

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19308

研究課題名(和文)疾患関連の異常翻訳後修飾蛋白質を特異的に人工的に細胞内で分解する新規手法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel method to specifically and artificially degrade irregularly post-translationally modified disease-related proteins in cells

研究代表者

鳥越 秀峰(Torigoe, Hidetaka)

東京理科大学・理学部第一部応用化学科・教授

研究者番号：80227678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞で発現量が増加したSUMO化MDM2は、p53の分解を促進し、癌化が進行する。SUMO化MDM2が特異的に結合するSENP2配列と、シャペロン介在性オートファジーに關与するHsc70が特異的に結合する配列(Hsc70bm)の融合蛋白質発現用プラスミドを哺乳類細胞に導入すると、SUMO化MDM2とSENP2-Hsc70bmとHsc70の複合体がリソソームに運搬され、SUMO化MDM2が効率的に分解され、p53は分解しなかった。しかし、SENP2-Hsc70b発現用プラスミドをマウスの腫瘍に局所投与すると、SUMO化MDM2はわずかに分解し、p53は分解した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質の翻訳後修飾が破綻した異常翻訳後修飾は、細胞内シグナル伝達や細胞機能で異常を引き起こし、疾患発症と關与することが多く、異常翻訳後修飾蛋白質が原因である多くの疾患が見出されている。異常翻訳後修飾蛋白質が特異的に結合する配列と、Hsc70が特異的に結合する配列の融合蛋白質を発現するプラスミドを細胞に導入し、異常翻訳後修飾蛋白質を特異的に人工的に細胞内で分解する新規手法の開発に、本研究成果は端緒を与えた。

研究成果の概要(英文)：The sumoylated MDM2 more largely expressed in cancer cells than in normal cells promoted the p53 degradation, which resulted in cancer progression. In this study, the plasmid to express fusion proteins consisting of SENP2 to specifically bind to sumoylated MDM2 and Hsc70bm to specifically bind to chaperone-mediated autophagy related Hsc70 was transfected into mammalian cells. Upon the transfection, the complex composed of sumoylated MDM2 and SENP2-Hsc70bm fusion protein and Hsc70 was transferred to the lysosome by chaperone-mediated autophagy, and the sumoylated MDM2 was significantly degraded in the lysosome without the p53 degradation. However, upon the transfection of the SENP2-Hsc70bm expression plasmid into tumor cells of mouse, the sumoylated MDM2 was degraded in a low level with the p53 degradation.

研究分野：生体関連化学、分子生物学

キーワード：異常翻訳後修飾蛋白質 疾患関連 シャペロン介在性オートファジー SUMO化 SENP2 Hsc70

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA から転写と翻訳を経て蛋白質が産生される。リン酸化やユビキチン化に見られるような官能基や小さい蛋白質が共有結合で付加する翻訳後修飾が蛋白質に施される場合が多い(図1)。蛋白質の翻訳後修飾は、蛋白質の機能発現や蛋白質間相互作用における複合体形成を制御し、細胞内シグナル伝達や細胞機能で重要な役割を果たす。一方、蛋白質の翻訳後修飾が破綻した異常翻訳後修飾は、細胞内シグナル伝達や細胞機能で異常を引き起こし、疾患発症と関連することが多い(図1)。異常翻訳後修飾が原因である多くの疾患が見出されている。よって、異常翻訳後修飾蛋白質の発現を特異的に人工的に抑制できれば、疾患発症の治療につながる事が期待される。

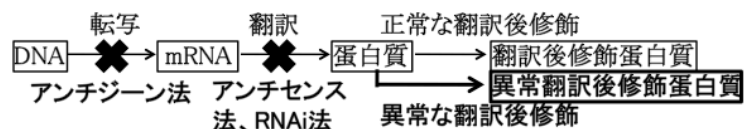


図1: 遺伝情報の流れでの異常翻訳後修飾

蛋白質の翻訳後修飾は、蛋白質の機能発現や蛋白質間相互作用における複合体形成を制御し、細胞内シグナル伝達や細胞機能で重要な役割を果たす。一方、蛋白質の翻訳後修飾が破綻した異常翻訳後修飾は、細胞内シグナル伝達や細胞機能で異常を引き起こし、疾患発症と関連することが多い(図1)。異常翻訳後修飾が原因である多くの疾患が見出されている。よって、異常翻訳後修飾蛋白質の発現を特異的に人工的に抑制できれば、疾患発症の治療につながる事が期待される。

