

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830078

研究課題名(和文)p53脱ユビキチン化酵素USP7の新規制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of p53 deubiquitinating enzyme USP7

## 研究代表者

加藤 琢哉(Kato, Takuya)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00551970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではSUMO E3 ligaseであるRFPが脱ユビキチン化酵素USP7と相互作用することで、DNA損傷時におけるp53タンパク質の安定性制御を行っていることを見出した。USP7はRFPタンパク質の安定化に寄与しており、安定化したRFPがp53の386番目のリジン残基のSUMO化を触媒することが判明した。さらに、USP7およびRFPはp53の発現依存的に、UV照射に対するがん細胞のアポトーシス抵抗性を亢進させていることを明らかにした。これらの結果はUSP7およびRFPがp53の安定化を介してDNA損傷時のがん細胞の生存に寄与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We found that a SUMO E3 ligase RFP and de-ubiquitination enzyme USP7 stabilise p53 protein through their interaction. USP7 contribute to the stabilisation of RFP and stabilised RFP SUMOylate p53 at lysine 386 residue. We further showed that both USP7 and RFP confer cancer cells resistance to UV-induced apoptosis in a p53 expression dependent manner. These data suggest that USP7 and RFP increase the cell survival during DNA damage by stabilising p53 protein.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：USP7 RFP

### 1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 p53 は主に転写因子として機能し、DNA 損傷を始めとした様々なストレスによりそのタンパク質が安定化し、活性化される。活性化した p53 は標的遺伝子の転写調節を介して細胞周期の停止や DNA 修復、アポトーシスなどを誘導し、ゲノムの安定性を維持している。変異による p53 の機能喪失はゲノム安定性の破綻をもたらし、発がんに寄与することが明らかにされている。実際に、がん患者の半数以上が p53 の変異を持つことも報告されており、p53 の機能喪失が発がん過程においていかに重要な位置を占めているかを物語っている。

p53 の機能制御には多くの翻訳後修飾が関与していることが知られている。p53 の代表的な翻訳後修飾としてリン酸化、ユビキチン化 (Ub 化)、アセチル化等が挙げられ、これらの修飾は反応を促進する酵素群と逆反応を担う酵素群の拮抗的な作用によって制御されており、またそれらの酵素群の活性が DNA 損傷シグナルによって制御されることで、複雑かつ精密な p53 の機能制御が果たされている。p53 の Ub 化に関わる酵素として MDM2 が有名であるが、その逆反応を担う脱 Ub 化酵素としては USP7/HAUSP が報告されており、Ub 化を介して互いに p53 に対して拮抗的に作用している。興味深いことに、USP7 の基質には MDM2 も含まれており、実際に MDM2 の Ub 化を阻害して安定化させることから、USP7 は p53 機能の促進と抑制の両方向に作用する分子であることが明らかになってきている (Chao D and Wei G., *Trends Mol. Med.* 2010)。最近の研究では、DNA 損傷シグナルの有無が、USP7 が p53 促進的、あるいは抑制的のどちらに作用するのかを決定していることが報告されている。定常状態では USP7 は MDM2 を脱 Ub 化して p53 を低レベルに維持しているが、DNA 損傷シグナルによって USP7 は p53 を基質として脱 Ub 化して安定化させ、p53 の機能を促進することが明らかにされている (Domagoj V. et al. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011)。また、複数のがん細胞において USP7 が p53 の機能阻害に特異的に機能していることが報告されており、がん細胞では正常細胞で見られるような基質の変換機構が破綻していることが考えられる。しかしながら、正常細胞において DNA 損傷シグナルが USP7 の機能を変化させ、基質を MDM2 から p53 に変化させる機構や、その機構ががん細胞において破綻することの意義については未解明の点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

がん抑制遺伝子 p53 はがん症例のうち半数において変異が認められ、p53 の制御異常はがんの発生において重要な役割を果たしている。DNA 損傷時に p53 のユビキチン化 (Ub

