

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：33303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25430119
研究課題名(和文) UBR4/p600-HPV16 E7相互作用による発がんメカニズム

研究課題名(英文) The role of UBR4/HPV16 E7 interaction in cancer

研究代表者
田崎 隆史 (TASAKI, Takafumi)

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授

研究者番号：70629815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸がんの原因であるヒトパピローマウイルスのE7は、98アミノ酸からなる小さなタンパク質である。宿主細胞中の様々な分子と結合しており、その中でもUBR4は約5800アミノ酸からなる巨大タンパク質である。本研究により、E7はUBR4上のUBR box領域を介して結合している事が示唆された。この領域は、UBR4の生体内での役割に関係している。次に、UBR4を人工的に欠損した細胞中でのE7タンパク質の性状を検討した。UBR4を欠損した細胞中では、E7タンパク質は顕著に不安定化していた。これらの結果から、E7はUBR4と複合体を作り安定化し、ウイルスの発癌活性に影響を与えている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cervical cancer is caused by certain types of human papilloma virus. The viral E7 is a small 98-amino acid protein that binds various cellular proteins in a host cell. Among these interaction proteins, UBR4 is a huge approx. 5800-amino acids protein. This study found out that the E7 binds to UBR4 via the conservative UBR box domain in UBR4. The UBR box domain is involved in a physiological role of UBR4. Next, we investigated a metabolic stability of the E7 in genetically modified UBR4-deficient cells. The E7 was significantly unstable in the UBR4-lacking cells. Our results suggest that the E7 forms a stable complex with the UBR4 and the complex regulates the viral cancer activity in host cells.

研究分野：ユビキチンタンパク質分解システム、ウイルス学

キーワード：パピローマウイルス がん E7 UBR4 代謝的安定性

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮頸がんの原因である HPV16 E7(以下 E7)は、様々な宿主タンパク質を標的とするがん蛋白である。近年、UBR4/p600 が新たな標的因子として同定された(文献 1, 2)。E7 は UBR4 に結合し、pRB に依存しない経路でトランスフォーミング活性を持つと考えられている(図 1)。しかし、UBR4-E7 相互作用の分子機構(図 1-)とその生化学的意義(図 1-)、がん化のメカニズム(図 1-)は不明である。

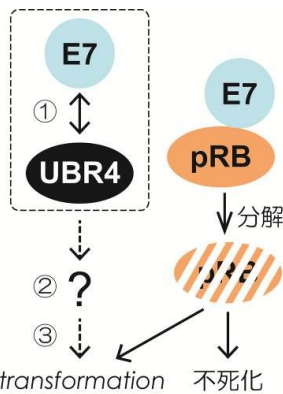


図 1 HPV16 E7 の標的因子とがん化モデル

(2) UBR4 (600 kDa) は、ユビキチン系の一つ N-end rule pathway の基質認識蛋白として私が発見し、短寿命タンパク質の分解に関わっていることを示した(文献 3, 4)。しかし、UBR4 の生理学的基質は分かっていない。E7 (98-aa) は、培養細胞中でユビキチン系によって分解される短寿命タンパク質であり(文献 5)、E7 の N 末側 CR1 領域が、UBR4 結合と E7 分解の両方にとって重要であることが報告されている(図 2)。従って、UBR4-E7 相互作用によって、E7 分解(半減期)が調節されている可能性がある。

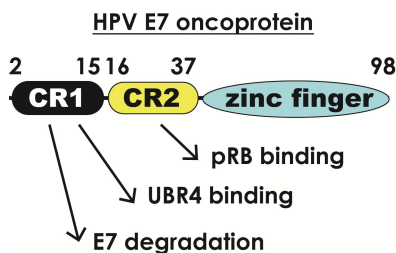


図 2 HPV16 E7 の構造と保存領域

2. 研究の目的

(1) UBR4 はどのように E7 と直接結合しているのか? UBR4 E7 複合体の in vitro 結合アッセイを確立する。組換え UBR4 蛋白断片を用い、UBR4 上の E7 結合部位を特定する。