蛋白質発現を人工的に抑制する手法として、転写過程で発現を人工的に抑制するアンチジーン法、翻訳過程で発現を人工的に抑制するアンチセンス法やRNAi法などがある。ただ、いずれの手法も遺伝子の転写過程や翻訳過程で蛋白質発現を人工的に抑制する(図1)ため、異常翻訳後修飾蛋白質と共に、正常翻訳後修飾蛋白質の発現も人工的に抑制する。このため、異常翻訳後修飾蛋白質の発現のみを特異的に人工的に抑制することができないため、副作用の要因となる。異常翻訳後修飾蛋白質の発現のみを特異的に人工的に抑制する手法はこれまで無かった。

2. 研究の目的

細胞内蛋白質分解系であるシャペロン介在性オートファジーでは、シャペロン Hsc70 が、Hsc70 結合性ペプチド配列(Hsc70bm:Hsc70-binding motif)を有する蛋白質に結合

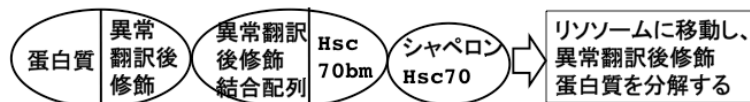


図2: 異常翻訳後修飾蛋白質のみを特異的に細胞内で分解する新規手法の概念図

し、これをリソソームに運搬し、標的蛋白質はリソソーム膜蛋白質 Lamp-2a に移行される。シャペロン Hsp90 により Lamp-2a がリソソーム膜上で多量体を形成し、この巨大複合体が形成されると、標的蛋白質はリソソームの内側に取り込まれ、分解される。その後、Hsp90 により Lamp-2a の巨大複合体は解消され、Lamp-2a は単一分子に戻る。本研究ではこのシャペロン介在性オートファジーを利用して、正常翻訳後修飾蛋白質を分解せず、異常翻訳後修飾蛋白質のみを特異的に人工的に細胞内で分解する新規手法を開発することを目的とした(図2)。具体的には、異常翻訳後修飾が特異的に結合する配列と Hsc70bm 配列の融合蛋白質を発現するプラスミドを細胞に導入し、異常翻訳後修飾蛋白質、プラスミドから発現した融合蛋白質、シャペロン Hsc70 の3者が特異的に結合して複合体を形成し、これがリソソームに運ばれ、異常翻訳後修飾蛋白質のみがリソソームで分解されることを目指した(図2)。

癌原遺伝子産物 Ski は様々な癌細胞で過剰発現している(図3)。Ski は、翻訳後修飾である SUMO 化に関する酵素 Ubc9 に結合し、Ubc9 の SUMO 化活性を増加させる(図3)。

