

機関番号：32665

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21688008

研究課題名(和文) 癌抑制のための腫瘍関連因子活性調節系の確立

研究課題名(英文) Establishment of the systems that regulate the activity of tumor-related factors for tumor suppression

## 研究代表者

舩廣 善和 (MASUHIRO YOSHIKAZU)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：00336083

## 研究成果の概要(和文)：

腫瘍関連因子の新たな分子機構を発見した。また、癌抑制のタンパク質療法のための細胞膜透過性癌抑制因子の発現系を構築した。

- (1) 癌増殖に関わる転写因子 DP-1 のタンパク質安定化モチーフ“Stabilon”の発見
- (2) SOCS7 による TRIP6 を介した LPA シグナル伝達系の抑制と新規 TRIP6 アイソフォーム群の発見
- (3) 細胞膜透過性 RAR $\alpha$ , SOCS-3, p53, SOCS-2 の大腸菌発現系の構築

## 研究成果の概要(英文)：

We discovered the newly molecular mechanisms of tumor-related factors. We also established that the expression system of cell-permeable tumor suppressors for the protein therapy of tumor suppression.

- (1) Identification of “Stabilon” motif that is significant for protein stability of transcription factor DP-1 concerned with tumor growth.
- (2) Discovery of the suppression of TRIP6-mediated LPA signal transduction by SOCS7 and new isoforms of TRIP6.
- (3) Establishment of E. coli. expression system of cell-permeable RAR $\alpha$ , SOCS-3, p53 and SOCS-2.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,300,000	5,490,000	23,790,000

研究分野：応用生物科学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物科学

キーワード：細胞膜透過性タグ、サイトカイン、SOCS、DP-1、p53、Stabilon

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) これまでの研究により、サイトカイン

シグナル抑制因子の一種であり、癌抑制活性を保持する SOCS (Suppressor of cytokine

signaling) -3 が転写因子 DP-1 の転写活性を抑制することで癌抑制活性を発揮していることを見出していた(Masuhiko Y., et. al. JBC 2008)。また、DP-1 の C 末端側を欠く新規アイソフォーム 2 種を発見していた(Ishida H. et. al. JBC 2005)。しかし、これらの C 末端側を欠く DP-1 アイソフォームは非常に発現が悪かった。また DP-1 のタンパク質分解機構についてはプロテアソームで分解されることは判明していたが、分子内のタンパク質安定化に関わる領域やユビキチン化の機構等は不明であった。

(2) SOCS ファミリーは CIS および SOCS1-7 の 8 種からなるが、SOCS5-7 はあまり機能が判明していなかった。しかし、CIS および SOCS1-3 にはサイトカインシグナル抑制機構があり、癌抑制に働くことから、これらの機能未知な SOCS にもどのような機能があるのか興味深い。本研究ではこの中でも SOCS-7 の相互作用因子に着目した。

(3) これまでに多くの癌抑制因子が判明しているが、この機能向上や発現導入による癌抑制療法は発達していない。特に細胞膜透過性ペプチドをベクターとして用いる細胞膜透過性タンパク質を応用するタンパク質療法は極めて注目されるが、現時点では開発段階である。本研究では前骨髄急性白血病に有効な RAR $\alpha$ 、多くの癌に有効な p53, SOCS-3, SOCS-3 に着目した。

## 2. 研究の目的

(1) DP-1 C 末端側領域が DP-1 タンパク質の分解に与える影響を調べる。

(2) SOCS7 相互作用因子 TRIP6 の新たなアイソフォームについて、SOCS7 相互作用能と LPA シグナル伝達抑制能を検討する。

(3) 機能活性を保持した細胞膜透過性癌抑制因子の発現系を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) DP-1 の C 末端欠失変異体を作成し、どの領域がタンパク質の安定化に重要かをウエスタンブロット法にて確認する。更に、この領域を GAL4DBD に融合し、一般的なタンパク質安定化領域かを検討する。siRNA を用い、DP-1 のユビキチン化に関わる E3 ユビキチンリガーゼの特定を行う。

(2) SOCS7 相互作用因子を酵母 Two-hybrid screening で検索する。新規 TRIP6 アイソフォームと SOCS7 で免疫沈降法-ウエスタンブロット解析を行い相互作用するアイソフォームを確認する。LPA シグナル伝達を抑制する TRIP6 アイソフォームを検索する。LPA シグナル伝達を SOCS7 が制御するかを調べる。SOCS7 と TRIP6 の相互作用による両者のタンパク質安定化を調べる。

(3) 細胞膜透過性癌抑制因子の大腸菌発現系を構築し、各種細胞に導入させる。細胞導入し、癌増殖抑制能や各種機能を保持しているかを分子生物学的な手法で確認する。

## 4. 研究成果

(1) DP-1 の最も C 末端側 (395-410a.a.) の酸性アミノ酸に富んだ領域が DP-1 タンパク質の安定化に重要であることが判明し、この領域を **Stabilon** と命名した。

DP-1 Stabilon は GAL4DBD に融合してもその効果を発揮し、GAL4DBD タンパク質を安定化した。また、Stabilon としての最小領域を調べたが 395-410a.a. の 16 アミノ酸が最もタンパク質安定化の活性が強かった。DP-1 のユビキチン化に E3 ユビキチンリガーゼ Skp2 が関与することが判明した。

(2) 酵母 Two-hybrid screening の結果、SOCS7 に TRIP6 が相互作用することを見出した。新規 TRIP6 アイソフォームのうちいくつかは SOCS7 と相互作用可能であった。また、これらの相互作用は LPA シグナル下流のシグナル伝達を抑制した。SOCS7 は TRIP6 のタンパク質分解を抑制し安定化させた。

