

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893275

研究課題名(和文) 形質膜異常タンパク質のユビキチン化制御機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism regulating ubiquitination of aberrant plasma membrane protein

研究代表者

沖米田 司 (Okiyoneda, Tsukasa)

関西学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：90398248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、形質膜に存在する構造異常膜タンパク質モデル F508 CFTR 変異体を用いて、形質膜品質管理に関わる脱ユビキチン化酵素(DUB)を同定する事を目的とした。阻害剤スクリーニングの結果、proteasome 結合型 DUB の阻害は、F508 CFTR 変異体の形質膜発現および膜安定性を増加させた。さらに、proteasome 結合型 DUB阻害は F508 CFTR 変異体のエンドサイトーシスを阻害した。従って、proteasome 結合型 DUB による脱ユビキチン化は、異常膜タンパク質の形質膜安定性を制御するという新たな可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here, we sought to identify the deubiquitination enzyme (DUB) involved in the peripheral protein quality control mechanism that eliminates aberrant plasma membrane proteins such as F508 CFTR. Analysis of a panel of DUB inhibitors discovered that inhibition of proteasome-associated DUB increased the cell surface expression and stability of F508 CFTR. Moreover, endocytosis of F508 CFTR was dramatically inhibited by inhibitors of proteasome-associated DUB. These results provide a novel regulatory mechanism that the proteasome-associated deubiquitination stimulates the elimination of aberrant plasma membrane proteins from the cell surface.

研究分野：タンパク質品質管理

キーワード：脱ユビキチン化 CFTR タンパク質品質管理

## 1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーター の CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) は肺や消化器などの上皮細胞の管腔側アピカル形質膜に発現する膜タンパク質であり、cAMP 依存性塩素チャネルとして機能する。CFTR は感染防御因子として非常に重要な機能を果たすが、遺伝子変異や環境ストレスにより CFTR の発現・機能が阻害されると、慢性感染症を引き起こし、嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis, CF) の原因となる。CF は白色人種間で頻度が高い致死性の遺伝病であり、根本的な治療法はなく致死性であるため、新規治療法の開発が世界中で強く望まれている。CF の主な原因は  $\Delta F508$  変異であり、 $\Delta F508$ -CFTR タンパク質はフォールディング異常を起こし、細胞内タンパク質品質管理 (protein Quality Control, QC) により分解シグナルであるユビキチン化され、分解除去されるため、形質膜に発現できず CF を引き起こす。また、 $\Delta F508$ -CFTR は一部、形質膜へ発現し機能するが、形質膜での安定性が悪く、すぐに分解除去されてしまう (Sharma M et al, J Cell Biol. 2004)。従って、小胞体および形質膜に存在する  $\Delta F508$ -CFTR の安定性を増加させる事により、その形質膜発現および機能を改善する事が、CF の新規治療戦略に重要であると考えられる。

代表者はこれまでに形質膜に局在する異常膜タンパク質を除去する形質膜タンパク質品質管理機構 (peripheral QC) の分子機構を世界で初めて明らかにし、形質膜の  $\Delta F508$ -CFTR は分子シャペロン Hsc70 および Hsp90 に認識され、シャペロン結合ユビキチンリガーゼ CHIP によりユビキチン化される結果、形質膜から速やかに分解除去される事を明らかにした (Okiyoneda T et al, Science. 2010, Okiyoneda T et al, Curr Opin Cell Biol. 2011)。しかしながら、CHIP ノックダウンでも CFTR の形質膜からの分解を完全に阻害できない事 (Okiyoneda T et al, Science. 2010) から、CHIP を含めたいくつかのユビキチン化酵素が形質膜の CFTR のユビキチン化に関与する可能性が考えられる。さらに、タンパク質のユビキチン化レベルはユビキチン化酵素だけではなく、ユビキチンを基質タンパク質から取り除く脱ユビキチン化酵素 (deubiquitinating enzyme: DUB) によっても制御されるが、現在まで形質膜の CFTR のユビキチン化を制御する DUB 分子は同定されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では形質膜の  $\Delta F508$ -CFTR 発現・機能を改善する事を目指すために  $\Delta F508$ -CFTR のユビキチン化レベルの制御因子、特に、脱ユビキチン化酵素 (DUB) を同定する事を目的とした。また、形質膜の CFTR レベル制御因子のハイスループットスクリーニングを目指すために、形質膜の CFTR レベルを簡便に定量する評価系を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CFTR-HA 安定高発現細胞株の樹立

