

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430147

研究課題名(和文) ユビキチン化の高感度検出法の担癌マウスモデルでの有用性の検討

研究課題名(英文) Highly sensitive detection of ubiquitination using tumor-bearing mouse model

研究代表者

宮本 和英 (Miyamoto, Kazuhide)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：10415317

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)：ユビキチン化のユビキチン結合酵素(E2)は、白血病、肺がん、乳がんなどに関わる。E2活性を高感度に検出できれば、がん疾患の診断や病態把握に役立つ。本研究では、人工的に作製したARF分子を活用し、AMISセンサーを備えた生理活性反応測定装置で、E2活性の検出を検討した。ARF分子を用いることで、ユビキチン化の基質を必要としない簡便なE2活性検出ができ、フェムト～マイクロmol/Lの応答濃度範囲で、E2活性のリアルタイムな高感度定量検出が可能となった。更に、抗がん剤を作用させた急性前骨髄性白血病細胞のE2活性をリアルタイムで計測することに成功したので、本法は疾患の病態分析に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitin-conjugating enzymes (E2) in ubiquitination are associated with various diseases such as leukemia, lung cancer, and breast cancer. Thus, assessing E2 activity leads to the monitoring of tumor development for diagnostic and prognostic purposes. Here, we described the detection of E2 activity on a signal accumulation ISFET biosensor (AMIS sensor) using an artificial RING finger (ARF). The use of ARF enabled the simplified detection of E2 activity without a substrate. The high-sensitivity quantitative detection of E2 activities was demonstrated via real-time monitoring over a response range of femtomolar to micromolar concentrations. Furthermore, the monitoring of E2 activities was successfully achieved using human acute promyelocytic leukemia cells following treatment with the anticancer drug bortezomib, which allowed the assessment of the pathological conditions.

研究分野：生物分析化学

キーワード：ユビキチン化 がん診断 ユビキチンリガーゼ E2活性 ARF

1. 研究開始当初の背景

生体内では、構造異常などが原因で不要となったタンパク質(標的タンパク質)を分解する機能、即ち、品質管理機能が存在する。これはユビキチン化により行われる。ユビキチン化は、基本的にユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)の3つの酵素が関与しており、ユビキチンがE1からE2に転移し、そしてE3を介して標的タンパク質に付加される。この反応が繰り返されることで複数のユビキチンが標的タンパク質に付加される。付加された複数のユビキチンを目印に、標的タンパク質の分解が行われる。このユビキチン化は、様々な疾患との関係も深く、ユビキチン化の度合いを高感度に検出できれば将来的に疾患の診断・病態把握が可能である。これまでにユビキチン化に関わる酵素であるユビキチンリガーゼ(E3)を人工的に作製し、これを活用することで、ユビキチン化の度合いを検出することに成功している。この本研究では、人工的なE3を活用して、がん細胞の培養上清中や血清中におけるユビキチン化の計測を実施し、疾患診断の可能性を検討する。

2. 研究の目的

(1) 急性前骨髄性白血病に関与するE3であるSIAH1のアミノ酸配列に基づき、人工的なE3(以下、ARFとする)を分子設計し作製する。

(2) 単離精製されたユビキチン、E1、E2、ARFなどユビキチン化に必要な試薬を混合させ、*in vitro*レベルで、ユビキチン化の度合いを検出する。

(3) 抗がん剤ボルテゾミブをがん細胞に作用させ、アポトーシスを誘導する。そのときの、培養上清を試験サンプルとして、ARFのユビキチン化機能の実験を検討する。

(4) 担癌マウスモデルの血清中におけるユビキチン化の度合いをARFで捉えて計測する条件を検討する。

3. 研究の方法

(1) 急性前骨髄性白血病由来のSIAH1の活性部位をARFの土台に移植し、ARFを分子設計し、合成する。

(2) 単離精製されたユビキチン、E1、E2、ユビキチンなど必要な試薬を混合させ、そこにARFを添加することで生じるユビキチン化をAMIS-101装置で検出する。ユビキチンの付加に伴う遊離プロトンの減少をAMIS-101を利用して定量的・高感度に検出・測定する。ユビキチン化の度合いは、プロトンの減少という観点から捉える事ができる。

