

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21056

研究課題名(和文) 誘導型ユビキチンリガーゼSSBによるEphrin受容体の機能制御

研究課題名(英文) Regulation of Ephrin receptor by inducible ubiquitin ligase SSB

研究代表者

奥村 文彦 (Okumura, Fumihiko)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：00507212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは機能未知のSSB4 (SPSB4)結合タンパク質として、細胞膜受容体EphB2を同定した。EphB2は細胞の種類に依存してガン遺伝子あるいはガン抑制遺伝子として機能することが知られている。私たちはSPSB4がEphB2の細胞内領域を分解誘導することを示した。次にephrin B2(リガンド)を発現する細胞と、EphB2受容体を発現する細胞を混ぜて共培養する系を用いて細胞間反発運動を解析した。その結果、SPSB4ノックダウンにより細胞間反発運動の亢進がみられ、SPSB4はEphB2刺激を介したシグナル伝達を抑制していることを明らかにした。

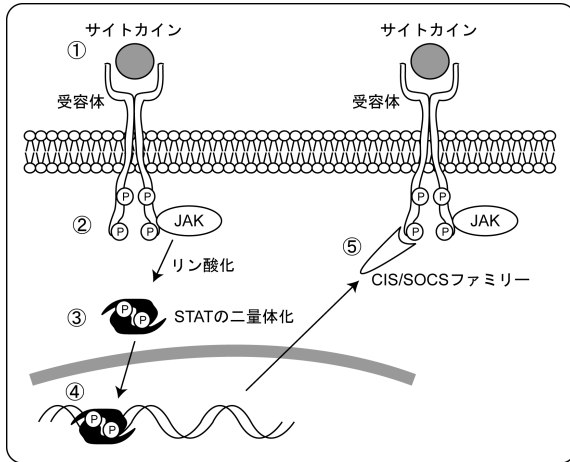
研究成果の概要(英文)：We identified ephB2 receptor as SSB4 (SPSB4)-interacting protein. SPSB4 is a functionally unknown ubiquitin ligase. EphB2 is known to act as oncogene or tumor suppressor depending on the cell type. We showed that SPSB4 destabilized EphB2 cytoplasmic domain. Next, we analyzed cell repulsive responses by co-culturing ephrin B2-expressing cells and EphB2-expressing cells. As a result, SPSB4 knock down enhanced cell repulsive responses and SPSB4 was shown to prevent EphB2 signaling pathway.

研究分野：タンパク質翻訳後修飾

キーワード：ユビキチン EphB2 細胞間反発運動 タンパク質分解 SPSB4

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは免疫反応を伝達する重要な細胞外分子である。インターフェロンやインターロイキンなどが有名であるがそれらは JAK/STAT 経路を介して細胞内に情報を伝達する。

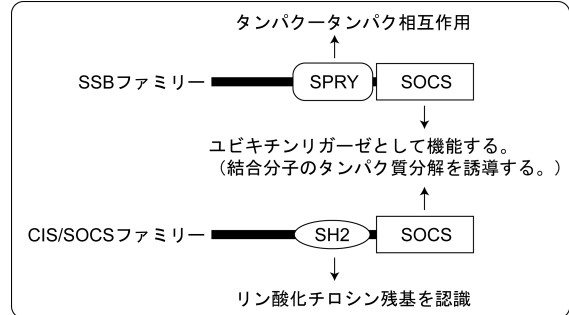


すなわち図に示すように、サイトカインが受容体に結合すると、主に JAK や Tyk と呼ばれるリン酸化酵素により受容体のチロシン残基がリン酸化を受け様々なアダプタータンパク質と相互作用し細胞内にシグナルを伝達する。

JAK はさらに細胞質に存在する転写因子 STAT のチロシン残基もリン酸化し、その結果 STAT は二量体化し活性型となり核内に移行する。活性化された STAT は核内に移行し標的遺伝子の転写をおこない、結果として種々のタンパク質が合成される。SOCS ボックスをもつ CIS/SOCS ファミリーはその標的遺伝子のうちのひとつである。CIS/SOCS ファミリーは受容体のリン酸化チロシン残基に結合し、受容体からのシグナル伝達を抑制する。(Tamiya T et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011)

