

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460068

研究課題名(和文) 常活性型蛋白質の分解不活化を誘導する新規E3ユビキチンリガーゼの生理機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological function of novel E3 ubiquitin ligase that induces the inactivation of constitutively active proteins by the proteasome-dependent degradation

研究代表者

西屋 禎 (Nishiya, Tadashi)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：80399831

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)：二重特異性ホスファターゼCDC14AがE3ユビキチンリガーゼ複合体“ECS(SPSB1/2/4)”によりポリユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解されることを明確にした。また、ECS(SPSB3)の基質として、Nrf3を初めて同定した。ECS(SPSB3)は、Nrf3のC末端部分に結合し、Nrf3のポリユビキチン化を誘導するとともに、Nrf3の転写抑制機能を負に制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We showed that CDC14A, a dual-specificity protein phosphatase, was polyubiquitinated by ECS(SPSB1/2/4) E3 ligase complex and degraded by the 26S proteasome. Additionally, we identified Nrf3 as a substrate for ECS(SPSB3). We found that ECS(SPSB3) induces the polyubiquitination of Nrf3 through the binding to the C-terminal region of Nrf3 and negatively regulates the function of Nrf3.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ECS(SPSB1/2/4) ECS(SPSB3) CDC14A Nrf3 ユビキチン化 タンパク質分解

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の活性は、主にその「発現」、「化学的修飾」、そして「分解」により制御される。特に、常に活性型である蛋白質の多くは、分解により不活化される。この“常活性型タンパク質”にベストなタイミングでユビキチンを付加し、プロテアソーム依存的分解に導くのが E3 ユビキチンリガーゼである。E3 は厳格な基質特異性を持つ。したがって、各 E3 がいかなる基質を認識し、いつ・どこで・どのように分解へ導くのかを明らかにすることは、生体の恒常性維持の仕組みを理解する上で極めて重要である。E3 はヒトで約 600 種類存在することがわかっているが、基質が同定された E3 は少ない。SPSB ファミリー分子 (SPSB1~SPSB4) を基質認識サブユニットに用いる複合型 E3 である ECS (SPSB) も例外ではなく、最近になって我々のグループや海外のグループが SPSB1、SPSB2、および SPSB4 を基質認識サブユニットに用いる ECS (SPSB1)、ECS (SPSB2)、ならびに ECS (SPSB4) (以下 ECS (SPSB1/2/4)) の基質として誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を同定した。しかしながら、iNOS 以外の基質は報告されておらず、また、SPSB3 を基質認識サブユニットに用いる ECS (SPSB3) の基質は同定されていない。したがって、ECS (SPSB) の生理機能については、不明な点が数多く残されたままである。

### 2. 研究の目的

本研究では、SPSB ファミリー分子を基質認識サブユニットに用いる複合型 E3 ユビキチンリガーゼ “ECS (SPSB)” の機能解明を行う。これまでに申請者は、ECS (SPSB1/2/4) の基質として iNOS を、また、基質候補として CDC14A、CTTNBP2、ならびに FOG-2 を同定している。これらはいずれも常活性型タンパク質であり、敗血症や循環器疾患、がん化などに関わる重要分子である。申請者は、ヒト iNOS のアミノ酸 1~124 部分 (マウス iNOS では 1~118 部分) が ECS (SPSB1/2/4) の機能の特異的に抑制することを見出している (SPSB1/2/4 インヒビター)。これを各種培養細胞株ならびにマウスに発現させて、ECS (SPSB1/2/4) の機能不全が原因で引き起こされる様々な異常や病態を分子レベルで明らかにし、ECS (SPSB) の生理機能を追究する。

### 3. 研究の方法

#### (1) A549 細胞における SPSB1/2/4 インヒビターの可逆的発現系の作出

ヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞に pRevTet-OFF ベクターを導入したのち、SPSB1/2/4 のインヒビターとして機能するヒト iNOS の N 末 1~124 アミノ酸部分をコードする cDNA をサブクローニングした pRevTRE ベクターを追加導入して作出した。

#### (2) RAW264.7 細胞を用いた Tet-ON システムの機能確認

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に pRevTet-On ベクターを導入したのち、マウス iNOS の全長をコードする cDNA をサブクローニングした pRevTRE ベクターを追加導入して作出した。培養液にドキシサイクリンを加えることで iNOS を誘導し、ドキシサイクリン付加前の iNOS レベルと比較した。

