

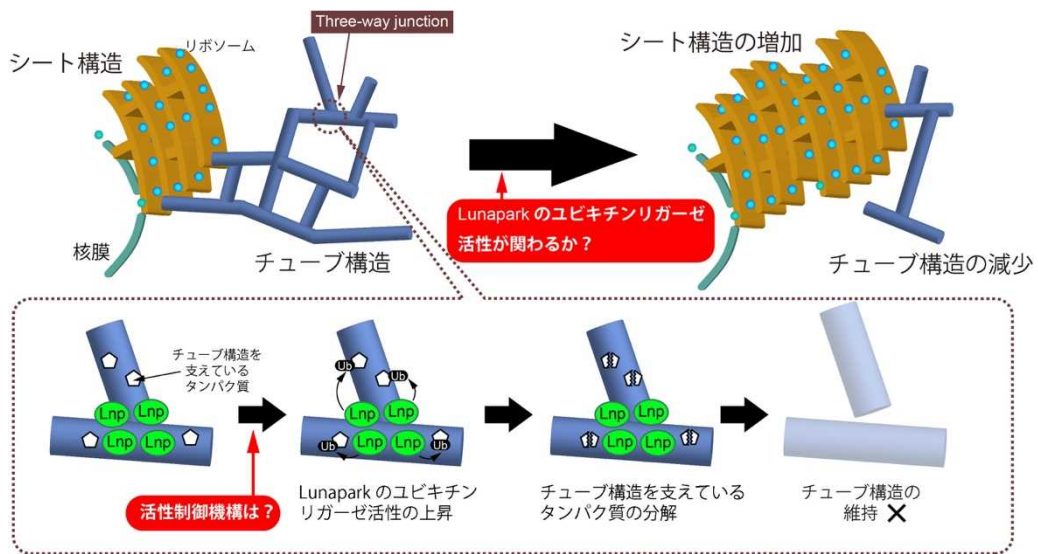
「細胞内小胞輸送による新しいがん抑制機構の解明」

神戸大学大学院 医学研究科 梶保 博昭

1 研究の背景と目的

細胞内には核・小胞体・ゴルジ体・エンドソームなど様々な細胞小器官（オルガネラ）がある。これらのオルガネラは小胞輸送によって結ばれている。がん化した細胞では細胞内小胞輸送を利用して悪性を亢進させていることが知られている。従って、細胞内小胞輸送の仕組みを明らかにすることががんの抑制機構の解明につながると考えられる。これまで私は細胞内小胞輸送を介したがんの悪性化機構を明らかとし、新たな概念を提唱してきた (Kajiho et al. *EMBO Reports*, 2016; Kajiho et al, *Small GTPases*, in press).

細胞内小胞輸送の出発点として小胞体は翻訳されたタンパク質をゴルジ体、エンドソーム、細胞膜などのオルガネラへと送る。小胞体は滑面／粗面小胞体という2種類の異なるオルガネラが連続する特徴を持つ。滑面小胞体は細胞質に張り巡らされたチューブ構造をとり、リボソームを多く結合する粗面小胞体はシート構造をとっている。このような小胞体の特徴的な構造は滑面／粗面小胞体それぞれに特異的に局在する膜貫通タンパク質によって支えられている。滑面小胞体のチューブ構造を支える膜貫通タンパク質の一つである Reticulon は甲状腺や膵臓などのがん細胞で高い発現が認められることから、がん細胞では小胞体の形状が変化していると考えられる。小胞体の形状が変化する際には小胞体のチューブ／シート構造を支えるタンパク質が選択的に分解されることが必要であると考えられる。Lunapark はチューブ構造の三叉構造である three-way junction に局在して three-way junction を安定化することが知られている。最近 Lunapark にユビキチンリガーゼ活性があることが報告されたが、その活性制御機構はわかっていない。また Lunapark のユビキチンリガーゼ活性が小胞体のシート構造やチューブ構造のバランスを制御するのかも不明である (図1)。そこで本研究では、Lunapark のユビキチンリガーゼ活性調節による小胞体の形状変化の分子機構を明らかにして、がんの抑制機構の解明を目指した。



