

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07335

研究課題名(和文)核小体ストレスによるユビキチン様タンパク質MNSF の脱凝集化と細胞増殖制御

研究課題名(英文)Ubiquitin-like protein MNSF is disaggregated and regulates cell proliferation

研究代表者

中村 守彦(Nakamura, Morihiko)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：20155865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：MNSF は凝集性が非常に高いユビキチン様タンパク質で、細胞内で種々の標的タンパク質と共有結合してアポトーシスを制御する。本研究でMNSF を脱凝集化する分子シャペロンHSPA8を見出した。そこで、細胞内MNSF の局在性を検討した。MNSF -GFP融合タンパク質は未刺激状態のヒトHeLa細胞では核内に局在するが、アクチノマイシンDによる核小体ストレスに応じて、細胞質へ移行した。そして、マウスマクロファージ系細胞株Raw264.7を栄養飢餓条件で培養してMNSF siRNA処理するとp53発現が増大した。以上より、MNSF は核小体ストレスを介して細胞増殖を制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の実験結果は、ユビキチン様タンパク質ファミリーの研究分野において多大な影響を与える。

研究成果の概要(英文)：We found molecular chaperone HSPA8 as a novel partner for ubiquitin-like protein MNSF . HSPA8 might promote the folding of the highly aggregable MNSF . Indeed, knockdown of HSPA8 significantly reduced the expression of MNSF in macrophage cell line Raw264.7 cells. We next examined the effect of HSPA8 on MNSF disaggregation. Although MNSF formed insoluble aggregation in vitro, HSPA8 significantly inhibited the aggregation of MNSF . Because HSPA8 has been reported to migrate from cytoplasm to nucleus during stress, we investigated the intracellular localization of MNSF . MNSF -GFP fusion protein localizes in the nucleus in unstimulated HeLa cells, yet located to the cytoplasm by actinomycin D, a transcription inhibitor. MNSF siRNA increased the level of p53 expression in Raw264.7 cells under nutrient starvation conditions. Collectively, MNSF regulates cell proliferation through nucleolus stress response.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン様タンパク質 核小体ストレス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者・中村は 1995 年に、サイトカインの 1 つとして、monoclonal nonspecific suppressor factor  $\beta$  (MNSF $\beta$ ) を発見した。cDNA クローニングの結果、MNSF $\beta$  はユビキチンと類似したタンパク質であることを明らかにした。MNSF $\beta$  は、その標的タンパク質とイソペプチド結合してアポトーシスなど重要な生命現象を制御する機能を有する。しかし、ユビキチンとは異なり、標的タンパク質を分解しない。MNSF $\beta$  は非常に凝集性の強いタンパク質で、リコンビナント MNSF $\beta$  でさえ容易に自己凝集して活性を失う。従って、これまで未同定の分子シャペロンが MNSF $\beta$  の正しい折り畳みを促進していると推察された。

### 2. 研究の目的

本研究では、MNSF $\beta$  の脱凝集化に関する分子シャペロンの同定および脱凝集反応の観察と、核小体ストレスに伴う MNSF $\beta$  の脱凝集化による細胞増殖の調節機構を明らかにすることを研究目的とした。本研究により、MNSF $\beta$  のユニークな特性と機能が明確となり、数多く報告されているユビキチン類似タンパク質ファミリーとの相互関係を構築する。さらに機能面において、ユビキチンとの類似および相違点を検討する。

### 3. 研究の方法

MNSF $\beta$  の脱凝集化に関する分子シャペロンの同定には、マウス肝臓抽出液から、GST-MNSF $\beta$  アフィニティークロマトグラフィーにより単離・精製する。同定した分子シャペロン HSC70 による MNSF $\beta$  の脱凝集化を *in vitro* で直接検証した。

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞における MNSF $\beta$  の局在を調べて、核小体ストレスにより局在の変化を観察する。

蛍光顕微鏡でその局在を観察するため、GFP-MNSF $\beta$  融合タンパク質を利用した。核小体ストレスはアクチノマイシン D により与えた。当研究室で長年、研究を続けてきたマウスマクロファージ系細胞株 Raw264.7 を用いて、MNSF $\beta$  および HSC70 による細胞増殖への関与を調べた。