(3) E2酵素が高発現している急性骨髄性白血病細胞株(NB4)に抗がん剤ボルテゾミブを添加し、アポトーシスを誘導させ、培養上清中にE2を漏出させた。この培養上清を被検体として、ARFを使ったユビキチン化検出を行う。

4. 研究成果

(1) 図1に示したように、急性前骨髄性白血病由来のSIAH1の活性部位(アミノ酸5残基PKLTC)をARFの土台に移植する。

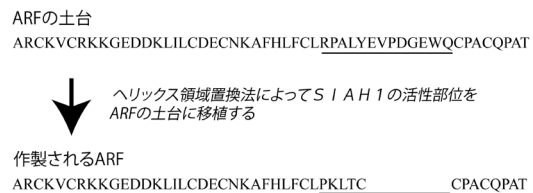


図1: ARFの分子設計法

この移植法は、これまでに我々が開発してきたヘリックス領域置換法を活用して行われた。この分子設計されたアミノ酸配列に基づき、ARFをペプチド合成(PSSM-8, 島津製)し、トリフルオロ酢酸等で脱保護を行った後、グラジエントHPLCで精製した。合成確認は、質量分析(AXIMA-TOF2, 島津製)によって行った。

(2) ARFによるユビキチン化実験を行った。先ず、ユビキチン化反応に必要な各種試薬

(E1, E2, ユビキチン)を混合させ、それを生理活性反応測定装置AMIS-101(バイオエックス製)の測定センサーに投入し、37°Cで温度安定させしばらく静置する。次に、AMIS-101のセンサーにARFを添加してユビキチン化の反応を生じさせて、混合液中の遊離プロトンの減少をリアルタイムに検出し定量的・高感度に測定を行った。この時、図2に示したように、E2にユビキチンが付加した複合体が形成されている。そこに、我々が開発したARFが添加され、ARF上にユビキチンが転移される。この転移量から、ユビキチン化の度合い、即ち、E2活性を見積もることができる。

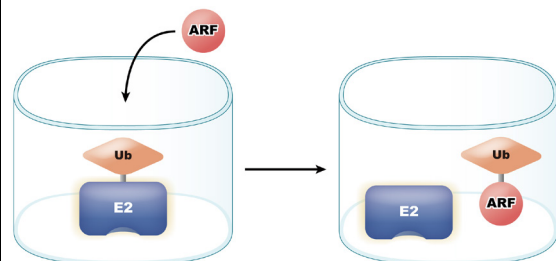


図2: ARFによるE2活性検出

この測定について、さらに、詳細に検討すべく、濃度の異なるE2 UbcH8(0.014, 0.56, および4.66 nM)を用いた時の、それぞれのE2活性検出を検討したので、図3に測定結果

を示した。

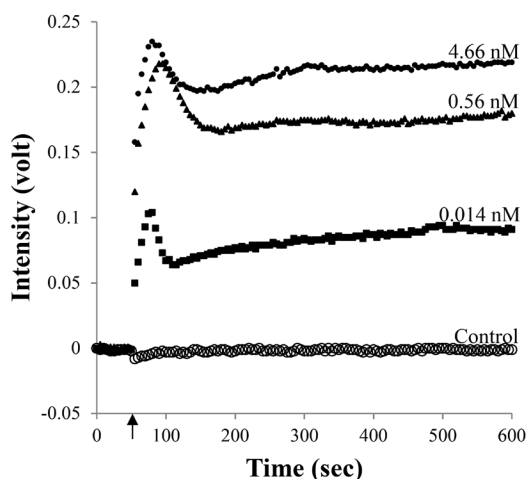


図3：E2活性のリアルタイム検出

図3では、時間軸に対して、AMIS強度(Volt)がプロットされている。E2濃度に依存して、AMIS強度(Volt)が増加していることが分かる。また、反応系にユビキチンを含まないサンプルをNegative Controlとして測定した。これら実験結果から、ユビキチン化反応中のE2活性をAMISセンサーで高感度に検出・測定できることが示された。図中の↑はARFを投入した時間を示している。ARF投入による物理的な影響によってショックピークが出現している。しかし、150秒後付近から、徐々にシグナルが安定しており、正味のARF由来のシグナルが観測できている。その後、約300秒の間、極めて安定なE2活性の観測が実現している。

