

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20590773  
 研究課題名(和文) ユビキチン化された26Sプロテアソーム会合分子ガンキリンによる肝  
 癌発生機序の解析  
 研究課題名(英文) Analysis of hepatocarcinogenesis due to monoubiquitylation of gankyrin  
 that is one of the proteasome-interacting proteins  
 研究代表者  
 東辻 宏明 (HIROAKI HIGASHITSUJI)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：60281094

## 研究成果の概要 (和文)：

癌遺伝子産物であるガンキリンのモノ ULM(ubiquitin-like-modifiers) (ユビキチン、NEDD8、SUMO1-4、ISG15、URM1 など) 化のうち、モノユビキチン化という翻訳後修飾はガンキリンによる肝細胞の癌化の働きを変化させた。肝癌細胞において、モノユビキチン化ガンキリンは癌抑制遺伝子産物である p53 より pRB のほうに MDM2 の基質特異性を変化させ、pRB をより分解する傾向を示した。ガンキリンのモノユビキチン化系の E1、E2、E3、E4、DUB は抗がん剤のターゲットとなりうることが示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

Gankyrin is monoubiquitylated at specific lysine residue posttranslationally. However, other ubiquitin like modifiers, that is, NEDD8, SUMO1-4, ISG15, or URM1, does not bind to gankyrin. Monoubiquitylation of oncogenic gankyrin induces hepatic cell transformation more stimulatedly than wild type nonmodified gankyrin posttranslationally. In hepatoma cell lines, monoubiquitylated gankyrin binds to S6 ATPase and MDM2. Nevertheless, monoubiquitylated gankyrin targets more effectively pRB than p53 toward MDM2 E3 ubiquitin ligase activity. Some of gankyrin monoubiquitylation systems consisting of E1, E2, E3, E4, and DUB will become targets of anti-cancer drugs.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：プロテアソーム、ガンキリン、モノユビキチン、肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質のモノユビキチン化は種々の細胞現象に関連する。たとえば、DNA修復時の FANCD2やPNCA蛋白のモノユビキチン化、エンドサイトーシスでのcoupled-monoubiquitylation、転写時のヒストン蛋白のモノユビキチン化、がん抑制遺伝子産物p53やFOXO、が

ん遺伝子産物rasのmonoubiquitylationによる細胞内局在の変化。モノユビキチン化はそのターゲット蛋白質の機能変換シグナルとして機能している。がん遺伝子産物ガンキリンのモノユビキチン化は、ガンキリンの肝がん細胞における機能を変化させ、ガンキリンによる細胞癌化の働きを亢進させる可能性がある。

(2) two-hybrid法、proteomics解析により、プロテアソームに相互作用するタンパク質が報告されている。ガンキリンはほ乳類組織より精製されたプロテアソームに含まれる分子として同定された。出芽酵母においては、19S-Regulatory-Particleには含まれるが26S-Proteasomeには含まれない分子として酵母のガンキリンorthologue、NAS6が同定された。ほ乳類細胞において19S-Regulatory-Particleのbaseのp48/S6/Tbp7/PSMC4と複合体を形成する分子としてガンキリンが同定された。ある状況下で一過性に(恒常的な内在性サブユニットとしてではなく)ガンキリンを結合したプロテアソームはその機能が変化していると想定される。モノユビキチン化ガンキリンは野生型ガンキリンに比較して、プロテアソームに会合しやすいのか、もしそうであれば、より強く結びついたモノユビキチン化ガンキリンはプロテアソームのどのような機能を変化させるのか。

(3) in vitro gankyrin ubiquitylation assay において、ガンキリンはモノユビキチン化をうける。抗ガンキリン抗体での肝癌細胞株のウエスタンブロットにより、内因性の 25 kDa のガンキリンと 8.5kDa のユビキチン一個分がちょうど加わった二本のバンドが検出された。大きい分子サイズのバンドは抗ガンキリン抗体による免疫沈降物のなかに抗ユビキチン抗体、抗ガンキリン抗体で共に認識できたことで、モノユビキチン化ガンキリンのバンドである。ガンキリンおよびモノユビキチン化ガンキリンはともに肝細胞癌、肝癌細胞株で過剰発現していた。

## 2. 研究の目的

モノユビキチン化ガンキリンが機能を変化させながら、肝細胞癌の発がん、進展(転移、浸潤)にどう関わっていくのか、検討する。

- (1) モノユビキチン化ガンキリンの肝細胞癌、肝癌細胞株での存在を確認する。
- (2) ガンキリンとモノユビキチン化ガンキリン(ガンキリンのC端にユビキチンを一個をtandemに融合した変異型ガンキリンを代替分子とする)の癌化能(げっ歯類の不死化細胞株およびp primary cultureを用いて)を比較する。
- (3) ガンキリンのがん抑制遺伝子産物p53やpRBタンパクの分解に与える影響がモノユビキチン化ガンキリンの場合