RNA 干渉実験に使用した siRNA は以下である。

MNSF $\beta$  siRNA (5'-CCACCCTGCCATGCTAATAAAA-3'); HSC70 siRNA (5'-AAGGTCGGAGCTGAAAGGAAT-3'); コントロール (Scramble) siRNA (5'-GGACTCGACGCAATGGCGTCA-3')。MNSF $\beta$  の脱凝集実験には、ProteoStat® を用いた。

### 4. 研究成果

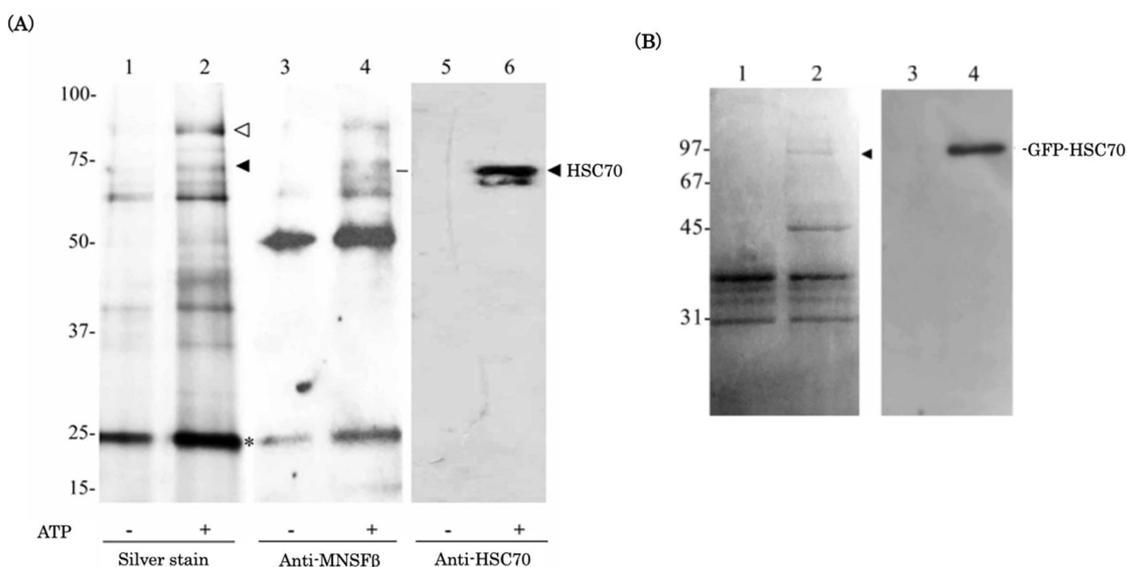


図 1 (A) 分子シャペロン HSC70 の単離精製と同定

Lanes 1 and 2, MNSFβに結合したタンパク質の銀染色; lanes 3 and 4, 抗 MNSFβ抗体によるウェスタンブロット; lanes 5 and 6, 抗 HSC70 抗体によるウェスタンブロット。

(B) MNSFβは *in vitro* の ATP 存在下で HSC70 と非共有結合する。GFP-HSC70 を発現した大腸菌のライセートを用いて、GST-MNSFβアフィニティークロマトグラフィーを ATP 存在下または非存在下で実施した。Lanes 1 and 2, MNSFβに非共有結合したタンパク質の CBB 染色; lanes 3 and 4, 抗 HSC70 抗体によるウェスタンブロット。

最初に、マウス肝臓抽出液から、GST-MNSFβアフィニティークロマトグラフィーを利用して、ATP 存在下において、分子シャペロン HSC70 を同定した ( 図 1 )。

次に、分子シャペロン HSC70 が MNSFβ発現を促進するかを検討した。HSC70 を Raw264.7 細胞で HSC70 siRNA 処理すると確かに MNSFβ発現は減少し(図 2 A, lane 3)、逆に、過剰発現させると MNSFβ発現は増強した(図 2 C, lane 3)。

