

平成 27 年 4 月 23 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：25860043

研究課題名(和文)誘導型ユビキチンリガーゼSSBファミリーによる細胞間クロストークの解明

研究課題名(英文)Regulation of intercellular crosstalk by induced ubiquitin ligase SSB

研究代表者

奥村 文彦(Fumihiko, Okumura)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00507212

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)：本申請課題はSOCSボックスタンパク質SSBファミリーによる細胞間情報伝達制御機構の解明を目的とした。我々はSSBの新規結合分子を探索し、いくつかを同定することができた。SSBはユビキチンリガーゼとして機能することが示唆されているので、同定した分子がSSB依存的に分解されるかを検証した。SSBファミリーのうちの一つをノックダウンにより発現抑制すると、同定した基質候補分子は蓄積した。この基質候補分子はがん抑制・促進、どちらも制御することが報告されており、現在は同定した基質候補分子の蓄積がどのような生理的役割を担っているのかを解析している。

研究成果の概要(英文)：The aim is to identify the molecular mechanism which regulates intercellular crosstalk by SOCS box protein SSB.

We identified SSB-binding proteins. Given that SSB is a ubiquitin ligase, we checked the stability of SSB-binding proteins and found that one of the candidate accumulated by knockdown of SSB. The candidate has been reported as a tumor suppressor gene and also as an oncogene. We are currently studying the physiological function of the candidate protein.

研究分野：ガン

キーワード：ユビキチン ガン

1. 研究開始当初の背景

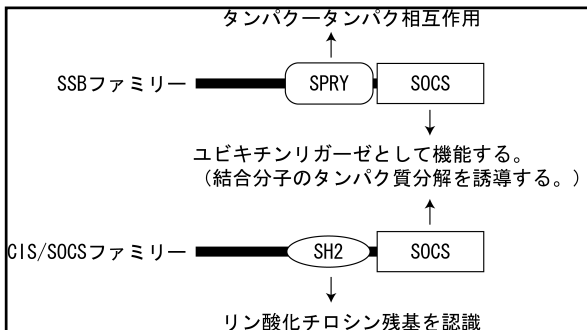
< CIS/SOCS ファミリー >

サイトカインは免疫反応を伝達する重要な細胞外分子である。インターフェロンやインターロイキンなどが有名であるがそれらは JAK/STAT 経路を介して細胞内に情報を伝達する。すなわち、サイトカインが受容体に結合すると、主に JAK や Tyk と呼ばれるリン酸化酵素により受容体のチロシン残基がリン酸化を受け様々なアダプタータンパク質と相互作用し細胞内にシグナルを伝達する。JAK はさらに細胞質に存在する転写因子 STAT のチロシン残基もリン酸化し、その結果 STAT は二量体化し活性型となり核内に移行する。活性化された STAT は核内に移行し標的遺伝子の転写をおこない、結果として種々のタンパク質が合成される。SOCS ボックスをもつ CIS/SOCS ファミリーはその標的遺伝子のうちのひとつである。CIS/SOCS ファミリーは受容体のリン酸化チロシン残基に結合し、受容体からのシグナル伝達を抑制する。(Tamiya T et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011)

< SSB ファミリー >

現在のところ機能はほとんど分かっていないが、SPRY ドメインをもつことから、このドメインを介して結合するタンパク質は、SOCS ボックス依存的にポリユビキチン化を受けタンパク質分解される可能性がある。予備実験から Eph 刺激依存的に SSB ファミリーのうちのひとつが選択的に誘導されることを明らかにしており、図のように CIS/SOCS ファミリーと同様なシグナル伝達制御機能を有している可能性が高い(未発表データ)。また SSB の過剰発現により Eph のタンパク質量が減少することをも見出している。これらの知見は SSB が Eph に対する誘導型ユビキチンリガーゼであることを示唆している。

2. 研究の目的



図のように SSB ファミリーはタンパク-タンパク相互作用に寄与する SPRY ドメインとユビキチンリガーゼとして機能することが予想される SOCS ボックスを有していることが

分かっている。(Hilton DJ et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1998)