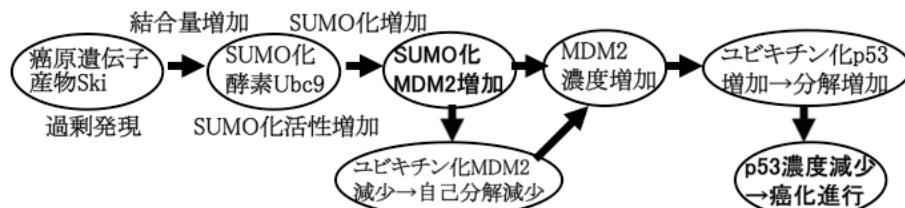


図3: 異常翻訳後修飾で生じる SUMO 化 MDM2 の増加による癌抑制蛋白質 p53 の減少と癌化進行

これにより、癌抑制蛋白質 p53 を分解へ導く MDM2 の、Ubc9 による SUMO 化が増加する(図3)。SUMO 化 MDM2 は、自己をユビキチン化して分解に導く活性が減少し、MDM2 濃度が増加する(図3)。増加した SUMO 化 MDM2 は、p53 のユビキチン化による分解を促進し(図3)、p53 濃度が減少し、癌化が進行する(図3)。本研究では、異常翻訳後修飾蛋白質として SUMO 化 MDM2 を考え、正常 MDM2 やユビキチン化 MDM2 を分解せず、SUMO 化 MDM2 のみを特異的に細胞内で分解し、p53 濃度を増加させ、癌化進行を抑制する手法を開発することを目指した。これを通して、新規手法が異常翻訳後修飾蛋白質のみを特異的に細胞内で分解する上で有用であることを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類細胞内発現用プラスミドの構築と哺乳類細胞への導入

SUMO が特異的に結合する配列として SENP2 を選び、SENP2-Hsc70bm を哺乳類細胞内で発現するためのプラスミドを構築した。シャペロン介在性オートファジーに関与する Hsc70 や Lamp-2a を哺乳類細胞内で発現するためのプラスミドを構築した。トランスフェクション試薬を用いてこれらのプラスミドを哺乳類細胞に導入した。

(2) SUMO 化 MDM2 の発現量の解析

哺乳類細胞内の蛋白質を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ウェスタンブロッティングでメンブレンに蛋白質を移動し、SUMO 蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色で SUMO 化 MDM2 蛋白質の発現量を検出した。

(3) p53 の発現量の解析

哺乳類細胞内の全 RNA を抽出し、p53 mRNA に対するプライマーを用いたリアルタイム PCR で p53 mRNA の発現量を解析した。また、哺乳類細胞内の蛋白質を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ウェスタンブロッティングでメンブレンに蛋白質を移動し、p53 蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色で p53 蛋白質の発現量を検出した。

4. 研究成果

(1) SUMO 化 MDM2、SUMO が特異的に結合する配列 (SENP2) と Hsc70 が特異的に結合する配列 (Hsc70bm) の融合蛋白質、シャペロン Hsc70 の 3 者が結合することにより、哺乳類細胞において SUMO 化 MDM2 が特異的に分解されるかに関する解析

SUMO が特異的に結合する配列 (SENP2) と Hsc70 が特異的に結合する配列 (Hsc70bm) の融合蛋白質発現用プラスミドを哺乳類細胞に導入し、細胞内で発現させた (図 4 実験群と対照群 1)。この際に、細胞内の蛋白質を抽出し、SUMO 化 MDM2 と正常 MDM2 の発現量を免疫染色で解析したところ、正常 MDM2 はほとんど分解されなかったが、SUMO 化 MDM2 は顕著に分解された。SUMO と SUMO 結合配列