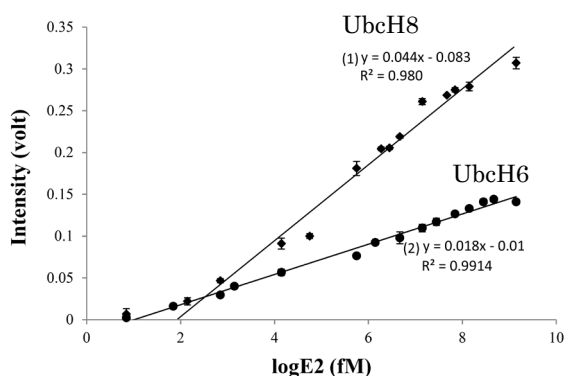


図4：AMISセンサーを用いるE2活性検出の検量線

次に、E2の濃度を更にワイドレンジで変化させた時の、AMISセンサー検出結果を図4に示した。ここでは、UbcH8とUbcH6の2種類のE2の活性を計測し、検量線を作成した。UbcH8では、応答濃度範囲(140.0 fM-1.4 μM)、検出限界50.4 fgであった。一方、UbcH6では、応答濃度範囲(70.0 fM-1.4 μM)、検出限界30.0 fgであった。また、検量線の傾きは、0.044 (UbcH8)、0.018 (UbcH6)となった。

ていた。今回の条件において、UbcH8の活性はUbcH6のそれよりも高いと言える。UbcH8およびUbcH6の両方において、E2活性をワイドレンジで測定できており、高感度且つ定量的に捉えることに成功していることが分かる。

以上の、実験結果より、ユビキチン化反応におけるE2活性は、ARFを活用するAMISセンサーにて高感度でリアルタイムに応答することが明らかとなった。

(3) (2)の実験結果を更に発展させるために、測定サンプルを精製された試薬を用いる系から、培養上清に変えて実験を進めた。

ヒト急性前骨髄性白血病株(NB4)に各種濃度のボルテゾミブを添加して、そのがん細胞の細胞死を誘導する実験を行った。NB4細胞の細胞死によって、UbcH8-ユビキチン複合体が細胞外に逸脱され、その結果、その複合体が培養上清中(以下、上清サンプル)で検出されることを明らかにした。また、添加するボルテゾミブの濃度を上昇させれば、それに応じて上清サンプルに漏出するUbcH8-ユビキチン複合体量が増加していくことも分かった。

次に、ARFを各種濃度(0, 10, 100 nM)のボルテゾミブを作用させた後の上清サンプルに添加し、ARFのユビキチン化反応実験を実施した。ここではウエスタンブロットにて検出して結果を図5に示した。

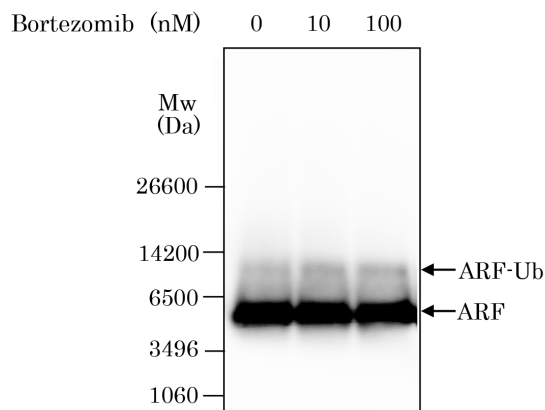


図5：ウエスタンブロット法によるARF反応の検出

図5では、ARFにユビキチンが付加したARF-Ubが僅かではあるが観測されており、E2活性を上清サンプルにて捉えることができた。

しかしながら、ボルテゾミブの濃度の変化に応答して変化するARFの反応性の違いを捉えることは難しい。

そこで、培養液中に異なる濃度のE2を含有した試験サンプルを用意し、そのE2活性の検量線を描いた結果を図6に示した。ここで得られた検量線は、図3におけるUbcH8と類似しており、明らかに、培養液の影響を殆