(2) UBR4 は E7 のタンパク質分解に関与しているのか? UBR4 欠損モデル細胞を確立する。UBR4 欠損細胞で E7 の代謝的安定性を分析する。

3. 研究の方法

(1) UBR4-E7 in vitro 結合アッセイの確立:

E7 の N 末 15 アミノ酸からなるペプチド (E7-N15) 及び、コントロール (E7-NC) を合成し、C 末ビオチン化 Lys 残基によって Streptavidin (SA)-ビーズに固定する。大腸菌外来タンパク質発現システムを用い、組換え E7-flag タンパク質を作製する。Cell-free system を用いヒト UBR4 蛋白断片を作成する。哺乳類細胞系を用い、組換えヒト UBR4 断片タンパク質を作製する。上記の方法で作製した E7(全長もしくは一部)と UBR4(全長及び一部)をチューブ内で懸濁し、SA ビーズもしくは抗 flag 抗体ビーズを用いて、結合タンパク質を分離する。分離したタンパク質中に、特異的な UBR4(全長もしくは一部)が含まれているのかを解析する。

(2) UBR4-E7 結合に対する阻害剤の影響を検討する。培養細胞の UBR4 を X-peptide beads 法(文献 3)で分離する際、野生型 E7-flag 及び変異型 E7-flag を添加し、UBR4 と X-peptide の結合が阻害されるか解析する。

培養細胞の UBR4 もしくは、UBR4 の一部を E7-flag に結合させる。その際、N-end rule pathway の阻害剤である、RA や FA もしくはその両方を添加し、UBR4-E7 結合の阻害実験を行う。

(3) UBR4 欠損細胞での E7 タンパク質の代謝的安定性を解析する。UBR4KO マウスおよび UBR4CKO/ERT2-Cre マウスより、胎仔性繊維芽細胞を調整する。E7 を発現するプラスミドを細胞に導入し、CHX や MG132 等を用いて、E7 のタンパク質安定性を解析する。

4. 研究成果

(1) UBR4-E7 in vitro 結合アッセイ法の確立。

当初の計画どおり、E7 の N 末 15 残基ペプチドを合成し、そのビオチン化した C 末側とストレプトアビジンビーズを用いて、結合アッセイを構築したが、合成したペプチドの不溶性が高く成功しなかった。HPV16 E7 は 98 アミノ酸残基と小さいが、N 末半分 (47aa) が intrinsically disordered protein であることが原因であると考えられた。そこで、E7 全長の C 末側に flag タグをつけ、大腸菌内で組換えタンパク質を発現させた。その可溶性画分より、抗 flag 抗体アガロースを用いて E7-flag タンパク質を精製した。この大腸菌由来 E7-flag と抗 flag 抗体アガロースを用いると、cell-free system および哺乳類細胞(HEK293)由来の UBR4 を効率よく精製できることが分かった(図 3)。また、2 種の E7 変異体 (d6-10, d21-24, 図 3) を作製し、UBR4-E7 結合アッセイを行ったところ、E7(d6-10)は、UBR4 結合能が著しく低下するが、pRb への結合能は変わらず、E7(d21-24)は、UBR4 結合能は変わらないが、pRb 結合能

は欠損していた。このことから、E7 の UBR4 と pRb への結合は、それぞれ独立した現象であることが分かった。

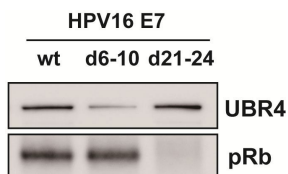


図3 UBR4-E7 in vitro 結合アッセイ

(2) E7 は UBR4 の UBR box を含む断片と強く結合する。

(1)で確立した、UBR4-E7 in vitro 結合アッセイを用いて、UBR4 上の E7 結合領域の同定を行った。UBR4 全長 (5184aa) および、その断片を作製し、それらの E7 結合能を検討したところ、UBR-E7 結合には、UBR box 領域(アミノ酸 1660-1727)が必要であり、UBR box 領域を含む 808 アミノ酸の UBR4 断片(アミノ酸 1464-2271)が E7 と効率よく結合することが分かった。残念ながら、UBR4 断片をさらに小さくすると、非常に不安定で、結合アッセイを行うことが出来なかった。しかし、以上の結果から、UBR4-E7 結合には、UBR box 領域(約 70 アミノ酸)が重要であることが予想できた。