化) は脱 Ub 化酵素 USP7 により解除され p53 は活性化するが、定常状態で USP7 が MDM2 の脱 Ub 化を介して p53 機能を抑制し、p53 機能の正、負両方向の制御を USP7 が担っている。その際に USP7 が如何にして基質を切り替えているのか、その分子機構およびがんにおける意義は未解明である。申請者は p53、MDM2 に対する SUMO E3 ligase である RET Finger Protein (RFP) が USP7 と相互作用することを見出している。本研究では、RFP による USP7、MDM2、p53 の制御機構の解析を通じて未解明である USP7 の MDM2-p53 間における基質変換機構およびがんにおける意義の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究計画開始以前に見出していた RFP と USP7 の相互作用についてさらに詳細に検討するために、各々の欠失変異体を作製し、免疫沈降法を行った。また、この相互作用に対する DNA 損傷シグナルの影響を、UV 照射、非照射のサンプル群を用意して検討した。

(2) DNA 損傷時に RFP および USP7 が p53 に与える影響について検討するため、野生型 p53 を発現するがん細胞株 (MCF-7, HCT116) にて USP7 もしくは RFP をノックダウンし、UV 照射時に見られる p53 タンパク質の安定化への影響をウェスタンブロットで検討した。

(3) USP7 および RFP による p53 の機能制御機構を解明するために、p53 の制御機構の一つである SUMO 化に着目した。FLAG タグをつけた p53 タンパク質を RFP、SUMO とともに HEK293 細胞に発現させ、さらにコントロールおよび USP7 に対する siRNA をトランスフェクトした細胞をサンプルとして FLAG 抗体による免疫沈降を行い、ウェスタンブロットにて p53 の SUMO 化を検出した。

(4) USP7 および RFP が p53 の機能制御を介してがん細胞のどのような生物学的特性を制御しているのかを明らかにするため、USP7、RFP をノックダウンした細胞に対して UV 照射を行い、DNA 損傷時によってアポトーシスを誘導された細胞の数を計測した。また、USP7、RFP によるアポトーシスの制御が p53 を介した現象であることを証明するため、p53 野生型および p53 を発現しない (p53<sup>-/-</sup>) がん細胞株 (HCT116) を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 欠失変異体を用いた検討により、RFP と USP7 の相互作用は、RFP の C 末端約 380 アミノ酸および USP7 の中央に位置する HUBL ドメインを含む 200 アミノ酸を介していることが明らかとなった。また、UV 照射/非照射時の両者の相互作用を検討したとこ

る、この相互作用は DNA 損傷の有無にかかわらず一定であることが判明した。興味深いことに、USP7 をノックダウンすると RFP のタンパク質量も減少していた。RFP が自身を Ub 化する能力(self-ubiquitination)を持つことを考え合わせると、USP7 が安定的に RFP と複合体を形成することで、RFP の Ub 化を阻害してプロテアソームによる分解を防止しており、その結果として RFP の機能を維持しているものと考えられる。

(2) USP7 および RFP のノックダウンによりコントロールの細胞と比較して UV 照射時の p53 タンパク質の発現量が減少していた。このことから、USP7 および RFP が DNA 損傷時における p53 タンパク質の安定化に寄与することが明らかとなった。上述したように、USP7 ノックダウン細胞では RFP タンパク質の発現量も減少していた。この結果と RFP が p53 の安定化に重要であることを考えると、USP7 が p53 だけでなく RFP タンパク質をも安定化し、安定化された RFP タンパク質もまた p53 の安定化に寄与しているものと考えられた。

(3) p53 の SUMO 化検出実験の結果から、RFP の強制発現により p53 の SUMO 化が増強し(図 1 参照)、さらに USP7 をノックダウ

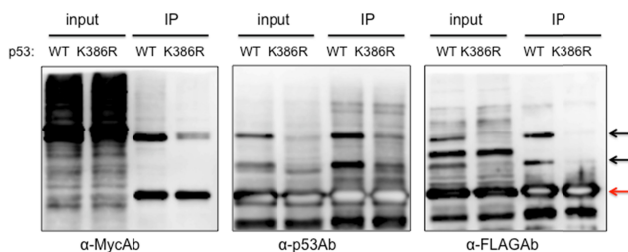


図 1 RFP による p53SUMO 化の検討。HEK293 細胞に myc-SUMO1、V5-RFP、FLAG-p53 (WT または K386R) をトランスフェクトし、FLAG 抗体で免疫沈降した。Myc 抗体、p53 抗体、FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットを行い、SUMO 化 p53 を検出した。黒矢印は SUMO 化 p53、赤矢印は p53 タンパク質を示している。野生型 p53 でみられる SUMO 化のバンドが K386R 変異体 p53 ではみられないか減弱していることが分かる。

