

## 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻  
平成23年度博士課程 進学  
氏名 吉原 英人  
指導教員名 千田 和広

### 論文題目

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

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ตอบสนอง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 (DUB) 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) によってユビキチン化 (Ub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Ub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DUB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Ub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。

### **IRS-1/2とUSP7の相互作用**

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。

### **USP7によるIRS-2のUb化制御**

次に、USP7がIRS-2のUb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Ub化サイトをMSにより解析した結果、80、811、1106、1134番目のリジン残基のUb化が対照細胞に比べて増加していた。更に、Ub化IRS-2に含まれるUb単体の量およびUb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Ub同士の結合量は変化しないのに対して、Ub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。

### **USP7によるIRSの量制御**

Ub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、Ub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Ub化し、IRS-2のUb-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。

### **IRS-2とUSP7の相互作用機構**

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。今回、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、IRS-2とUSP7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、IRS-2とUSP7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IRS-2変異体とUSP7変異体を用いたpull-down assayの結果も併せると、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。

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Ub-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。

### **IRS-2とUSP7の解離機構**

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抽出液では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、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の相互作用を同様に解析したが、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の阻害剤の存在下でH4-IIE細胞をインスリン処理し、この細胞抽出液中の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をはじめとした下流シグナル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が知られている。そこで、H4-IIE細胞をインスリン処理し、この細胞抽出液中の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。これらの結果から、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。

### **IGF刺激に応答して変動するUb化基質の網羅的解析**

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Ub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Ub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Ub化基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 法によりUb化タンパク質を精製し、トリプシンで消化した。続いて、この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Ub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Ub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Ub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33種類の新規基質が含まれていた。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Ub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Ub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によるUb化だけでなく、DUBによる脱Ub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Ub化制御も明らかにすることができた。今後、今回開発したUb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Ub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。