

脱ユビキチン化酵素 USP14 はインスリンによるプロテアソーム活性制御に介在する

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tahira, Yumiko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049314

【要約】

修士課程優秀論文

脱ユビキチン化酵素 USP14 はインスリンによる
プロテアソーム活性制御に介在する

Deubiquitinating enzyme USP14 is involved in insulin-mediated regulation of proteasome activity

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 包括的代謝学

田 平 裕 美 子

はじめに

我が国を含めた先進諸国において、生活習慣の変化により生じる肥満は、深刻な健康問題として指摘されている。小胞体 (ER) ストレスは肥満により誘導され、肝臓にインスリン抵抗性を引き起こすが、これらの機序は完全には解明されていない。当研究室は、ヒト肝臓遺伝子発現情報から、2型糖尿病患者に肥満が加わると、プロテアソーム関連遺伝子群の発現が変動することを報告した¹⁾。その機序を遺伝子改変マウスと培養細胞を用いた実験から検証した結果、プロテアソーム機能障害が肥満による肝臓でのERストレスの原因の一つであることをつきとめた²⁾。

真核生物には2つのタンパク質分解系、オートファジーリソソーム系とユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) が存在する。UPSでは、プロテアソームにより分解される基質は、分解の目印となるユビキチン (Ub) 鎖がつけられ、ユビキチン化タンパク質 (Ub-prs) となる。プロテアソームは、このUb-prsを選択的に除去することで、細胞内のタンパク質恒常性維持に寄与する (図1)。プロテアソームは26Sプロテアソームとも呼ばれ、分解の中心である20Sプロテアソームと19Sと呼ばれる蓋から成る (図1)。19Sは、Ub-prsのUb鎖を捕捉し、Ub-prs

をATP依存的に20S内腔へと送り込む。20Sプロテアソームは単独で存在することもあり、非ストレス下とストレス下で、その複合体の在り方を変えてタンパク質分解機能を維持する³⁾。

しかし、肥満がいかにプロテアソーム機能を障害するか、またプロテアソーム機能を高めることがER ストレス軽減につながるのかは不明のままである。そこで本研究では肥満時にプロテアソーム機能が低下する機序を解明するため、肥満状態で観察される高インスリン状態がUPSに及ぼす影響についてラット肝癌由来H4IIEC3細胞を用いて検討した。

結 果

インスリンは26Sプロテアソーム活性を低下させる

インスリンを2時間作用させた際のプロテアソーム活性をin-gel analysisで確認した。この方法は、プロテアソーム全体の活性測定ではなく、Native-PAGEによりプロテアソームを26Sと20Sに分離し、それぞれの活性をゲル中で確認する。プロテアソームにより分解を受けると蛍光を発する基質ペプチドを作用させ、蛍光の強さでプロテアソーム活性を評価した。インスリン2時間処置では、26Sプロテアソーム活性は低下した。

インスリンはUb-prs量を低下させる

26Sプロテアソーム活性が低下するインスリン添加後2時間におけるUb-prsの蓄積を、ウェスタンブロット法により確認した。インスリン2時間処置では、26Sプロテアソーム活性は低下するにもかかわらず、Ub-prs量は減少していた。

インスリンによるプロテアソーム活性低下とUb-prs量減少はUSP14を介している

Ub-prsのUb鎖は、Ub化酵素により伸長し、脱Ub化酵素 (DUBs) により切断される。USP14はDUBsのひとつで、プロテアソームと共存するものと、単独で存在しているものがある。USP14は、26Sプロテアソームによって分解される基質のUb鎖を切断することで、26Sプロテアソームによるタンパク質の分解を遅らせる。USP14は、単独では触媒活性がほとんどなく、プロテアソーム