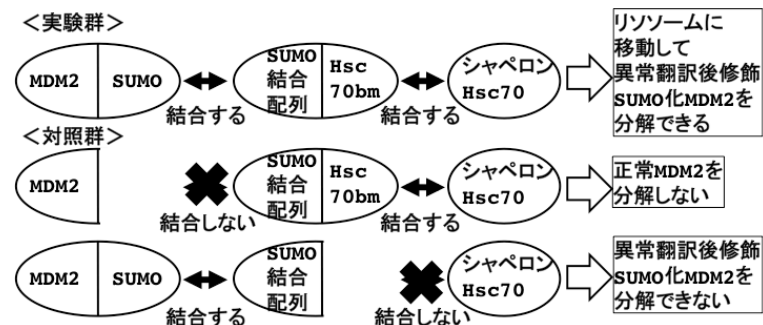


図 4: シャペロン介在性オートファジーで、異常翻訳後修飾 SUMO 化 MDM2 のみを特異的に人工的に細胞内で分解する新規手法の概念図

(SENP2) の結合により、SUMO 化 MDM2 を特異的に分解できることが明らかとなった。この際、Hsc70 発現用プラスミドや Lamp-2a 発現用プラスミドも哺乳類細胞に導入すると、SUMO 化 MDM2 の分解効率が増加した。次に、Hsc70bm 配列を有しないが、SUMO が特異的に結合する配列 (SENP2) のみを有する発現用プラスミドを哺乳類細胞に導入し、細胞内で発現させた (図 4 対照群 2)。この際に、細胞内の蛋白質を抽出し、SUMO 化 MDM2 と正常 MDM2 の発現量を免疫染色で解析したところ、SUMO 化 MDM2 も正常 MDM2 もほとんど分解されなかった。Hsc70bm 配列を有しないため、SUMO 化 MDM2 は分解されないことが明らかとなった。以上の一連の解析より、Hsc70bm 配列が存在し、SUMO と SUMO 結合配列 (SENP2) の結合が生じると、SUMO 化 MDM2 に特異的な分解を進行させることが明らかとなった。

(2) SUMO 化 MDM2、SUMO が特異的に結合する配列と Hsc70 が特異的に結合する配列の融合蛋白質、シャペロン Hsc70 の 3 者が結合することによる、哺乳類細胞における SUMO 化 MDM2 の特異的な分解がシャペロン介在性オートファジーで進行することに関する解析

哺乳類細胞に導入することにより、SUMO 化 MDM2 を特異的に分解することができた、SUMO 結合配列 (SENP2) と Hsc70bm の融合蛋白質発現用プラスミドと共に、シャペロン介在性オートファジーでは、標的蛋白質がリソソームに運ばれて分解されることに鑑み、シャペロン介在性オートファジーの阻害剤として、リソソームに存在するプロテアーゼに対する阻害剤 (塩化アンモニウム、クロロキン) を哺乳類細胞に導入した。この際に、細胞内の蛋白質を抽出し、SUMO 化 MDM2 の発現量を免疫染色で解析したところ、SUMO 化 MDM2 はほとんど分解されなくなり、SUMO 化 MDM2 に特異的な分解は顕著に抑制された。また、SUMO 結合配列 (SENP2) と Hsc70bm の融合蛋白質発現用プラスミドと共に、マクロオートファジーの阻害剤 (3-メチルアデニン) やユビキチンプロテアソーム分解系の阻害剤 (MG132) を培養細胞に導入した。この際に、細胞内の蛋白質を抽出し、SUMO 化 MDM2 の発現量を免疫染色で解析したところ、SUMO 化 MDM2 に特異的な分解は少しだけ抑制された。以上の一連の解析より、シャペロン介在性オートファジーの阻害剤を哺乳類細胞に導入した時のみ、SUMO 化 MDM2 に特異的な分解は顕著に抑制された。つまり、SUMO 化 MDM2 に特異的な分解はシャペロン介在性オートファジーで進行することが明らかとなった。

(3) SUMO 化 MDM2 の分解に伴う、癌抑制蛋白質 p53 の発現量の変化の解析

SUMO 化 MDM2 は、癌抑制蛋白質 p53 をユビキチン化して分解に導く活性を有する。このため、(1) で解析したように、SUMO 結合配列 (SENP2) と Hsc70bm の融合蛋白質発現用プラスミドを哺乳類細胞に導入して、SUMO 化 MDM2 を特異的に分解できれば、SUMO 化 MDM2 による p53 の分解が抑制され、p53 濃度が増加すると期待される。そこで、SUMO 結合配列 (SENP2) と Hsc70bm の融合蛋白質発現用プラスミドを哺乳類細胞に導入して、SUMO 化 MDM2 を特異的に分解した際に、細胞内の全 RNA や蛋白質を抽出し、p53 の発現量をリアルタイム PCR や免疫染色で解析した。p53 の発

現量が増加し、p53 濃度が増加した。SUMO 化 MDM2 に特異的な分解により、p53 が増加した。

(4) SUMO 化 MDM2、SUMO が特異的に結合する配列と Hsc70 が特異的に結合する配列の融合蛋白質、シャペロン Hsc70 の 3 者が結合することにより、大腸癌モデルマウスの腫瘍において SUMO 化 MDM2 が特異的に分解されるかに関する解析