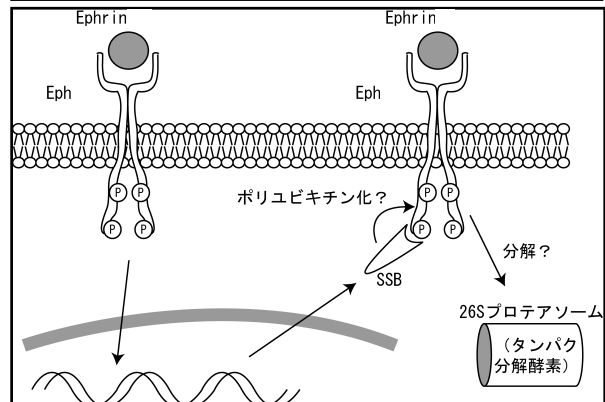
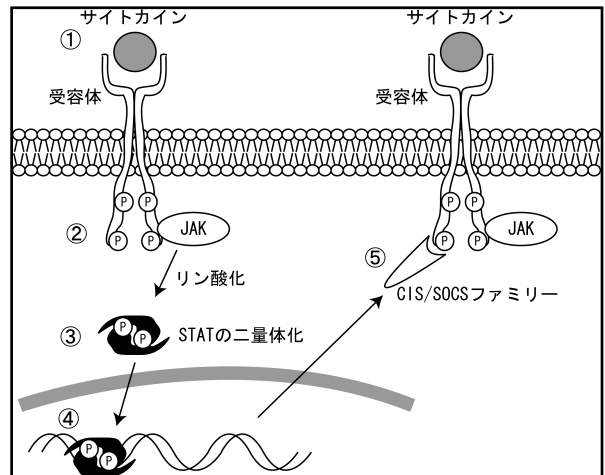
しかしながらその生理的機能はいまだに明らかとなっていない。SOCS ボックスをもつタンパク質として CIS/SOCS ファミリーが有名であり、これらはサイトカインシグナル伝達の制御に重要な役割を担っている。したがって SSB ファミリーも、類似の機能を有している可能性がある。

申請者らは免疫沈降と質量分析機を組み合わせた予備実験で、SSB ファミリータンパク質の結合分子として Eph を同定した(未発表データ)。また SSB の過剰発現により Eph のタンパク質量が減少することを見出した。多くの研究者により Eph の解析は進んでおり、細胞間の情報伝達を担う受容体であることが分かっており、ガン化を亢進あるいは抑制する。(Noborini R et al., Cancer Cell 2009)

したがって次のことを目的とする。

SSB ファミリーが Eph をタンパク質分解に導くユビキチンリガーゼであることを明らかにする。

SSB ファミリーによる Eph の機能制御が細胞間シグナル伝達に及ぼす影響を過去の報告に従い明らかにする。



3. 研究の方法

SSB が Eph に対するユビキチンリガーゼであることを明らかにする

これまでの予備実験から既に 293T 細胞を用いた過剰発現系において SSB ファミリー（4 種類存在する、SSB1-4）のすべてが Eph に結合することを確認している（未発表）。したがって SOCS ボックスをもつ SSB ファミリーは Eph のユビキチンリガーゼである可能性が高い。FLAG タグを導入した SSB1-4 をそれぞれ過剰発現させ、HA タグを導入した Eph の安定性が影響を受けるか、一般的に行なわれているシクロヘキシミドを用いたチェイス実験をおこない、抗 FLAG あるいは抗 HA 抗体を用いて明らかにする。

Colo201 など大腸がん由来細胞株を用いて内在性の SSB の発現を確認し、発現が認められればそれぞれをノックダウンし Eph の安定性が影響を受けるか、抗 Eph 抗体（R&D 社）を用いて確認する。大腸菌 BL21(DE3) など、あるいは昆虫細胞株 SF21 を用いてリコンビナントタンパク質として SSB、Eph を作製・精製し、同様に作製・精製したユビキチン修飾に必要な酵素群と混合し、試験管内でポリユビキチン化反応を行い、SSB が Eph に対するユビキチンリガーゼであることを示す。

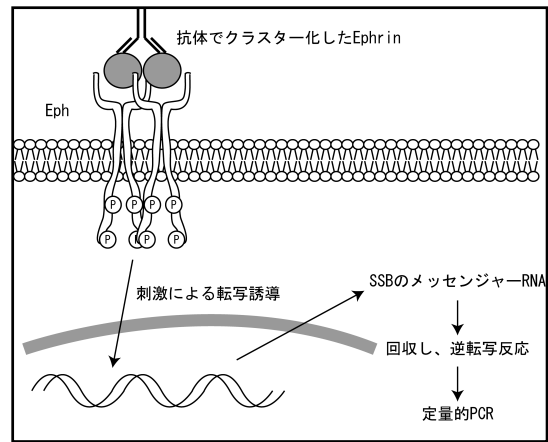
Eph がユビキチン-プロテアソーム経路で分解されることを証明するために、プロテアソーム阻害剤 MG132、ラクタシスチンなどを用いる。それら薬剤処理により、内在性の Eph タンパク質の蓄積を示す。

抗 SSB 抗体、Eph 抗体により免疫沈降を行い、内在性の SSB と Eph の結合を示す。

SSB による Eph の発現制御が細胞間シグナル伝達に及ぼす影響を過去の報告に従い明らかにする。

SSB ファミリーは CIS/SOCS ファミリーと同様に、細胞外の刺激依存的に発現誘導され、標的となる受容体を阻害することで、過剰なシグナル伝達を抑制することが予想される。したがって既に報告されているように、抗体でクラスター化した Ephrin を用いて実験をおこない確認する。具体的には Eph を発現していない 293T 細胞株に Eph を安定発現させ、クラスター化した Ephrin を培地に加え経時的に細胞を回収し、定量的 RT-PCR によりそれぞれの SSB 1-4 のメッセンジャー RNA を定量する。予備実験では SSB ファミリーのうちのひとつが刺激依存的に発現誘導されていることを確認したので、今後再現性も含めて発現パターンを詳細に確認する。