#### (3) 酵母ツーハイブリッド法を用いた SPSB3 結合タンパク質の網羅的探索

クロンテック社の Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3 を用いた。ヒト SPSB3 の N 末端 1~145 アミノ酸部分を bait に用いて、ヒト肝臓、腎臓、心臓、および胎児脳 cDNA ライブラリーを付属のインストラクションに従ってスクリーニングした。

#### (4) タンパク質分解速度の解析

細胞にシクロヘキシミド (最終濃度 100  $\mu$  M) を加えてから、0、1、3、6 時間後に細胞抽出液を調製し、各タンパク質またはタグに特異的な抗体を用いたイムノプロットを行って、各時間のタンパク質レベルを調べた。

#### (5) ユビキチン化レベルの解析

Myc タグ付きのユビキチンを定期的に発現する HEK293T 細胞に SPSB ファミリー分子と基質候補タンパク質を異なるタグを付けて発現させ、その細胞から調製した細胞抽出液から免疫沈降法により基質候補タンパク質を精製し、得られた免疫沈降物に対して抗 myc 抗体を用いたイムノプロットを行い、ユビキチン化タンパク質を検出した。

#### (6) SPSB ファミリー分子と基質候補との結合

HEK293T 細胞に SPSB ファミリー分子と基質候補タンパク質を異なるタグを付けて発現させ、その細胞から調製した細胞抽出液から免疫沈降法により各タンパク質を精製し、得られた免疫沈降物に対して結合を見たいタンパク質に付けたタグに対する抗体を用いたイムノプロットを行った。

#### (7) 細胞局在の解析

各タンパク質を発現させた細胞から生化学的に細胞質画分、膜画分、核画分等を調製し、各タンパク質に対する抗体を用いたイムノプロットを行った。また、各タンパク質を YFP 融合タンパク質として細胞に発現させて、その細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

### 4. 研究成果

本研究における具体的成果、結果、および今後の展望を以下に示す。

#### (1) ECS (SPSB1/2/4) による二重特異性ホスフ

### アターゼ CDC14A の分解制御について

HEK293T 細胞において、CDC14A のユビキチン化が SPSB1/2/4 存在下で亢進することがわかった。

ECS (SPSB1/2/4) インヒビターの可逆的発現系を用いた実験から、ECS (SPSB1/2/4) の機能を抑制した場合に、CDC14A の分解が著しく遅延することがわかった。

SPSB1/2/4 に結合しない N533A 変異体 (CDC14A 分子中の SPSB1/2/4 認識配列 (E-L-N-N-N) 中の Asp-533 を Ala に置換したもの) について、変異による細胞局在の変化は起こらないが、内在性の ECS (SPSB1/2/4) を発現するヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞やヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞において、CDC14A の分解速度が N533A 変異導入により大きく遅延することがわかった (図 1)。

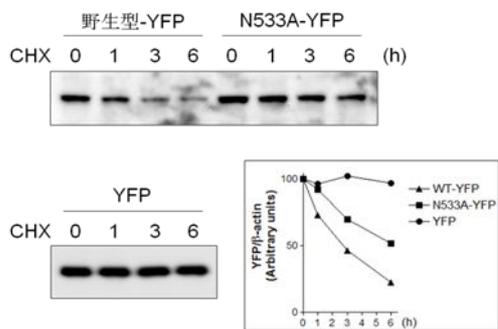


図 1 . HeLa 細胞における野生型および N533A 変異体の分解。

以上の結果から、CDC14A タンパク質の寿命が ECS (SPSB1/2/4) により制御されることが明確となった (論文投稿準備中)。CDC14A の生理機能については、酵母ホモログが細胞周期の調節に関与することが明らかにされているが、哺乳動物ホモログにはその機能はなく、哺乳動物ホモログの生理機能は不明である。したがって、今後の展開として、ヒト CDC14A によって脱リン酸化されるタンパク質を同定し、ECS (SPSB1/2/4) による CDC14A の寿命制御の生理的意義の解明を目指す予定である。

