

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440054

研究課題名(和文) ユビキチン様タンパク質MNSF による細胞分化の分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of action of ubiquitin-like protein MNSFb in regulating cell differentiation

研究代表者

中村 守彦 (Nakamura, Morihiko)

島根大学・産学連携センター・教授

研究者番号：20155865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン様タンパク質であるMNSF は、アポトーシス促進因子であるBcl-Gなど種々の標的タンパク質に共有結合する。本研究で、新しい標的タンパク質を単離した。MALDI-TOF MSによるフィンガープリント法により、このタンパク質は分子シャペロンHSPA8であることを同定した。MNSFはin vitroでATP存在下においてHSPA8と非共有結合することを確認した。MNSFとHSPA8のダブルノックダウンにより、RANKLが誘導するマクロファージ系細胞Raw264.7から破骨細胞への分化を強く抑制した。これはMNSFが他のタンパク質と非共有結合して生理活性を発揮する初めての報告である。

研究成果の概要(英文)：MNSF, a ubiquitin-like protein, covalently binds to various target proteins including proapoptotic Bcl-G. During the course of isolation of MNSF-conjugating enzyme(s), we identified a novel target protein for MNSF. MALDI-TOF MS fingerprinting revealed that the MNSF interacting protein is HSPA8 (heat shock 70-kDa protein 8). We observed that MNSF noncovalently binds to HSPA8 in the presence of ATP in vitro. Double knockdown of MNSF and HSPA8 strongly inhibited RANKL induced osteoclastogenesis from Raw264.7 macrophage-like cells. The same treatment inhibited RANKL-induced ERK1/2 and p38 phosphorylation and TNF production, suggesting that the association of MNSF with HSPA8 may promote RANKL-induced osteoclastogenesis. This is the first report that MNSF binds to a protein substrate via the noncovalent association and exerts biological effects.

研究分野：生物化学

キーワード：ユビキチン様タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者・中村は、ユビキチン様タンパク質として Monoclonal Nonspecific Suppressor Factor  $\beta$  (MNSF $\beta$ ) を発見した (Nakamura *et. al Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995)。ユビキチンは極めて保存性の高いタンパク質であるが、これまでにユビキチンのアミノ酸配列に相同性を示すユビキチン様タンパク質が報告されている。近年、申請者等はユビキチン化と同様のシステムでイソペプチド結合する2つの標的タンパク質を同定した。その1つ Bcl-G はアポトーシス促進タンパク質で、MNSF $\beta$  化により MAP キナーゼ ERK のリン酸化を抑制することを証明した (Nakamura *et. al J. Biol. Chem.* 2006)。他方の Endophilin-II は、これまで機能が不明であったが、MNSF $\beta$  化によるファゴサイトーシスおよび自然免疫の制御機能を明らかにした (Nakamura *et. al. FEBS J.* 2009, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010)。そして最近、MNSF $\beta$  化がアポトーシスを正に制御することを見出した (Watanabe *et al. FEBS J* 2013)。MNSF $\beta$  と他のユビキチン様タンパク質 (SUMO および ISG15 など) と生理活性等の共通点は多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、イソペプチド結合による MNSF $\beta$  化とは異なり、MNSF $\beta$  と非共有結合する HSC71 を介する細胞分化の制御機構を分子レベルで解明する。HSC71 は最近、当研究室で新しい MNSF $\beta$  パートナータンパク質として認められた分子シャペロンである。破骨細胞分化因子 RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) 刺激によるマウスマクロファージ系 Raw264.7 (Raw) 細胞の破骨細胞への分化誘導における MNSF $\beta$  の制御を明らかにする。

### 3. 研究の方法

RANKL 刺激による破骨前駆細胞 Raw264.7 の破骨細胞への誘導

#### 1) 細胞分化の誘導法

RANKL (100 ng/ml) により Raw 細胞を 48 時間刺激して、破骨細胞への分化を誘導した。破骨細胞の確認は、マーカー酵素の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ

(Tartrate-Resistant Acid. Phosphatase ; TRAP) により染色観察した。

#### 2) 細胞分化調節の評価方法

i) MNSF $\beta$  cDNA を過剰発現した Raw 細胞とコントロール (ベクターのみ) との差異を観た。

ii) MNSF $\beta$  siRNA

(5'-CCACCCTGCCATGCT AATAAA-3')