形質膜に発現する CFTR を特異的に検出するために、CFTR の細胞外ドメインにエピトープタグ (HA tag) を導入した WT-CFTR-HA または  $\Delta F508$ -CFTR-HA を用いた。WT-CFTR-HA または  $\Delta F508$ -CFTR-HA をヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE410- (CFBE) 細胞に組換えレンチウイルスを用いて恒常的に発現させ、Tet-ON 発現誘導システムを用いて、CFTR の発現量を制御した。

### (2) 96 ウェルプレートを用いた CFTR 膜発現定量法の確立

CFBE 細胞における CFTR-HA 形質膜発現量を cell surface ELISA 法 (Peters KW and Okiyoneda T et al, Methods Mol Biol 2011) を用いて定量した。ネガティブコントロールとして、CFTR-HA 未発現細胞を用いた。ハイスループットスクリーニングを行うために、96 ウェルプレートを用いた cell surface ELISA 法の確立、つまり、細胞数、抗体量、wash 条件、検出用酵素基質 (蛍光、または、発光) の最適化を行った。

### (3) DUB 阻害薬を用いた検討

市販の DUB 阻害薬 (PR-619: 非特異的 DUB 阻害薬, IU1: USP14 阻害薬, b-AP15: USP14, UCH-L5 阻害薬, LDN-57444: UCH-L1 阻害薬, TCID: UCH-L1 阻害薬, WP1130: USP9x, USP5, USP14, UCH-L5 阻害薬, HBX-41108: USP7 阻害薬など) を用いて  $\Delta F508$ -CFTR の形質膜発現量を CFBE 細胞を用いた cell surface ELISA 法で定量した。また、ヒット阻害剤を用いて、その作用機序を CFBE 細胞、および、HeLa 細胞での発現系を用いて、過去の方法 (Okiyoneda T et al, Science. 2010) に従い、種々の解析を行った。

#### 4. 研究成果

CFTR の形質膜発現量を簡便に定量するために、CFTR の細胞外ドメインに HA tag を導入した CFTR-HA を構築し、CFTR-HA を発現する組換えレンチウイルスを作製した。ウイルス感染後、2 週間の薬剤選択を行い、tetracycline 誘導性 CFTR-HA 安定発現ヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE 細胞を樹立した。96 ウェルプレートでの HA 抗体を用いた ELISA 法により CFTR 膜発現の定量法を行ったが、エッジ効果などにより、データのばらつきに大きな問題が生じた。そこで、無標識で細胞表面の CFTR 発現を直接定量化するために、細胞外領域に Horse Radish Peroxidase (HRP) tag を融合した CFTR-HRP を構築し、安定発現する tetracycline 誘導性ヒト CF 患者気道上皮細胞由来 CFBE 細胞を樹立した。HRP tag は HA tag と比較して、分子量が 34 kDa と非常に大きいため、CFTR の形質膜発現、膜安定性、チャネル機能などのフェノタイプに影響する可能性が懸念された。そこで、HRP tag の影響を検討するために、ELISA 法、および、CFTR チャネル機能解析実験を行った結果、HRP tag は CFTR のフェノタイプには影響しないことが確認できた。次に、 $\Delta F508$ -CFTR-HRP 発現 CFBE 細胞を用いた 96 穴プレートでの評価を行った。細胞外の HRP 活性を指標に CFTR 膜発現を評価した結果、 $\Delta F508$ -CFTR の膜発現を改善する化合物の効果を再現良く確認できた。また、ハイスループット評価系の指標となる Z'-factor も 0.6 以上であり、ハイスループットアッセイに適した評価系が確立できた。

次に、 $\Delta F508$ -CFTR の形質膜発現を制御する脱ユビキチン化酵素 (DUB) を同定するために、市販の DUB 阻害薬ライブラリーを用いて、 $\Delta F508$ -CFTR-HRP の形質膜発現を指標にスクリーニングを行った。その結果、proteasome 結合型 DUB の阻害薬は、 $\Delta F508$  CFTR 変異体の形質膜発現を増加させた。ELISA 法による  $\Delta F508$ -CFTR 形質膜安定性を評価した結果、proteasome 結合型 DUB 阻害薬は  $\Delta F508$ -CFTR 形質膜安定性を増加させた。さらに、cell surface ELISA 解析の結果、proteasome 結合型 DUB 阻害薬は  $\Delta F508$  CFTR 変異体のエンドサイトーシスを阻害することが分かった。同様に、免疫蛍光染色法を用いて、形質膜からエンドサイトーシスさ

