

## 脱ユビキチン化酵素 USP40 の機能解析 ーリガンド探索とノックアウトマウスの解析

西 堀 由 紀 野

杏林大学医学部小児科学

2006年に新規糸球体特異的遺伝子の一つとして USP40(ubiquitin-specific protease 40)が報告された(Takemoto M, et al. EMBO J 25:1160, 2006)。USP40は脱ユビキチン化の主役としてユビキチン・プロテアソーム系の機能制御を担う USP family の一つである。しかしその臓器特異的タンパク機能は殆どが未解明である。USP40は、mRNA レベルにおいて腎臓に特異的に発現することが報告されているが、USP40の異常に伴う疾患としては遅発性パーキンソン病が挙げられているのみで、タンパク機能は不明である。本研究の目的は、腎・糸球体の発生・機能維持・障害機序に関わる USP40の蛋白機能を解明することにある。

### 【方 法】

1) マウス腎 cDNA ライブラリーから、USP40 full length のサブクローニングを行い、USP40 発現細胞株、リコンビナント USP40、Yeast-two hybrid 法用 bait を作製した。2) マウス腎を用いて、免疫染色とウェスタンブロット法で局在と発現を確認した。3) マウス胎児腎を用いて、発生過程における USP40 の発現を免疫蛍光染色で確認した。4) ノックダウンゼブラフィッシュを作製し、その表現形と電顕で構造を明らかにし、更に 500kDa 蛍光デキストランをゼブラフィッシュの血流系に還流させ、糸球体濾過機能を検討した。5) USP40 の基質タンパクの探索の為、ヒト腎 cDNA ライブラリーを prey、USP40 を bait として Yeast-two hybrid screening を行った。6) 5) で挙げたリガンド蛋白の発現を、in vitro・in vivo レベルさらに発生過程における変化を免疫蛍光染色とウェスタンブロット法で比較検討した。7) USP40 の exon2 を target として、Cre-LoxP system を用いた USP40 コンディショナルノックアウトマウスを作製し

表現形を確認した。

### 【結 果】

1) マウス成熟腎において糸球体優位に約 140kDa のタンパクの発現を認めた。その局在は糸球体に特異的で、上皮細胞足突起細胞質に強く、内皮細胞の細胞質に中等度に発現した (Fig. 1a and b)。2) マウス胎児腎を用いた免疫蛍光染色では、胎生期糸球体 S-shaped body 及び capillary stage では内皮細胞優位に発現するが、新生児期より上皮細胞優位に発現が変化していることが判明した。3) USP40 ノックダウンゼブラフィッシュの糸球体は矮小化を呈した。更に蛍光デキストランの還流下において、尿細管へのデキストランの再吸収が確認されたことから、糸球体濾過機能の破綻を呈することが推察された。また電顕において糸球体上皮細胞の構造は維持されているが、内皮細胞の有窓化障害を認めた。4) Yeast-two hybrid screening では、histidin triad nuc 1 eotid-binding protein1 (HINT1) をリガンド候補の一つとして挙げられた。USP40 発現細胞株から USP40 を認識する FLAG 抗体で免疫沈降した産物を用いたウェスタンブロット法で、HINT1 の発現を確認したことから、HINT1 は USP40 の結合タンパクとして同定された。5) HEK293 細胞では HINT1 は核に強く発現するが、USP40 存在下では核と細胞質に強く発現することが判明した。胎児・新生児マウス腎において HINT1 は capillary stage では内皮細胞優位に発現するも、分化が進むにつれてポドサイト優位の局在に変位した。これは USP40 と同様の発現パターンであった。更に培養ポドサイトを用いたウェスタンブロット法では、成熟したポドサイトに USP40 と HINT1 が共により強く発現することが確認された。7) USP40 コンディショナルノックアウトマウスを作製し

た。今回、血管内皮のみに発現する VE Cadherin を Cre のプロモーターとしたが、その表現形は wild type と有意な差は認めなかった。マウス腎を用いた Cre 抗体によるウェスタンでは、USP40 ノックアウトマウスで Cre 蛋白の発現を認めことから、Cre リコンビナーゼの酵素活性が有意で無いと考えられた。今後全身 Cre マウスとの交け合わせによる検討が必要と考えられた。

#### 【考 察】

HINT1 は、サイクリン依存性キナーゼ阻害分子である、p27<sup>KIP1</sup> の分解を抑制することにより、細胞周期を静止することが知られている。既に、胎生期の糸球体において p27<sup>KIP1</sup> の発現はポドサイトに強く、内皮細胞では弱い可能性があることが報告されている。USP40-HINT1-p27<sup>KIP1</sup> の相互作用として、USP40 が HINT1 の分解を制御することにより、p27<sup>KIP1</sup> の発現をコントロールし、細胞周期を調節していることが推察された。ノックダウンゼブラフィッシュでは内皮細胞の障害のみが観察

された理由としては、発生早期の表現形の観察であったことから、内皮細胞の障害しかみられなかったと考えられた。更に内皮細胞においては、p27<sup>KIP1</sup> と異なる細胞周期関連分子の存在の可能性が考えられた。

#### 【結 語】

糸球体において、USP40 は HINT1 蛋白の分解系を制御することにより、糸球体の発生に関与していると考えられる。内皮における USP40-HINT1 相互作用の標的分子は、異なる可能性がある。

#### [ 講演記録 ]

1. Role of Ubiquitin Specific Protease 40. American Society of Nephrology Renal Week 20011, Philadelphia, November 9, 2011
2. 脱ユビキチン化酵素 USP40 の機能解析-リガンド探索とノックアウトマウスの解析- 第 40 回杏林医学会総会, 東京, 2011 年 11 月 19 日