一方、SOCS ボックスをもつ SPSB ファミリー (SPSB-1, 2, 3, 4) はその機能が分かっていない。下図のように SSB ファミリーはタンパク-タンパク相互作用に

寄与する SPRY ドメインとユビキチンリガーゼとして機能することが予想される SOCS ボックスを有していることが分かっている。(Hilton DJ et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1998)



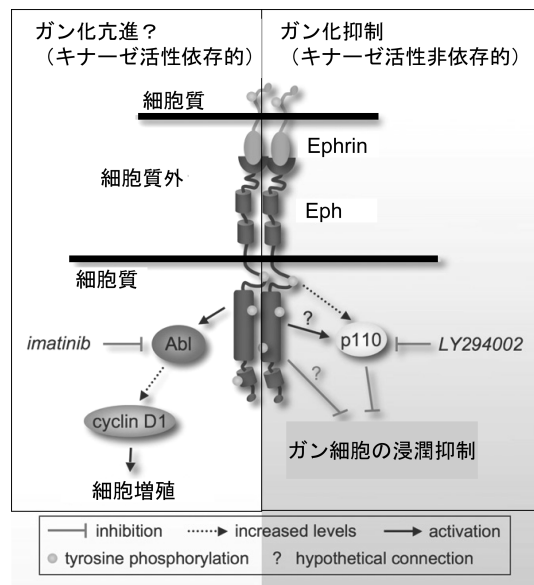
しかしながらその生理的役割はまだまだ明らかとなっていない。

SOCS ボックスをもつタンパク質として CIS/SOCS ファミリーが有名であり、これらはサイトカインシグナル伝達の制御に重要な役割を担っている。したがって SSB ファミリーも類似の機能を有している可能性がある。

私たちは SPSB ファミリーの新規結合分子を探索した結果、細胞膜受容体 EphB2 を候補タンパク質として同定した。

2. 研究の目的

Ephファミリータンパク質は細胞の種類によりガン遺伝子あるいはガン抑制遺伝



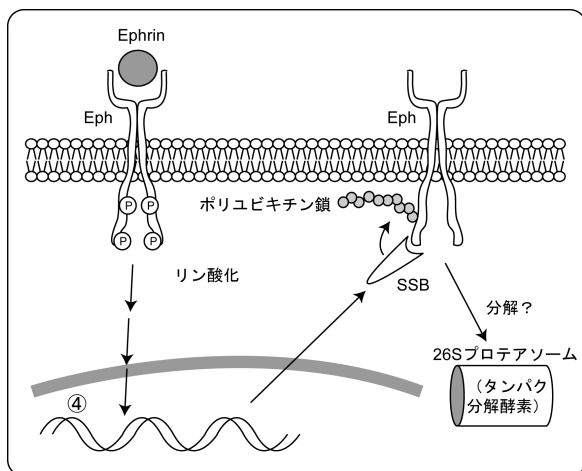
—| inhibition    ..... increased levels    —> activation  
● tyrosine phosphorylation    ? hypothetical connection

子として機能していることが知られている。(Noberini R et al., Cancer Cell 2009 上図、一部改変)

SPSBはユビキチンリガーゼとして機能することが知られており、EphB2がSPSB依存的なユビキチン修飾により不安定化するかを確認する。また、SPSBによるEphB2の発現抑制が確認できた場合、それがどのような生理的役割を担っているのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

SPSBファミリーはEphB2のユビキチンリガーゼである可能性が高い。SPSB1-4をそれぞれ過剰発現させ、EphB2の安定性が影響を受けるか、一般的に行なわれているシクロヘ



キシミドを用いたチェイス実験をおこない明らかにする。

EphB2がユビキチン-プロテアソーム経路で分解されることを証明するために、プロテアソーム阻害剤MG132を用いて、内在性のEphB2タンパク質の蓄積を示す。

EphB2はEphrin刺激により細胞内ドメインが細胞膜から切断され、細胞内に遊離することが報告されている。SPSBは、この細胞内ドメインに対するユビキチンリガーゼである可能性も上記と同様に解析す

