

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07339

研究課題名(和文) USP15による新規RNAプロセシング制御と神経疾患との関連

研究課題名(英文) Loss of USP15 induces cerebellar neurodegeneration involved in the control of RNA metabolism.

研究代表者

鶴田 文憲 (Tsuruta, Fuminori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30571450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：RNAプロセシング異常は神経変性疾患をはじめ、中枢神経系に重篤な影響を及ぼす。先行研究から、脱ユビキチン化酵素の一つUSP15がRNAプロセシングに寄与することが示唆されていた。さらにUSP15の異常は神経変性をはじめとする様々な病態にも関与することが報告されている。本課題ではUSP15がRNAプロセシング制御を行うか、また神経系にどのような影響を与えるか解析を行った。その結果、USP15がスプライソーム制御因子TUT1を脱ユビキチン化し、活性を亢進すること、またUSP15の異常によって神経変性などにも関与するSparcl1の機能欠失型変異体を産生することも新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、脱ユビキチン化酵素USP15の機能解析を行い、USP15がRNA代謝制御に関わることを見出した。またUSP15の下流で制御される標的遺伝子も同定した。USP15は神経変性疾患をはじめとする様々な疾患との関連性も報告されており、本課題の成果は、これまで明らかにされていなかった疾患のメカニズム解明にもつながる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we report that deubiquitinating enzyme, ubiquitin specific peptidase 15 (USP15), regulates neuronal functions by controlling the RNA metabolism. We found that lack of USP15 in mice induces impairment in motor ability with cerebellar malfunction. We also found that USP15 deubiquitinates terminal uridylyl transferase 1 (TUT1), which is responsible for polyuridylation of U6-snRNA, a core factor of spliceosome. TUT1 is normally localized on nucleolus via K63-linked ubiquitination; however, TUT1 redistributed from nucleolus to nucleoplasm after deubiquitination. Lack of USP15 reduced U6-snRNA levels and also widely affects splicing patterns of multiple genes, including Sparcl1. Thus, our results suggest that USP15 is important for spliceosomal functions through the regulation of TUT1, and lack of USP15 may trigger aberrant gene expression related to the maintenance of cerebellar functions and enhance the risk of developing neurodegenerative disorder.

研究分野：神経科学 分子生物学

キーワード：RNA USP15 TUT1

1. 研究開始当初の背景

脱ユビキチン化酵素 (Deubiquitinating enzymes: DUBs) は、細胞内のユビキチン修飾を調節することで、タンパク質の品質管理や遺伝子発現、シグナル伝達など、様々な細胞内現象を調節している。DUBs の一つである Ubiquitin specific protease 15 (USP15) は、TGF β R や Smad、Mdm2、Keap1 などの基質を脱ユビキチン化し、タンパク質の安定性やシグナル伝達を制御する。また近年、ataxin-3 遺伝子を導入した脊髄小脳変性症のモデルマウスで、Usp15 遺伝子の発現が低下していることも発見されており、Usp15 の異常と運動障害や小脳変性との関連などが示唆されていた。一方、USP15 の異常がなぜ神経変性につながるのか、脱ユビキチン化の標的因子や分子メカニズム、個体レベルでの解析などはほとんどなされていない。

2. 研究の目的

近年、DUBs の包括的なプロテオミクス解析の結果から、USP15 が RNA プロセッシングに関与することが示唆されていた。中でも USP15 は、多岐にわたるスプライソソーム構成因子と複数相互作用することが報告されている。スプライシングエラーを起こした mRNA やスプライシング構成因子の機能異常はタンパク質や RNA の凝集を引き起こし、細胞に対してストレスとなりうることから、USP15 異常による神経変性は RNA プロセッシング機能の破綻が関与するのではないかと考えた。興味深いことに、スプライシング構成因子の変異は、脊髄小脳変性症や筋萎縮性側索硬化症を始め、様々な神経変性疾患発症の原因ともなる。これまでに申請者は、USP15KO マウスを解析し、USP15KO マウスが月齢依存的な運動障害、小脳変性 (特にプルキンエ細胞の脱落) の表現型を呈することを発見した。また他グループの先行研究と同様、申請者も USP15 のプロテオミクス解析を行ったところ、U6-snRNAs 構成因子を中心とする RNA プロセッシング関連タンパク質を複数同定していた。中でも、RNA 修飾酵素 Terminal uridylyl transferase 1 (TUT1) は、in vitro で USP15 によって脱ユビキチン化されることから、TUT1 が USP15 の下流で RNA スプライシングを制御する新規因子になりうるのではないかと考えた。本課題では、神経変性に関連づけられる USP15 による TUT1 の制御機構を明らかにし、その下流で RNA プロセッシング変化を起こす因子を同定、解析していく。

3. 研究の方法

本研究では、USP15 による TUT1 の脱ユビキチン化がどのような意義を持つのか分子生物学的に解析した。また Affymetrix Exon array の結果から見出した RNA プロセッシングの標的候補因子を解析し、このスプライシング異常が神経変性につながるか検証した。

(1) USP15 による TUT1 の制御

ポリユビキチン鎖は修飾されるリジン残基によって、タンパク質分解のみならず、シグナル伝達や膜輸送をはじめとする様々な細胞内機能を調節することが示唆されている。USP15 はタンパク質分解に重要な Lys48 連結型ユビキチン鎖のみならず、Lys63 連結型のユビキチン鎖も脱ユビキチン化することから、USP15 が TUT1 のどのユビキチン鎖を標的としているのか Lys 残基を Arg に置換した変異体を用いて解析した。また TUT1 のユビキチン化、脱ユビキチン化が TUT1 の活性や細胞内局在に影響を与えるか、培養細胞やマウス脳を用いた細胞染色、組織染色、また放射性同位体を用いた評価系で検証を行った。

