

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780078  
 研究課題名（和文）新規サイトカインシグナル抑制機構の解明と細胞膜透過性癌抑制タンパク質の開発  
 研究課題名（英文）Elucidation of the new mechanisms of cytokine signal suppression and development of the cell membrane permeable cancer restraint proteins  
 研究代表者  
 舩廣 善和（MASUHIRO YOSHIKAZU）  
 日本大学・大学院総合科学研究科・講師  
 研究者番号：00336083

研究成果の概要：サイトカインシグナル抑制因子 SOCS3 の相互作用因子として DP-1 を見出し、この相互作用による両者の機能の相互干渉を見出した。特に SOCS-3 の癌抑制機能の1つが DP-1 の転写活性化能の抑制であると推測された。また、細胞膜透過性 RAR $\alpha$  タンパク質発現系を確立し、RAR $\alpha$ -PML 融合タンパク質を原因とする白血病患者由来の細胞を好中球に分化させることに成功した。細胞膜透過性 SOCS-2,3 の発現系の確立にも成功した。また SOCS-7 相互作用因子として TRIP6 を同定した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達、サイトカインシグナル抑、癌抑制

## 1. 研究開始当初の背景

(1) サイトカインシグナル抑制因子 SOCS (Suppressor of cytokine signaling) は JAK キナーゼを抑制することで JAK-STAT シグナル伝達経路を抑制するタンパク質として知られていたが、その他の機能は不明な点が多かった。また、SOCS-1,2,3 は癌組織においてその遺伝子プロモーターがメチル化され発現が抑制されることから、癌抑制タンパク質と考えられていたが、その直接的な分子メカニズムは不明であった。そこで、本研究では、酵母 Two-hybrid スクリーニングにより

SOCS-3 相互作用因子の検索を行っていた。その候補因子の一つに細胞周期調節性の転写因子 DP-1 があった。DP-1 と SOCS-3 の相互作用は細胞内での強制発現系では認められたが、個体内での相互作用は不明であった。また、強制発現系においては、DP-1 と SOCS-3 の相互作用は相互の機能を干渉する作用が見られたが、siRNA を用いた研究は検討されていなかった。本研究を進める段階で作成した DP-1 の C 末端側の欠失変異体は発現が極めて悪かった。以前本研究で見出していた DP-1 alpha と beta アイソフォーム(い

ずれも DP-1 の C 末端側を欠いている) の発現も極めて悪かった。以上の結果より、DP-1 の C 末端側には DP-1 タンパク質の安定化に係る領域が存在すると予測していた。

(2) 近年、ドラッグデリバリーシステム(DDS)開発が進んでいるが、そのうちの1つである細胞膜透過性ペプチドタグを有用タンパク質に繋ぎ、細胞に導入する方法の開発も進んでいる。本研究では、2005年に Hawiger 教授等のグループより報告された MTM (Membrane translocating motif) 融合 SOCS-3 が、細胞内に容易に浸透し、JAK-STAT 抑制能や LPS シグナル伝達系抑制能を持つことが示されたことから、MTM 融合の SOCS-2,3 の発現プラスミドを作成していた。また、ある種の前骨髄球性白血病では核内レチノイン酸受容体である RAR alpha と PML が染色体転座に伴う遺伝子組み換えから融合タンパク質を産生し、これに起因するこれら両タンパク質の機能欠損が原因で白血病が発症することから、これらの正常型タンパク質が導入出来れば、この病態の改善が図れると考えられた。そこで、MTM 融合 RAR alpha タンパク質の発現プラスミドも作成していた。

(3) SOCS4-7 の研究報告は他の SOCS もしくは CIS に比べて少なく、機能がよくわかってなかった。SOCS4-7 は特徴として N 末端側が大きく特異的な配列を持っている。

## 2. 研究の目的

(1) SOCS-3 相互作用因子として見出していた DP-1 との相互作用について、詳細な解析を行ない、その分子メカニズムを解明する。個体内での SOCS-3 と DP-1 の相互作用を明らかにする。これまでに強制発現系で得ていた DP-1 と SOCS-3 の相互作用に伴う機能的な相互干渉作用が siRNA を用いても証明出来るか検討する。DP-1 アイソフォームのプロテアソームによる分解に関する領域の詳細な解析を行ない、DP-1 のプロテアソームによる分解機構の解明を目指す。

(2) SOCS-2 タンパク質は成長ホルモンレセプターのシグナル伝達系を抑制することから、細胞膜透過性 SOCS-2 ができれば、成長ホルモンの過剰による先端巨大症の患者に対するタンパク質療法の元となる発現系になると考えた。また SOCS-2 は SOCS-3 の分解を促進することから、SOCS-3 の高発現が原因となっているアレルギー性疾患(喘息やリウマチ)のタンパク質療法にも有効である可能性がある。SOCS-3 タンパク質は JAK-STAT シグナル伝達、LPS シグナルを抑制することから、細胞膜透過性 SOCS-3 タンパク質は抗炎症を中心としたタンパク質療法に有効である可能性がある。また、DP-1 の活性を抑制することから、癌のタンパク質