Eph を発現していない大腸がん細胞株



(LIM2405)に Eph を過剰発現させると細胞移動・浸潤能が抑制するので、Eph はガン抑制遺伝子と考えられている (Paul V. Senior et al., Int J Colorectal Dis, 2010)。この細胞株は SSB の過剰発現によって Eph の発現が低下していることが予想されるので、SSB に対する抗体により確認する。抗体が機能しない場合は作製する。発現が確認できた場合は、ノックダウンにより SSB を抑制することで Eph の発現が回復するかを、ウェスタンブロットティングにより確認する。また、多くの大腸ガンで Eph の発現が低下しており (Batlle E, et al., Nature 2005) それは予後の悪さと相関している (Guo DL, Carcinogenesis, 2006)。したがって SSB のノックダウンにより Eph の発現が回復すれば、ガン細胞の増殖・浸潤能の低下が予想されるので、BioCoat ガン細胞浸潤アッセイシステム (BD 社) などを用いて解析する。これらの細胞株で SSB の発現が認められない場合は、Eph-FLAG を安定に発現する 293T 細胞株を樹立し、Ephrin 刺激依存的に Eph に結合する分子を抗 FLAG 抗体 (M2-アガロース、シグマアルドリッチ社) を用いて精製し、質量分析器により同定する。そのうち、ユビキチンリガーゼ活性をもつと考えられるものを候補分子とし解析を続ける。Eph 受容体経路の刺激がどのように核内に伝えられているかは不明であるので、上記のようにして同定した分子群のうち、以下のようにして下流分子を同定する。Eph はチロシンキナーゼ活性を有するので、同定された候補分子のうちチロシンリン酸化を受けることが分かっている分子を優先的に解析する。CIS/SOCS ファミリーシステムで有名な転写因子 STAT のように、転写因子が Eph に結合し、チロシンリン酸化を受け活性化されたのち、さまざまな下流遺伝子群の転写を誘導している可能性が高いので、得られた候補分子のうち転写因子も

優先的に解析を進める。具体的には Ephrin 刺激依存的なチロシン酸化や核内移行を抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) や細胞の免疫染色などにより確認し、シグナル伝達機構を明らかにする。

4. 研究成果

Ephrin 刺激により SSB のうちのひとつが発現誘導することを mRNA レベルで確認した。
SSB ファミリーのうちのひとつをノックダウンにより発現抑制すると、基質候補が蓄積した。

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4件)

Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Okumura, F., Takeuchi, A., Horiuchi, K., Kano, T., Kanda, A., Saito, W., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., and Sasaki, H. (2014) Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *Journal of neurology* **261**, 224-226 査読あり
doi: 10.1007/s00415-013-7134-5.

Nakatsukasa, K., Kanada, A., Matsuzaki, M., Byrne, S. D., Okumura, F., and Kamura, T. (2014) The Nutrient Stress-induced Small GTPase Rab5 Contributes to the Activation of Vesicle Trafficking and Vacuolar Activity. *J Biol Chem* **289**, 20970-20978 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24923442>

Okumura, F., Okumura, A. J., Uematsu, K., Hatakeyama, S., Zhang, D. E., and Kamura, T. (2013) Activation of Double-stranded RNA-activated Protein Kinase (PKR) by Interferon-stimulated Gene 15 (ISG15) Modification Down-regulates Protein Translation. *J Biol Chem* **288**, 2839-2847 査読あり
doi: 10.1074/jbc.M112.401851.

Okumura, F., Okumura, A., Nakatsukasa, K., and Kamura, T. (2013) [Regulation of cellular functions by Elongin BC based E3 ubiquitin ligase]. *Seikagaku* **85**, 76-88 総説

[学会発表](計3件)

奥村 文彦, 植松 桂司, 松崎 真理子, 平野 みえ, 奥村 晶子, 錦見 昭彦, 金森 正和, 執印 太郎, 福井 宣規, 中務 邦雄, 嘉村 巧

pVHL は FOB と HIF-1 の分解を介して VHL 病を制御する 2014年11月26日、横浜、口頭発表第37回 日本分子生物学会年会

奥村 文彦, 奥村 晶子, 植松 桂司, 畠山 鎮次, Dong-er Zhang, 嘉村 巧

Regulation of protein translation by ISG15-modified PKR. 2013年12月4日、神戸(神戸国際展示場1号館2階)、ポスター発表 第36回 日本分子生物学会年会

1. Fumihiko Okumura

2. Activation of PKR by ubiquitin-like molecule ISG15 modification

down-regulates protein translation,

The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological

Roles. July 9-12, 2013 CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Japan、ポスター発表

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/laboratory/mcb.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

(奥村文彦)

研究者番号: 00507212

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

(嘉村巧)

研究者番号: 40333455