

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440044

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素TRE17によるクラスリン非依存性カーゴ蛋白質の細胞内輸送制御

研究課題名(英文) Regulation of clathrin-independent endocytic cargo trafficking by the ubiquitin-specific protease TRE17

研究代表者

船越 祐司 (FUNAKOSHI, Yuji)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30415286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜蛋白質の細胞内輸送における脱ユビキチン化酵素TRE17の機能解析を行い、TRE17がクラスリン非依存に取り込まれる膜蛋白質を脱ユビキチン化することにより、リソソームにおける分解を抑制しリサイクリングを促進することを明らかにした。この機構により制御を受ける膜蛋白質として免疫や細胞の接着、癌化に関わる因子を同定しており、TRE17はこれら膜蛋白質の細胞膜上での発現量や局在を調節することにより種々のシグナルを制御し、細胞の遊走や免疫、腫瘍形成に関わることが想定される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated functions of the deubiquitinating enzyme TRE17 in intracellular trafficking of plasma membrane proteins. We found that TRE17 promotes recycling of cargo proteins which are internalized through clathrin-independent endocytosis by deubiquitinating them. We also identified several membrane proteins involved in immune responses, cell adhesion, and tumorigenesis, as the cargoes whose trafficking is regulated by TRE17-mediated recycling. These findings indicate that TRE17 regulates levels and localization of the plasma membrane proteins at the cell surface to control their signaling pathways, thereby contributing to cell motility, immune responses and tumorigenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：脱ユビキチン化酵素 メンブレントラフィック リサイクリング

## 1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは、細胞外との物質の授受、膜蛋白質・受容体あるいは膜脂質の取り込みなど、細胞にとって基本的かつ重要な機能である。取り込まれた物質は、細胞内の種々の輸送経路により、各小器官への輸送、細胞膜へのリサイクリング、リソソーム等による分解といった運命をたどる。従って、エンドサイトーシスとその後の輸送経路は、細胞膜表面上の蛋白質や脂質の量、局在、組成を調節する役割も担っている。エンドサイトーシスには複数の様式があるが、よく知られているのがクラスリンコート蛋白質を介したエンドサイトーシス (Clathrin-mediated endocytosis: CME) である。CME は古くより研究が進められており、クラスリン被覆小胞形成のメカニズム、取り込まれた膜蛋白質 (以下、カーゴ蛋白質) の細胞内輸送機構など、その研究成果は膨大な数に上り、詳細なメカニズムが明らかにされつつある。一方で、クラスリンのようなコート蛋白質を必要としないクラスリン非依存性エンドサイトーシス (Clathrin-independent endocytosis: CIE) も知られており、近年、注目を集めつつある (Maldonado-Baez et al., Exp. Cell. Res. 2013)。CIE によって取り込まれる膜蛋白質として、MHCI (主要組織適合因子複合体クラス I)、CD59 などの免疫に関わるもの、インテグリン、カドヘリン等細胞接着に関わるものなどが同定され、CIE の重要性も指摘されている。しかしながら、カーゴ蛋白質の取り込みのメカニズム、その後の輸送機構は、多くが未解明のままである。

CIE によって取り込まれた膜蛋白質は、初期エンドソームを経て、リソソームによる分解を受けるか、あるいは細胞膜へとリサイクリングされる。分解かリサイクリングかの選択は、膜蛋白質の寿命や局在変化の上で重要なものであり、細胞の機能に大きく影響を及ぼす。そのメカニズムは未だ多くは不明であるが、Donaldson らのグループは、CIE カーゴ蛋白質のユビキチン化がリソソームへの移行を促進することを明らかにし (Eyster et al., Mol. Biol. Cell 22, 2011)、そのユビキチン化を担う因子として MARCH ユビキチンライゲースを同定した。つまり、ユビキチン化が CIE 後のカーゴ蛋白質の運命決定に大きく寄与しているのである。

## 2. 研究の目的

上記のような状況下、申請者は細胞内輸送の研究を進める過程で、脱ユビキチン化酵素 TRE17 に着目し、同酵素が MARCH による MHCI および CD98 (いずれも CIE カーゴ) のリソソームへの輸送を負に制御するという予備的知見を得た。すなわち、リソソームにて分解されるようコードされたカーゴ蛋白質が、TRE17 の働きによりリサイクリングへと移行するのである。