処理した Raw 細胞とコントロール siRNA 処理した細胞とを比較検討する RNA 干渉実験を遂行した。同様に、HSC71 siRNA (5'-AAGGTCGGAGCTGAAAGGAAT-3') についても実施した。

### 4. 研究成果

ユビキチン様タンパク質である MNSF $\beta$  は、アポトーシス促進因子である Bcl-G など種々の標的タンパク質に共有結合する。本研究で、マウス肝臓抽出液から新しい標的タンパク質を単離した。MALDI-TOF MS によるフィンガープリント法により、このタンパク質は分子シャペロン HSPA8 であることを同定した。MNSF $\beta$  は *in vitro* で ATP 存在下において HSPA8 と非共有結合することを確認した。そこで、マウス各臓器における HSPA8 および MNSF $\beta$  複合体 (MNSF $\beta$ -adducts) の発現を Western blot 法により検出した (図 1)。HSPA8 の発現は特に肝臓と膵臓で強く、これらに応じて MNSF $\beta$ -adducts の形成も多く認められた。これらの結果は、HSPA8 のシャペロン効果により MNSF $\beta$  が正しく折りたたまれ (folding)、その生理機能が高まって標的タンパク質とのイソペプチド結合の形成が促進したと解釈できる。

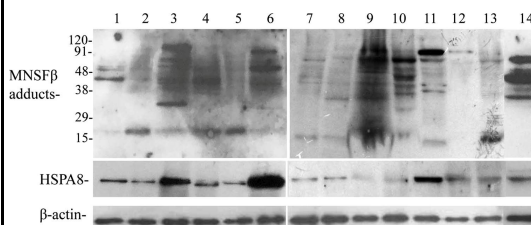
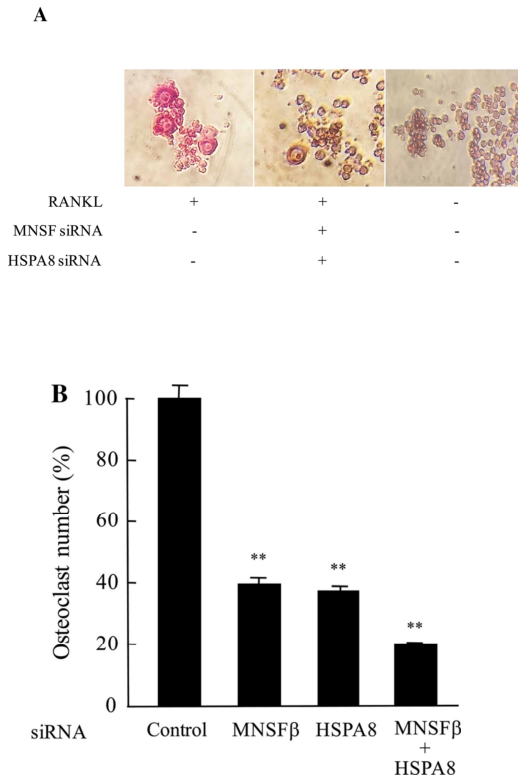


図 1 HSPA8 および MNSF $\beta$ -adducts の組織分布。抗 HSPA8 抗体および抗 MNSF $\beta$  抗体を利用した Western blot により検出した。

Lane 1, 大脳; lane 2, 肺臓; lane 3, 肝臓; lane 4, 腎臓; lane 5, 脾臓; lane 6, 膵臓; lane 7, 胃; lane 8, 小腸; lane 9, 大腸; lane 10, 膀胱; lane 11, 精巣; lane 12, 卵巣; lane 13, 子宮; lane 14, Raw 細胞

