

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19591931

研究課題名(和文) プロテアソーム結合蛋白ガンキリンのモノユビキチン化による卵巣がん機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of ovarian carcinogenesis due to monoubiquitylation of gankyrin that is one of proteasome-interacting-proteins (PIPs)

研究代表者 東辻 久子 (HIGASHITSUJI HISAKO) 京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：20402852

研究成果の概要：

癌遺伝子産物であるガンキリンのモノ ULM(ubiquitin-like-modifiers) (ユビキチン、nedd8、sumo1-4、ISG15、urml など) 化、特に nedd8 化という翻訳後修飾はガンキリンによる細胞癌化の働きを変化させた。卵巣がん細胞において、モノ nedd8 化ガンキリンは癌抑制遺伝子産物である p53 より pRB のほうに MDM2 の基質特異性を変化させ、pRB をより分解する傾向を示した。Nedd8 系の成分は抗がん剤のターゲットとなりうることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：プロテアソーム、ガンキリン、モノユビキチン、卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質のモノユビキチン化は種々の細胞現象に関連する。DNA修復時のFANCD2やPNCA蛋白のモノユビキチン化、エンドサイトーシスでのcoupled-monoubiquitylation、転写時のヒストン蛋白のモノユビキチン化、p53やFOXO、rasのmonoubiquitylationによる細胞内局在の変化。モノユビキチン化はそのターゲット蛋白質の機能変換シグナルとして機能している。

がん遺伝子産物ガンキリンのモノユビキチン化は、ガンキリンの機能を変化させ、ガンキリンによる細胞癌化の働きを変化させる可能性がある。

(2) 酵母two-hybrid法、proteomics解析により、プロテアソームに相互作用するタンパク質が多数報告されている。ガンキリンはほ乳類組織より精製されたプロテアソームに含まれる分子として同定された。出芽酵母においては、19S-Regulat

ory-Particleには含まれるが26S-Proteasomeには含まれない分子として酵母のガンキリンorthologue、NAS6が同定された。ほ乳類細胞において19S-Regulatory-Particleのbaseのp48/S6/Tbp7/PSMC4と複合体を形成する分子としてガンキリンが同定された。ある状況下で一過性に（恒常的な内在性サブユニットとしてではなく）ガンキリンを結合したheterogenousなプロテアソームはその機能が変化していると想定される。

(3) *in vitro* gankyrin ubiquitylation assayにおいて、ガンキリンはモノユビキチン化をうける。抗ガンキリン抗体での卵巣がん細胞株のウェスタンブロットにより、内因性の25 kDaのガンキリンと8.5kDaのユビキチン一個分がちょうど加わった二本のバンドが検出された。大きい分子サイズのバンドは抗ガンキリン抗体による免疫沈降物のなかに抗ユビキチン抗体、抗ガンキリン抗体で共に認識できたことで、モノユビキチン化ガンキリンのバンドである。ガンキリンおよびモノユビキチン化ガンキリンはともに卵巣がん、卵巣がん細胞株で過剰発現していた。

2. 研究の目的

モノユビキチン化ガンキリンが機能を変化させながら、卵巣がんの発がん、進展にどう関わっていくのか、検討する。

- (1) モノユビキチン化ガンキリンの卵巣がん細胞株での存在を確認する。
- (2) ガンキリンとモノユビキチン化ガンキリン（ガンキリンのC端にユビキチンを一個融合した変異型ガンキリン）の癌化能を比較する。
- (3) ガンキリンのがん抑制遺伝子産物p53やpRBタンパクの分解に与える影響がモノユビキチン化ガンキリンの場合はどうなるのか？細胞内での局在の変化。p53やpRBの半減期の変化。E2、E3との結合の変化など。
- (4) プロテアソーム結合タンパクとしてのガンキリンのモノユビキチン化は26Sプロテアソームの機能にどのような影響を与えるのか。モノユビキチン化ガンキリンが結合

した26Sプロテアソームの機能がどのように変化するか調べる。

- (5) 基質タンパクのポリユビキチン化と同様にモノユビキチン化もユビキチンシステムが必要であるので、ガンキリンのモノユビキチン化に関与するE1、E2、E3、それを調節するDUBを同定する。
- (6) モノユビキチン化ガンキリンに結合するタンパク分子を同定する。

