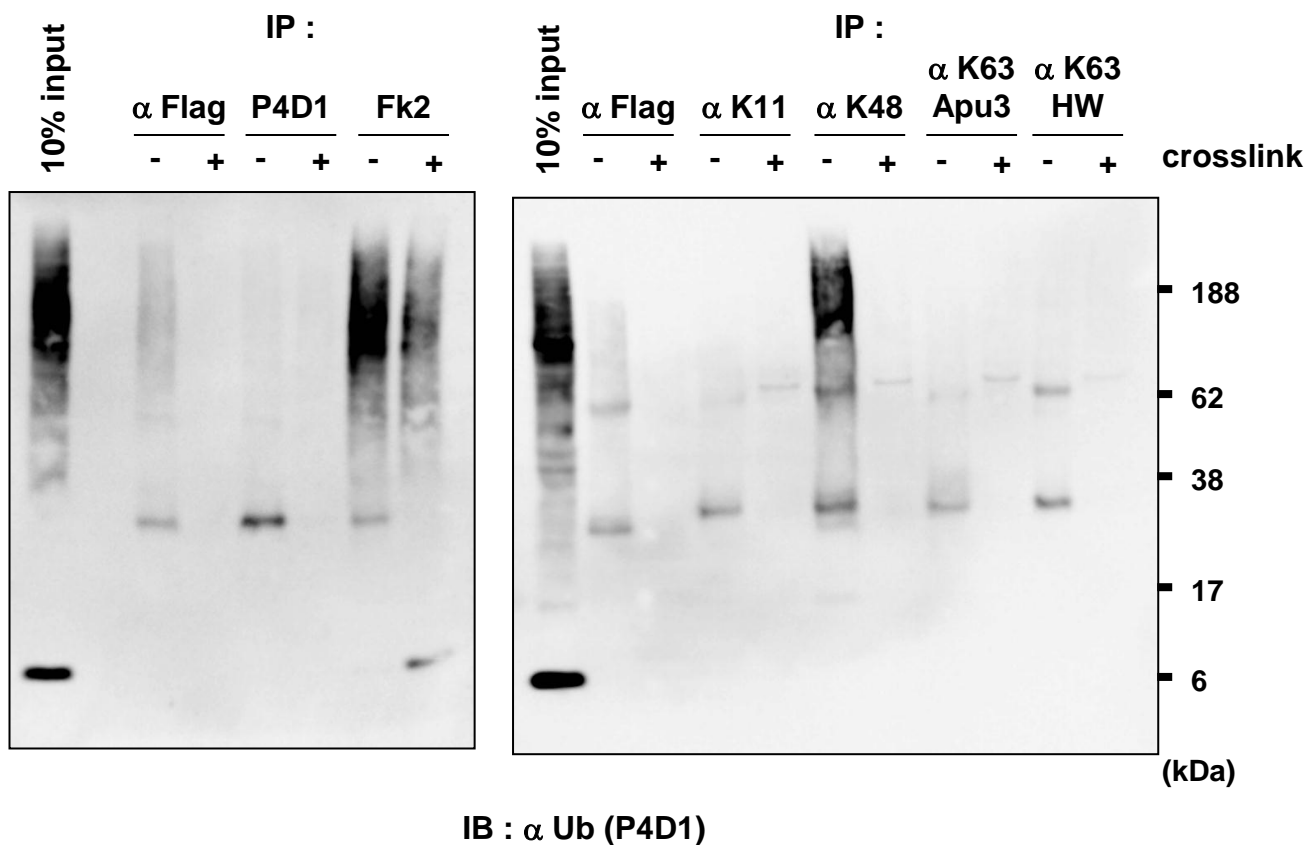
また、今回同定されたタンパク質の中には、既知の機能は IGF の生理活性と関連がないと考えられるものも複数存在した。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の輸送に関わっている膜輸送タンパク質 Anion exchange protein (SLC4A) 2 や機能未知のアセチル化酵素 N-alpha-acetyltransferase

(NAA) 11、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  のホメオスタシスに関与することが報告されている Wolframin (WFS1)、などがその例である (Arnesen *et al.*, 2006; Rickmann *et al.*, 2007; Takei *et al.*, 2006)。

今回の解析により、これら IGF 刺激に応答してユビキチン化、プロテアソームに分解されるタンパク質のユビキチン化リジン残基はすでに同定されている。そこで、今後、このリジン残基を置換させた変異体を細胞に発現させ、IGF 刺激依存的な分解が起こらない変異体が IGF シグナルや生理活性に及ぼす影響を解析していきたい。これにより、今回同定されたタンパク質の IGF シグナルにおける意義が明らかにできると考えている。

### まとめ

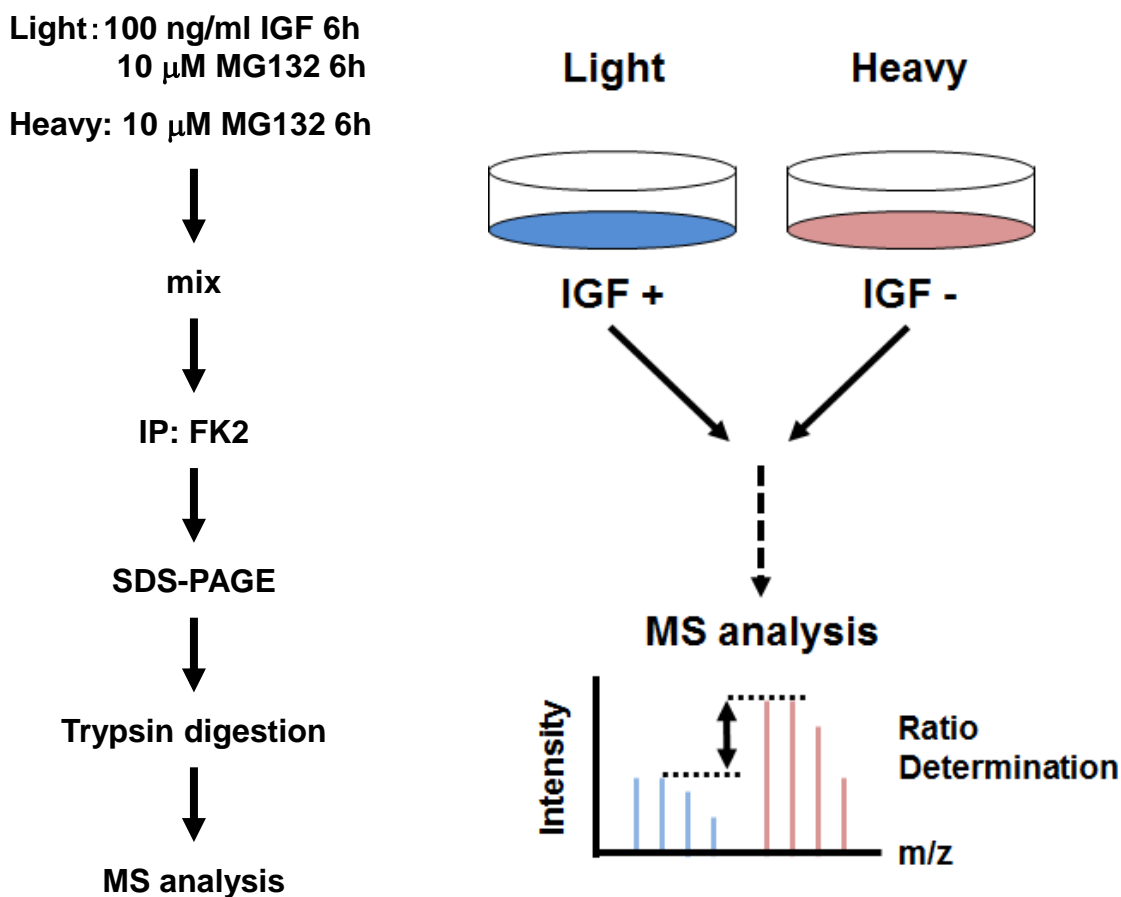
今回、TR-TUBE と抗 diGly 抗体を用いることで、IGF 刺激依存的にユビキチン化が変動するタンパク質を網羅的に解析する手法の確立に成功した。この手法により、IGF 刺激依存的に 200 種類を超えるタンパク質のユビキチン化状態が変動しており、その一部はプロテアソームを介した分解が誘導されていることを示すことができた。また、IGF 刺激によりユビキチン化、プロテアソームに分解されるタンパク質として、31 種類の新規タンパク質を同定した (Fig. 4-7)。今回確立したユビキチン化タンパク質の網羅的解析法は、IGF 以外の細胞外因子の刺激や特定の生理状態などにおけるユビキチン化タンパク質の解析にも利用でき、今後のユビキチン研究に大いに役立つと考えている。



**Fig. 4-1 抗ユビキチン抗体を用いたユビキチン化タンパク質の精製法の検討**

MCF-7を血清非存在下で18時間培養後、20  $\mu$ MのMG132で6時間処理し、細胞抽出液を調整した。その後、crosslinkerにより定法通り抗体とbeadsをcrosslinkしたあるいはしていない図に示したユビキチン抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物をSDS-PAGEに供し、抗ユビキチン抗体 (P4D1) を用いたimmunoblottingを行った。なお抗ユビキチン抗体の代わりに抗FLAG抗体を用いたものをネガティブコントロールとした。

A)