る。

ephrinを発現する細胞とEphB2を発現する細胞を混ぜて共培養するとお互いが接触すると同時に離れようとする反発運動が起きることが知られている。したがってSPSB4をロックダウンした場合に細胞間反発運動がどのように影響を受けるかを解析する。

### 4. 研究成果

他のグループが既にEphB2受容体はephrinB2(リガンド)刺激により細胞膜内で切断されることを示しており私たちも確認することができた。この細胞内ドメインはプロテアソーム依存的に分解され、プロテアソーム阻害剤の添加により安定化した。したがって、EphB2はephrinB2刺激により細胞外ドメインと細胞内ドメインに分離する。

私たちはHEK293T細胞にEphB2細胞内ドメイン、Hisタグを付加したユビキチン、それぞれのSPSBタンパク質を発現させ、EphB2細胞内ドメインのポリユビキチン修飾を比較した。その結果、EphB2細胞内ドメインのポリユビキチン修飾は、特にSPSB4の過剰発現により亢進することを見出した。また、SPSBファミリータンパク質のうちSPSB4と内在性EphB2の結合が強いことも見出した。これらの結果はSPSB4がEphB2細胞内ドメインをポリユビキチン化しプロテアソーム依存的タンパク質分解に導くことを示唆している。また、SPSB4ロックダウンはEphB2細胞内ドメインを安定化することを見出した。

次にephrinB2(リガンド)を発現する細胞と、EphB2受容体を発現する細胞を混ぜて共培養する系を用いて細胞間反発運動を解析した。EphB2発現細胞はephrinB2発現細胞と接触するとEphB2を介したシグナ

ル伝達が起こり、ephrinB2発現細胞から逃げるように動く細胞間反発運動が起こることが知られている。

EphB2発現細胞とephrinB2発現細胞を共培養すると既に報告されているようにEphB2発現細胞はephrinB2発現細胞に反発してコロニーを形成した。一方、内在性SPSB4をノックダウンしたEphB2発現細胞とephrinB2発現細胞を共培養するとSPSB4ノックダウンEphB2発現細胞はコントロールEphB2発現細胞に比べて大きなコロニーを形成した。

さらに、コロニーを形成できずにephrinB2発現細胞の集団の中にシングルセルとして存在するEphB2発現細胞の数を比較したところ、SPSB4ノックダウンによりその数はコントロールに比べて減少していた。このことはSPSB4がEphB2依存的なシグナル伝達経路を負に制御していることを示している。

細胞間反発運動は細胞の適切な場所への局在やシナプス形成、ガン細胞の浸潤などに関与していることが知られているので私たちはSPSB4の発現と様々ながん細胞との関係をTCGAデータベース

(<https://cancergenome.nih.gov/>)を用いて解析した。その結果、SPSB4の発現は結腸直腸腺がん、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、肝細胞がん、皮膚黒色腫、前立腺がん、甲状腺がん、ぶどう膜メラノーマ、腎明細胞がん、乳頭状腎細胞がんで低下していた。したがってEphB2細胞内ドメインの安定化がこれらのがん化に関与していることが示唆された。一方、その他のSPSBファミリータンパク質の発現に大きな違いは認められなかった。

これらの結果はEphB2の発現量を制御する化合物は抗がん剤として機能する可能性を示している。特に、EphB2細胞内ドメ

インのキナーゼ活性を阻害する化合物を探索し、上記がん細胞に投与することでその抗がん剤としての活性を評価できる。また、上記がん患者におけるSPSB4の発現を解析することでSPSB4の役割を詳細に解明することができると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Okumura F\*, Joo-Okumura A, Obara K, Petersen A, Nishikimi A, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T\*: **Ubiquitin ligase SPSB4 diminishes cell repulsive responses mediated by EphB2.** *Molecular Biology of the Cell* 2017, **28**(24):3532-3541. doi:

10.1091/mbc.E17-07-0450. Co-corresponding author 査読有

Okumura F\*, Joo-Okumura A, Nakatsukasa K, Kamura T\*: **Hypoxia-inducible factor-2alpha stabilizes the von Hippel-Lindau (VHL) disease suppressor, Myb-related protein 2.** *PLoS One* 2017, **12**(4):e0175593. doi:

10.1371/journal.pone.0175593.