MNSFβについても同様の実験を行い、ポジティブコントロールとした(図 2 A, lane 2 ; 図 2 C, lane 2)。

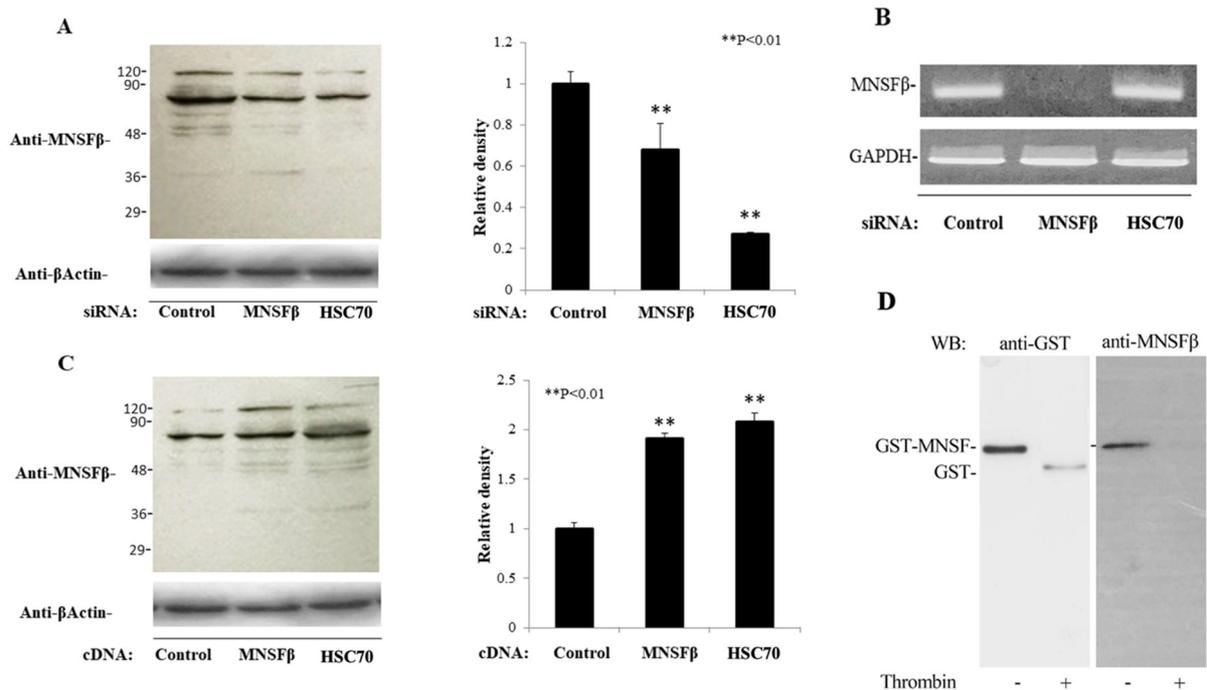


図 2 HSC70 siRNA 処理 (A)または HSC70 cDNA トランスフェクション(C)した Raw264.7 細胞を抗 MNSFβ抗体によりウェスタンブロットした。  
\*\*,  $P < 0.01$  control に対する有意差。

図 2 の結果は、HSC70 が凝集性の強い MNSFβを正しく折り畳んで (folding) 安定化する作用を有することを強く示唆する。そこで、*in vitro* 実験により、HSC70 が MNSFβの凝集を抑制するかどうかを検証した。

GST-MNSFβをトロンピンで処理すると MNSFβ単体となり、凝集性を帯びる ( 図 3 )。しかし、そこに GFP-HSC70 を共存させると、MNSFβの凝集は著しく抑制された。従って、HSC70 のシャペロン効果によって MNSFβが安定化されたと考えられる。注目すべきは、ATP 存在下でのみ、その効果が確認できた点である。