B)

protein	372
peptide	2229
H/L count	2000
H<L protein	36
H>L protein	0

**Fig. 4-2 SILAC法を用いたユビキチン化タンパク質の網羅的解析**

A)本実験の流れを模式図で示した。B)同位体標識のしていないMCF-7細胞 (Lighr)およびリジンとアルギニンを同位体標識したMCF-7細胞 (Heavy)を血清非存在下で18時間培養し、Lightは100 ng/mlのIGF-Iおよび10 μMのMG132でHeavyは10 μMのMG132で、6時間処理し、細胞抽出液を調製した。同量タンパク量の細胞抽出液を混合し、FK2抗体で免疫沈降後、SDS-PAGEに供した。ゲルを切り出し、トリプシンで消化後、質量分析に供した。

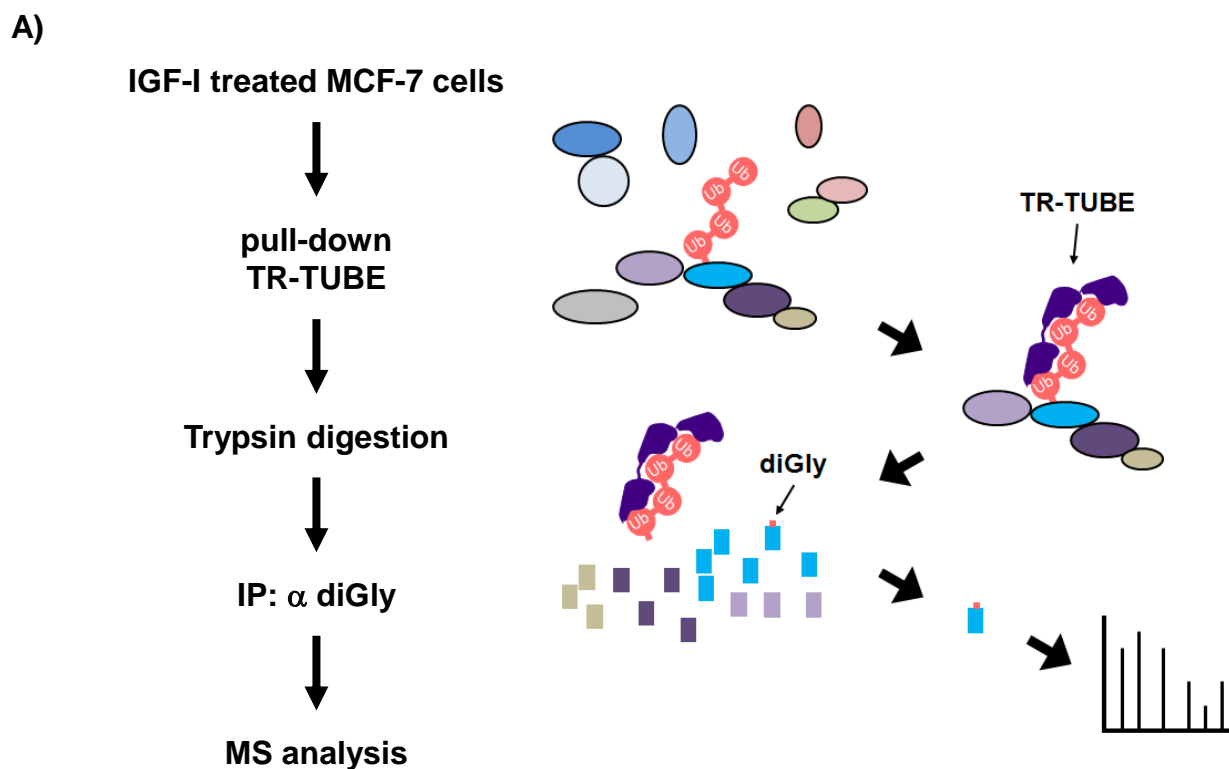


**Table4-1 抗ユビキチン抗体およびSILAC法を用いたユビキチン化基質の網羅的解析により同定されたタンパク質一覧**

抗ユビキチン抗体およびSILAC法を用いた解析により同定されたIGF刺激により量の変動したタンパク質の一覧。Proteinはタンパク質の名前、Peptideは同定されたペプチドの種類、Heavy/LightはMSスペクトルのピーク面積の比較定量結果、Countは各ペプチドに対して定量を行った回数、誤差は同一タンパク質において、複数回比較定量を行った場合の誤差を示している。

Protein	Peptides	Heavy/Light	Count	誤差 [%]
Partitioning defective 6 homolog beta	4	0.258	3	11.7
BAG family molecular chaperone regulator 3	5	0.324	5	14.9
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	3	0.327	3	15.3
Importin subunit alpha-2	2	0.366	2	17.7
Ubiquitin-like protein 4A	3	0.370	3	7.0
NEDD8	3	0.373	4	14.1
Nucleolin	6	0.378	5	19.5
Target of Myb protein 1	6	0.393	6	14.9
Fructose-bisphosphate aldolase A	3	0.402	3	11.5
40S ribosomal protein S14	3	0.421	2	2.4
Myosin-14	65	0.426	64	21.2
Myosin-9	25	0.428	18	10.4
Reticulocalbin-2	8	0.432	5	17.0
TOM1-like protein 2	11	0.437	12	14.8
Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	4	0.438	4	13.8
Golgi to ER traffic protein 4 homolog	8	0.441	7	22.2
Heat shock protein HSP 90-beta	17	0.442	10	20.3
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	7	0.449	10	17.7
Ras-related protein Rap-2c	2	0.450	3	16.3
40S ribosomal protein S28	2	0.454	2	18.0
E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	3	0.455	3	14.5
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	5	0.467	6	22.4
Cofilin-1	7	0.475	9	11.8
DnaJ homolog subfamily A member 1	4	0.479	2	20.7
Exportin-2	4	0.479	4	3.8
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	5	0.483	5	13.1
Nucleosome assembly protein 1-like 4	4	0.489	2	6.7
E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	12	0.489	10	24.0
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	7	0.491	6	23.7
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	11	0.491	11	16.3
BAG family molecular chaperone regulator 2	3	0.492	3	3.6
DnaJ homolog subfamily B member 2	6	0.493	8	6.3
40S ribosomal protein S18	4	0.494	2	12.5
Ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1	4	0.494	4	22.6
2',5'-phosphodiesterase 12	5	0.496	5	20.1
60S ribosomal protein L10	2	0.500	2	5.6





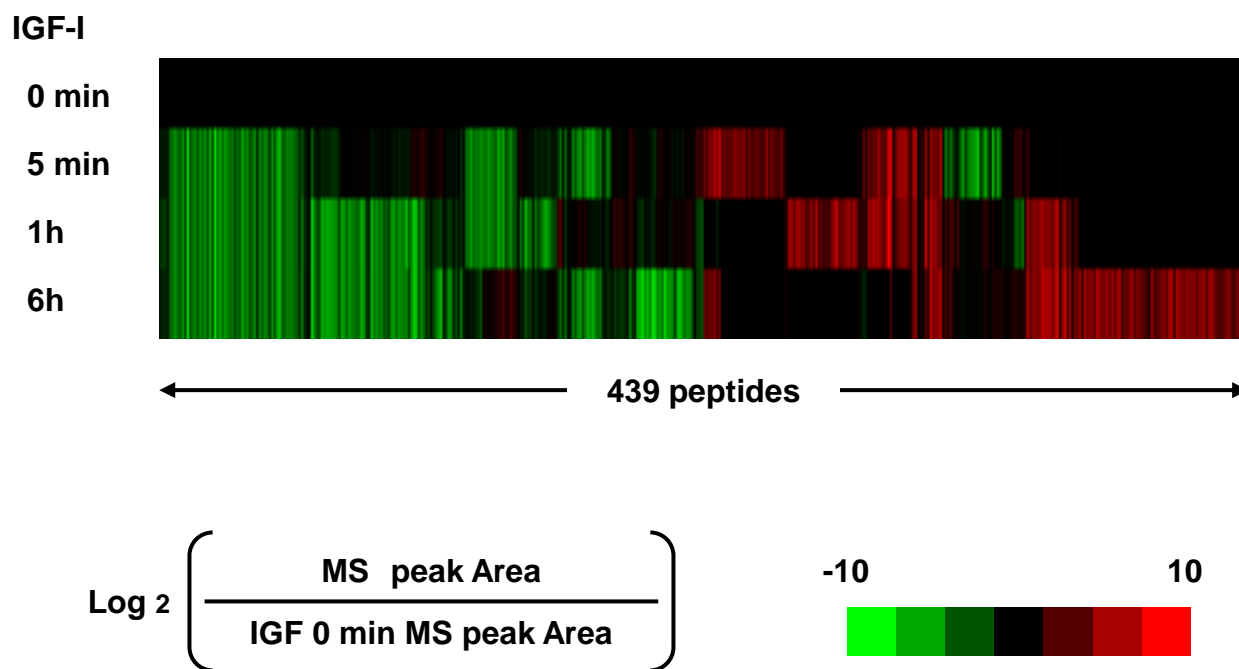
B)

	IGF-I (100 ng/ml)				all
	0min	15min	1h	6h	
protein	144	125	155	177	260
peptide	325	299	354	425	611
diGly-peptide	293	282	337	407	596