(1)と同様に、SUMO が特異的に結合する配列 (SENP2) と Hsc70 が特異的に結合する配列 (Hsc70bm) の融合蛋白質発現用プラスミドを、マウスの腫瘍に局所投与した (図 4 実験群と対照群 1)。この際に、細胞内の蛋白質を抽出し、SUMO 化 MDM2 と正常 MDM2 の発現量を免疫染色で解析したところ、正常 MDM2 の発現量が顕著に変化せず、SUMO 化 MDM2 の発現量はわずかに減少したように見えた。次に、(1)と同様に、Hsc70bm 配列を有しないが、SUMO が特異的に結合する配列 (SENP2) のみを有する発現用プラスミドをマウスの腫瘍に局所投与した (図 4 対照群 2)。この際に、細胞内の蛋白質を抽出し、SUMO 化 MDM2 と正常 MDM2 の発現量を免疫染色で解析したところ、SUMO 化 MDM2 も正常 MDM2 もほとんど分解されなかった。

(5) 大腸癌モデルマウスの腫瘍における SUMO 化 MDM2 の分解に伴う、癌抑制蛋白質 p53 の発現量の変化の解析

(4)で SUMO 結合配列 (SENP2) と Hsc70bm の融合蛋白質発現用プラスミドをマウスの腫瘍に局所投与して、SUMO 化 MDM2 の発現量がわずかに減少したように見えた時に、細胞内の全 RNA や蛋白質を抽出し、p53 の発現量をリアルタイム PCR や免疫染色で解析した。p53 の発現量は残念ながら減少したように見受けられた。

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 0件）

1. 著者名 de Kerckhove, M., ..., Torigoe, H., ..., Mori, R.	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeting miR-223 in neutrophils enhances the clearance of Staphylococcus aureus in infected wounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO. Mol. Med.	6. 最初と最後の頁 e9024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/emmm.201809024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funai, T., Aotani, M., Kiriu, R., Nakamura, J., Miyazaki, Y., Nakagawa, O., Wada, S., Torigoe, H., Ono, A. and Urata, H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Silver(I)-Ion-Mediated Cytosine-Containing Base Pairs: Metal Ion Specificity for Duplex Stabilization and Susceptibility toward DNA Polymerases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChembioChem	6. 最初と最後の頁 517-522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201900450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuno, Y., Atsumi, Y., Alauddin, M., Rana, M.M., Fujimori, H., Hyodo, M., Shimizu, A., Ikuta, T., Tani, H., Torigoe, H., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Komai, M., Shirakawa, H., Yoshioka, K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Resveratrol and Its Related Polyphenols Contribute to the Maintenance of Genome Stability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci.Rep.	6. 最初と最後の頁 5388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62292-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 0件）

1. 発表者名 田村理紗、森 雅正、立澤 桜子、鳥越秀峰
2. 発表標題 シャペロン介在性オートファジー機構を利用した標的蛋白質を人工的に分解する新規手法の効率化
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村理紗、宮本佑馬、森雅正、立澤桜子、鳥越秀峰
2. 発表標題 シャペロン介在性オートファジー機構を利用した標的蛋白質を人工的に分解する新規手法の開発
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村理紗、宮本佑馬、森 雅正、立澤 桜子、鳥越秀峰
2. 発表標題 シャペロン介在性オートファジー機構を利用した標的蛋白質を人工的に分解する新規手法の効率化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野武、宮澤沙絵、小林百合香、荘司健太、三宅康之、花岡文雄、今本尚子、鳥越秀峰
2. 発表標題 何故げっ歯類にはPot1bが存在するのかーテロメアラギング鎖合成との関係
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澄昌輝、佐藤加奈、久保江理郁、田中美穂、前角直人、竹原 喬、鳥越秀峰
2. 発表標題 分裂酵母テロメア結合蛋白質間相互作用によるテロメア長調節
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----