3. 研究の方法

- (1) モノユビキチン化ガンキリンの卵巣がん細胞株 SK-0V3 での存在を確認する。
- (2) ガンキリンのモノユビキチン化される主要なリジン残基をリジン・アルギニン変異型ガンキリンにより決定する。
- (3) 野生型ガンキリン分子と上記(2)で得られたモノユビキチン化されない変異型ガンキリン分子の癌化能を比較する。野生型ガンキリン分子とガンキリンのC端に diglycine 配列を除いたヒトユビキチン分子を融合した分子（モノユビキチン化ガンキリンの代替分子）の癌化能を比較する。
- (4) ガンキリンのがん遺伝子としての機能（Mdm2 の E3-ligase 活性を促進することでがん抑制遺伝子産物 p53 や pRB タンパクの分解を促進し、それらの活性が失われる）がモノユビキチン化ガンキリンの場合はどうなるのか。モノユビキチン化ガンキリンの方が活性化されるとすれば、その機序は何か。
- (5) プロテアソーム結合タンパクとしてのガンキリンのモノユビキチン化は26Sプロテアソームの機能にどのような影響を与えるのか。ガンキリン

の knockout-mice を作製して、モノユビキチン化ガンキリンの結合していない 26S プロテアソームの活性、生化学的特徴を解析する。

- (6) 基質タンパクのポリユビキチン化と同様にモノユビキチン化もユビキチンシステムが必要であるので、ガンキリンのモノユビキチン化に關与する E1、E2、E3、それを調節する DUB を同定する。モノユビキチン化ガンキリンの細胞内レセプターを同定し、モノユビキチン化ガンキリンとそのレセプタータンパクを介したシグナル伝達機構について解析する。方法としては、酵母の two-hybrid 法、TAP(tandem-repeat-affinity-purification)-tagged-gankyrin-ubiquitin fusion protein を細胞に発現させ、IgG-Sepharose、protease 処理、calmodulin-Sepharose-affinity purification をおこない、複合体を形成するタンパク群を mass spectrometry で解析する。

4. 研究成果

- (1) 卵巣がん細胞株による in vivo でのガンキリン分子の ubiquitin-like modifiers(ULM) による翻訳後修飾を検討した。ubiquitin 化、nedd8 化、ISG15 化、sumo1-4 化、urml 化を免疫沈降、ウエスタンブロットで確認したところ、ガンキリン分子はモノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化されていた。モノ sumo1-4 化、モノ urml 化は受けていなかった。
- (2) in vitro のユビキチン化、nedd8

化、ISG15 化のアッセイ系をそれぞれの E1、E2、E3 を recombinant proteins として作製し、確立した。この系を用いて、in vitro でのガンキリン分子の ubiquitin-like modifiers(ULM) による翻訳後修飾を検討した。(1) と同様の結果を得た。

- (3) ガンキリンのモノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化をうけるリジン残基はすべて同じ 16 個のリジン残基のうちの N 端から 10 番目のリジンであった。ガンキリン蛋白、226 アミノ酸のうち、153 番目のリジン残基である。N 端ではなく、やや C 端よりである。同じリジン残基が 3 種類の ubiquitin-like modifiers(ULM) による翻訳後修飾を受けることになるので、ある状況下では ubiquitin-like modifiers(ULM) による翻訳後修飾が互いに competitive に働く可能性がある。
- (4) 卵巣癌細胞株中ではモノユビキチン化は非ストレス下でも起きる。モノ Nedd8 化は特に酸化ストレス下、H2O2 処理後によく起こる。モノ ISG15 化はインターフェロンアルファ刺激時に起こる。
- (5) Rat embryonic fibroblast を用いて、ガンキリンとモノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化ガンキリン (C 端に diglycine 配列-GG を除去したユビキチン、nedd8、ISG15 を一個融合した変異型ガンキリン) の癌化能を比較した。野生型ガンキリンに比して、ガンキリンユビキチン融合蛋白

とガンキリン ISG15 融合蛋白は同程度の癌化能であった。ガンキリン nedd8 融合蛋白は唯一野生型ガンキリンより癌化能が亢進していた。

- (6) モノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの p53 や pRB タンパクの細胞内での局在に与える影響を検討した。モノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化ガンキリン 3 者ともに、自分自身 (ガンキリン) の細胞内局在は核と細胞質両者にあるという野生型ガンキリンのそれと変わりなかった。また、p53 や pRB、mdm2 タンパクの細胞内での局在に与える影響を二重、三重蛍光免疫染色で confocal-microscopy 観察を行なったが、やはり変化はなかった。
- (7) モノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの p53 や pRB タンパクの転写活性化能に対する効果をレポータージーンアッセイで解析した。モノユビキチン化、モノ ISG15 化ガンキリンの効果は p53 レポーターにも pRB (E2F1) レポーターにも野生型ガンキリンとの差は見られなかった。モノ nedd8 化ガンキリンは p53 転写活性化能に対しては野生型ガンキリンと差がなかったが、E2F1 転写活性化能に対しては野生型ガンキリンより亢進していた。
- (8) モノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの p53 や pRB タンパクのタンパク分解に対