はどうか?細胞内での局在の変化。p53やpRBの半減期の変化。E2、E3との結合の変化。MDM2の基質特異性への影響。

- (4) プロテアソーム結合タンパクとしてのガンキリンのモノユビキチン化は26Sプロテアソームの機能にどのような影響を与えるのか。ペプチド分解の特異性の変化、19S regulatory particleに対する $\gamma$ シャペロン活性の変化。
- (5) 基質タンパクのポリユビキチン化と同様に基質のモノユビキチン化も多分独自のあるいは使い回しのユビキチンシステムが必要であるので、ガンキリンのモノユビキチン化に関与するE1、E2、E3、E4、DUBを同定する。
- (6) モノユビキチン化ガンキリンに結合するタンパク分子を網羅的に同定する。

## 3. 研究の方法

- (1) モノユビキチン化ガンキリンの肝癌細胞株 HepG2、Huh-7、PLC での存在を確認する。
- (2) ガンキリンのモノユビキチン化される主要なリジン残基(ガンキリン分子には全部で 16 個のリジン残基がある)をリジン・アルギニン変異型ガンキリンにより決定する。
- (3) 野生型ガンキリン分子と上記(2)で得られたモノユビキチン化されない変異型ガンキリン分子の癌化能を比較する。野生型ガンキリン分子とガンキリンのC端にdiglycine配列を除いたヒトユビキチン分子をtandemに融合した分子(モノユビキチン化ガンキリンの代替分子)の癌化能をげっ歯類の不死化細胞株あるいはrat embryonal fibroblastを使い、比較する。
- (4) ガンキリンのがん遺伝子としての機能(MDM2のE3 ubiquitin ligase活性を促進することでがん抑制遺伝子産物p53やpRBタンパクの分解を促進

- し、それらの活性が失われる)がモノユビキチン化ガンキリンの場合はどうなるのか(MDM2の基質特異性)。モノユビキチン化ガンキリンの方が活性化あるいは基質特異性の変化があるとすれば、その機序は何か。
- (5) プロテアソーム結合タンパクとしてのガンキリンのモノユビキチン化は26Sプロテアソームの機能にどのような影響を与えるのか。ガンキリンのノックアウトマウスを作製して、野生型ガンキリンの結合していない26Sプロテアソームの活性、生化学的特徴を解析する。モノユビキチン化されるリジン残基をアルギニンに置換したガンキリンのノックインマウスを作製し、モノユビキチン化ガンキリンの結合していない26Sプロテアソームの活性、生化学的特徴を解析する。
  - (6) 基質タンパクのポリユビキチン化と同様にモノユビキチン化もユビキチンシステムが必要であるので、ガンキリンのモノユビキチン化に関与するE1、E2、E3、E4、それを調節するDUBを同定する。モノユビキチン化ガンキリンの細胞内レセプターを同定し、モノユビキチン化ガンキリンとそのレセプタータンパクを介したシグナル伝達機構について解析する。方法としては、two-hybrid、TAP(tandem-repeat-affinity-purification)-tagged-gankyrin-ubiquitin fusion proteinを細胞に発現させ、IgG-Sepharose、protease処理、calmodulin-Sepharose-affinity purificationをおこない、複合体を形成するタンパク群をmass

spectrometryでproteomics解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) 肝癌細胞株によるin vivoでのガンキリン分子のubiquitin-like modifiers(ULM)による翻訳後修飾を検討した。ubiquitin化、NEDD8化、ISG15化、SUMO1-4化、URM1化を免疫沈降、ウェスタンブロットで確認したところ、ガンキリン分子はモノユビキチン化、モノNEDD8化、モノISG15化されていた。モノSUMO1-4化、モノURM1化は受けていなかった。
- (2) in vitroのユビキチン化、NEDD8化、ISG15化のアッセイ系をそれぞれのE1、E2、E3をrecombinant proteinsとして作製し、確立した。この場合の成分分子は他のタンパク質の場合をそのまま用いた。この系を用いて、in vitroでのガンキリン分子のubiquitin-like modifiers(ULM)による翻訳後修飾を検討した。(1)と同様の結果を得た。
- (3) ガンキリンのモノユビキチン化、モノNEDD8化、モノISG15化をうけるリジン残基はすべて同じ16個のリジン残基のうちのN端から10番目のリジンであった。ヒトガンキリン蛋白226アミノ酸のうち、153番目のリジン残基である。N端ではなく、ややC端よりであるので、ガンキリンのC端にdiglycine配列を除いたヒトユビキチン分子をtandemに融合した分子をモノユビキチン化ガンキリンの代替分子として利用できる。同じリジン残基が3種類のubiquitin-like modifiers(ULM)による翻訳後修飾を受けることになるので、

