

論文内容要旨

The USP21 short variant (USP21SV) lacking NES, located mostly in the nucleus in vivo, activates transcription by deubiquitylating ubH2A in vitro

(USP21の短い変異体はNESが欠失しており、in vivo では核内に多く存在し、in vitro でubH2Aを脱ユビキチン化することによって転写を活性化する)

PLOS ONE, Volume 8, Issue 11, 2013.

主指導教員：大段 秀樹教授
(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

副指導教員：越智 光夫教授
(統合健康科学部門 整形外科)

副指導教員：田代 裕尊准教授
(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

奥田 浩

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

Ubiquitin specific peptidase 21 (USP21)はユビキチン化ヒストン H2A のイソペプチド結合を加水分解する脱ユビキチン化酵素であり、ユビキチン化ヒストン H2A (ubH2A) は転写抑制に働くことが示されており、USP21 は細胞核内において転写を活性化することが予想される。また、USP21 はマウスの肝切除後の肝再生の際に発現が上昇していることが示されており、肝再生の分野における臨床応用の期待があると考えられ、USP21 の機能に注目した。近年、USP21 は細胞質にも存在し、生理学的なプロセスに関連した微小管と中心体の支配のもとで役割を果たすことが報告された。細胞内局在は USP21 の機能を考察する上で重要であり、本研究において USP21 のバリエーションの発見とその詳細な細胞内局在に関して研究した。

本研究では cDNA を用いて USP21 の発現を RT-PCR で検討する過程においてスプライシングバリエーションの存在を示唆する産物を見いだした。この産物をサブクローニングし解析することにより Nuclear Export Signal (NES)が欠失した USP21 short variant (USP21SV) を同定した。NES を有する USP21 long variant (USP21LV) と USP21SV の細胞内局在の違い、酵素活性の違い、細胞内での働きの違いを明らかにするため *in vivo*, *in vitro* の実験を行った。

まず USP21SV の全長を pET15 プラスミドにサブクローニングし、USP21SV の塩基配列を確認した。USP21SV は、既に報告されている USP21LV と比較してエクソン 2 の一部(87 アミノ酸)が欠失した splicing variant であり、細胞での局在に影響する Nuclear Export Signal (NES) を欠失することを確認した。

次に USP21LV と USP21SV の *in vitro* におけるユビキチン化ヒストン H2A の脱ユビキチン化酵素活性を比較するため、His-tag を融合させた USP21SV および USP21LV を *E. coli* を用いて発現・精製し、解析した。どちらの variant もヒストン H2A とユビキチンとのイソペプチド結合を加水分解することが出来たが、*in vitro* においては USP21LV がより強い脱ユビキチン化酵素活性を示した。

In vivo における機能や活性を検索するため、Hela 細胞を用いて EGFP と融合させた USP21SV と USP21LV を導入し発現させた。USP21SV と USP21LV の詳細な局在とユビキチン化ヒストン H2A の脱ユビキチン化を免疫蛍光で解析した。USP21SV は核、核膜、細胞質に存在しているが、USP21LV は核と比較して、主に細胞質に存在していることを明らかにした。活性の指標である細胞核内の ubH2A のシグナルは USP21SV と USP21LV を発現させることにより共に減弱した。

USP21SV と USP21LV の酵素活性を *in vivo* で比較するため、293T 細胞に USP21SV と USP21LV をそれぞれ導入し、各蛋白の発現と活性の指標である ubH2A のシグナルを Western blot により解析した。USP21SV と USP21LV は同程度発現しているにもかかわらず、USP21LV の導入と比較して USP21SV の導入により ubH2A のシグナルはより減少しており、USP21SVの方がより高い脱ユビキチン化酵素活性を示した。

本研究ではユビキチンとヒストン H2A とのイソペプチド結合加水分解を触媒する脱ユビ

キチン化酵素である USP21 の NES が欠失した USP21 short variant (USP21SV)を同定した。USP21SV は USP21LV と比較して核内に多く局在し、遺伝子転写制御に関わることを示唆した。USP21SV および USP21LV の局在の違い、酵素活性の違いは、細胞内でのユビキチン化、脱ユビキチン化のネットワークにおいて USP21 は複数の役割をもつことが示唆される。