GST-MNSFβのトロンピン処理により、確かに MNSFβ単体となるが ( 図 2 D )、自己凝集性により 8 kDa-MNSFβは検出できない。

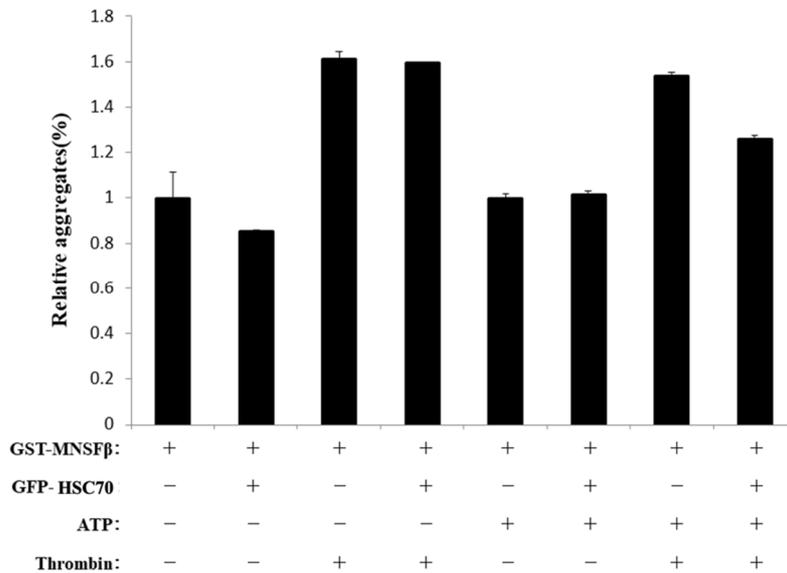


図3 HSC70はMNSFβの凝集を強く阻害する。HSC70のシャペロン効果はATP存在下でのみ発揮された(右端)。

HSC70は核小体ストレスや栄養飢餓ストレスにより、細胞質から核内に移行することが報告されている。そこで、MNSFβの細胞内局在を調べた。Hela細胞では、MNSFβは核内に局在するが、核小体ストレスを与えるアクチノマイシンD処理によって、MNSFβは細胞質へ移行することが確認された(図4)。この現象は、栄養飢餓ストレスにおいても観察された。従って、核小体ストレスによりHSC70が細胞質から核内に移行した結果、MNSFβが安定化されたと推察される。

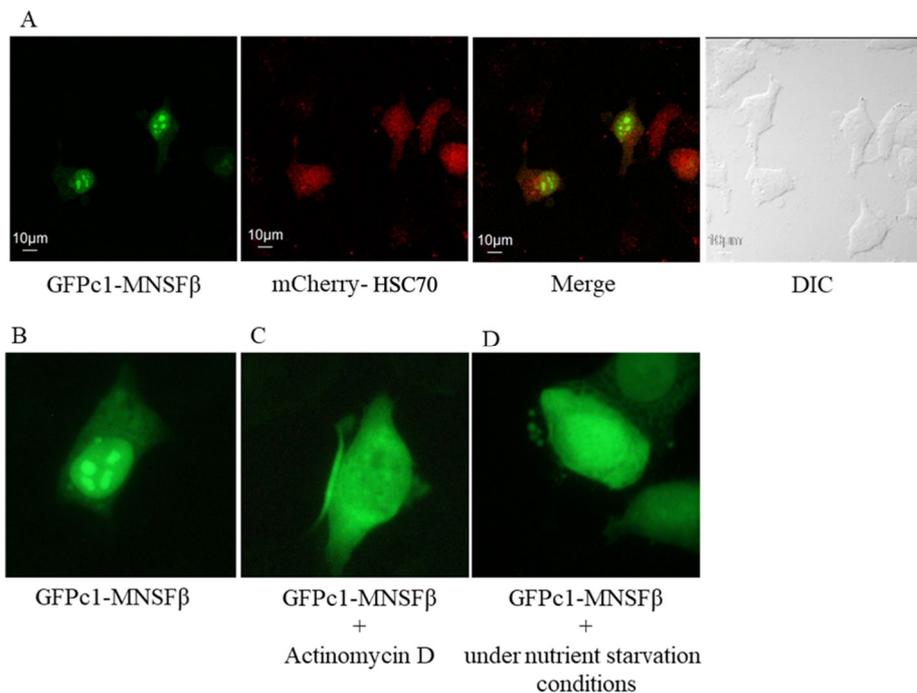
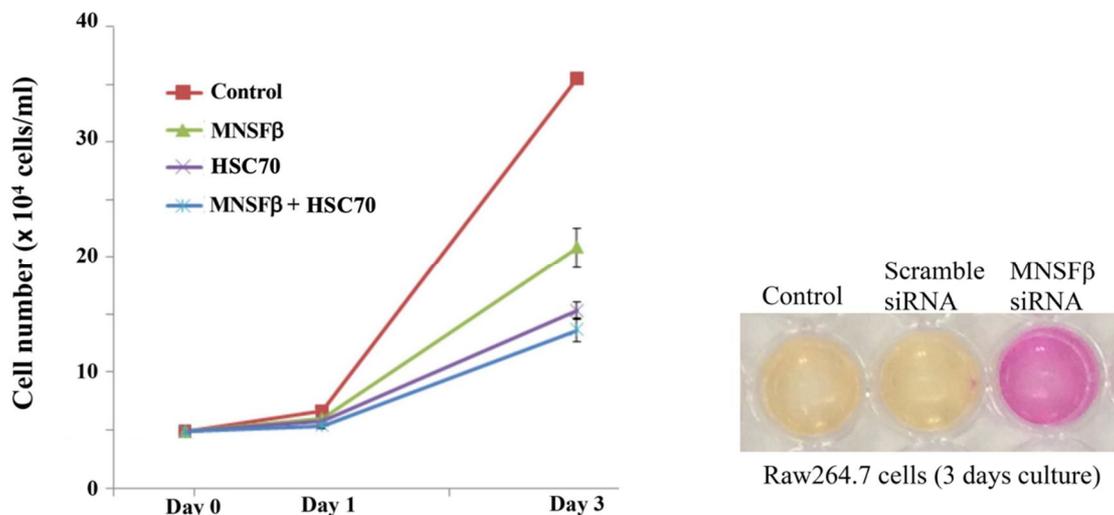