**Fig. 4-4 TR-TUBEおよび抗diGly抗体を用いたユビキチン化タンパク質の網羅的同定**

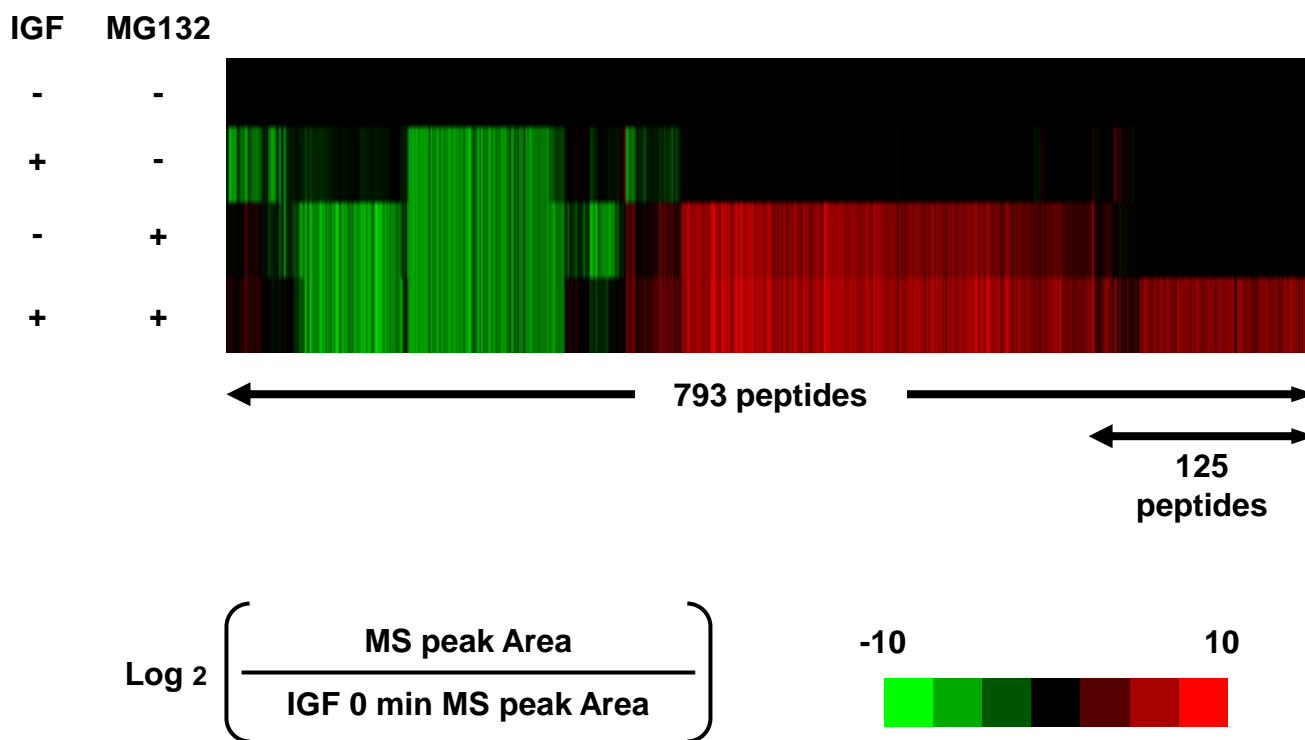
A)本実験の流れを模式図で示した。B)MCF-7細胞を血清非存在下で18時間培養し、100 ng/mlのIGF-Iで図に示した時間刺激し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液にTR-TUBEを添加し4°Cで2時間インキュベートした後、ストレプトアビジンビーズを添加し4°Cで40分インキュベートした。沈降物にトリプシンを添加し、37°Cで13時間インキュベートした。消化物をチップカラムで脱塩・濃縮し、抗diGly抗体で免疫沈降した。沈降物を酸溶出し、チップカラムで脱塩・濃縮、質量分析に供した。

C)



**Fig. 4-5 TR-TUBEおよび抗diGly抗体を用いたユビキチン化タンパク質の網羅的定量**

C) 同定されたユビキチン化ペプチドについて、MSスペクトルのピークエリアを定量した。IGF刺激をしていないサンプルと各サンプルの定量結果の比の底を2とした対数を取り、その値をもとにaverage法によるクラスタリング解析を行った。解析結果をヒートマップとして図に示した。



**Fig. 4-6 IGF刺激に应答してユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されるタンパク質の網羅的解析**

MCF7細胞を血清非存在下で18時間培養し、20 μMのMG132で30分間処理した。その後、100 ng/mlのIGF-Iで30分間刺激し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液にTR-TUBEを添加し4°Cで2時間インキュベートした後、ストレプトアビジンビーズを添加し4°Cで40分インキュベートした。沈降物にトリプシンを添加し、37°Cで13時間インキュベートした。消化物をチップカラムで脱塩・濃縮し、抗diGly抗体で免疫沈降した。沈降物を酸溶出し、チップカラムで脱塩・濃縮、質量分析に供した。同定されたdiGly修飾の入ったペプチドについて、MSスペクトルのピークエリアを定量した。定量結果のうち、3点間の標準誤差が平均値の半分以下であったペプチドについて、MG132未処理、IGF刺激0分のサンプルを基準に比較し、差のあったペプチドに関してaverage法によるクラスタリング解析を行った。解析の結果をヒートマップとして図に示した。

**Table 4-2-1 MG132存在下、IGF刺激に応答してユビキチン化が亢進した新規タンパク質の一覧**

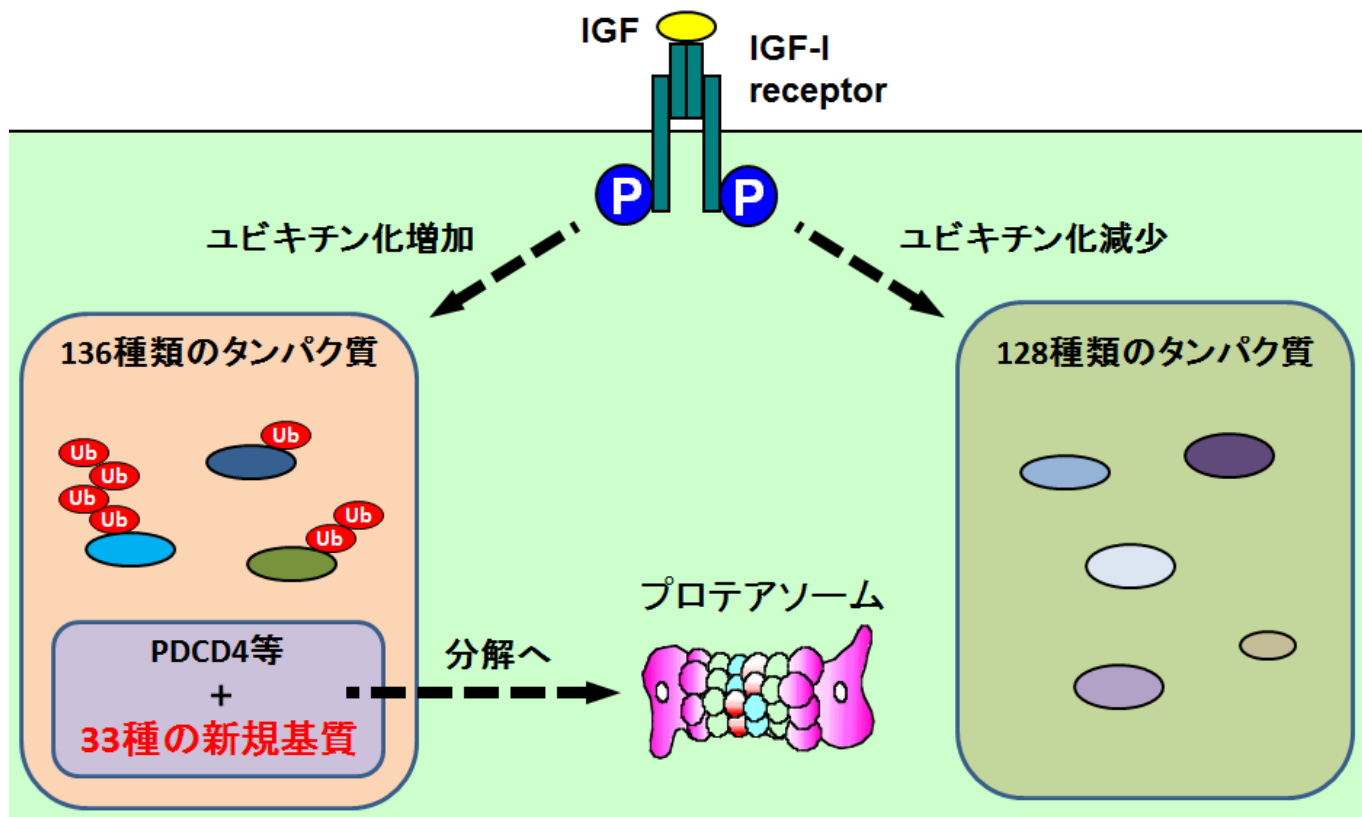
TR-TUBEおよび抗diGly抗体を用いたユビキチン化タンパク質の網羅的解析により同定された、IGF刺激に応答してユビキチン化が更新した新規タンパク質。タンパク質名は同定されたタンパク質の名前、配列は検出されたペプチドの配列、修飾は同定されたペプチド配列に付加された修飾を示している。Kはリジン、Mはメチオニンを示しており、その後続く数字は配列上の何番目のアミノ酸かを示している。ピーク面積比はMsスペクトルのピーク面積をIGFおよびMG132処理を行っていないサンプルとの比の底を2とした対数をとった値。