TRE17 は、Ewing 肉腫よりがん遺伝子とし

て同定され、脱ユビキチン化ドメイン (DUB ドメイン) が腫瘍化に関わることが示唆されている。一方、TRE17 は DUB ドメインの他に、TBC ドメインとよばれる構造を分子内にもち、細胞内輸送に関わる低分子量 G 蛋白質 Arf6 と結合する。Arf6 は、CIE とその後の細胞内輸送において重要な役割を担っている。つまり、TRE17 は DUB ドメインと、CIE のキープクターである Arf6 に作用する TBC ドメインの 2 つをもつという興味深い特性を有するのである。しかしながら、CIE 経路における TRE17 の機能は不明であり、標的因子も明らかにされていない。そこで本研究では、膜タンパク質輸送、特に CIE カーゴ蛋白質の細胞内輸送における TRE17 の機能を解明することを目的とし、解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 膜蛋白質の取り込み、細胞内輸送の解析、および免疫蛍光染色

MHCI、CD98、TfR の細胞内への取り込み、その後の細胞内の輸送は、それぞれに特異的な抗体を用いて解析した。HeLa 細胞をカバーガラス上に培養し、各種発現ベクターをトランスフェクション後 20-24 時間培養した。その後、細胞を各膜蛋白質カーゴに特異的な抗体を含む DMEM 培地 (10% 血清添加) にて 37 °C、1 時間培養後、細胞を培地にて洗浄し、さらに 2 時間 37 °C にて培養した。2 時間培養時には、リソソームにおける分解を抑制するため 25 mM の塩化アンモニウムを添加した。その後、2% ホルムアルデヒド / PBS にて 10 分室温で固定し、10% 血清を含む PBS にてブロッキングした。発現させた蛋白質を検出するため、一次抗体と 0.2% saponin を含むブロッキング溶液で 1 時間室温にて反応させ、蛍光ラベルした二次抗体を用いて検出した。観察は共焦点顕微鏡にて行った。

### (2) CD98-SNAP のユビキチン化の観察

SNAP は、O6-benzylguanine と共有結合する蛋白質である。SNAP-tag を付加した CD98 とともに、解析したい遺伝子の発現ベクター (MARCH や TRE17 など) を HeLa 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養した。その後、O6-benzylguanine-PEG4-biotin を含む培地で 37 °C、4 時間培養し、SNAP-CD98 を標識した。細胞を回収し溶解した後、1% SDS 存在下 15 分間煮沸し蛋白質を変性させた。Triton X-100 にて SDS を quench し、Lysis Buffer を加え Streptavidin-agarose にて CD98-SNAP-BG-biotin を回収した。回収した複合体を SDS-PAGE にて分離後、Western Blot にてユビキチン、各蛋白質を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) TRE17 は、MARCH による CIE カーゴのリソソームへの移行を抑制する。

前述のように、CIE カーゴタンパク質は MARCH によってユビキチン化されることに

より、リソソームへと輸送され分解が促進される。TRE17 は DUB ドメインを有することから、この経路への関与を免疫蛍光染色により検討した。HeLa 細胞に MARCH と TRE17 を共発現し、MHCI と CD98 (共に MARCH による調節を受ける CIE カーゴ)のエンドサイトーシス後の細胞内輸送を観察したところ、MARCH 単独発現で観察された MHCI や CD98 のリソソームへの蓄積と細胞膜上の著しい発現低下が、TRE17 の共発現により抑制されていた(細胞膜上の発現量回復とリソソームへの移行が消失)。この抑制作用は、TRE17 の脱ユビキチン化活性を欠失した変異体(TRE17 CS)ではみられなかったことから、TRE17 は、脱ユビキチン化活性依存に MHCI や CD98 のリソソームへの移行を抑制することが明らかとなった。

上記と同様の解析を、細胞膜やエンドソームに局在し EGF 受容体などの CME カーゴを脱ユビキチン化する USP8、および、TRE17 の DUB ドメインと高い相同性を示す DUB ドメイン(塩基配列で 97%一致)をもつ USP32 を用いて行ったところ、USP8、USP32 のいずれも TRE17 のような作用は示さなかった。以上より、TRE17 による CIE カーゴのリソソームへの移行の抑制は、DUB の発現による非特異的な効果ではなく、TRE17 に特異的な機能であることが示唆された。

(2) TRE17 は、CME カーゴである *Transferrin Receptor* の輸送には関与しない

クラスリン依存性(CME)カーゴについても、TRE17 が細胞内輸送に関与するか検討するため、MARCH が標的とする CME カーゴ *Transferrin receptor (TfR)* の輸送について同様の解析を行った。その結果、MARCH による TfR のリソソームでの分解促進は、TRE17 による抑制を受けないことが明らかとなった。これより、TRE17 は CIE カーゴ特異的に作用することが推測された。