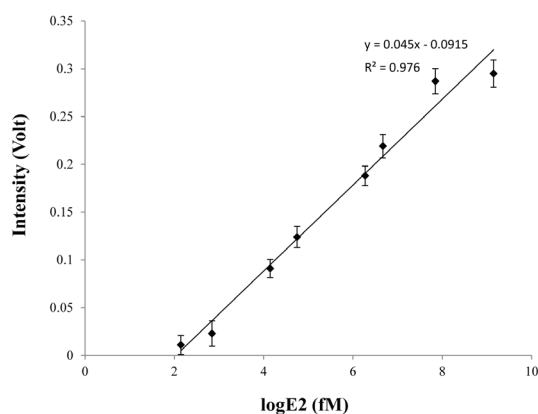


図6: 上清サンプル中の E2 活性の検量線

ど受けずに、AMIS センサーにて、E2 活性を検出・測定できることを見出した。この検量線を使って、NB4 細胞 (1×10^5 cells/ml) から培養上清に漏出してくる E2 活性を見積もった。その結果、10 と 100 nM のボルテゾミブを作用させたとき E2 活性は、それぞれ 5.1 pM (8.9 pg/100 μ l) および 17.3 pM (30.4 pg/100 μ l) となった。

以上より、簡便且つ定量的に、ARF を用いた検出系で E2 活性を捉え計測することに成功した。

(4)(3) で得られた結果を踏まえて、実験動物マウスの血清中にて、ARF を活用するユビキチン化検出を実施中である。動物実験に移行するための最適な測定条件を検討しているところである。

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 7 件)

① 宮本和英, 砂川真弓, 齋藤一樹

人工ユビキチンリガーゼの分子設計法の開発、2017、印刷中。査読有

② Kazuhide Miyamoto, Miho Sumida, Mayumi Yuasa-Sunagawa, Kazuki Saito, Highly sensitive detection of E2 activity in ubiquitination using an artificial RING finger, J. Peptide Sci., 23(3), 222-227 (2017)。査読有

③ Hideki Azuma, Jiawei Li, Ryota Youda, Toshio Suzuki, Kazuhide Miyamoto, Taizo Taniguchi, akeshi Nagasaki, Improved isolation procedure for shikonin from the root of the Chinese medicinal plant Lithospermum erythrorhizon and its solubilization with cyclodextrins, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 3(2), 58-63(2016)。査読有

④ Kazuhide Miyamoto, Miho Sumida, Mayumi Sunagawa, Rapid and accurate monitoring of E2 activities using an artificial E3

ligase on a signal accumulation ISFET biosensor, Peptide Science, 171-172(2016) 査読有

⑤ Mayumi Sunagawa, Arisa Nakatani, and Kazuhide Miyamoto, The Artificial Ubiquitin Ligase E3 Inhibits Cellular Proliferation in Cancer Cells, Peptide Science, 125-126(2016)。査読有

⑥ Mariko Takenokuchi, Kazuhide Miyamoto, Katsuyasu Saigo, Taizo Taniguchi Bortezomib Causes ER Stress-related Death of Acute Promyelocytic Leukemia Cells Through Excessive Accumulation of PML-RARA. Anticancer Res., 35, 3307-3316 (2015)。査読有

⑦ Kazuhide Miyamoto, Ubiquitination on an artificial RING finger as an E3 ligase Peptide Science 331-332 (2014)。査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

① ユビキチン化反応における E2 活性のリアルタイム検出法、超異分野学会 大阪フォーラム 2017、立命館大学

(2017 年 3 月 11-12 日) 招待講演

② Real-time detection of E2 activities in the ubiquitination reaction using an artificial E3 ligase、第 39 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜

(2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日)

③ Creation of an artificial E3 ligase and its anticancer effects、第 39 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜

(2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日)

④ 人工ユビキチンリガーゼの分子設計法の構築、第 33 回関西ペプチドセミナー、近畿大学

(2016 年 11 月 26 日) 招待講演

⑤ 人工ユビキチンリガーゼによる急性前骨髄性白血病の抑制効果、第 33 回関西ペプチドセミナー、近畿大学

(2016 年 11 月 26 日)