タンパク質名	配列	修飾	ピーク面積比			
			IGF -	IGF +	IGF -	IGF +
			MG -	MG -	MG +	MG +
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	LDIPKQSIQR	K5(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.16
Acyl-CoA desaturase	EKGSTLDLSDLEAEKLV MFQR	K2(GlyGly); K15(GlyGly); M18(Oxidation)	0.00	0.00	0.00	5.61
Adenine phosphoribosyltransferase	DISPVLKDPASFR	K7(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.90
ADP/ATP translocase 2	DFLAGGVAAAISKTA PIER	K13(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.06
ADP/ATP translocase 2	QIFLGGVDKR	K9(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.50
ADP/ATP translocase 2	QIFLGGVDKR	K9(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.64
ADP/ATP translocase 3	LAADVKGSGTER	K7(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.69
Amyloid protein-binding protein 2	EITAGLPVKVVVDVLR	K9(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	3.79
AP-2 complex subunit mu	TTKDIIIPFR	K3(GlyGly)	0.00	-2.43	1.05	2.39
BRO1 domain-containing protein BROX	ENITEDEAKEVHR	K9(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.26
Ceramide synthase 2	QPKQVEVELLSR	K3(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.14
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	WVFKEEGVLR	K4(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.83
E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP	TSKEVYDHAR	K3(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.98
Extended synaptotagmin-1	FFLQDPQSQELDVQVKD DSR	K16(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.92
Fatty acid desaturase 1	KVYNISEFTR	K1(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.22
Kelch-like protein 11	DVKALAIEDR	K3(GlyGly)	0.00	0.00	2.84	3.72
Kunitz-type protease inhibitor 2	TVWSSGDDKEQLVK	K9(GlyGly)	0.00	0.76	-0.03	1.08
L-lactate dehydrogenase A chain	DYNVTANSKLVITAGAR	K9(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.51

**Table 4-2-2 MG132存在下、IGF刺激に応答してユビキチン化が亢進した新規タンパク質の一覧**

TR-TUBEおよび抗diGly抗体を用いたユビキチン化タンパク質の網羅的解析により同定された、IGF刺激に応答してユビキチン化が更新した新規タンパク質。タンパク質名は同定されたタンパク質の名前、配列は検出されたペプチドの配列、修飾は同定されたペプチド配列に付加された修飾を示している。Kはリジン、Mはメチオニンを示しており、その後続く数字は配列上の何番目のアミノ酸かを示している。ピーク面積比はMsスペクトルのピーク面積をIGFおよびMG132処理を行っていないサンプルとの比の底を2とした対数をとった値。

タンパク質名	配列	修飾	ピーク面積比			
			IGF -	IGF +	IGF -	IGF +
			MG -	MG -	MG +	MG +
LSM domain-containing protein 1	QQLEALLNKTMR	K9(GlyGly); M11(Oxidation)	0	0.00	0.00	4.44
N-alpha-acetyltransferase 11	YYADGEDAYAMKR	K12(GlyGly)	0	0.00	0.00	2.35
ORM1-like protein 2	GTPFETPDQGKAR	K11(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.29
Protein CutA	VAKEIAR	K3(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.41
Protein max	ALEKAR	K4(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	2.80
Protein UXT	DKVYEQLAKYLQLR	K9(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.88
RNA-binding protein NOB1	NPKVLNPR	K3(GlyGly)	0.00	2.91	1.90	4.19
SH3 domain-binding protein 5	MDAALKR	N-Term(Acetyl); M1(Oxidation); K6(GlyGly)	0.00	0.00	1.51	2.77
SH3 domain-binding protein 5	KTVDDLQAK	K1(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	3.94
Signal peptidase complex subunit 2	DPTGMDPDDIWLSSSLKR	M5(Oxidation); K18(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.81
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	EQPLDEELKDAFQNAYLELG GLGER	K9(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.62
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	ASGADSKGDDLSTAILKQK	N-Term(Acetyl); K17(GlyGly)	0.00	-0.35	-1.15	0.63
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	LDQLIYIPLPEKSR	K13(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.15
Translocon-associated protein subunit delta	VQNMALYADVGGKQFPVTR	M4(Oxidation); K13(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	7.01
Translocon-associated protein subunit delta	YQVSWSLDHKSAHAGTYEVR	K10(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.71
Wolframin	GVIPSSLFLQDDEDDDELAKG SPEDLPLR	K21(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.17
Wolframin	EAVKLLR	K4(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	4.50
Zinc transporter ZIP6	DVSSSTPPSVTSKSR	K13(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.04
Zinc transporter ZIP6	YESQLSTNEEKVDDDRTEGYLR	K11(GlyGly)	0.00	0.00	0.00	5.77



**Fig. 4-7 IGF刺激に应答したタンパク質のユビキチン化変動の作業仮説**

IGF刺激依存的に200種類を超えるタンパク質のユビキチン化が増減することが明らかとなった。また、プロテアソームによる分解が誘導される基質として31種類の新規基質が同定された。これらIGF刺激依存的に分解が誘導されるタンパク質には細胞増殖に抑制的に働くものが多く存在した。これら一連の解析から、IGFシグナルは、これまで知られていたような、細胞増殖を誘導するタンパク質の発現上昇や活性化を誘導するだけでなく、細胞増殖を抑制する多くのタンパク質の分解を誘導することで、細胞増殖を促進していると結論した。今回確立したユビキチン化タンパク質の網羅的同定法は、IGF以外の細胞外因子の刺激や特定の生理状態などにおけるユビキチン化基質の解析にも利用でき、今後のユビキチンの研究領域の基礎研究に大いに役立つと考えられる。



## 総合討論

本章では、本研究により得られた結果と、これまでの他の報告を合わせて、

第一節 本論文のまとめとその意義、

第二節 IRS と脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼの相互作用の制御、

第三節 IRS のユビキチン化を介したインスリン様シグナルの調節、

第四節 IRS のユビキチン化と他のインスリン様シグナル分子のユビキチン化の連携、

第五節 IRS のユビキチン化と疾患、

の順に議論したい。最後に本研究の今後の展望を述べる。

### 第一節 本論文のまとめとその意義

本研究では、ユビキチン化タンパク質のユビキチン化リジン残基の同定法、付加されたユビキチンの結合様式の解析法、ユビキチン化タンパク質の網羅的解析法、という三つの新しい解析法を、ユビキチンの研究領域で開発した。抗 diGly 抗体による精製、そして、指定した MS スペクトルについてのみ解析を行うターゲットプロテオミクスの手法を取り入れることにより、目的のペプチドを高感度に検出することができ、これにより微量なユビキチン化ペプチドの解析が可能になったことが、これらの手法開発の実現に重要であった。更に、ユビキチン化ペプチドを定量することにより、比較解析を行うことも可能となり、対照細胞との比較から薬剤処理などの影響を除き、IGF 刺激などの目的の処理のみの影響を解析することができるようになった。

これらの手法により、今回、USP7 の優性阻害変異体を過剰発現した細胞において、IRS-2 は 80、811、1106、1134 番目のリジン残基がマルチプルモノユビキチン化されている、また IGF 刺激に応答して 200 種類以上のタンパク質のユビキチン化状態が変動し、その一部はプロテアソームに分解されることを示した。今回開発した解析法は、これまで解析が難しいことから不明な点が多かったユビキチンの結合様式の解析、ユビキチン化により発揮される機能の発現機構の解明、そして、タンパク質ユビキチン化の全体像を掴むための網

羅的解析などに大いに利用されることが期待され、ユビキチンの研究領域の基礎研究の発展に役立つ有用な手段と考えている。

一方、今回私は、初めて IRS-1/2 に複数種の脱ユビキチン化酵素が相互作用することを明らかにし、USP7 については IRS-2 に対する脱ユビキチン化活性を介して IRS-2 の量の維持に重要な役割を担っていることを示すことができた。これまで、IRS が E3 リガーゼによってユビキチン化、分解されることは複数報告されていたが、IRS の脱ユビキチン化については全く明らかにされていなかった。また、本研究により、USP7 は IRS-2 の 80、811、1106、1134 番目のリジン残基のモノユビキチンを脱離することがわかった。IRS のユビキチン化リジン残基や付加されるユビキチンの結合様式が明らかとなったことは、全く新しい知見である。更に、インスリン/IGF 刺激された細胞では、USP7 が IRS-2 から解離し、その結果、IRS-2 の分解が誘導され、インスリン様シグナルが減弱するという「脱感作」の新しい機構が稼働していることも発見した。この研究成果は、IRS の量制御の研究領域で主流であった E3 リガーゼによるユビキチン化だけでなく、脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン化もインスリン/IGF の応答性の調節に重要な役割を果たしていることを初めて示した点で、学術的意義も大きいと考えている。

## 第二節 IRS と脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼの相互作用の制御

一般に、基質と脱ユビキチン化酵素あるいは E3 リガーゼの相互作用は、基質タンパク質のユビキチン化状態に大きな影響を与えると考えられている (Li *et al.*, 2004)。このことは、脱ユビキチン化酵素および E3 リガーゼによる基質のユビキチン化状態の調節には、これらの酵素と基質の相互作用の制御が重要であることを示している。では、脱ユビキチン化酵素や E3 リガーゼと IRS との相互作用はどのような機構で調節されているのだろうか。ここでは、IRS の分子内修飾、細胞内局在、他のタンパク質との相互作用が、脱ユビキチン化酵素あるいは E3 リガーゼと IRS の相互作用に及ぼす影響について議論したい。

### (1) IRS の分子内修飾による IRS と脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼの相互作用の制御

まず、IRS の分子内修飾についてだが、今回、IRS と USP7 の相互作用が IRS のセリン/スレオニンリン酸化によって制御されていることが明らかとなった。これまでに、IRS のセリン/スレオニンリン酸化は、IRS の分解やチロシンリン酸化の抑制などに関わることが知られており、IRS がセリンリン酸化されると E3 リガーゼ Cul7 複合体が相互作用し、IRS のユビキチン化が誘導されることが報告されている (Xu *et al.*, 2008)。これらのことを合わせると、E3 リガーゼと脱ユビキチン化酵素は主に IRS のセリン/スレオニンリン酸化