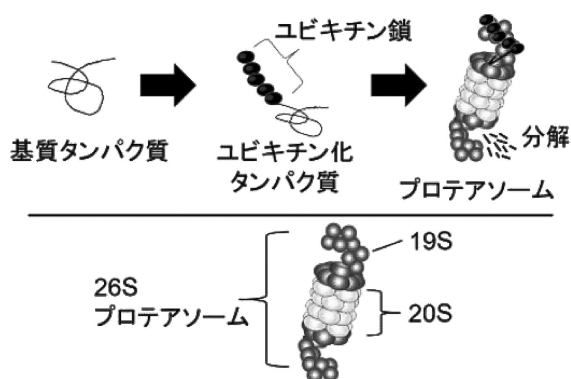


図1. ユビキチン化による基質タンパク質の分解とプロテアソームの構造

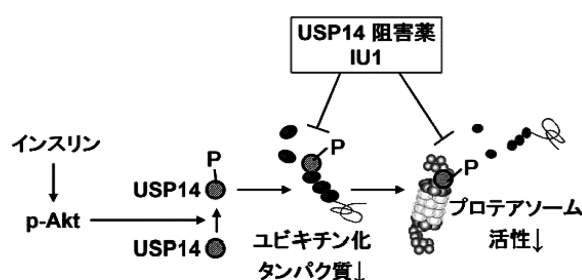


図2. 今回の実験結果より提案されるモデル

と共に存在するか、リン酸化Aktによるリン酸化を受けて作用が亢進する^{4,5)}。インスリンシグナルはAktをリン酸化することで活性化する。そこで、このUSP14がインスリン作用時の26Sプロテアソーム活性やUb-prs量に関与しているのではないかと考え、USP14阻害薬のIU1⁴⁾が、インスリン2時間処置における26Sプロテアソーム活性とUb-prs量に及ぼす作用を観察した。IU1はインスリンによる26Sプロテアソーム活性の低下、及びUb-prs量の減少を阻害した。このことは、インスリンがAktリン酸化を介してUSP14を活性化させ、26Sプロテアソーム活性の低下及び、Ub-prs量の減少に関与していることを示唆する(図2)。

インスリンによるERストレスの増加に対するUSP14の影響は限定的である

インスリン添加後2時間は、ERストレスマーカーであるリン酸化IRE1 α とCHOPのタンパク質量を増加させた。このとき、インスリンとIU1の併用はインスリン単独と比べて26Sプロテアソーム活性を十分に高めているにも関わらず、リン酸化IRE1 α とCHOPのタンパク質量をほぼ変えず、USP14はインスリンによるERストレスの増加に大きな影響を与えないと考えられた。

考 察

本研究ではH4IIEC3細胞において、インスリンの短時間処置がUSP14を介してプロテアソーム活性を抑制し、同時にUb-prs量を減らすことを見出した。このことは、インスリンがUPSによるタンパク質分解に関与していることを示唆する。一方、UPSの阻害は一般にERストレス誘因の一つだが²⁾、USP14阻害薬は、インスリンにより増加したリン酸化IRE1 α とCHOPのタンパク質量に影響を与えなかった。Bennett et al. は、インスリン短時間処置によるプロテアソーム活性低下にinsulin-degrading

enzyme (IDE) の関与を示したが⁶⁾、インスリンがプロテアソーム活性を低下させる意義はまだ分かっていない。今回、このインスリンによるプロテアソーム活性低下がUSP14阻害薬により回復することを見出したが、IDEとの関係は不明である。USP14はプロテアソームによる分解制御を介して、老化や癌化と強い関連があるmTORのタンパク質量を変化させるという報告もある⁵⁾。今後、肝臓の正常細胞やin vivoでの実験による検証が必要ではあるが、インスリンによるプロテアソーム活性低下の機序とその意義が詳細に解明されれば、肥満や糖尿病だけに留まらず、細胞の老化や癌化の研究にも貢献できるかもしれない。

結 語

インスリンによるプロテアソーム活性の低下にUSP14が関与することを示した。インスリン作用によるプロテアソーム活性制御に関わる分子発見は、肥満および高インスリン血症の新たな治療法開発のターゲットとなる可能性がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました包括的代謝学分野 篠 俊成教授に心より厚く御礼申し上げます。

また、数々の御指導、御助言を賜りました御簾 博文准教授、石井 清朗特任准教授に心より御礼申し上げます。

最後に、御指導、御助言を頂きました菊地 晶裕研究員、高山 浩昭技官、田島・白崎 奈津美研究補佐員をはじめとする包括的代謝学分野の皆様へ深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Takamura T, et al. *Obesity*. 16: 2601-2609, 2010
- 2) Otoda T, et al. *Diabetes*. 62: 811-824, 2013
- 3) Charity T, et al. *Mol Cell Proteomics*. 10: R110.006924, 2011
- 4) Lee BH, et al. *Nature*. 467: 179-184, 2010
- 5) Xu D, et al. *Elife*. 4: e10510, 2015
- 6) Bennett RG, et al. *Endocrinology*. 141: 2508-2517, 2000



Profile

2001年3月 京都薬科大学薬学部薬学科卒業
2017年3月 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科修士課程 修了
2017年4月 金沢大学大学院先進予防医学研究科博士課程 在籍中