(3) UBR4-E7 相互作用には、UBR4 の UBR box 領域が重要である。

UBR4 上の E7 結合部位は、UBR box 領域であると仮定し、二種類の阻害実験を行った。UBR4 は N-end rule pathway の N-recognin であるので、モデル基質である X-peptide beads (X = Arg, Phe)で捕らえることが出来る(文献 3)。この X-peptide 結合アッセイを行い、その際、大腸菌に発現させた E7-flag もしくは E7(d6-10)-flag タンパク質を添加した。その結果、UBR4 に結合能をもつ E7-flag は、濃度依存的に UBR4:X-peptide 結合を強く阻害するが、UBR4 結合能を失った E7(d6-10)-flag は、UBR4:X-peptide 結合を阻害しなかった。つまり、E7-flag タンパク質は、UBR4 の N-end rule 基質結合を阻害する事が示された。次に、UBR4-E7 相互作用が、N-end rule pathway 阻害剤(dipeptides)で阻害されるかどうか検討した。H-Arg-Ala-OH (RA) や H-Phe-Ala-OH (FA) は UBR4-E7 結合を阻害したが、それぞれのコントロールである H-Ala-Arg-OH (AR) と H-Ala-Phe-OH (AF) では阻害されなかった。RA と FA 両方を加えると、さらに強い阻害効果が見られた。つまり、N-end rule pathway 阻害剤は UBR4 と E7 の結合を阻害する事が示された。これらの結果から、UBR4-E7 相互作用には、UBR box 領域が関与している事が強く示唆された。

(4) E7 は UBR4 欠損細胞内で不安定化する。

UBR4-E7 結合は、どのような生理的意義があるのだろうか。E7 はユビキチンタンパク質分解系による作用で、短寿命であることが報告されている。UBR4 はユビキチンリガーゼであることから、E7 の代謝的安定性に関与している事が予想された。そこで、UBR4 ノックアウトマウスから、胎仔性繊維芽細胞(MEFs)を作製し、UBR4KOMEFs における E7 の代謝的安定性を解析した。E7 プラスミドを野生型 MEFs に導入し、タンパク質転写阻害剤 CHX 処理を 4 時間行ったところ、E7 タンパク質はほぼ消滅し、プロテアソーム阻害剤 MG132 の同時添加によって、安定化する事が確認できた。驚いたことに、UBR4KOMEFs において、E7 はさらに不安定になった。これらの結果は、E7 が UBR4 存在下で安定化する事を示唆している。E7 は UBR4 と結合することで複合体を形成し、それがユビキチン化によるタンパク質分解を遅くしている事が示唆された。

以上の結果から、以下のモデルを提案することが出来る。1. HPV16 感染によって、宿主細胞内で E7 タンパク質が合成される。そして、宿主細胞の UBR4 に結合する。2. ウイルスの E7 タンパク質は、それ自体では非常に不安定であるが、UBR4 と複合体を形成することにより安定化し、その結果、細胞内の E7 濃度を一定レベルに保たれる。3. このことにより、他のウイルス蛋白質 E6 等と強調して、宿主細胞をがん化に誘導する(図 4)。

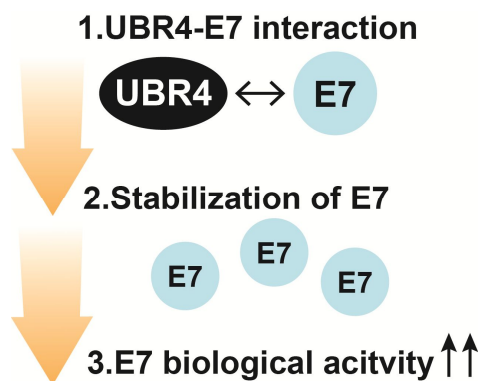


図4 本研究によって考えられたモデル

本研究によって、UBR4-E7 相互作用が、新たな抗癌剤のターゲットになる可能性が示された。この相互作用に対する阻害剤は子宮頸がんの治療薬になるかもしれない。別の可能性として、UBR4 による未知のタンパク質分解を E7 が阻害し、これによって細胞のがん化が促進されている事も考えられる。さらなる研究によって、UBR4-E7 相互作用に対する理解を深める必要があるだろう。