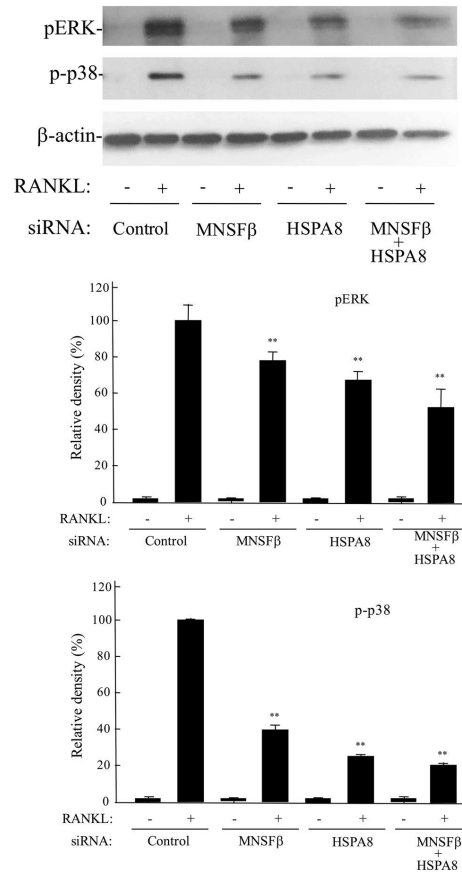
MNSF $\beta$  の作用機序については当研究室で詳しく明らかにしてきたが、細胞の分化制御に関しては不明であった。そこで、この制御機構を明らかにするため、MNSF $\beta$  siRNA で 48 時間処理した後、Raw 細胞を 100 ng/ml RANKL と 50 ng/ml M-CSF 存在下で 4 日間培養し、破骨細胞への分化を TRAP 染色により観察した。対照群として、scramble siRNA 処理した細胞は破骨細胞へと分化したが、MNSF $\beta$  siRNA 処理した細胞は十分に分化できなかった (図 2 A&B)。



**図2** MNSFβはRANKL誘導の破骨細胞分化を促進する。siRNA処理したRAW細胞の破骨細胞への分化を比較検討した。A, 破骨細胞のTRAP染色; B, 破骨細胞数

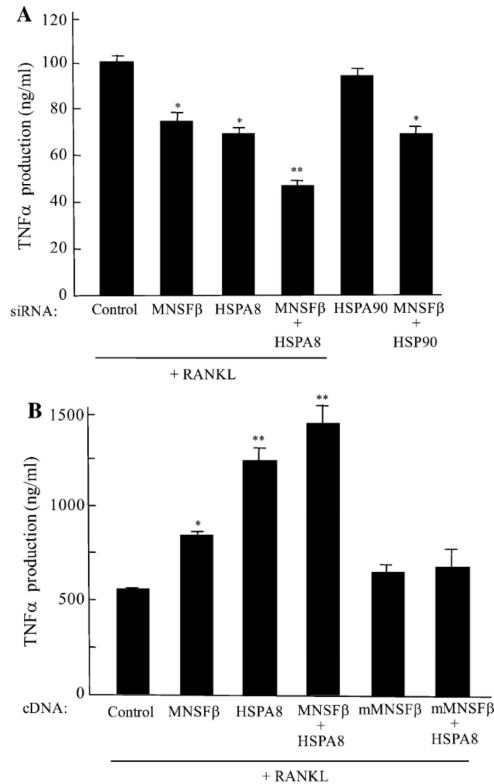
我々は、科学研究費補助金(23570138)の研究により、MNSFβの新規パートナータンパク質として分子シャペロンであるHSPA8をマウス肝臓の抽出物中に発見した。両者は*in vitro*においてATP存在下で非共有結合により会合する。HSPA8は、高凝集性のMNSFβを正しい折りたたみへと導いてMNSFβ活性が安定すると考えられる。そこで、HSPA8のノックダウン実験を遂行した。特に、HSPA8 siRNAとMNSFβ siRNAのノックダウンにより、破骨細胞へと分化が著しく阻害された(図2 A&B)。この結果は、上記の仮説を十分に支持するものである。

RANKLが仲介するRAW細胞(破骨前駆細胞)の情報伝達の下流には、MAPキナーゼ(ERK, p38 MAPK, and JNK)が関与している。そこで、MNSFβが本伝達経路に関わっているかどうかをMNSFβ siRNA実験により確かめた。RANKL刺激によるERKおよびp38のリン酸化は20分でピークになりその後徐々に減衰するが、MNSFβ siRNA処理したRAW細胞では両者とも有意に抑制された。尚、JNKについては明確な影響は示唆されなかった(図3)。