(3) 細胞膜透過性 RAR $\alpha$  は前骨髄急性白血病患者由来の NB4、NB4R2 細胞を分化促進することができた。細胞膜透過性 p53, SOCS-3, SOCS-2 は培養癌細胞の細胞増殖を抑制した。また、細胞膜透過性 RAR $\alpha$  と p53 タンパク質は Gel shift assay の結果、DNA 結合能を保持していた。また、Luciferase assay の結果、これらは転写活性可能も保持していた。細胞膜透過性 SOCS-3 は LIF 刺激による JAK-STAT 活性化機構を抑制し、細胞増殖も抑制した。また、細胞膜透過性 SOCS-2 は GH, IGF-1 刺激によるシグナル伝達を抑制し細胞増殖を抑制した。

## 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 荒川貴史、舩廣善和、上谷能彬、小島裕久、花澤重正、Identification of significant regions of transcription factor DP-1 (TFDP-1) involved in stability/instability of the protein. Biochem Biophys Res Commun. 397巻, p345-349. 2010年、査読有り

[学会発表] (計 15 件)

① 舩廣善和、田口顕広、小島裕久、花澤重正、尿素変性タンパク質の透析におけるリフォールディング効率と等電点の関係

2011年度日本農芸化学会  
2011年3月26日（京都）

- ②小島裕久、大穂満隆、和田菜々枝、舩廣善和、花澤重正、分解耐性型細胞膜透過性山中因子の恒常的発現系の開発  
2011年度日本農芸化学会  
2011年3月26日（京都）
- ③吉田尚弘、佐藤あまね、舩廣善和、花澤重正、細胞膜透過性SOCS2蛋白質によるIGF-1シグナル抑制系の開発  
2011年度日本農芸化学会  
2011年3月26日（京都）
- ④大穂満隆、小島裕久、舩廣善和、花澤重正、細胞膜透過性c-Mycの大腸菌発現系の確立  
2011年度日本農芸化学会  
2011年3月26日（京都）
- ⑤舩廣善和、稲垣みずき、白戸智恵、小島裕久、花澤重正、細胞膜透過性レチノイン酸受容体(RAR $\alpha$ )による白血病細胞の顆粒球への分化誘導、  
日本大学幹細胞研究フォーラム  
2011年1月22日（東京）
- ⑥小島裕久、大穂満隆、舩廣善和、花澤重正、タンパク質誘導のiPS細胞産生に必要な細胞膜透過性山中因子の恒常的発現系の開発、  
日本大学幹細胞研究フォーラム  
2011年1月22日（東京）
- ⑦大穂満隆、小島裕久、舩廣善和、花澤重正、大腸菌による細胞膜透過性c-Myc発現系の構築、  
日本大学幹細胞研究フォーラム  
2011年1月22日（東京）
- ⑧舩廣善和、郡尚子、中山隆太郎、小島裕久、花澤重正、細胞膜透過性TIPE2の大腸菌による発現系の構築  
第33回日本分子生物学会  
2010年12月8日（神戸）
- ⑨小島裕久、大穂満隆、舩廣善和、花澤重正、細胞膜透過性山中因子の安定的発現系の構築  
第33回日本分子生物学会  
2010年12月10日（神戸）
- ⑩舩廣善和、荒川貴史、小島裕久、花澤重正、タンパク質安定化発現モチーフDP-1 Stabilonの性状解析  
日本農芸化学会 2010年度大会  
2010年3月28日（東京）
- ⑪小島裕久、舩廣善和、花澤重正、iPS細胞

産生系に係わる Yamanaka 因子の安定的発現系の構築

- 日本農芸化学会 2010年度大会  
2010年3月28日（東京）
- ⑫舩廣善和、荒川貴史、小島裕久、花澤重正  
転写因子 DP-1 のユビキチン-プロテアソーム系による分解機構  
第32回日本分子生物学会年会  
2009年12月11日（横浜）
- ⑬小島裕久、舩廣善和、花澤重正  
SOCS7はLPA刺激によるTRIP6の55番目チロシンのリン酸化を抑制する  
第32回日本分子生物学会年会  
2009年12月9日（横浜）
- ⑭小島裕久、増見健太郎、舩廣善和、花澤重正、ヒトTRIP6の新規アイソフォームの同定と機能解析  
第82回日本生化学会大会  
2009年10月24日（神戸）
- ⑮舩廣善和、花澤重正、白血病治療に応用可能な細胞膜透過性RARタンパク質の発現系確立  
第8回国際バイオフォーラム  
2009年7月1-3日（東京）

〔図書〕（計1件）

- ① 著者名；加藤茂明、山本裕司、真野博、柳澤純、大竹史明、武山健一、北川浩史、舩廣善和、他  
書名；「現代栄養学を理解するための分子生物学入門」  
発行年；2010年  
出版社；光生館

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

- ① 名称；「タンパク質療法や抗体療法に応用可能なプロテアソームによるタンパク質分解を阻害する酸性アミノ酸から成るモチーフの確立」  
発明者；舩廣善和、花澤重正  
権利者；日本大学  
種類；特許  
番号；特願2009-122552  
出願年月日；2009年5月20日  
国内外の別；国内
- ② 名称；「タンパク質療法や細胞の分化／未分化制御、抗体療法に応用可能な細胞内でのタンパク質の安定化を可能にする酸性アミノ酸からなるモチーフの確立」  
発明者；舩廣善和、花澤重正

権利者：日本大学  
種類：特許  
番号：PCT / JP2009 / 070081 ; N002P08005  
出願年月日：2009年11月20日  
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/70/0006909/profile.html>

[http://www.nihon-u.ac.jp/arish/prof/profile\\_masuhiro.html](http://www.nihon-u.ac.jp/arish/prof/profile_masuhiro.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舩廣 善和 (Masuhiro Yoshikazu)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：00336083