### (2) ECS (SPSB3) による Nrf3 の機能制御について

酵母ツーハイブリッド法を用いて、ヒト腎臓 cDNA ライブラリーから SPSB3 結合タンパク質として Nrf3 を単離した。

哺乳動物細胞における Nrf3 と SPSB3 との結合を共免疫沈降法により確認した。

Nrf3 と他の SPSB ファミリー分子との結合は、SPSB3 と比較してかなり弱いことが分かった。

Nrf3 と SPSB3 の結合には、Nrf3 の C 末 508 ~ 694 アミノ酸部分が必要であることを明らかにした (図 2)。

SPSB3 の存在下で Nrf3 のユビキチン化が亢進することを明らかにした。

Nrf3 の NQO1 発現抑制を SPSB3 が負に制御することを明らかにした。

SPSB3 は Nrf3 の細胞局在や small Maf との相互作用には影響を与えないことがわかった。

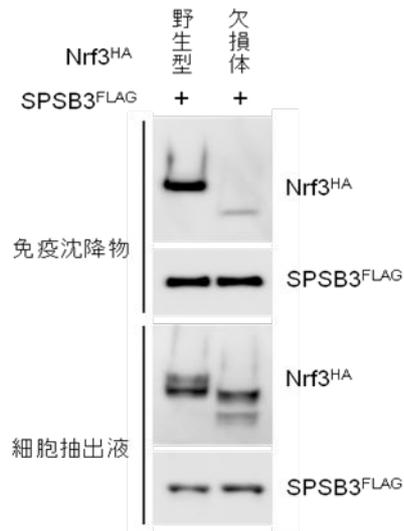


図 2 . Nrf3 の C 末 508 ~ 694 部分の欠損体は SPSB3 に結合しない。抗 FLAG 抗体で免疫沈降したのち、抗 HA 及び抗 FLAG 抗体でイムノブロットした。

以上の結果から、SPSB3 は Nrf3 に結合し、Nrf3 の機能を負に制御することが示唆された。しかしながら、その分子メカニズムの詳細を明らかにするには至らなかった。今後、SPSB3 による Nrf3 の機能制御における Nrf3 のユビキチン化の必要性を含めて、その分子機構を明らかにする予定である。

### (3) SPSB1/2/4 インヒビターの可逆的発現系の構築について

Tet-OFF システムを用いて、SPSB1/2/4 インヒビターを可逆的に発現させることが可能な細胞系列の作出を行った。

マウスにおける可逆的発現系の構築として Tet-ON システムを検討したが、未誘導状態の発現リークが大きく、このリークをできる限り少なくする何らかの方策が必要となった。

SPSB1/2/4 インヒビターの発現は、培養細胞においては細胞死を引き起こすといった研究に支障のある現象は起こっていないが、マウスの全身に発現させた場合、致命的に作用することが以前の研究でわかっている。したがって、マウスを用いた解析を行う場合、SPSB1/2/4 インヒビターを可逆的に発現させる必要がある。現時点で、Tet-OFF システムのほうが Tet-ON システムよりも発現リークが少ないため、都合が良いと思われる。今後、Tet-OFF システムを用いて SPSB1/2/4 インヒビターの可逆的発現系をマウスに導入する予定である。

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2件)

Takeda Y, Suto, Y, Ito K, Hashimoto W, Nishiya T, Ueda K, Narushima T, Takahashi T, Ogasawara K. TRAV7-2\*02 expressing CD8+ T cells are responsible for Palladium allergy. *Int J Mol Sci* 31(18), E1162, 2017. 査読有  
DOI: 10.3390/ijms18061162.

Makino K, Okuda K, Sugino E, Nishiya T, Toyama T, Iwawaki T, Fujimura M, Kumagai Y, Uehara T. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercurulation and neurotoxicity induced by methylmercury. *Neurotox Res* 27(2), 99-105, 2015. 査読有  
DOI: 10.1007/s12640-014-9494-8.

[学会発表](計2件)

緒方沙樹、篠原瑠奈、西屋禎 : E3 ヲビキチンリガーゼ ECS(SPSB3)の基質同定、第55回日本薬学会東北支部大会、2016年9月25日、奥羽大学(福島県・郡山市)

丸山拳、西屋禎、上原孝 : E3 ヲビキチンリガーゼ ECS(SPSB)による転写制御因子FOG-2の寿命制御、第125回日本薬理学会近畿部会、2014年6月20日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
西屋 禎 (NISHIYA TADASHI)  
奥羽大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 80399831

(2)研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3)連携研究者  
( )

研究者番号 :

(4)研究協力者  
( )