ンすると p53 の SUMO 化が減弱するという結果が得られた。さらに、p53 のリジン残基における点突然変異体を用いた検討では、p53 の 386 番目のリジン残基をアルギニンに置換 (K386R) した場合に p53 の SUMO 化のシグナルがみられなくなったことから、RFP は p53 のリジン 386 に対して SUMO タンパク質を付加しているものと考えられる。また、p53 の SUMO 化を示すバンドが、SUMO 分子が一つ付加された位置にドミナントに検出されたことから、RFP による p53 の SUMO 化はモノ SUMO 化が優勢であることが明らかとなった。これらの結果から、RFP が p53 リジン 386 のモノ SUMO 化を担う E3 ligase であ

り、USP7 はその RFP の機能に必要であることが判明した。USP7 は RFP の安定性制御を介してその機能の制御を行っているものと考えられる。

(4) p53 野生型のがん細胞では USP7 もしくは RFP のノックダウンにより UV 照射後に誘導されるアポトーシスが増加したのに対し、p53 -/- のがん細胞ではコントロールの細胞との間に有意な差を認めなかった(図 2 参照)。また、USP7 と RFP を単独でノックダウンした細胞と同時にノックダウンした細胞と比較すると、両者の間に有意差が見られなかった(図 2 参照)。このことから、USP7 と RFP は同一のパスウェイ上で機能しているものと推測される。これらの結果から、USP7 と RFP は p53 タンパク質依存的に DNA 損傷時のがん細胞の生存を制御していることが明らかとなった。

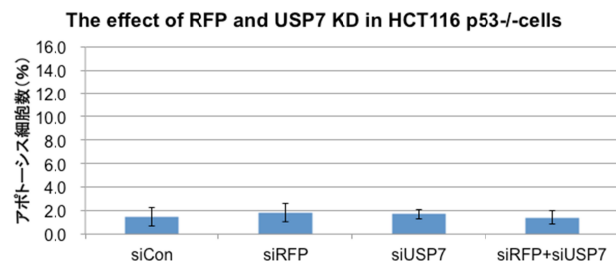
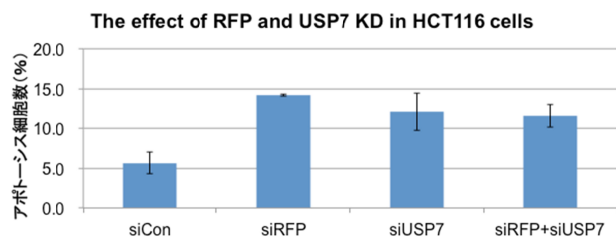
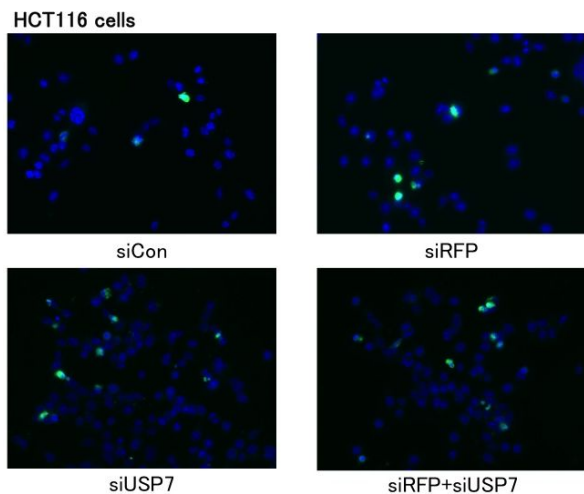


図 2 USP7 および RFP によるがん細胞の DNA 損傷ストレス抵抗性の制御。(写真) HCT116 細胞におけるアポトーシス細胞の検出の例。コントロール、USP7 または RFP、もしくは両者をノックダウンした HCT116 細胞に UV を照射し、24 時間後に固定、活性化 Caspase 3 抗体で免疫染色した。(グラフ) 野生型 HCT116 および HCT116 p53<sup>-/-</sup>にて USP7 もしくは RFP をノックダウンした細胞に UV を照射し、アポトーシスを起こした細胞の数を計測した。

## 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8件)

全て査読あり

1. Yamamura Y, Asai N, Enomoto A, Kato T, Mii S, Kondo Y, Ushida K, Niimi K, Tsunoda N, Nagino M, Ichihara S, Furukawa K, Maeda K, Murohara T, Takahashi M. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer Res.* 2015. 75: 813-23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1317.