(3) DUB の CIE カーゴの認識は、CIE カーゴコンパートメントへの局在に依存する。

TRE17 の CIE カーゴ蛋白質に対する認識機構について解析するため、TRE17 と MHCI、CD98、および TfR の細胞内局在を検討した。TRE17 が作用する MHCI や CD98 は、細胞膜や CIE カーゴに特徴的なエンドソーム上で TRE17 と高い共局在を示したのに対し、TfR と TRE17 は異なる細胞内局在を示した。これらの結果より、TRE17 は、CIE カーゴが局在するコンパートメントにリクルートされることにより CIE カーゴを認識し、輸送を調節していることが示唆された。これを検証するため、前述の USP8(CIE カーゴの輸送への関与がみられなかった)を CIE カーゴコンパートメントにアンカリングすることを試みた。H-Ras は C 末端にファルネシル化される領域を有しており、この領域を他の蛋白質に融合すると、その融合蛋白質は細胞膜や CIE カー

ゴのエンドソームや小胞上に局在することが報告されている(Porat-Shilom et al., Mol. Biol. Cell 2008)。そこでこの領域を USP8 の C 末端側に付加し(USP8-Ras-C<sup>20</sup>)細胞内局在、CIE カーゴ輸送への影響を検討した。その結果、USP8-Ras-C<sup>20</sup> は MHCI や CD98 と共局在するとともに、TRE17 と同様に MARCH による MHCI や CD98 のリソソームへの移行促進を抑制した。以上により、CIE カーゴの輸送制御には、脱ユビキチン化酵素の CIE コンパートメントへの局在が重要であることが明らかとなった。

(4) TRE17 は CIE カーゴタンパク質を脱ユビキチン化し、安定化させる。

上記の TRE17 の機能が、CIE カーゴの脱ユビキチン化を介しているのかを検討するため、SNAP-tag を付加した CD98(CD98-SNAP)を HeLa 細胞に発現させ、そのユビキチン化状態を解析した。CD98-SNAP と MARCH のみを発現させた細胞では、コントロールと比較し、CD98 のユビキチン化の亢進と分解促進による発現量の低下がみられた。一方、TRE17 を共発現すると、CD98 の脱ユビキチン化とともに CD98 蛋白質の安定化が観察された。この CD98 の脱ユビキチン化・安定化は、TRE17 CS 変異体、USP8、あるいは USP32 では認められず、リソソームへの移行の観察結果と相関して、TRE17 に特異的かつ脱ユビキチン化活性依存的な作用であることが明らかとなった。同様の結果は、別の CIE カーゴである Tac (IL-2 receptor  $\alpha$ )でも得られた。以上の結果より、TRE17 は標的 CIE カーゴを脱ユビキチン化することによりリソソームへの輸送を抑制し、CIE カーゴの安定化・細胞膜上での発現量増加に寄与することが明らかとなった。

(5) TRE17 A6-変異体は、CIE カーゴのリソソームへの移行を抑制しない。

前述のように TRE17 は、TBC ドメインを介して Arf6 と結合することが報告されている。そこで、上記の TRE17 による CIE カーゴの輸送制御機構と Arf6 との関係について解析を試みた。解析には、TBC ドメインに変異をもち、Arf6 と結合できない変異体(TRE17 A6-変異体)を用いた。TRE17 は、HeLa 細胞において細胞膜や CIE カーゴに特徴的なエンドソーム上に局在するが、TRE17 A6-変異体は細胞質全体に拡散していた。さらに、TRE17 A6-変異体は、MARCH による MHCI や CD98 のリソソームへの輸送促進、細胞膜上での発現量低下を回復することはできなかった。一方で、TRE17 A6-変異体に前述の H-Ras の C 末端領域を付加し、CIE カーゴコンパートメントにアンカーすると、TRE17 A6-変異体でも CIE カーゴのリソソームへの移行を抑制し、蛋白質を安定化させることが認められた。以上の結果より、Arf6 は TRE17 の細胞内局在を規定することにより、CIE カーゴの脱ユビ

キチン化を促進し、CIE カーゴの輸送を制御していることが示唆された。

(6) TRE17 による CIE カーゴの輸送制御は、Arf6 に依存しない。

前項の仮説を検証するため、Arf6 をノックダウンした細胞において同様の解析を行った。しかしながら、予想に反し、Arf6 をノックダウンした細胞においても TRE17 の細胞内局在に異常はみられず、TRE17 による CIE カーゴ脱ユビキチン化、リソソームへの移行の抑制、安定化が観察された。これらの結果より、Arf6 以外に TRE17 の細胞内局在と機能を制御する因子の存在が示唆された。