修飾により IRS との相互作用が制御されていると考えられる。

一方、IRS の一部のリジン残基がアセチル化されることが明らかとなっており (Kaiser and James, 2004)、一般にアセチル化されたリジン残基にはユビキチンは結合できないとされていることから、アセチル化も IRS のユビキチン化を制御していると予想された。HEK293T 細胞を用いた過剰発現系において、血清存在下で脱アセチル化酵素阻害剤の添加によりアセチル化を蓄積させ、その後 MG132 を処理することでユビキチン化を蓄積させた IRS-1 を質量分析計により解析したところ、アセチル化が見られるリジン残基は全くユビキチン化されていない (藤枝久美子, 修士論文 2013)。このことから、血清により増殖を誘導している際には、ユビキチン化とアセチル化はそれぞれ異なるリジン残基を修飾することで、機能の棲み分けが行われている可能性が考えられる。現在、阻害剤の添加以外にアセチル化が誘導される条件が見つかっていないことから、アセチル化が誘導される細胞外因子や生理状態を探索し、そのモデル細胞を用いてユビキチン化とアセチル化が拮抗的に働くのかについて、解析していきたい。

このように、IRS はセリン/スレオニンリン酸化やアセチル化などの分子内修飾により E3 リガーゼや脱ユビキチン化酵素との相互作用や、自身のユビキチン化が制御されている可能性が極めて高い。

## (2) IRS の細胞内局在による IRS と脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼの相互作用の制御

次に、IRS の細胞内局在による IRS と脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼの相互作用の制御について考えてみたい。第一章、第二章でも述べた通り、LDM 画分に存在する PI3K の活性化が、インスリン依存的な糖取り込みの促進に必須である (Clark *et al.*, 1998)。また、種々の細胞内部位へ移行するよう移行シグナル配列を付加した IRS 変異体の解析から、ミトコンドリアや細胞膜画分など LDM 画分以外の局在の IRS もそれぞれ異なる機能を発揮している可能性が示されている (吉永聖, 修士論文 2011)。したがって、IRS は細胞内局在に応じてそれぞれ異なるインスリン様活性の発現を仲介すると考えている。今回、USP7 は細胞質画分の IRS と相互作用しており、LDM 画分の IRS とは相互作用していないことが明らかとなった。このことから、LDM 画分では USP7 以外の脱ユビキチン化酵素が IRS と相互作用し、そのユビキチン化を制御していると私は推定している。それぞれの細胞内部位で異なる脱ユビキチン化酵素が IRS と相互作用することで、IRS はそれぞれの細胞内局在で異なるユビキチン化制御を受け、異なる機能を発揮する可能性が考えられる。今後は、今回 IRS と相互作用することが明らかとなった USP7 以外の脱ユビキチン化酵素と IRS の複合体の細胞内局在を同定するとともに、それらがどの細胞内局在の IRS のユビキチン

化を制御するのかを検討する必要がある。

### (3) IRSAP による IRS と脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼの相互作用の制御

最後に、他のタンパク質との相互作用による制御について述べたい。我々は、IRS が種々のタンパク質 (IRSAP) と相互作用して巨大な複合体を形成していることを報告してきた (Fukushima *et al.*, 2011)。したがって、IRSAP が、IRS の同じ領域で相互作用する脱ユビキチン化酵素や E3 リガーゼと相互作用で競合する、あるいは IRSAP との相互作用によって IRS の立体構造が変化することなどによって、IRS とこれらの酵素の相互作用が変動するなどの機構の存在が考えられる。第一章でも述べた通り、IRS を LDM 画分に留める機能を持つ IRSAP がこのような機構を介して USP7 と IRS の相互作用を阻害することにより、LDM 画分では IRS と USP7 が相互作用していない可能性もあると考えている。

## 第三節 IRS のユビキチン化を介したインスリン様シグナルの調節

IRS のユビキチン化が有する機能として、まず IRS の分解制御が挙げられるが、それ以外にも IRS を介したシグナル強度の制御や IRS の細胞内局在制御も考えられる。ここでは IRS のユビキチン化がインスリン様シグナルの調節に果たす役割について議論したい。

### (1) IRS のユビキチン化を介した IRS の分解制御

IRS のユビキチン化が分解を誘導する例として、インスリン/IGF の長時間刺激によって IRS がユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されるという現象が、我々を含め複数のグループにより発表されている (Lee *et al.*, 2000; Rui *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2011; Usui *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008)。これは、インスリン様シグナル経路のネガティブフィードバック機構の一つと考えることができる。このフィードバック機構が正常に働かない場合には、PI3K の異常な活性化による過増殖やがん化誘導などを誘発すると考えられており、実際多くのがん罹患患者やがん細胞において IGF シグナルが過剰に活性化していることが報告されている (Bjornsti and Houghton, 2004; Manning *et al.*, 2005; Mardilovich *et al.*, 2009)。

また第三章で述べた通り、無タンパク質食や低アミノ酸食を給餌したラットの肝臓において IRS-2 量が増加し、そのため、食餌によって誘導された IRS-2 のチロシンリン酸化が増加、インスリンシグナルが増強される結果、脂肪合成が増加し、脂肪が肝臓に蓄積するという現象が起こっていることが明らかになりつつある。今回、無タンパク質食を一週間給餌したラットの肝細胞において、IRS-2 と USP7 の相互作用が増加していたことから、IRS-2 の量の増加は USP7 と IRS-2 の相互作用が増加した結果、USP7 による脱ユビキチン化が亢進、IRS-2 の分解が抑制されたからであると考えられた。このように、IRS のユビ

キチン化は、分解を促進することで IRS の量を減らすだけでなく、分解を抑制することで IRS の量を増加する機能も有する。

更に、我々は脂肪前駆細胞が成熟脂肪細胞へ分化する際に、まず IRS-1 が著減し、その後再び増加するという量制御を受けており、この IRS-1 の著減が分化に重要であること、この著減にはユビキチン-プロテアソーム系を介した分解が関与していることを見出した。この IRS-1 の分解は、PI3K 経路の活性を減弱させ、GSK3 $\beta$ の活性化を誘導、これにより分化に必須や転写因子の発現が可能になると考えている（長谷川高士，博士論文 2008）。

これらの研究成果を併せると、IRS の分解制御は生体内の状況に応じて IRS の量を増減させることで、IRS の量に応じたインスリン様シグナルおよびそれに伴う生理活性の強度を制御するだけでなく、IRS の分解がインスリン様生理活性の誘導を行う場合があると考えられる。

## (2) IRS のユビキチン化を介したチロシンリン酸化制御

続いて、IRS を介したシグナル強度の制御について考察してみたい。我々は、IRS と相互作用するタンパク質として E3 リガーゼ Nedd4 を同定している。Nedd4 について解析を進めたところ、甲状腺由来細胞 FRTL-5 において、甲状腺刺激ホルモン (TSH) によって活性化される cAMP 経路の刺激によって IRS-2 と Nedd4 の相互作用が強まり、IRS-2 が Nedd4 によってユビキチン化されると、IGF 刺激に応答した IRS-2 のチロシンリン酸化が増強、細胞増殖活性が増強されることを発見している (Fukushima *et al.*, 2008)。これは、IRS のユビキチン化が、量の制御だけでなく、刺激依存的な IRS のチロシンリン酸化も制御している可能性を強く示している。これまで、Nedd4 は USP7 による脱ユビキチン化と逆に、IRS-2 をマルチプルモノユビキチン化することが示されている。一方、ユビキチン化リジン残基は、今回明らかとした USP7 の脱ユビキチン化リジン残基とは異なるリジン残基であることが分かってきている (福嶋俊明, 私信)。このことは、同じマルチプルモノユビキチン化であっても、ユビキチンが付加されるリジン残基によって分解誘導とリン酸化の増強という全く異なる運命をたどることを示しており、今後、どのような機構を介してこのような違いが生まれるのかを解析していく必要がある。また、Nedd4 と USP7 では異なるリジン残基のユビキチン化を制御していることから、USP7 は Nedd4 による IRS の IGF 刺激に応答したチロシンリン酸化の変動には関与していないと考えられる。しかし、今回 USP7 以外にも複数の脱ユビキチン化酵素が IRS と相互作用することが明らかとなったため、それらのなかに Nedd4 と拮抗的に働き、IRS を脱ユビキチン化することで IGF 刺激に応答したチロシンリン酸化を減弱させる脱ユビキチン化酵素がある可能性も否定できない。今後は、Nedd4 と拮抗的に働く脱ユビキチン化酵素を同定し、脱ユビキチン化の面からも

解析していきたい。また、これまで IRS の分解を誘導する E3 リガーゼによる IRS のユビキチン化リジン残基や、付加されるユビキチンの結合様式についての報告はないため、今回開発した手法を用いて解析し、Nedd4 によるユビキチン化との差異を調べる必要がある。

本研究により、無タンパク質食を給餌したラットの肝細胞において、IRS-2 量が増加し、インスリン刺激依存的な IRS-2 のチロシンリン酸化が増強されている際に、USP7 と IRS-2 の相互作用が増加していることが明らかになった。我々は、この細胞において、Nedd4 と IRS-2 の相互作用も増加していることを見出している。このことから、無タンパク質食を給餌したラット肝臓においては、USP7 と IRS-2、Nedd4 と IRS-2 の相互作用が増加することで IRS の分解を誘導するユビキチン化は抑制され、チロシンリン酸化の増強を誘導するユビキチン化は増加され、結果として相乗的にインスリンシグナルが亢進されているという可能性も考えられる。第三章で述べた通り、無タンパク質食あるいは低タンパク質食給餌による USP7 と IRS-2 の相互作用の増加は、血中インスリン濃度の減少あるいは血中アミノ酸濃度の低下が誘導する可能性を考えている。一方、Nedd4 と IRS-2 の相互作用増加の機構は明らかとされていない。今後、これらの異なる意義を持つユビキチン化が、同一のシグナルにより制御され、シグナルを相乗的に調節しているのか、あるいは、それぞれ独立した制御を受け、シグナルをクロストークによって調節しているのかなど、解析を進めていくことで明らかとしていきたい。

