

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860241

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼ疾患の発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of disease pathogenesis caused by ubiquitin ligase deficiency.

研究代表者

弓本 佳苗 (Kanae, Yumimoto)

九州大学・生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：30596838

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)：われわれはユビキチンリガーゼ(E3)とその基質の関係を詳細に明らかにすることによって疾患の解明を目指している。これまで、E3 基質関係を網羅的に解析するDiPIUS法を開発した。本研究においてE3の1つであるFbxw7の新規基質として転写因子OASIS、BBF2H7を報告した。また、別のE3であるMDM2の基質としてRNAヘリカーゼDDX24を報告した。

また、E3であるFbxw7ががん転移を非細胞自律的に抑制していること、これはFbxw7によりNotchが分解されることに起因することを解明し、報告した。

研究成果の概要(英文)：We aim to reveal the mechanisms of pathogenesis by elucidating the relationship between a ubiquitin ligase and its substrates. We previously developed a new approach, termed DiPIUS (differential proteomics-based identification of ubiquitylation substrates), to discover substrates of ubiquitin ligases. We revealed that Fbxw7 controls osteoblast and chondrocyte differentiation by targeting OASIS and BBF2H7, basic leucine zipper (bZIP) type transcription factors, for proteasome-mediated degradation. We also showed that DEAD-box RNA helicase DDX24 is a substrate for MDM2. We also showed that Fbxw7 inhibits cancer metastasis in non-cell autonomous manner by targeting Notch for degradation.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：ユビキチンリガーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

あらゆる生命現象は様々なタンパク質の厳密な時空間的発現制御の上に成り立っている。タンパク質の発現量は転写・翻訳による制御に加えて、分解による制御が重要視されるようになった。特に、ユビキチン介在性のタンパク質分解機構は、さまざまなシグナル伝達因子や細胞周期制御因子などの量的制御を司っており、その破綻は癌や神経変性疾患などの疾病の原因となる。

### 2. 研究の目的

ユビキチンシステムの中で基質特異性を担うのはユビキチンリガーゼ (E3) であり、さまざまな E3 遺伝子の変異が疾患の原因となることが報告されている。これらの疾患の原因メカニズムの大半は、対応する基質がユビキチン化できない結果として、基質が細胞内に蓄積するためだと考えられている。そのため、E3-基質関係の発見こそがこれらの疾患メカニズムの解明にとって最重要である。そこで高感度プロテオミクス技術を用いた E3 の網羅的基質同定法 (DiPIUS 法) 疾患に関わる E3 の基質を網羅的に探索し、判明した基質と E3 との関係を生化学的・遺伝学的に解析し、ユビキチン化の異常による疾患の発症機構の解明および治療応用へつなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

E3 の基質探索は、基質分子の細胞内量が少ないこと、酵素基質の結合が微弱であることに加え、いったん基質が酵素と結合すると基質が分解されてしまうこともあり、他の酵素以上に困難であることが知られていた。われわれは E3 - 基質問題の打開策として、高感度プロテオミクス技術を用いて E3 - 基質関係を網羅的に探索できる方法 DiPIUS 法 (Differential Proteomics-based Identification of Ubiquitylation Substrates) [Yumimoto et al., *J. Proteome Res.*, (2012)] を開発した。本方法は E3 - 基質間の結合を指標に基質を探索する方法であり、ユビキチン化が分解のシグナルとなる全ての E3 の基質を網羅的に同定可能である。従来、酵素 - 基質のような弱い結合は多数の非特異的結合に埋もれて検出不能であったが、本方法では、ディファレンシャルプロテオミクスを用いることによりこの問題を解決した。

### 4. 研究成果

(1) Fbxw7 の新規基質としての ER 膜アンカー型転写因子 OASIS、BBF2H7 の発見

DiPIUS 法を用いて E3 の 1 つである Fbxw7 の新規基質として 2 つの関連する転写因子である OASIS と BBF2H7 を発見した [Yumimoto et al., *J. Biol. Chem.*, (2013)]。OASIS と BBF2H7 は共に ER 膜にアンカーされているが、ER ストレスによって切断され、その N 末端が核移行して、それぞれ骨分化と軟骨分