する影響を調べた。p53 タンパクに対しては卵巣癌細胞株を用いて、cycloheximide-chase-assay を行なった。野生型ガンキリンと比べて、モノユビキチン化、モノ nedd8 化、モノ ISG15 化ガンキリンの 3 者は同程度の half-life を示した。pRB タンパクに対しても卵巣癌細胞株を用いて、in vivo での cycloheximide-chase-assay を行なった。野生型ガンキリンと比べて、モノユビキチン化、モノ ISG15 化ガンキリンの 2 者は同程度の half-life を示した。モノ nedd8 化ガンキリンは野生型ガンキリンに比べて、短い half-life を示した。

- (9) 今後の展望としては、①モノ nedd8 化ガンキリンについて、E2 や E3 (MDM2) との結合の変化を調べる。②プロテアソーム結合タンパクとしてのガンキリンのモノ nedd8 化は 26S プロテアソームの機能 (ペプチドやモデルタンパクの分解) にどのような影響を与えるのかを検討する。③モノ nedd8 化ガンキリンは p53 より pRB のほうに MDM2 の基質特異性を変化させ、pRB をより分解する傾向を示した。その機序について解析する。④モノ ISG15 化ガンキリンは検討した限り、野生型のガンキリンとの差異はみいだせなかった。インターフェロンのシグナル伝達経路での役割を検討する。⑤モノユビキチン化ガンキリンは野生型ガンキリンに比して短い half-life を示した。野生型ガン

キリンは非常に安定したタンパクなので、そのタンパク分解による量的な調節がモノユビキチン化ガンキリンのポリユビキチン化によって行なわれているかどうかを解析する。⑥ガンキリンのシステイン残基は、S-nitrosylation されることが判明した。Sニトロソ化ガンキリンの機能をストレス応答の系で調べる。

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. Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue T, Fujita J. Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and IGFBP-5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 Feb, 47(2) : 493-502. 査読有。
2. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Liu Y, Masuda T, Fujita T, Abdel-Aziz HI, Kongkham S, Dawson S, John Mayer R, Itoh Y, Sakurai T, Itoh K, Fujita J. The oncoprotein gankyrin interacts with RelA and suppresses NF-kappaB activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov, 363(3):879-84. 査読有。
3. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Masuda T, Liu Y, Itoh K, Fujita J. Enhanced deacetylation of p53 by the anti-apoptotic protein HSCO in association with histone deacetylase 1. *J Biol Chem*. 2007 May, 282(18):13716-25. 査読有。
4. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Nagao T, Sumitomo Y, Masuda T, Dawson S, Shimada Y, Mayer RJ, Fujita J. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer Cell*. 2005 Jul, 8(1):75-87. 査読有。
5. Murakami T, Higashitsuji H, Yoshinaga K, Terada Y, Ito K, Ikeda H. Management of ovarian hyperstimulation due to follicle-stimulating hormone-secreting gonadotroph adenoma. *BJOG*. 2004 Nov 111(11):1297-1300. 査読有。
6. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Fujii S, Itoh K, Fujita J. A novel protein overexpressed in hepatoma accelerates export of NF-kappaB from the nucleus and inhibits p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*. 2002Oct2(4):335-346. 査読有。

[学会発表] (計 2 件)

1. 東辻久子
卵巣癌で過剰発現する抗アポトーシス蛋白 HSCO は、脱アセチル化酵素 HDAC1 を p53 にリクルートすることにより、化学療法剤耐性を賦与する。
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会
2007 年 4 月 16 日
国立京都国際会館、京都市
2. 東辻久子
卵巣癌で過剰発現する癌遺伝子産物ガンキリンは NFkappaB (RelA) と結合しその転写活性化能を抑制する。
第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会
2009 年 4 月 5 日
国立京都国際会館、京都市

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 東辻久子
(HIGASHITSUJI HISAKO) 京都大学・
医学研究科・助教
研究者番号：20402852