療法としても用いられる可能性がある。RAR alpha と PML 融合タンパク質を産生する前骨髄球性白血病では、多くの場合高濃度レチノイン酸の投与により、一次的に回復することから、正常型の RAR alpha タンパク質がこれらの白血病細胞へ導入出来れば、生体内のレチノイン酸濃度で好中球の誘導が可能となるかもしれない。そこで、このタンパク質の添加により培養癌細胞の増殖抑制や白血病患者由来の細胞を好中球に分化させる系を作る。以上より、細胞膜透過性タグ融合の SOCS-2,3 および RAR $\alpha$  タンパク質の大腸菌による発現系を構築し、機能的な細胞膜透過性タンパク質発現系を構築する。

(3) SOCS4-7 の相互作用因子を新たに発見することで、これまで未知であったこれらのタンパク質の機能が明らかとなり、そのメカニズムにより細胞内の機能の制御・調節が可能となるかもしれない。そこで、発現量の少ない遺伝子産物もスクリーニング可能な酵母 Two-hybrid 法により検索を行ない、この中から細胞内で本当に相互作用する因子を選択する。またこの相互作用による両タンパク質への影響を調べる。これらの相互作用因子の中から、機能的に SOCS4-7 の活性に影響を与えるものを見出す。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞内・個体組織内での SOCS-3 と DP-1 の相互作用の確認を免疫沈降—ウエスタンブロットングにより解析する。SOCS-3 発現時のフローサイトメトリーによる細胞周期の測定を siRNA を用いて行なう。STAT3 や E2F/DP-1 の転写活性を指標としたルシフェラーゼアッセイを siRNA を用いて行なう。DP-1 アイソフォームの分解機構の解析については、各種 DP-1 変異体とプロテアソーム阻害剤 MG132 の組み合わせにより、分解抑制領域、分解促進領域の決定を行なう。主に HEK 293 細胞にトランスフェクション後、細胞抽出液を作製し、この中の強制発現 DP-1 の分解度をウエスタンブロットングにより解析する。

(2) 細胞膜透過性タグ融合の SOCS-2,3 および RAR alpha タンパク質の大腸菌発現系の構築を通常の遺伝子組換え操作により行なう。これらの細胞膜透過性タグ融合タンパク質は大腸菌にて封入体として発現させる。グアニジン塩酸や尿素変性条件下ニッケルレジンで精製する。種々のバッファーの組み合わせで透析を行ない、透析によるリフォールディング系を確立する。FITC ラベルした細胞膜透過性タンパク質を細胞に添加し共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内局在を確認する。細胞膜透過性タグ融合 SOCS-2,3 による細胞増殖抑制の確認を行なう。細胞膜透過性タグ融合 SOCS-3 による JAK-STAT 抑制能

の検証を、STAT3 の Y705 のリン酸化度を指標としたウエスタンブロット解析により行なう。SOCS-2 の GHR (成長ホルモンレセプター) 結合能を調べる。細胞膜透過性タグ融合 RAR alpha タンパク質の DNA 結合能の確認をゲルシフトアッセイにて、また転写活性化能の確認をルシフェラーゼアッセイにて行なう。また、細胞膜透過性タグ融合 RAR alpha タンパク質とレチノイン酸による PML/RAR alpha 融合遺伝子を持つ白血病患者由来細胞の好中球分化を検証する。

(3) 酵母 Two-hybrid 法による SOCS-7 相互作用因子のスクリーニングを行なう。細胞内での相互作用を確認するための免疫沈降法を HEK 293 細胞における強制発現系で行なう。相互作用因子との相互作用による細胞内での局在の変化の確認を共焦点レーザー顕微鏡で行なう。NF- $\kappa$ B の転写活性を指標としたルシフェラーゼアッセイにより SOCS-7 とその相互作用因子の働きを検証する。

#### 4. 研究成果

(1) 個体 (マウス) 組織内で、SOCS-3 と DP-1 が肺と精巣で発現することを見出し、これらが組織内で相互作用することを見出した。JAK-STAT 系における SOCS-3 の JAK 抑制能を DP-1 は強力に阻害したが、この効果は siRNA を使用した実験によっても確認できた。E2F/DP-1 の転写活性可能および細胞周期促進能を SOCS3 は抑制したが、この効果は siRNA を使用した実験によっても確認できた。本研究で発見した DP-1 アイソフォーム DP-1 $\alpha$ , $\beta$  の分解様式をウエスタンブロットにより解析した結果、DP-1 内の分解抑制領域が DP-1 の C 末端側に存在することを確認した。また、DP-1 の様々な欠変異体と MG132 を用い、これらの分解様式をウエスタンブロットにより解析した結果、DP-1 のプロテアソーム分解に対する促進と抑制領域を発見した。

