

神経系における脱ユビキチン化酵素の機能解析

前野 優太 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

導入・背景

ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis: 筋萎縮性側索硬化症)は、成人の脳から脊髄を通して筋肉に至るまでの上下位の、SMA (Spinal Muscular Atrophy: 脊髄性筋萎縮症)は、乳幼児期の子供の脊髄から筋肉にいたるまでの下位の運動ニューロンを変性・脱落することが共通の症状として知られている。また、ALS においては TDP-43 と FUS、SMA においては SMN1 と呼ばれる遺伝子が原因遺伝子としてあげられる。これらの原因遺伝子の発現タンパク質は、いずれも核内の gem と呼ばれる構造体に局在しており、RNA スプライシングに関わる可能性が示唆されている。

gem とは、gemin1(SMN1)タンパク質を中心とする gemin family タンパク質(gemin2-8)と機能分子である snRNA が結合した snRNP 複合体が集合している構造体である。さらに、種々のタンパク質が集まることで、snRNA が修飾を受け、スプライソソームへ発展していくことが知られている。スプライソソームとは、mRNA 前駆体からイントロンを除き、成熟 RNA にする機能を担っており、スプライシング反応の中心となっている構造体である。

USP15 タンパク質は分子量約 110KDa の脱ユビキチン化酵素であり、ユビキチン化酵素であるユビキチンリガーゼと拮抗して働くことが知られている (図1 参照)。ユビキチン化は選択的タンパク質分解の認識マーカーであるユビキチンを標的タンパク質に結合させる反応であり、近年、DNA 修復、転写因子の核内移行、翻訳調節、細胞周期、ガン化、神経変性疾患など、様々な生命現象に関わっていることが明らかになってきた。

当研究室の先行研究で、USP15 ノックアウトマウスが運動神経失調様の症状を示すことが明らかとなった。また、USP15 と相互作用するタンパク質をプロテオーム解析したところ、RNA スプライシング関連タンパク質を含んでいることが判明した。これまでの成果で、ALS、SMA などの運動神経疾患の原因遺伝子産物が RNA スプライシングに関わっていること、USP15 ノックアウトマウスの運動失調様の症状および、USP15 と RNA スプライシング関連タンパクが相互作用することから、USP15 が RNA スプライシングを介して、運動神経疾患に関わる可能性が考えられる。しかし、USP15 と運動神経疾患の原因遺伝子産物がどのように関わるか、USP15 がどのようにスプライシングに関わるかというメカニズムは、明らかになっていない。そこで、本研究では、TDP-43、FUS と SMN が局在する gem に着目し、USP15 が gem に及ぼす作用を gem 構成タンパク質である gemin1 (SMN1) をマーカーとして、培養細胞を用いて解析した。

方法

1.USP15 過剰発現時の細胞内での gem の数の変化

Hela 細胞、SHSY5Y 細胞において、USP15 の WT、または、その変異体を GFP と共にトランスフェクションした。24 時間後に、gemin1、GFP の一次抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、核内の gem の数に変化がないか比較した。

2.USP15 と gemin1 のタンパク質相互作用の解析

HEK293T 細胞に FLAG タグの付いた USP15 をトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収し、タンパク質を溶出させた後、FLAG 抗体を用いて、免疫沈降をした。その後、一次抗体として gemin1 抗体を用いたウェスタンブロットにより、gemin1 の検出を行い、USP15 と gemin1 との相互作用の有無を検討した。

結果・考察

詳細な結果は発表会において、報告予定である。

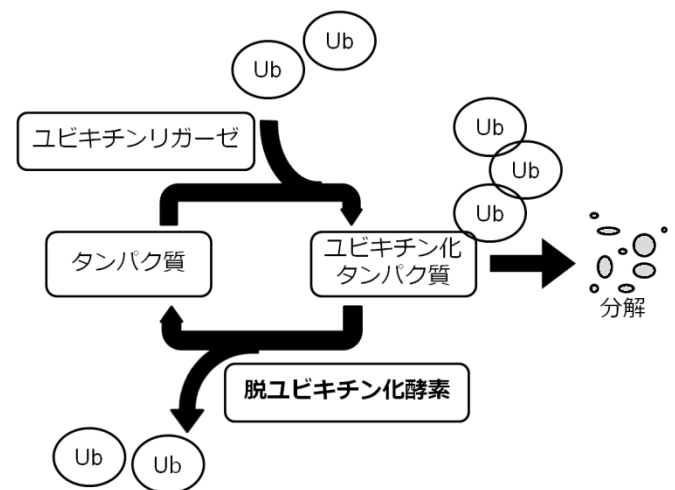


図1.ユビキチン化の可逆性