⑥ Rapid and accurate monitoring of E2 activities using an artificial E3 ligase on a signal accumulation ISFET biosensor、第 53 回ペプチド討論会、京都テルサ

(2016 年 10 月 26-28 日)

⑦ The artificial ubiquitin ligase E3 inhibits cellular proliferation in cancer cells、第 53 回ペプチド討論会、京都テルサ

(2016 年 10 月 26-28 日)

⑧ 新規抗がん剤としての人工ユビキチンリガーゼの設計とその作用機序、第 66 回日本薬学会近畿支部、大阪薬科大学

(2016 年 10 月 15 日)

⑨ ユビキチン結合酵素 (E2) 活性の検出に基づく腫瘍サイズの決定、第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜

(2016 年 10 月 6-8 日)

⑩ 人工ユビキチンリガーゼを用いるユビキ

チン結合酵素 (E2) 活性の検出法、第 65 回
日本分析化学会、北海道大学

(2016 年 9 月 14-16 日)

⑪ 人工ユビキチンリガーゼを用いた血清中
のユビキチン化反応の検出法、第 29 回バイ
オメディカル分析科学シンポジウム、京都大
学

(2016 年 9 月 2-3 日)

⑫ 人工ユビキチンリガーゼのがん細胞増殖
抑制効果、第 29 回バイオメディカル分析科
学シンポジウム、京都大学

(2016 年 9 月 2-3 日)

⑬ 癌などの重篤疾患の治療前診断法、企
業・大学・学生マッチング、兵庫県立大

(2016 年 5 月 28 日)

⑭ Structural analysis of ubiquitin
transfer onto an artificial E3 ligase、第
38 回日本分子生物学会、神戸国際会議場

(2015 年 12 月 2 日)

⑮ 癌などの重篤疾患の治療前診断法、国際
フロンティア産業メッセ、神戸国際会議場

(2015 年 9 月 4 日)

⑯ 癌などの重篤疾患の治療前診断法、企
業・大学・学生マッチング、兵庫県立大

(2015 年 5 月 28 日)

⑰ ユビキチンプロテアソームと疾患診断法、
メディカルジャパン 2015、インテックス大阪
(2015 年 2 月 6 日) 招待講演

⑱ ユビキチンプロテアソームを活用する治
療前診断法、姫路医療セミナー、姫路商工会
議所

(2014 年 12 月 11 日)

⑲ Ubiquitination on an artificial RING
finger as an E3 ligase、第 51 回ペプチド
討論会、徳島大学

(2014 年 10 月 22 日)

⑳ ユビキチン化を用いた新しい診断法、国
際フロンティア産業メッセ、神戸国際会議場
(2014 年 9 月 4 日)

㉑ ユビキチン化を用いた新しい診断法、企
業・大学・学生マッチング、兵庫県立大

(2014 年 5 月 29 日)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 2 件)

1. 名称: キメラタンパク質 (E2 との選択的
結合活性を有し標的タンパク質の必要なし
にタンパク質のユビキチン化活性を示すタ
ンパク質の提供)

発明者: 宮本和英 他

権利者: 宮本和英 他

種類: 特許

番号: 特許第 5971788 号

取得年月日: 平成 28 年 7 月 22 日

国内外の別: 国内

2. 名称: 人工合成疑似 E 3 を有効成分とす
る、癌診断薬、抗癌剤選択支援剤、および天
然 E 3 に拮抗する阻害剤

発明者: 宮本和英 他

権利者: 宮本和英 他

種類: 特許

番号: 特許第 5990308 号

取得年月日: 平成 28 年 8 月 19 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

研究室ホームページ

http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_p_harm/pharm/bioanalysis/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 和英 (KAZUhide, Miyamoto)

姫路獨協大学薬学部・准教授

研究者番号: 10415317

(2) 研究分担者

炬口 真理子 (MARIKO, Takenokuchi)

姫路獨協大学薬学部・准教授

研究者番号: 10379430

(期間: 平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年
6 月 20 日)

谷口 泰造 (TAIZO, Taniguchi)

姫路獨協大学薬学部・教授

70346253

(期間: 平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年
6 月 20 日)