Co-corresponding author 査読有

Uematsu K, Okumura F\*, Tonogai S, Joo-Okumura A, Alemayehu DH, Nishikimi A, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T\*: **ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation.** *The Journal of Cell Biology* 2016, **215**(1):95-106. Co-first and co-corresponding author 査読有

Okumura F\*, Uematsu K, Byrne SD,

Hirano M, Joo-Okumura A, Nishikimi A, Shuin T, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T\*: **Parallel Regulation of von Hippel-Lindau Disease by pVHL-Mediated Degradation of B-Myb and Hypoxia-Inducible Factor alpha.** *Molecular and Cellular Biology* 2016, **36**(12):1803-1817. doi: 10.1128/MCB.00067-16.

Co-corresponding author 査読有

Okumura F\*, Joo-Okumura A, Nakatsukasa K, Kamura T\*: **The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases.** *Cell Division* 2016, **11**:1. doi: 10.1186/s13008-016-0016-3.

Co-corresponding author 査読有

Nakatsukasa K\*, Okumura F, Kamura T\*: **Proteolytic regulation of metabolic enzymes by E3 ubiquitin ligase complexes: lessons from yeast.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2015, **50**(6):489-502. doi: 10.3109/10409238.2015.1081869.

査読有

Nakatsukasa K\*, Nishimura T, Byrne SD, Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Okumura F, Kamura T\*: **The Ubiquitin Ligase SCF(Ucc1) Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle.** *Molecular Cell* 2015, **59**(1):22-34. doi:

10.1016/j.molcel.2015.04.013. 査読有

[学会発表](計6件)

奥村 文彦, 植松 桂司, 外海 駿輔, 奥村(城尾) 晶子, Dawit Hailu ALEMAYEHU, 錦見 昭彦, 福井 宣規, 中務 邦雄, 嘉村 巧  
ユビキチンリガーゼ ASB7 による DDA3

の発現制御は適切な紡錘体形成と染色体分配に必要である

2018年3月27日、金沢、日本薬学会第138年会、口頭発表

奥村 文彦

Cu12型ユビキチンリガーゼ FOD による筋分化の抑制

2018年1月19日、東京大学大学院薬学系研究科、第1回ユビキチン研究会、口頭発表

奥村 文彦、植松 桂司、外海 駿輔、奥村(城尾) 晶子、Alemayehu Dawit、錦見 昭彦、福井 宣規、中務 邦雄、嘉村 巧  
ユビキチンリガーゼ ASB7 による DDA3 の発現制御は、適切な紡錘体形成と染色体分配に必要である  
2017年12月9日、神戸、ConBio2017、招待講演

奥村 文彦、植松 桂司、Byrne STUART D., 平野 みえ、奥村(城尾) 晶子、錦見 昭彦、執印 太郎、福井 宣規、中務 邦雄、嘉村 巧

pVHL 依存的な B-Myb と HIF の分解はそれぞれ独立して VHL 病を制御している

2017年3月25日、仙台、日本薬学会第137年会、口頭発表

奥村 文彦、植松 桂司、外海 駿輔、奥村(城尾) 晶子、Dawit Hailu Alemayehu, 錦見 昭彦、福井 宣規、中務 邦雄、嘉村 巧

ユビキチンリガーゼ ASB7 による DDA3 の発現制御は適切な紡錘体形成と染色体分配に必要である Ubiquitin ligase ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation

2016年12月1日、横浜、第39回日本分子生物学会年会、ポスター発表

奥村 文彦, 植松 桂司, Stuart D. Byrne,  
平野 みえ, 奥村(城尾) 晶子, 錦見 昭  
彦, 執印 太郎, 福井 宣規, 中務 邦雄,  
嘉村 巧

pVHL 依存的な FOB と HIF の分解はそれ  
ぞれ独立して VHL 病を制御している

2015 年 12 月 3 日、神戸、口頭発表 (座  
長)

第 38 回 日本分子生物学会年会、第 88  
回日本生化学会大会合同大会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥村 文彦 (OKUMURA, Fumihiko )  
名古屋大学・大学院理学研究科・講師  
研究者番号 : 00507212

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

( )