化に關与する。共免疫沈降実験により、OASIS と BBF2H7 は Fbxw7 と核内で結合することが示された。Fbxw7 を過剰発現すると OASIS と BBF2H7 の核内の量が減少し、逆に RNA 干渉法により Fbxw7 をノックダウンすると、これらの量は上昇した。OASIS と BBF2H7 の Fbxw7 結合領域に変異を導入すると、タンパク質は安定化した。また、*in vitro* で実際に OASIS や BBF2H7 が直接ユビキチン化されることを証明した。この Fbxw7-OASIS/BBF2H7 の関係の生理的意義を証明するために、細胞株で Fbxw7 のノックダウンをおこない、骨分化および軟骨分化に対する影響を検討した。C2C12 細胞において Fbxw7 をノックダウンすると OASIS が上昇し、それに伴い OASIS の転写ターゲットである Col1A1 の発現が上昇した。逆に Fbxw7 を過剰発現すると Col1A1 の発現が減少することがわかった。同様に、Fbxw7 の条件的ノックアウト細胞を用いて軟骨分化を観察すると、BBF2H7 の蓄積とともに軟骨基質が増加していることが明らかとなった。逆に Fbxw7 を過剰発現すると、これらの基質の蓄積は減少する。Fbxw7 は今までに C/EBP $\alpha$ 、KLF5、SREBP などの転写因子群を分解誘導することで脂肪細胞の分化を抑制していることが知られていたが、今回の研究から骨分化及び軟骨分化の制御転写因子である OASIS や BBF2H7 の分解制御もおこなっていることが明らかになったことから、間葉系幹細胞からの分化全体に Fbxw7 依存的な制御が寄与している可能性が示唆された。

(2) MDM2 による DDX24 のポリユビキチン化とリボソーム RNA プロセッシング制御の発見

DiPIUS 法を用いて E3 の 1 つである MDM2 の新規基質として DDX24 を発見した [Yamauchi et al., *Mol. Cell. Biol.*, (2014)]。DDX24 は RNA ヘリカーゼの 1 種であり、酵母のオーソログである MAK5 はリボソーム RNA のプロセッシングに關与することが知られていた。MDM2 の結合タンパク質として、DDX24 は同定された。MDM2 は DDX24 と結合し、*in vitro*、*in vivo* でともに DDX24 をユビキチン化することが判明した。しかし、MDM2 の過剰発現や RNA 干渉法によるノックダウンによって、DDX24 の量や半減期に差が見られなかったことから、DDX24 のユビキチン化はプロテアソーム依存的な分解シグナルではないことが示唆された。むしろ DDX24 のユビキチン化は、NCL や NIP7 といったリボソーム RNA のプロセッシングに關与する因子との結合を増強させ、DDX24 のリボソーム前駆体への取り込みを促進させることを発見した。RNA 干渉法による DDX24 のノックダウン細胞ではリボソーム RNA のプロセッシングが障害された。以上から、がん遺伝子 MDM2 の新たな生理学的役割が示唆された。

### (3) コピキチンリガーゼの新規制御機構の発見

コピキチンリガーゼのサブファミリーの1種である SCF( Skp1-Cul1-F-box タンパク質複合体)は不変因子の Cul1、Skp1、Rbx1 と可変因子の F-box タンパク質から構成されている。われわれは F-box タンパク質の1つである Fbx13 の新規基質探索を行う過程で、SCF<sup>Fbx13</sup> の新規活性制御機構を発見した [Yumimoto et al., *J. Biol. Chem.*, (2013)]。Fbx13 は既に Cryptochromes (Cry) を基質として分解することが知られている。Fbx13 の F-box ドメインを解析したところ、Fbx13 の F-box ドメインは保存度が低く、Skp1 や Cul1 との結合に必要ないくつかのアミノ酸が保存されていないことがわかった。実際、HeLa 細胞の免疫沈降実験において Fbx13 を単独で過剰発現させた細胞においては、Fbx13 の SCF 複合体形成が確認できなかった。しかし驚くべきことに、同時に Cry1 を過剰発現させた細胞では Fbx13 の SCF 複合体形成ができた。Fbx13 の C 末端を欠損させ Cry1 と結合できなくさせた変異体 Fbx13 は SCF 複合体を形成できないことから、Fbx13 と基質の結合が SCF 複合体形成に重要であることが示唆された。一方基質結合ドメインを完全に欠損させた変異体や Fbx13 の F-box ドメインに Skp2 の基質結合ドメインを付加した変異体は Skp1 と結合できたことから、Fbx13 の基質結合領域が SCF 形成阻害効果を持つことが示唆された。おそらく Cry の非存在下では何らかの阻害因子が Fbx13 に結合しており、そのため SCF 複合体は形成できないが、Cry の細胞内濃度が一定以上高まると、Cry が Fbx13 に結合して SCF 複合体を形成して Cry の分解が始まるものと考えられた。Cry 等の時計タンパク質群は転写調節および翻訳調節によってその周期性が保証されていると信じられているが、今回明らかにした機構は Cry タンパク質の周期的変動パターンの形成に一役買っているものと推測される。

### (4)がん抑制 E3 である Fbxw7 の癌ニッチにおけるがん転移抑制機構の解明

Fbxw7 は癌遺伝子産物である c-Myc や Notch の分解を誘導することが知られている。Fbxw7 の変異は様々な癌細胞株やヒトの癌患者で高頻度に見つかっており、有力な癌抑制遺伝子として近年注目を集めている。われわれは乳癌患者の癌部および末梢血より qRT-PCR で Fbxw7 の mRNA を測定したところ、驚くべきことに癌部だけでなく、末梢血中の Fbxw7 が低い群は高い群に比べて有意に予後が有意に不良であることを発見した [Yumimoto et al., *J. Clin. Invest.*, (2015)]。