(2) USP15 異常によって産生される RNA プロセッシング変異体の解析

これまでに、マウス小脳を用いた Exon array から USP15 ノックアウトマウスでスプライシング変異を起こす複数の候補因子を同定してきた。中でも申請者は、アルツハイマー病の発症促進に寄与することも報告されているアストロサイト分泌因子 Sparcl1 に着目した。まず USP15KO の下流で産生される Sparcl1 の塩基配列を決定した。また Sparcl1 がシナプ

ス形成促進に働くことから、この Sparcl1 変異体がシナプス形成に影響を与えるか検討した。さらに小脳変性の原因として、Sparcl1 変異体の発現が細胞自律的なストレスを産生するか、周辺細胞に対して細胞自律的にストレスを付与するか検証を行った。

4 . 研究成果

(1) USP15 による TUT1 の制御

USP15 が TUT1 のどのポリユビキチン鎖を取り除くのか、Lys48 と Lys63 に変異が入ったユビキチンを用いて検証した。その結果、USP15 は TUT1 の Lys63 を効率よく脱ユビキチン化することがわかった。次に脱ユビキチン化された TUT1 がどのような挙動を示すか、HeLa 細胞に導入して観察したところ、通常 TUT1 は核小体に局在しているが、USP15 を導入すると核小体から核質へ移行することがわかった。さらに USP15 が TUT1 の活性を制御するか、32P を用いたアッセイで TUT1 活性を測定したところ、USP15 活性依存的に TUT1 活性も促進することがわかった。

(2) USP15 異常によって産生される RNA プロセッシング変異体の解析

USP15KO マウス脳で発現する Sparcl1 をクローニングし、塩基配列を同定したところ、C 末端側の RNA スプライシングに異常が生じていることを見出した。そこでこの Sparcl1 変異体の機能を検証したところ、この Sparcl1 は細胞外に分泌されないことを発見した。Sparcl1 はシナプス形成に重要な因子であることが報告されているが、申請者らの結果から、Sparcl1 変異体は細胞外に分泌されるのではなく、細胞内に蓄積してしまう変異体であることが示唆された。一方、この変異体を細胞に導入し、過剰発現がストレス応答経路の活性化に十分か検証したところ、変異体の発現だけでは細胞死誘導に必要な強いストレスを付与することはなかった。以上の結果から、当初予定していた Sparcl1 変異体によるシナプス形成の異常は観察されず、分泌されないことで細胞内シグナル伝達経路に何らかの影響を与えている可能性が推測できた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Microglial dynamics during brain development

Okajima T, Tsuruta F[#]

Neural Regen. Res. 13: 222-223 (2018) [#]corresponding (査読あり)

2. KLHL7 promotes TUT1 ubiquitination associated with nucleolar integrity: Implications for retinitis pigmentosa

[#]Kim J, ^{**}Tsuruta F, Okajima T, Yano S, Sato B, ^{*}Chiba T

Biochem. Biophys. Res. Commun. 494: 220-226 (2017) [#]co-corresponding [#]co-first (査読あり)

3. Quantification of Endosome and Lysosome Motilities in Cultured Neurons Using Fluorescent Probes

Tsuruta F[#], Okajima T, Yano S, Chiba T

J. Vis. Exp. 123 (2017) [#]corresponding (査読あり)

4. CACUL1/CAC1 attenuates p53 activity through PML post-translational modification

Fukuda T, Kigoshi-Tansho Y, Naganuma T, Kazaana A, Okajima T, Tsuruta F[#], Chiba T[#]

Biochem. Biophys. Res. Commun. 482: 863-869 (2017) [#]co-corresponding (査読あり)

5. USP15 stabilizes the transcription factor Nrf1 in the nucleus, promoting the proteasome gene expression.

Fukagai K, Waku T, AM Masudul Azad Chowdhury; Kubo K, MatsumotoM, Kato H, Natsume T,

Tsuruta F, Chiba T, Taniguchi H, Kobayashi A

Biochem. Biophys. Res. Commun. 478: 363-370 (2016) (査読あり)

6. SCF^{Fbl12} increases p21^{Waf1/Cip1} expression level through atypical ubiquitin chains synthesis
Tsuruta F[#], Takebe A, Haratake K, Kanemori Y, Kim J, Endo T, Kigoshi Y, Fukuda T, Miyahara M, Ebina M, Baba T, Chiba T[#]

Mol. Cell Biol. 36: 2182-2194 (2016) [#]co-corresponding (査読あり)

7. New insights into the functions of PtdIns(3,5)P₂ in the pathogenesis of neurodegenerative disorders.

Tsuruta F[#].

Neural Regen. Res. 11: 240-241 (2016) [#]corresponding (査読あり)

8. KIAA0368-deficiency affects disassembly of 26S proteasome under oxidative stress condition.
Haratake K, Sato A, Tsuruta F, Chiba T.

J. Biochem. 159: 609-618 (2016) (査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

1. Loss of USP15 induces cerebellar neurodegeneration through the control of RNA metabolism

第41回日本神経科学大会 神戸コンベンションセンター 金材炫、鶴田文憲

2. USP15/SART3 is important for neuromuscular functions via regulation of alternative RNA splicing.

第39回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 金材炫、鶴田文憲

3. SCF^{Fbl12} increases p21^{Waf1/Cip1} expression level through atypical ubiquitin chain synthesis

第39回分子生物学会年会 パシフィコ横浜 鶴田文憲

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://ftsuruta.wixsite.com/fuminori-tsuruta>

6. 研究組織

・研究代表者

鶴田文憲 (Fuminori Tsuruta)

筑波大学生命環境系 助教

研究者番号: 30571450