図4 MNSFβの細胞内局在は、核小体ストレスによって核内から細胞質へ移行する(C,D)。この現象は、核内へ移行したHSC70のシャペロン効果によるものと推察された。

最後に、MNSFβによる細胞増殖の抑制効果を検討した。MNSFβ siRNA処理したRaw264.7細胞増殖はコントロールに比べて有意に抑制された(図5)。この結果は、MNSFβが細胞増殖を促進する機能を有することを明確に示唆する。そして、MNSFβ siRNAとHSC70 siRNAのダブルノックダウンにより、その細胞増殖抑制効果は増強された。以上の結果を総合すると、HSC70が分子シャペロンとしてMNSFβを安定化し、細胞増殖の抑

制効果を増大させたものと結論した。  
今後、更に詳しく MNSFβの細胞増殖抑制機序を解明する。

図5 MNSFβ siRNA 処理により Raw264.7 細胞の増殖は著しく抑制され、HSC70 siRNA と



のダブルノックダウンにより、さらにその抑制効果は増した（左図）。3日間培養した上清からも、MNSFβ siRNA 処理により細胞増殖が抑制されていることが確認できる（右図）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura M, Notsu K, Nakagawa M.	4. 巻 456
2. 論文標題 Heat shock protein 60 negatively regulates the biological functions of ubiquitin-like protein MNSF in macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 29-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-018-3487-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura M, Watanabe N	4. 巻 33
2. 論文標題 Subchronic intravenous toxicity study of biofunctional ZnO and its application as a fluorescence probe for cell-specific targeting.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem Mol Toxicol.	6. 最初と最後の頁 e22276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbt.22276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura M, Notsu K, Nakagawa M	4. 巻 455
2. 論文標題 Heat shock protein 60 negatively regulates the biological functions of ubiquitin-like protein MNSF in macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and cellular biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-018-3487-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高野恵、野津香織、中村守彦
2. 発表標題 ユビキチン様タンパク質MNSF による糖代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura M., Notsu K.
2. 発表標題 Ubiquitin-like protein MNSF is disaggregated and regulates cell proliferation.
3. 学会等名 24st International Congress of Biochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野津香織、中村守彦
2. 発表標題 ユビキチン様タンパク質MNSF の脱凝集化と細胞増殖制御機構の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野恵、福間裕紀、野津香織、中村守彦
2. 発表標題 ユビキチン様タンパク質MNSF による抗炎症作用の機序解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Notsu K, Yamasaki K and Nakamura M
2. 発表標題 Ubiquitin-like protein MNSF is deaggregated and regulates cell proliferation
3. 学会等名 第90回 日本生化学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------