### (3) IRS のユビキチン化を介した IRS の細胞内局在制御

第二節にも述べたとおり、IRS は異なる細胞内部位でそれぞれ異なる機能を発揮する可能性が考えられている。IRS 自身には局在を制御するような移行シグナルなどはないことから、IRS 自身ではなく IRS と相互作用する分子によってその局在は制御されていると予想される。実際我々は IRS 結合タンパク質として複数の局在制御タンパク質を同定しており、膜タンパク質の輸送を担う AP-1 複合体は IRS のエンドソームへの局在を制御していることを見出している(Yoneyama *et al.*, 2013)。一方、タンパク質のユビキチン化はタンパク質の分解だけでなく、タンパク質の局在も制御することが様々なタンパク質で明らかにされてきている(Chen and De Camilli, 2005; Hicke, 2001)。IRS の局在は IRS と相互作用する局在制御タンパク質だけでなく、ユビキチン化によっても制御されている可能性も考えられ、今後検討していくべき課題と言えよう。

#### 第四節 IRS のユビキチン化と他のインスリン様シグナル分子のユビキチン化の連携

今回、IGF 刺激に応答して、200 種類を超えるタンパク質のユビキチン化状態が変動することを示すことができた。中でも、複数の細胞増殖へ抑制的に働くタンパク質が IGF 刺激依存的にユビキチン化、プロテアソームにより分解されていることも明らかとなった。このことは、第四章の緒言で述べた、「USP7 をはじめとした一部の E3 リガーゼと脱ユビキチン化酵素がインスリン/IGF 刺激に応答して相互作用するタンパク質を変化させることで、刺激依存的にタンパク質のユビキチン化状態がダイナミックに変動、それによりインスリン/IGF シグナルが制御されている」という仮説を強く支持する結果であった。ここでは、脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼによる複数種の基質のユビキチン化制御における基質同士の拮抗的作用による酵素と基質の相互作用制御、複数種の基質のユビキチン化制御におけるスイッチング機構、複数種の基質を同時に制御する生理的意義について討論したい。

##### (1) 複数種の基質のユビキチン化制御における基質同士の拮抗的作用による酵素と基質の相互作用制御

細胞内に同様の機構で認識される基質が複数種存在した場合、酵素は基質を親和性の順に攻撃するが、同程度の親和性を有すれば反応はお互いに拮抗すると考えられる。例えば、今回 IRS と相互作用することが明らかとなった USP7 はインスリン様シグナル分子である PTEN と相互作用することも知られている (Song *et al.*, 2008)。PTEN は PI3K と拮抗的に働く脱リン酸化酵素であり、USP7 によって脱ユビキチン化されると基質の存在する核外へ移行、インスリン様シグナルに抑制的に働く。刺激が無い状態では IRS が USP7 と相互作用しているため、IRS は USP7 と PTEN の相互作用を競合的に阻害している。その結果、IRS-2 は USP7 により脱ユビキチン化されるため、量が維持され、PTEN は核に留まるため、シグナルを抑制しない、つまり、両基質はシグナルに対し正に働いている。このように、脱ユビキチン化酵素と複数種の基質との相互作用が基質同士の拮抗的な働きにより制御され、シグナル全体が正にあるいは負に制御されるのではないかと予想している。

##### (2) 複数種の基質のユビキチン化制御によるスイッチング機構

これに対して、今回、インスリン/IGF 刺激に応答して USP7 が IRS から解離、IRS が脱ユビキチン化されなくなり、分解されることが明らかとなった。この際、解離した USP7 が PTEN と相互作用し、PTEN が脱ユビキチン化されることで核外に移行、シグナルを抑制すると考えられる。これによりこの両基質はともにシグナルに対し負に働く。

このように、脱ユビキチン化酵素が刺激依存的に一つの基質から解離し、連動して異な

る基質を脱ユビキチン化することで、シグナル全体を正あるいは負に変換するような合目的な機構が稼働している可能性が考えられる。

### (3) 複数の基質のユビキチン化を同時に制御する生理学的意義

IGF 刺激に応答して脱ユビキチン化酵素や E3 リガーゼがこのような機構を介して複数の基質タンパク質のユビキチン化を制御することで、IGF 刺激依存的に 200 種類ものタンパク質のユビキチン化状態が変動し、それによりシグナルが制御されると考えている。今回開発した手法を用いてさらに解析を進めることで、このようなユビキチン化カスケードともいえる機構の存在が示せるのではないかと期待している。

## 第五節 IRS のユビキチン化と疾患

インスリン/IGF シグナルの過剰な増強あるいは抑制は、種々の疾病の原因となるという報告が集積している（化学と生物 Vol.51 No.6 2013）。そこで、それらの疾病とインスリン様シグナルの関連、IRS のユビキチン化との関連について議論した後に、今回明らかとした成果を応用したこれら疾病に対する新しい治療薬の開発について論議したい。

### (1) インスリン様シグナルの過剰な増強と抑制による疾病

IGF シグナルの過増強は、過増殖能・不死化能あるいは浸潤能などのがん細胞の特徴的な形質の獲得・維持に重要であることが知られている(Mardilovich *et al.*, 2009)。実際、多くのがん罹患患者やがん細胞において血中 IGF 濃度が高く、IGF-I 受容体が高発現であること、IRS の下流分子が変異により異常に活性化していることなどの報告がある(Bjornsti and Houghton, 2004; Manning *et al.*, 2005)。一方、寝たきり患者や宇宙飛行士の骨格筋においては、がん細胞とは逆に、IGF 抵抗性となり、タンパク質合成が抑制、筋萎縮が起こることが知られている(Nakao *et al.*, 2009)。このように、インスリン様シグナルは適切に制御されなくてはならず、インスリン/IGF シグナルに存在するシグナル分子の量や生理作用の活性調節メカニズムは緻密に制御されている必要がある。これに異常が生じた場合には、種々の疾患に陥る。

### (2) IRS のユビキチン化とこれら疾病との関係

IRS のユビキチン化はこのようなインスリン様シグナルの過増強や抑制、それに伴う疾病に関わっている可能性が極めて高い。第三節でも述べた通り、インスリン/IGF の長時間刺激に応答した IRS の分解は、インスリン様シグナルにおけるネガティブフィードバック機構の一つであり、このフィードバック機構が正常に働かないと PI3K などの下流シグナ



ルの異常な活性化や、それに伴う過増殖、がん化誘導などを誘発する(Manning *et al.*, 2005)。また、このことから、がん治療には IGF シグナルの抑制が有効と考えられているが、IRS 下流分子の活性阻害を標的とした抗がん剤は、IGF シグナルのネガティブフィードバック機構が働かなくなり、IRS の量が増加、IGF の上流シグナルが異常に増強され、十分な治療効果が得られないことが報告されてきている (O'Reilly *et al.*, 2006)。今回の成果とこれらの報告を合わせると、IRS が高発現しているがん細胞や IRS の下流分子の活性を阻害したがん細胞では、IGF シグナルのネガティブフィードバック機構が破綻→USP7 と IRS の相互作用が維持→IRS の脱ユビキチン化が促進→IRS の量が増加→IGF シグナルが過増強されるという機構が働いていると推定している。

一方、寝たきり患者や宇宙飛行士の骨格筋では、Cbl-b と呼ばれる E3 リガーゼの発現が上昇、この E3 リガーゼによって IRS-1 がユビキチン化、プロテアソーム系を介して分解され、IGF 抵抗性となり、タンパク質合成が抑制、筋萎縮が起こることが知られている(Nakao *et al.*, 2009)。現在、この機構の解析は Cbl-b によるユビキチン化の面からのみ行われており、脱ユビキチン化酵素の関与は研究されていない。今後、脱ユビキチン化酵素の面からも解析を進めることで、筋萎縮に関与する新しい機構が見つかると考えている。

### (3) IRS のユビキチン化が関係している疾病の新しい治療薬の開発

(2)で述べたように、一部のがん細胞や下流分子の活性阻害剤を添加したがん細胞では、IGF 刺激下でも USP7 と IRS の相互作用が維持されているため、IRS の量が増加、IGF シグナルが過増強されていると考えられる。このことから、USP7 の IRS に対する脱ユビキチン化活性を抑制する阻害剤が抗がん剤として用いることができると予想される。しかし、USP7 はがん抑制因子 p53 をはじめとした様々なタンパク質を脱ユビキチン化し、その量を制御することが知られており、今回用いた P5091 のような USP7 の活性阻害剤は副作用が大きい可能性が高い。実際、第二章において示した通り、H4-IIIE 細胞や DU145 細胞は P5091 の添加により死滅してしまう。そこで、USP7 と IRS の相互作用を特異的に阻害して IRS の分解を促進する化合物が取得できれば、新しい作用点を有する抗がん剤のリード化合物として利用できることを期待している。また、IRS の分解が促進され、IRS の量が減少、IGF シグナルが抑制されている寝たきり患者や宇宙飛行士の骨格筋において、IRS と E3 リガーゼの相互作用を特異的に阻害する、あるいは、ユビキチン化リジン残基と相互作用し、ユビキチン化を阻害する化合物が取得できれば、筋萎縮に対する治療薬として利用できることを予測している。