れた  $\Delta F508$  CFTR 変異体を選択的に蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡で可視化した結果、proteasome 結合型 DUB 阻害薬は  $\Delta F508$  CFTR 変異体を形質膜へ蓄積させた。形質膜を含む post-Golgi 区画に存在する成熟型  $\Delta F508$  CFTR 変異体を affinity beads を用いて変性状態で単離後、そのユビキチン化レベルを定量した。その結果、proteasome 結合型 DUB 阻害薬は成熟型  $\Delta F508$  CFTR 変異体のユビキチン化レベルを増加させる傾向が見られた。今後、形質膜に存在する  $\Delta F508$  CFTR 変異体のみを単離する手法を確立し、形質膜に局在する  $\Delta F508$  CFTR 変異体のユビキチン化レベル、および、ポリユビキチン鎖パターンへの影響を検討する予定である。

以上、本研究の結果より、proteasome 結合型 DUB は恐らく脱ユビキチン化能を介して、構造異常膜タンパク質である  $\Delta F508$  CFTR のユビキチン化レベルを増加させるが、そのエンドサイトーシスを抑制し、 $\Delta F508$  CFTR の形質膜安定性と膜発現量を増加するという新しい形質膜タンパク質品質管理の可能性が示唆された。今後、さらに解析を行って行く事で、より詳細な分子機構の解明を目指して行く予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. **沖米田司**, 異常な形質膜タンパク質を除去する新しい品質管理機構, **生化学**, 第 86 巻第 1 号, pp.54-58, 2014, PMID: 24693698  
査読無し
2. Apaja PM, Foo B, **Okiyoneda T**, Valinsky WC, Barriere H, Atanasiu R, Ficker E, Lukacs GL, Shrier A. Ubiquitination-dependent quality control of hERG K<sup>+</sup> channel with acquired and inherited conformational defect at the plasma membrane. **Mol Biol Cell**. 2013 Dec;24(24):3787-804. doi: 10.1091/mbc.E13-07-0417. PMID: 24152733  
査読有り
3. **Okiyoneda T**, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, Roldan A, Verkman AS, Kurth M, Simon A, Hegedus T, Beekman JM, Lukacs

GL. Mechanism-based corrector combination restores F508-CFTR folding and function.

*Nat Chem Biol.* 2013 Jul;9(7):444-54. doi: 10.1038/nchembio.1253. PMID: 23666117  
査読有り

〔学会発表〕(計7件)

1. **沖米田司**, CFTR コレクターの作用機序に基づく嚢胞性線維症の薬物併用療法, 生理研研究会「粘膜免疫学と膜輸送生理学の融合」2014.10.27-28. 自然科学研究機構生理学研究所(愛知県岡崎市)

2. **沖米田司**, ユビキチン化による膜タンパク質 CFTR の品質管理機構, 第87回日本生化学会大会 シンポジウム ユビキチン・ワールド: 分子の鎖が織りなす多彩な生命機能, 2014.10.15-18. 国立京都国際会館(京都府京都市)

3. **Okiyoneda T** & Lukacs GL, CFTR quality control checkpoints as drug target, International Symposium: Cystic Fibrosis in Asia from basics to clinics (国際CFシンポジウム) 2014.9.29-30. 名古屋大学

4. **沖米田司**, Gergely Lukacs, 嚢胞性線維症の薬物療法を目指した CFTR コレクターの分類と相乗効果, 日本薬学会第134回年会シンポジウム 2014. 3.27-30. 熊本大学

5. **沖米田司**, CFTR proteostasis mechanism at the post-ER compartments, 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ 2013. 12.3-6. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

6. **沖米田司**, Gergely Lukacs, 形質膜における異常タンパク質の品質管理機構, 第65回日本細胞生物学会大会シンポジウム 2013. 6.19-21. ウィンクあいち(愛知県名古屋市)

7. **沖米田司**, 嚢胞性線維症の薬物療法を目指した CFTR コレクターの分類と相乗効果, 第8回トランスポーター研究会年会シンポジウム 2013. 6.15-16. 熊本大学

〔その他〕

新聞報道

2013.5.13. 神戸新聞(三面)  
嚢胞性線維症治療に光  
原因改善仕組み解明

ホームページ等

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~okiyoneda/okilab.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

沖米田 司 (OKIYONEDA, Tsukasa)  
関西学院大学 理工学部 准教授  
研究者番号: 90398248