<引用文献>

1. Huh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102: 11492-11497

2. DeMasi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102: 11486-11491
3. Tasaki et al., Mol. Cell. Biol. 2005, 25: 7120-7136
4. Tasaki & Kwon, Annu. Rev. Biochem. 2012, 81: 261-289
5. Reinstein et al., Oncogene 2000, 19: 5994-5950

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6件)

1. Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. Suppressive effect of topoisomerase inhibitors on JC polyomavirus propagation in human neuroblastoma cells. Microbiol Immunol. (2016)60:253-60. doi:10.1111/1348-0421.12372. 査読有
 2. Nukuzuma S, Sugiura S, Nakamichi K, Kameoka M, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. Replication of IMR-32-adapted JC virus clones in human embryonic kidney cells. Microbiol Immunol. (2015) 59:238-42. doi:10.1111/1348-0421.12243. 査読有
 3. Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. TNF- stimulates efficient JC virus replication in neuroblastoma cells. J Med Virol. (2014)86:2026-32. doi: 10.1002/jmv.23886. 査読有
 4. Boso G, Tasaki T, Kwon YT, Somia NV. The N-end rule and retroviral infection: no effect on integrase. Virol J. (2013)10:233. doi:10.1186/1743-422X-10-233. 査読有
 5. Kim ST, Tasaki T, Zakrzewska A, Yoo YD, Sa Sung K, Kim SH, Cha-Molstad H, Hwang J, Kim KA, Kim BY, Kwon YT. The N-end rule proteolytic system in autophagy. Autophagy. (2013) 9:1100-3. doi: 10.4161/auto.24643. 査読有
 6. Tasaki T, Kim ST, Zakrzewska A, Lee BE, Kang MJ, Yoo YD, Cha-Molstad HJ, Hwang J, Soung NK, Sung KS, Kim SH, Nguyen MD, Sun M, Yi EC, Kim BY, Kwon YT. UBR box N-recognin-4 (UBR4), an N-recognin of the N-end rule pathway, and its role in yolk sac vascular development and autophagy. Proc Natl Acad Sci U S A. (2013) 110:3800-5. doi: 10.1073/pnas.1217358110. 査読有
- [学会発表](計6件)
1. 田崎隆史, UBR4-E7 相互作用は UBR box 領域を介している, 第 38 回日本分子生物学会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートピアアイランド, 兵庫県神戸市
 2. 田崎隆史, 北川陽子, 大類洋, 菅原二三男, 奴久妻聡一, 竹上勉, デオキシヌクレオチド類似体 EdAP による抗日本脳炎ウイルス作用, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015 年 11 月 23 日, 福岡国際会議場, 福岡県福岡市
 3. 田崎隆史, 北川陽子, 大類洋, 菅原二三男, 竹上勉, D-ribose 誘導体 EdAP による日本脳炎ウイルス阻害効果, 日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2015 年 5 月 16 日, ホテル京都エミナース, 京都府京都市
 4. 田崎隆史, 北川陽子, 堀貴代江, 奴久妻聡一, 竹上勉, 宿主細胞内 pH による日本脳炎ウイルス複製調節機構, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日, パシフィコ横浜会議センター, 神奈川県横浜市
 5. 田崎隆史, Yong Tae Kwon, 竹上勉, UBR-box protein UBR4 の分子生物学, 日本生化学会北陸支部第 32 回大会, 2014 年 5 月 24 日, 富山大学杉谷キャンパス, 富山県富山市
 6. Tasaki T, Kim ST, Zakrzewska A, Kwon YT, UBR4, an N-recognin of the N-end rule pathway, and its role in yolk sac vascular development and autophagy. The 35th NAITO CONFERENCE on The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles, 2013 年 7 月 11 日, シャトラーゼガトーキングダムサッポロ, 北海道札幌市
6. 研究組織
(1)研究代表者
田崎 隆史 (TASAKI, Takafumi)
金沢医科大学 総合医学研究所 准教授
研究者番号: 70629815