## 第六節 本研究の今後の展望

最後に本研究の今後の展望を述べたい。

今回私は、三つの新しい解析法を確立した。ユビキチン化タンパク質の網羅的解析法は、IGF 以外の細胞外因子の刺激や特定の生理状態などにおけるユビキチン化タンパク質の解析にも利用でき、今後のユビキチン研究に大いに役立つと考えている。ユビキチン化修飾の新しい解析法は、これまで解析が困難であったユビキチン化リジン残基同定とユビキチンの結合様式の解析を可能とすることから、これらの違いがどのような分子機構を介して異なる機能を発揮するのかというユビキチン研究の大きな謎を解く強力なツールになる。また、今回示した IRS-2 がマルチプルモノユビキチン化を介して分解される機構の詳細な解析は、プロテアソームがどのような基質を認識するかという問題の答えを見いだすのに有効ではないかと期待している。

一方、私は今回初めてインスリン様シグナルの制御に IRS の脱ユビキチン化が関与することを示した。更に、IRS には USP7 以外の脱ユビキチン化酵素が複数相互作用していることや、一部の脱ユビキチン化酵素/E3 リガーゼが複数のシグナル分子のユビキチン化を制御することもわかってきており、これら酵素はそれぞれ異なる機構を介してインスリン様シグナルの制御に関わっていると考えられる。今後、今回開発した新しい手法を駆使してインスリン様シグナル伝達に関わる分子のユビキチン化制御の意義を総合的に検討していくことで、様々な新しいインスリン/IGF 応答性の調節機構の解明に寄与したいと考えている。

このような新しい観点からのインスリン/IGF 応答性の調節機構の解明は、新規治療薬開発への展開が大いに期待される。今回明らかとなった機構に関しても、第五節で述べた通り、USP7 と IRS の相互作用を阻害する薬剤は、新しい作用点を有する抗がん剤のリード化合物として利用できる。また、網羅的解析より明らかとなった IGF 刺激依存的に分解が誘導される細胞増殖を抑制するタンパク質群は、その分解を抑制する薬剤が開発できれば、IGF シグナルを抑制できると推定されるため、抗ガン剤として用いることができる可能性が高い。このように、新たな調節機構の解明の成果が治療薬開発などの応用研究に貢献できると期待している。

今回、新たに明らかとなったインスリン様シグナル・活性の制御機構に関する知見や、新しく開発したユビキチン化タンパク質の新しい解析法をもとに、動物個体の発達・成長・代謝・老化などを制御している緻密な生命維持機構の解明だけでなく、この異常による疾患の発症機構やその治療法の開発が、飛躍的に推進されることを願って筆を置きたい。

## 参考文献

- Agrawal, P., Chen, Y.T., Schilling, B., Gibson, B.W., and Hughes, R.E. (2012). Ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked (USP9X) modulates activity of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem* *287*, 21164-21175.
- Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* *1695*, 189-207.
- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.E., Bruning, J.C., Haag, B., 3rd, Johnson, R.S., and Kahn, C.R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* *372*, 186-190.
- Arnesen, T., Betts, M.J., Pendino, F., Liberles, D.A., Anderson, D., Caro, J., Kong, X., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R. (2006). Characterization of hARD2, a processed hARD1 gene duplicate, encoding a human protein N-alpha-acetyltransferase. *BMC Biochem* *7*, 13.
- Ayer, D.E., Kretzner, L., and Eisenman, R.N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* *72*, 211-222.
- Behrends, C., and Harper, J.W. (2011). Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 520-528.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* *30*, 586-623.
- Bjornsti, M.A., and Houghton, P.J. (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *4*, 335-348.
- Bosch-Comas, A., Lindsten, K., Gonzalez-Duarte, R., Masucci, M.G., and Marfany, G. (2006). The ubiquitin-specific protease USP25 interacts with three sarcomeric proteins. *Cell Mol Life Sci* *63*, 723-734.
- Boutet, S.C., Disatnik, M.H., Chan, L.S., Iori, K., and Rando, T.A. (2007). Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell* *130*, 349-362.

- Butler, A.A., Yakar, S., Gewolb, I.H., Karas, M., Okubo, Y., and LeRoith, D. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* *121*, 19-26.
- Carvallo, L., Munoz, R., Bustos, F., Escobedo, N., Carrasco, H., Olivares, G., and Larrain, J. (2010). Non-canonical Wnt signaling induces ubiquitination and degradation of Syndecan4. *J Biol Chem* *285*, 29546-29555.
- Cheatham, B., and Kahn, C.R. (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* *16*, 117-142.
- Chen, H., and De Camilli, P. (2005). The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 2766-2771.
- Clague, M.J., and Urbe, S. (2006). Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol* *16*, 551-559.
- Clark, S.F., Martin, S., Carozzi, A.J., Hill, M.M., and James, D.E. (1998). Intracellular localization of phosphatidylinositide 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: potential involvement of a membrane skeleton. *J Cell Biol* *140*, 1211-1225.
- Clemmons, D.R., Horvitz, G., Engleman, W., Nichols, T., Moralez, A., and Nickols, G.A. (1999). Synthetic alphaVbeta3 antagonists inhibit insulin-like growth factor-I-stimulated smooth muscle cell migration and replication. *Endocrinology* *140*, 4616-4621.
- Cummins, J.M., and Vogelstein, B. (2004). HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* *3*, 689-692.
- Curcio-Morelli, C., Zavacki, A.M., Christofollete, M., Gereben, B., de Freitas, B.C., Harney, J.W., Li, Z., Wu, G., and Bianco, A.C. (2003). Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation. *J Clin Invest* *112*, 189-196.
- Daughaday, W.H., and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* *10*, 68-91.
- De Domenico, I., Vaughn, M.B., Li, L., Bagley, D., Musci, G., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2006). Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J* *25*, 5396-5404.
- Demuth, D.R., Showe, L.C., Ballantine, M., Palumbo, A., Fraser, P.J., Cioe, L., Rovera, G., and Curtis, P.J. (1986). Cloning and structural characterization of a human non-erythroid band 3-like protein. *EMBO J* *5*, 1205-1214.

- Dimova, N.V., Hathaway, N.A., Lee, B.H., Kirkpatrick, D.S., Berkowitz, M.L., Gygi, S.P., Finley, D., and King, R.W. (2012). APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1. *Nat Cell Biol* *14*, 168-176.
- Doerr, A. (2012). Targeting with PRM. *Nat Methods* *9*, 950.
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M.J., Soligo, S., Morsut, L., *et al.* (2009). FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* *136*, 123-135.
- Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J* *16*, 1519-1530.
- Faesen, A.C., Dirac, A.M., Shanmugham, A., Ovaa, H., Perrakis, A., and Sixma, T.K. (2011). Mechanism of USP7/HAUSP activation by its C-terminal ubiquitin-like domain and allosteric regulation by GMP-synthetase. *Mol Cell* *44*, 147-159.
- Fukushima, T., Arai, T., Ariga-Nedachi, M., Okajima, H., Ooi, Y., Iijima, Y., Sone, M., Cho, Y., Ando, Y., Kasahara, K., *et al.* (2011). Insulin receptor substrates form high-molecular-mass complexes that modulate their availability to insulin/insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Fukushima T, F Hakuno, S Takahashi. (2008). "Nedd4 interacts with insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 leading to enhancement of IGF signals through the PI 3-kinase pathway in a different manner. " *Growth Hormone & IGF Research* *18*: 11
- Gupta, M.K., Jung, J.W., Uhm, S.J., Lee, H., Lee, H.T., and Kim, K.P. (2009). Combining selected reaction monitoring with discovery proteomics in limited biological samples. *Proteomics* *9*, 4834-4836.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., and Lamb, R.F. (2005). Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci* *30*, 35-42.
- Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P.M., Olefsky, J.M., and Kobayashi, M. (2000). A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* *14*, 783-794.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* *67*, 425-479.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 195-201.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., and Spiegelman, B.M. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4854-4858.

- Hu, M., Gu, L., Li, M., Jeffrey, P.D., Gu, W., and Shi, Y. (2006). Structural basis of competitive recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: implications for the regulation of the p53-MDM2 pathway. *PLoS Biol* 4, e27.
- Iwasaki, H., and Yada, T. (2007). Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 1015-1021.
- Jin, H.O., Seo, S.K., Kim, Y.S., Woo, S.H., Lee, K.H., Yi, J.Y., Lee, S.J., Choe, T.B., Lee, J.H., An, S., *et al.* (2011). TXNIP potentiates Redd1-induced mTOR suppression through stabilization of Redd1. *Oncogene* 30, 3792-3801.
- Kaiser, C., and James, S.R. (2004). Acetylation of insulin receptor substrate-1 is permissive for tyrosine phosphorylation. *BMC Biol* 2, 23.
- Kawaguchi, T., Qin, L., Shimomura, T., Kondo, J., Matsumoto, K., Denda, K., and Kitamura, N. (1997). Purification and cloning of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* 272, 27558-27564.
- Kerouz, N.J., Horsch, D., Pons, S., and Kahn, C.R. (1997). Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest* 100, 3164-3172.
- Kido, Y., Burks, D.J., Withers, D., Bruning, J.C., Kahn, C.R., White, M.F., and Accili, D. (2000). Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105, 199-205.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y., Cohen, S., and Ciechanover, A. (2009). Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor. *Mol Cell* 33, 496-504.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., and Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 4, 222.
- Lee, A.V., Gooch, J.L., Oesterreich, S., Guler, R.L., and Yee, D. (2000). Insulin-like growth factor I-induced degradation of insulin receptor substrate 1 is mediated by the 26S proteasome and blocked by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition. *Mol Cell Biol* 20, 1489-1496.
- Lehner, B., and Sanderson, C.M. (2004). A protein interaction framework for human mRNA degradation. *Genome Res* 14, 1315-1323.
- Li, M., Brooks, C.L., Kon, N., and Gu, W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell* 13, 879-886.
- Lin, H.K., Wang, L., Hu, Y.C., Altuwajri, S., and Chang, C. (2002). Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J* 21, 4037-4048.