2. Kiyota A, Iwama S, Sugimura Y, Takeuchi S, Takagi H, Iwata N, Nakashima K, Suzuki H, Nishioka T, Kato T, Enomoto A, Arima H, Kaibuchi K, Oiso Y. Identification of the novel autoantigen candidate Rab GDP dissociation inhibitor alpha in isolated adrenocorticotropin deficiency. *Endocr J.* 2015. 62: 153-60. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0369.

3. Weng L, Enomoto A, Miyoshi H, Takahashi K, Asai N, Morone N, Jiang P, An J, Kato T, Kuroda K, Watanabe T, Asai M, Ishida-Takagishi M, Murakumo Y, Nakashima H, Kaibuchi K, Takahashi M. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. *EMBO J.* 2014. 33: 2098-112. doi: 10.15252/embj.201488289.

4. Kato T, Enomoto A, Watanabe T, Haga H, Ishida S, Kondo Y, Furukawa K, Urano T, Mii S, Weng L, Ishida-Takagishi M, Asai M, Asai N, Kaibuchi K, Murakumo Y, Takahashi M. TRIM27/MRTF-B-dependent integrin  $\beta 1$  expression defines leading cells in cancer cell collectives. *Cell Rep.* 2014. 7: 1156-67. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.068.

5. Niimi K, Murakumo Y, Watanabe N, Kato T, Mii S, Enomoto A, Asai M, Asai N, Yamamoto E, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2014. 105: 545-52. doi: 10.1111/cas.12390.

6. Sakakura H, Murakumo Y, Mii S, Hagiwara S, Kato T, Asai M, Hoshino A, Yamamoto N, Sobue S, Ichihara M, Ueda M, Takahashi M. Detection of a soluble form of CD109 in serum of CD109 transgenic and tumor xenografted mice. *PLoS One.* 2014. 9: e83385. doi: 10.1371/journal.pone.0083385.

7. Miyachi H, Mii S, Enomoto A, Murakumo Y,

Kato T, Asai N, Komori K, Takahashi M. Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of small interfering RNA for vein graft failure. *J Vasc Surg.* 2014. 60: 479-489. doi: 10.1016/j.jvs.2013.06.080.

8. Watanabe N, Mii S, Asai N, Asai M, Niimi K, Ushida K, Kato T, Enomoto A, Ishii H, Takahashi M, Murakumo Y. The REV7 subunit of DNA polymerase  $\zeta$  is essential for primordial germ cell maintenance in the mouse. *J Biol Chem.* 2013. 288: 10459-71. doi: 10.1074/jbc.M112.421966.

〔学会発表〕(計4件)

1. 加藤 琢哉、榎本 篤、浅井 真人、浅井直也、高橋 雅英「TRIM27-USP7によるp53制御機構の解明」第103回日本病理学会総会 広島県広島市 広島国際会議場 2014年4月24日

2. Takuya Kato, Atsushi Enomoto, Masato Asai, Naoya Asai, Masahide Takahashi. Mechanism underlying the integrin beta1 expression that define heterogeneity in migrating cancer cell collectives. American Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting. New Orleans. Dec 14-18 2013.

3. 加藤 琢哉、榎本 篤、浅井 真人、浅井直也、高橋 雅英「がん細胞集団におけるLeading cellを規定する分子機構の解明」第72回日本癌学会学術総会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2013年10月3-5日

4. 加藤 琢哉、榎本 篤、浅井 直也、村雲芳樹、高橋 雅英「移動するがん細胞集団内における多様性の確立機構」第102回病理学会総会 北海道札幌市 ロイトン札幌 2013年6月6-8日

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

プレスリリース

1. 「がん転移導く物質解明」、中日新聞、2014年5月2日

2. 「がん細胞集団に「船頭」」、読売新聞、2014年5月2日

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 琢哉 (KATO TAKUYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00551970

(2)研究分担者

なし