ある状況下では ubiquitin-like modifiers(ULM)による翻訳後修飾が互いに competitive に働く可能性がある。

- (4) 肝癌細胞株中ではモノユビキチン化は非ストレス下でも起きる。モノ NEDD8 化は特に酸化ストレス下、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後によく起こる。モノ ISG15 化はインターフェロンアルファ刺激時に起こる。
- (5) Rat embryonic fibroblast を用いて、ガンキリンとモノユビキチン化、モノ NEDD8 化、モノ ISG15 化ガンキリン (C 端に diglycine 配列-GG を除去したユビキチン、NEDD8、ISG15 を一個 tandem に融合した変異型ガンキリン) の癌化能を比較した。野生型ガンキリンに比して、ガンキリン NEDD8 融合蛋白とガンキリン ISG15 融合蛋白は同程度の癌化能であった。ガンキリンユビキチン融合蛋白は唯一野生型ガンキリンより癌化能が亢進していた。
- (6) モノユビキチン化、モノ NEDD8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの p53 や pRB タンパクの細胞内での局在に与える影響を検討した。モノユビキチン化、モノ NEDD8 化、モノ ISG15 化ガンキリン 3 者ともに、自分自身 (ガンキリン) の細胞内局在は核と細胞質両者にあるという野生型ガンキリンのそれと変わらなかった。また、p53 や pRB、MDM2 タンパクの細胞内での局在に与える影響を二重、三重蛍光免疫染色で confocal-microscopy 観察を行なったが、やはり変化はなかった。
- (7) モノユビキチン化、モノ NEDD8 化、

モノ ISG15 化ガンキリンの p53 や pRB タンパクの転写活性化能に対する効果をレポータージーンアッセイで解析した。モノ NEDD8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの効果は p53 レポーターにも pRB (E2F1)レポーターにも野生型ガンキリンとの差は見られなかった。モノユビキチン化ガンキリンは p53 転写活性化能に対しては野生型ガンキリンと差がなかったが、E2F1 転写活性化能に対しては野生型ガンキリンより亢進していた。

- (8) モノユビキチン化、モノ NEDD8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの p53 や pRB タンパクのタンパク分解に対する影響を調べた。p53 タンパクに対しては肝癌細胞株を用いて、CHX-chase-assay を行なった。野生型ガンキリンと比べて、モノユビキチン化、モノ NEDD8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの 3 者は同程度の half-life を示した。pRB タンパクに対しても肝癌細胞株を用いて、in vivo での CHX-chase-assay を行なった。野生型ガンキリンと比べて、モノ NEDD8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの 2 者は同程度の half-life を示した。モノユビキチン化ガンキリンは野生型ガンキリンに比べて、短い half-life を示した。すなわち、ガンキリンの分解能が pRB に対しては促進していた。
- (9) 今後の展望としては、1) モノユビキチン化ガンキリンについて、E1、E2やE3(MDM2)との結合の変化を調べる。2) プロテアソーム結合タンパクとしてのガンキリンのモノユビキチン化は 26S プロテアソームの機

能（ペプチドやモデルタンパクの分解）にどのような影響を与えるのかを検討する。3）モノユビキチン化ガンキリンはp53よりpRBのほうにMDM2の基質特異性を変化させ、pRBをより分解する傾向を示した。その機序について解析する。

4）モノISG15化ガンキリンは検討した限り、野生型のガンキリンとの差異はみだせなかった。インターフェロンのシグナル伝達経路での役割を検討する。5）モノユビキチン化ガンキリンは野生型ガンキリンに比して短いhalf-lifeを示した。野生型ガンキリンは非常に安定したタンパクなので、そのタンパク分解による量的な調節がモノユビキチン化ガンキリンのポリユビキチン化によって行なわれているかどうかを解析する。

6）ガンキリンのシステイン残基は、S-nitrosylationされることが判明した。Sニトロソ化ガンキリンの機能をストレス応答の系で調べる。

#### 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3件）

1. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Ito K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology*. 2009 6 : 1-10. 査読有。
2. Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue T, Fujita J. Association of gankyrin protein

expression with early clinical stages and IGFBP-5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 , 47(2) : 493-502. 査読有。

3. Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. Ortiz CM, Ito T, Tanaka E, Tsunoda S, Nagayama S, Sakai Y, Higashitsuji H, Fujita J, Shimada Y. *Int J Cancer*. 2008 , 122:325-332. 査読有。

〔学会発表〕（計3件）

#### 1. 東辻宏明

肝癌で高発現する CIRP(cold-inducible RNA binding protein)は腫瘍細胞の浸潤能を亢進させる。

第46回日本肝臓学会総会

2010年5月28日

山形市、ホテルメトロポリタン山形

#### 2. 東辻宏明

NEDD8化ガンキリンを介したMDM2の基質特異性の変化。

第95回日本消化器病学会

2009年5月9日

ロイトン札幌、札幌市

#### 3. 東辻宏明

肝癌で過剰発現するがん遺伝子ガンキリンはNFkappaB(RelA)と結合しその転写活性化能を抑制する。

第44回日本肝臓学会

2008年6月6日

松山市、愛媛県

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等はなし。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

**東辻 宏明 (HIROAKI HIGASHITSUJI)**

**京都大学・医学研究科・助教**

研究者番号：60281094

### (2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：