- Liu, J.L., and LeRoith, D. (1999). Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology* *140*, 5178-5184.
- Lui, T.T., Lacroix, C., Ahmed, S.M., Goldenberg, S.J., Leach, C.A., Daulat, A.M., and Angers, S. (2011). The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* *31*, 2053-2065.
- Manning, B.D., Logsdon, M.N., Lipovsky, A.I., Abbott, D., Kwiatkowski, D.J., and Cantley, L.C. (2005). Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. *Genes Dev* *19*, 1773-1778.
- Mardilovich, K., Pankratz, S.L., and Shaw, L.M. (2009). Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. *Cell Commun Signal* *7*, 14.
- Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2009). Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell* *36*, 805-818.
- Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishidoh, K., Yamada, C., Ohno, A., Okumura, Y., Nonaka, I., Yasutomo, K., Baldwin, K.M., *et al.* (2009). Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol* *29*, 4798-4811.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* *123*, 773-786.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* *1*, 376-386.
- O'Reilly, K.E., Rojo, F., She, Q.B., Solit, D., Mills, G.B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D.J., Ludwig, D.L., *et al.* (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* *66*, 1500-1508.
- Pickart, C.M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell* *116*, 181-190.
- Rickmann, M., Orłowski, B., Heupel, K., and Roussa, E. (2007). Distinct expression and subcellular localization patterns of Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (SLC 4A4) variants NBCe1-A and NBCe1-B in mouse brain. *Neuroscience* *146*, 1220-1231.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1976). Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A* *73*, 2365-2369.
- Rome, S., Meugnier, E., and Vidal, H. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *7*, 249-254.

- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277, 42394-42398.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Saridakis, V., Sheng, Y., Sarkari, F., Holowaty, M.N., Shire, K., Nguyen, T., Zhang, R.G., Liao, J., Lee, W., Edwards, A.M., *et al.* (2005). Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. *Mol Cell* 18, 25-36.
- Sarkari, F., La Delfa, A., Arrowsmith, C.H., Frappier, L., Sheng, Y., and Saridakis, V. (2010). Further insight into substrate recognition by USP7: structural and biochemical analysis of the HdmX and Hdm2 interactions with USP7. *J Mol Biol* 402, 825-837.
- Sawka-Verhelle, D., Tartare-Deckert, S., White, M.F., and Van Obberghen, E. (1996). Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem* 271, 5980-5983.
- Schmid, T., Jansen, A.P., Baker, A.R., Hegamyer, G., Hagan, J.P., and Colburn, N.H. (2008). Translation inhibitor Pcd4 is targeted for degradation during tumor promotion. *Cancer Res* 68, 1254-1260.
- Schmidt, A., Gehlenborg, N., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Campbell, D., Mueller, M., Aebersold, R., and Domon, B. (2008). An integrated, directed mass spectrometric approach for in-depth characterization of complex peptide mixtures. *Mol Cell Proteomics* 7, 2138-2150.
- Seglen, P. O. (1979). Hepatocyte suspensions and cultures as tools in experimental carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 5(2-3): 551-60.
- Sehat, B., Andersson, S., Girnita, L., and Larsson, O. (2008). Identification of c-Cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res* 68, 5669-5677.
- Shabek, N., Herman-Bachinsky, Y., Buchsbaum, S., Lewinson, O., Haj-Yahya, M., Hejjaoui, M., Lashuel, H.A., Sommer, T., Brik, A., and Ciechanover, A. (2012). The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation. *Mol Cell* 48, 87-97.
- Shaeffer, J.R., and Kania, M.A. (1995). Degradation of monoubiquitinated alpha-globin by 26S proteasomes. *Biochemistry* 34, 4015-4021.



- Sheng, Y., Saridakis, V., Sarkari, F., Duan, S., Wu, T., Arrowsmith, C.H., and Frappier, L. (2006). Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 285-291.
- Shi, J., Luo, L., Eash, J., Ibebunjo, C., and Glass, D.J. (2011). The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *Dev Cell* *21*, 835-847.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* *55*, 555-590.
- Song, M.S., Salmena, L., Carracedo, A., Egia, A., Lo-Coco, F., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* *455*, 813-817.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* *15*, 1265-1273.
- Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J., and Pledger, W.J. (1979). Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 1279-1283.
- Takano, A., Haruta, T., Iwata, M., Usui, I., Uno, T., Kawahara, J., Ueno, E., Sasaoka, T., and Kobayashi, M. (2001). Growth hormone induces cellular insulin resistance by uncoupling phosphatidylinositol 3-kinase and its downstream signals in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* *50*, 1891-1900.
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y., and Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* *580*, 5635-5640.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* *19*, 94-102.
- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Monthouel-Kartmann, M.N., and Van Obberghen, E. (2005). Regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and expression of HIF hydroxylases in response to insulin-like growth factor I. *Mol Endocrinol* *19*, 1304-1317.
- Tsuchiya, H., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2013). The parallel reaction monitoring method contributes to a highly sensitive polyubiquitin chain quantification. *Biochem Biophys Res Commun* *436*, 223-229.
- Usui, I., Imamura, T., Huang, J., Satoh, H., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., Hupfeld, C.J., and Olefsky, J.M. (2004). beta-arrestin-1 competitively inhibits insulin-induced ubiquitination and degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol Cell Biol* *24*, 8929-8937.

- Valero, R., Bayes, M., Francisca Sanchez-Font, M., Gonzalez-Angulo, O., Gonzalez-Duarte, R., and Marfany, G. (2001). Characterization of alternatively spliced products and tissue-specific isoforms of USP28 and USP25. *Genome Biol* 2, RESEARCH0043.
- van der Horst, A., de Vries-Smits, A.M., Brenkman, A.B., van Triest, M.H., van den Broek, N., Colland, F., Maurice, M.M., and Burgering, B.M. (2006). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* 8, 1064-1073.
- Vucic, D., Dixit, V.M., and Wertz, I.E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 439-452.
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., *et al.* (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.
- Xu, X., Sarikas, A., Dias-Santagata, D.C., Dolios, G., Lafontant, P.J., Tsai, S.C., Zhu, W., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Field, L.J., *et al.* (2008). The CUL7 E3 ubiquitin ligase targets insulin receptor substrate 1 for ubiquitin-dependent degradation. *Mol Cell* 30, 403-414.
- Yang, X., and Lazar, I.M. (2009). MRM screening/biomarker discovery with linear ion trap MS: a library of human cancer-specific peptides. *BMC Cancer* 9, 96.
- Yoneyama, Y., Matsuo, M., Take, K., Kabuta, T., Chida, K., Hakuno, F., and Takahashi, S. (2013). The AP-1 complex regulates intracellular localization of insulin receptor substrate 1, which is required for insulin-like growth factor I-dependent cell proliferation. *Mol Cell Biol* 33, 1991-2003.
- Zick, Y. (2003). Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 *Suppl* 3, S56-60.

長谷川高士, 博士論文 2008  
藤枝久美子, 修士論文 2013  
古田遥佳, 卒業論文 2012  
森友美, 修士論文 2013  
吉永聖, 修士論文 2011

化学と生物 Vol.51 No.6, 2013

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始丁寧かつ熱心なご指導を賜りました高橋伸一郎准教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）に心より御礼を申し上げます。適切なお助言を頂きました千田和広教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）に深く感謝いたします。温かいご指導とお心遣いを賜りました伯野史彦助教（東京大学大学院農学生命科学研究科）に深く感謝いたします。

ヒト上皮様細胞癌由来細胞 A431 を御恵与頂いた矢花直幸博士（東京大学医科学研究所）、ラット甲状腺濾胞由来正常株化細胞 FRTL-5 を御恵与頂いた Dr. Leonard Kohn (Edison Biotechnology Institute and College of Osteopathic Medicine)、ラット肝臓癌由来細胞 H4-IIIE 細胞を御恵与頂いた伊藤芳明准教授（岩手大学農学部）、HEK293 細胞を御恵与頂いた鈴木幸一博士（国立感染症研究所ハンセン病研究所）、HEK293T 細胞を御恵与頂いた塩田邦郎教授（東京大学大学院農学生命科学研究科）、ヒト乳腺癌由来上皮細胞 MCF-7 を御恵与頂いた早川洋一教授（東京理科大学薬学部）、NIR 細胞を御恵与頂いた、Dr. Derek LeRoith (Division of Endocrinology, Mount Sinai School of Medicine)、抗 USP9X 抗体を御恵与頂いた Dr. Stephen A. Wood (National Centre for Adult Stem Cell Research, Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies)、に感謝いたします。

質量分析計を用いた解析を進めるにあたり、技術や施設利用の面で多大なる御援助を頂きました東京都医学総合研究所蛋白質代謝研究室の方々に深く感謝いたします。特に研究を進めていく上で御指導を賜りました田中啓二所長（同研究室）、佐伯泰博士（同研究室）に深く感謝致します。また、親身に相談に乗って下さいました同研究室の土屋光氏、海保愛氏、新井直子氏に深く感謝いたします。IRSAP の解析にご協力いただき、適切なお助言を頂いた、夏目徹センター長（産業技術総合研究所）、家村俊一郎教授（福島県立医科大学）、無タンパク質食を給餌したラットのサンプルを御恵与頂いた鈴木由香助教（日本医科大学老人病研究所）、に感謝いたします。

本研究において常に親身にご指導くださり、適切なお助言を頂きました福嶋俊明助教（広島大学医歯薬学総合研究科）に深く感謝いたします。研究において様々な相談にのって下さいました本研究室の皆様に深く感謝いたします。そして、研究生活全般にわたり支えてくださった家族、友人に深く感謝いたします。