(7) TRE17 新規結合因子の探索

上記の結果を受け、TRE17 の細胞内局在と機能を調節する新規結合因子を同定するため、TRE17 の野生型に結合し、かつ TRE17 A6-変異体には結合しない因子の探索を免疫沈降により探索した。その結果、TRE17 野生型に特異的に結合する因子の候補を複数同定した。

以上のように本研究では、TRE17 が CIE カーゴの脱ユビキチン化を介してそれらの細胞内輸送を制御することを明らかにした。今後は、新規候補結合因子を同定し、TRE17 による CIE カーゴ輸送のメカニズムを明らかにしていく予定である。また、TRE17 によって輸送が制御される CIE カーゴとして、上に挙げた因子の他にも CD44 や CD147 などを同定している。MHCI や Tac は免疫応答に、CD44、CD98、CD147 は細胞の接着、がん細胞の浸潤や遊走、腫瘍形成に関わることが知られており、TRE17 はこれらの膜蛋白質の細胞膜上での発現量を調節することにより、上記のような細胞機能を制御していることが想定される。これらの細胞機能への関与、また TRE17 による腫瘍形成メカニズムについても解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Miura Y, Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y. ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons. *Biochem J*. 473, 2591-602, 2016 DOI: 10.1042/BCJ20160183 (査読有)

Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y. Pathological functions of the small GTPase Arf6 in cancer progression: Tumor angiogenesis and metastasis. *Small GTPases* 7, 47-53, 2016 DOI: 10.1080/21541248.2016.1154640 (査読無)

Okada R, Yamauchi Y, Hongu T, Funakoshi Y,

Ohbayashi N, Hasegawa H, Kanaho Y. Activation of the Small G Protein Arf6 by Dynamin2 through Guanine Nucleotide Exchange Factors in Endocytosis. *Sci. Rep.* 5, 14919, 2015 DOI: 10.1038/srep14919 (査読有)

Hongu T, Funakoshi Y, Fukuhara S, Suzuki T, Sakimoto S, Takakura N, Ema M, Takahashi S, Itoh S, Kato M, Hasegawa H, Mochizuki N, Kanaho Y. Arf6 regulates tumour angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial  $\beta$ 1 integrin recycling. *Nat Commun.* 6, 7925, 2015 DOI: 10.1038/ncomms8925 (査読有)

Funakoshi Y, Chou MM, Kanaho Y, Donaldson JG. TRE17/USP6 regulates ubiquitylation and trafficking of cargo proteins that enter cells by clathrin-independent endocytosis. *J. Cell Sci.* 127, 4750-4761, 2014 DOI: 10.1242/jcs.156786 (査読有)

[学会発表](計 4 件)

Yuji Funakoshi, Julie G Donaldson, Yasunori Kanaho. The Ubiquitin-specific Protease TRE17/USP6 Regulates Trafficking of Clathrin-independent Endocytic Cargo Proteins. The 9th KOREA-JAPAN Conference on Cellular Signaling for Young Scientists 2016.7.21-23. Seoul (Korea)

船越祐司, Julie G Donaldson, 金保安則: 低分子量 G タンパク質 Arf6 による脱ユビキチン化酵素 TRE17 依存的リサイクリングの制御. BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015.12.1-4. 神戸ポートアイランド(神戸市・兵庫県)

船越祐司, Julie G. Donaldson, 金保安則: 脱ユビキチン化酵素 TRE17/USP6 は、クラスリン非依存的に取り込まれる膜蛋白質の細胞内輸送を制御する. 第 13 回生命科学研究会, 2014.6.20-21. JR タワーホテル日航札幌(札幌市・北海道)

Yuji Funakoshi, Kiyoshi Nagashima, Julie G. Donaldson, Yasunori Kanaho: Functional link between the ubiquitin-specific protease TRE17/USP6 and the small GTPase Arf6 in recycling of clathrin-independent cargo proteins. 第 66 回日本細胞生物学会大会, 2014.6.11-13. 奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター(奈良市・奈良県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/kanaholab/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

船越祐司 (Funakoshi Yuji)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 30415286

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

金保安則 (Kanaho Yasunori)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00214437

長谷川潤 (Hasegawa Hiroshi)

神戸薬科大学・薬学研究科・教授

研究者番号：10332230

(4)研究協力者

佐藤詢 (Sato Jun)

筑波大学大学院・人間総合科学研究科

永島聖 (Nagashima Kiyoshi)

筑波大学・グローバル教育院・ヒューマン

バイオロジー学位プログラム