(2) 細胞膜透過性タグ融合 SOCS2,3 および RAR $\alpha$  タンパク質の発現系確立を試み、これらの高発現系を確立した。これらの系についてはタンパク質変性条件下 (8M 尿素存在下) でニッケルレジンをを用いて完全精製し、その後透析によりリフォールディング系の確立も行なった。様々なバッファーで透析条件を検討した結果、アルギニンを含んだバッファーで透析した時が最もリフォールディング効率がよく、その効率は 20-40% であった。精製したタンパク質を FITC ラベル後、共焦点レーザー顕微鏡で確認したところ、各々の細胞内導入を確認した。また、細胞内導入後、実際に機能しているかの確認を各種アッセイ系により行った。この結果、細胞膜透過性 SOCS2 は成長ホルモンレセプターと相互作用し、細胞増殖を抑制可能であることが判明した。細胞膜透過性 SOCS3 は JAK-STAT シグナル伝達

系を抑制可能であることが判明した。また、DP-1 と相互作用した。細胞膜透過性 RAR alpha は in vitro の実験において DNA 結合能、転写活性化能を保持していた。また、PML/RAR alpha 融合遺伝子を持つ白血病患者由来の白血病細胞に投与したところ、この細胞を顆粒球 (好中球) へ分化させることが可能であることが判明した。

(3) 酵母 Two-hybrid screening により SOCS-7 相互作用因子のスクリーニングを行ない数個の相互作用候補因子を得た。細胞内での相互作用を確認するため、HEK293 細胞を用いて強制発現後免疫沈降法を行ない、TRIP6 が相互作用因子の 1 つであることを見出した。細胞内で両者の局在変化の確認を行なったところ両者の局在は大部分で重なった。また、NF- $\kappa$ B の転写活性を指標としたルシフェラーゼアッセイで、SOCS-7 は TRIP6 の NF- $\kappa$ B のコアクチベーターとしての機能を抑制した。

#### 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 1 件)

① 舩廣善和、嘉山謙一、福島晶絵、馬場孝治、双津牧雄、上谷能彬、後藤道雄、山口登、花澤重正 SOCS-3 inhibits E2F/DP-1 transcriptional activity and cell cycle progression via interaction with DP-1. The Journal of Biological Chemistry. 283. 31575-31583. 2008 年、査読有り

[学会発表] (計 8 件)

① 舩廣善和、細胞膜透過性タグ融合サイトカインシグナル抑制因子 SOCS-2 の大腸菌による発現系の確立、日本農芸化学会、2009 年 3 月 29 日、福岡

② 荒川貴史、細胞周期調節性転写因子 DP-1 のプロテアソームを介する分解機構；その分解制御領域 Stabilon 及び Degron の同定、日本農芸化学会、2009 年 3 月 29 日、福岡

③ 稲垣みずき、遺伝子組換え型細胞膜透過性 RAR $\alpha$  の発現系の確立と前骨髄球性白血病細胞に関する分化誘導作用、日本農芸化学会 2009 年 3 月 29 日、福岡

④ 尾勝圭、サイトカインシグナル抑制因子 SOCS-7 の新規機能の解析；TRIAD3 は SOCS-7 の新たな相互作用因子である、日本農芸化学会、2009 年 3 月 28 日、福岡

⑤ 舩廣善和、SOCS-3 と DP-1 の相互作用による細胞周期調節機構の解析、日本分子生物学会、2008 年 12 月 12 日、神戸

⑥ 上谷能彬、細胞周期調節性転写因子 DP-1 のプロテアソーム系を介する自己分解機構、日本分子生物学会、2008 年 12 月 12 日、神

戸

⑦小島裕久、SOCS-7はNF- $\kappa$ Bシグナル活性化因子TRIP6と相互作用しそのシグナルを負に制御する、日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸

⑧双津牧雄、Erk2によるヒトSOCS-3のS159のリン酸化とJAK-STATシグナル伝達系制御、日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：白血病治療に応用可能な細胞膜透過性タグおよび核移行シグナル融合RAR $\alpha$ タンパク質の大量発現系、精製系の確立

発明者：花澤重正、舩廣善和

権利者：日本大学

番号：特願2009-077375

出願年月日：2009年3月26日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/AA/0006909/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舩廣 善和 (MASUHIRO YOSHIKAZU)

日本大学・大学院総合科学研究科・講師

研究者番号：00336083

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者