末梢血中の Fbxw7 低発現が予後不良につながるメカニズムをマウスモデルを用いて調べる目的で、骨髄特異的 Fbxw7 欠損マウスに黒色腫細胞、肺癌細胞、乳がん細胞を移植

し、肺への転移を調べた。その結果、対照群と比較して Fbxw7 欠損マウスでは肺転移が亢進し、早期に死亡することがわかった。Fbxw7 欠損骨髄細胞を移植した野生型マウスでも同様に転移の亢進がみられたことから、骨髄に由来する細胞群の Fbxw7 の欠損が癌転移を促進する原因となっていることが明らかとなった。

次にわれわれは、骨髄 Fbxw7 の低下が転移を亢進させるメカニズムについて解析した。骨髄特異的 Fbxw7 欠損マウスの肺では、転移初期に癌細胞の周囲に monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSC) および macrophage が数多く集積していた。この原因を探るべく血中のサイトカインの変動を調べた結果、骨髄特異的 Fbxw7 欠損マウスにおいて CCL2 と CCL12 が上昇していた。乳癌患者においても血中 Fbxw7 mRNA 量と CCL2 タンパク質量との間に負の相関があることを確認した。CCL2 と CCL12 のレセプターである CCR2 のアンタゴニストをマウスに投与することにより、転移巣(肺)での癌細胞の増殖および Mo-MDSC の集積が解消され、転移巣の増大が大幅に抑制されることがわかった。

骨髄由来細胞のうち CCL2 を分泌する細胞として monocytes/macrophages と mesenchymal stromal cells (MSC) が報告されている。Fbxw7 は monocytes/macrophages の CCL2 分泌には影響しない一方で、Fbxw7 欠損 MSC では、分解基質 Notch1 の蓄積の結果 CCL2 の分泌が亢進していた。また癌細胞と MSC との共移植実験により、Fbxw7 欠損 MSC は CCL2 依存的に癌転移を亢進させることを確認した。つまりヒトでは体質的に Fbxw7 の高低があり、Fbxw7 の低い群では MSC における Notch の分解が不十分で蓄積するため、その下流遺伝子 CCL2 が活性化され、それが癌周囲に Mo-MDSC 等の集積を促すために転移巣における腫瘍の増殖が著しく増大するものと結論された。

### 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5件)

Yumimoto, K., Matsumoto, M., Onoyama, I., Imaizumi, K., and Nakayama, K. I. F-box and WD repeat domain-containing-7 (Fbxw7) protein targets endoplasmic reticulum-anchored osteogenic and chondrogenic transcriptional factors for degradation. *J. Biol. Chem.*, 288, 28488-28502. (2013). doi: 10.1074/jbc.M113.465179.

Yumimoto, K., Muneoka, T., Tsuboi, T., and Nakayama, K. I. Substrate binding promotes formation of the Skp1-Cul1-Fbx13

(SCF(Fbx13)) protein complex. *J. Biol. Chem.*, 288, 32766-32776. (2013). doi: 10.1074/jbc.M113.511303.

Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., and Nakayama, K. I. MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24. *Mol. Cell. Biol.*, 34, 3321-3340. (2014). doi: 10.1128/MCB.00320-14.

Yumimoto, K., Akiyoshi, S., Ueo, H., Sagara, Y., Onoyama, I., Ueo, H., Ohno, S., Mori, M., Mimori, K., and Nakayama, K. I. Fbxw7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner. *J. Clin. Invest.*, 125, 621-35. (2015). doi: 10.1172/JCI78782.

Nakajima T., Kitagawa K., Ohhata T., Sakai S., Uchida C., Shibata K., Minegishi N., Yumimoto, K., Nakayama K. I., Masumoto K., Katou F., Niida H., and Kitagawa M. Regulation of GATA-binding Protein 2 Levels via Ubiquitin-dependent Degradation by Fbw7: INVOLVEMENT OF CYCLIN B-CYCLIN-DEPENDENT KINASE 1-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF THR176 IN GATA-BINDING PROTEIN 2. *J. Biol. Chem.*, 290, 10368-81. (2015) doi: 10.1074/jbc.M114.613018.

〔学会発表〕(計3件)

Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T., and Nakayama, K. I. Comprehensive Identification of Substrates for F-box Proteins by Differential Proteomics Analysis. NAITO conference, 2013.7

弓本 佳苗、宗岡 哲也、坪井 智広、中山 敬一、基質の結合が Fbx13 の SCF 複合体形成を促進する (第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013.12)

弓本 佳苗、秋吉 清百合、上尾 裕紀、小野山 一郎、上尾 裕昭、森 正樹、三森 功士、中山 敬一、癌周囲の微小環境における Fbxw7 の発現量が癌転移能を規定する (第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014.11)(ワークショップ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

弓本 佳苗 (YUMIMOTO, Kanae)  
九州大学・生体防御医学研究所・学術研究員