**図3** MNSFβ または HSPA8 siRNA 処理により RANKL 誘導性の MAP キナーゼの活性化が抑制される。ウェスタンブロットにより ERK, p38 のリン酸化の検出し、グラフ化した。

RANKL 刺激によって RAW 細胞が産生する TNFα は破骨細胞分化を促進する。MNSFβ siRNA で 72 時間処理した後、RANKL(100 ng/ml) で 16 時間刺激した RAW 細胞による TNFα 産生は有意に抑制された(図4)。さらに、HSPA8 siRNA 処理でも同程度に抑制されたが、その効果は MNSFβ siRNA とのダブルノックダウンにより一層増強された。同じ分子シャペロン HSP90 siRNA ではその相乗効果は認められなかった。逆に、MNSFβ cDNA により MNSFβ を過剰発現した RAW 細胞を RANKL 刺激して誘導された TNFα 産生は増強され、HSPA8 cDNA とのダブルトランスフェクトでその産生は著しく増強された(図4)。従って、siRNA 干渉実験の結果が確認できた。また、ユビキチン化に必須で MNSFβ 化にも重要な C 末端グリシンをアラニンに変換した変異 MNSFβ を導入した RAW 細胞では、この増強効果は全く認められなかったことより、MNSFβ のイソペプチド結合の関与が実証された。



**図4 RANKL 誘導性の TNF $\alpha$  産生への MNSF $\beta$  および HSPA8 の関与。A, MNSF $\beta$  および HSPA8 siRNA 処理した RAW 細胞; B, MNSF $\beta$  および HSPA8 cDNA をトランスフェクションした RAW 細胞。**

以上により、RANKL 刺激によるマクロファージの破骨細胞への分化過程において、MNSF $\beta$  がその制御に関与しており、MAPキナーゼ ERK および p38 の活性化が分化を促進することが確認された。

加えて、分子シャペロン HSPA8 が MNSF $\beta$  の安定化に寄与し、破骨細胞への分化に導くことも明らかになった。HSPA8 も MNSF $\beta$  と同様に全ての組織で発現しているユビキタスなタンパク質であるが、今後も MNSF $\beta$  の生理作用における役割を解明する。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕 (計 4 件)

Notsu k, Nakagawa M, Nakamura M. Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  noncovalently binds to molecular chaperone HSPA8 and regulates osteoclastogenesis. Mol Cell Biochem 421:149-156, 2016 査読有  
 Imaoka E, Nakatani T, Hashimoto T, Sutou I, Shizunami H, Ito Y, Nakamura M. Saito Y. Evaluation of the Effect of Aromatherapy using rose fragrance for the

patients in palliative care unit. 島根大学医学部紀要, 第 38 巻, 29~34 頁, 2016 査読有

Nakamura M. Watanabe N, Notsu K. Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  covalently binds to cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase and regulates thymocyte function. Biochem Biophys Res Commun. 464:1096-1100, 2015 査読有  
Nakamura M. Nakagawa M, Watanabe J. Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  negatively regulates T cell function and survival. Immunol. Invest. 44:1-12, 2015 査読有

### 〔学会発表〕 (計 4 件)

#### 【国内】

Notsu K, Nakagawa M, Nakamura M. Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  non-covalently binds to molecular chaperone HSC71 and regulates osteoclastogenesis. 第 89 回 日本生化学会, (仙台) 仙台国際センター 2016.9.25  
Nakamura M. Yamasaki K, Notsu K. Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  covalently binds to FDH and regulates thymocyte function. 第 88 回 日本生化学会, (神戸) 神戸ポートアイランド 2015.12.3  
Nakamura M. Nakagawa M. Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  negatively regulates T cell function and survival. 第 87 回 日本生化学会, (京都) 国立京都国際会館 2014.10.17

#### 【国外】

Nakamura M. Notsu K. Ubiquitin-like protein MNSF $\beta$  binds to proapoptotic Bcl-G and regulates apoptosis in macrophages and T cells. Cell symposia: Cell Death and Immunology, Berkeley, USA 2015

### 〔図書〕 (計 0 件)

### 〔産業財産権〕

### 出願状況 (計 2 件)

名称: 栄養管理システム  
 発明者: 中村守彦  
 権利者: 島根大学長  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2016-106664  
 出願年月日: 2016 年 5 月 17 日  
 国内外の別: 国内  
 名称: 健康管理システム  
 発明者: 野口瑛一、江草典政、馬庭荘吉、中村守彦  
 権利者: 島根大学長  
 種類: 特許

番号：特願 2016-096633  
出願年月日：2015 年 5 月 13 日  
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/CMRC/index2.htm>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中村 守彦 (NAKAMURA MORIHIKO)  
島根大学・産学連携センター・教授  
研究者番号：20155865