(図1) Three-way junction に局在するユビキチンリガーゼ Lunapark による小胞体の形状変化の調節機構

## 2 研究方法・研究内容

### 2-1) Lunapark と Lunapark 結合タンパク質の結合実験

GST-Lunapark の野生型および欠失変異体と MBP-Lunapark 結合タンパク質(未発表データのため、以降 protein X と表記)の組換えタンパク質を精製し、グルタチオンセファロースを用いたプルダウンアッセイにより両者の結合を調べた。HEK293 細胞に Lunapark-FLAG の野生型および欠失変異体と HA-protein X を発現させた。細胞からの抽出液を抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。免疫沈降画分を SDS-PAGE 後に抗 HA, 抗 FLAG 抗体によるイムノブロットを行った。

### 2-2) In vitro ubiquitination assay

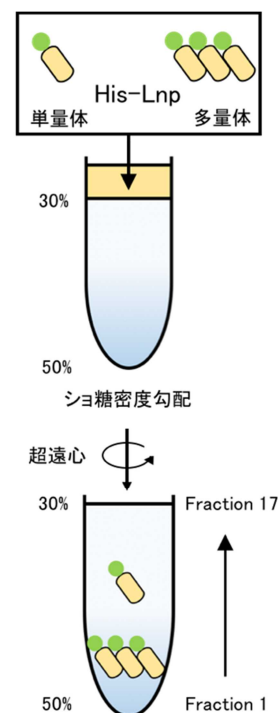
Lunapark のユビキチンリガーゼ活性は in vitro での Lunapark への自己ユビキチン化能を指標として測定した。組換えタンパク質 His-Lunapark をユビキチン活性化酵素 (E1), ユビキチン結合酵素 (E2), HA-ユビキチン, MBP-protein X と混合し 37°C で 1 時間反応させた。反応物を SDS-PAGE 後、抗 HA および抗 Lunapark 抗体によるイムノブロットを行った。

### 2-3) In cell ubiquitination assay

培養細胞内での Lunapark のユビキチンリガーゼ活性を検討した。HEK293 細胞に Lunapark-FLAG, HA-ユビキチン, HA-protein X を共発現させた。細胞からの抽出液を renature, denature 処理した後に抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。免疫沈降画分を SDS-PAGE 後に抗 HA, 抗 FLAG および抗 protein X 抗体によるイムノブロットを行った。

### 2-4) ショ糖密度勾配遠心法による Lunapark の多量体と単量体の分離

組換えタンパク質 His-Lunapark を単独または MBP-protein X と混合して 4°C で 1 時間混合した。反応物を 30% から 50% のショ糖密度勾配を作成したバッファーの上に載せ、4°C, 20 時間遠心した (200,000g)。遠心後の反応物を 300μl ずつ 17 個のフラクションにわけ (図 2)、各フラクションを SDS-PAGE 後、抗 Lunapark 抗体によるイムノブロットを行った。



### 2-5) 培養細胞の小胞体の染色

カバーガラスの上に培養している COS-7 細胞に (図 2) ショ糖密度勾配遠心法 CellLight ER-RFP, BacMam (ThermoFisher Scientific) を添加し、1 日後に細胞を PFA により固定した。また COS-7 細胞を PFA 固定後、抗 CLIMP-63 抗体により免疫染色を行った。細胞の観察は共焦点顕微鏡によりおこなった。

## 3 研究成果

### 3-1) Lunapark 結合タンパク質との結合に必要な Lunapark のドメインの決定

組換えタンパク質を用いて Lunapark の protein X 結合ドメインをプルダウンアッセイにより調べた。その結果 Lunapark の野生型は protein X と結合したが、C 末の coiled-coil ドメインを欠いた変異体とは結合しなかった。また HEK293 細胞内でも Lunapark の野

生型と protein X は結合したが coiled-coil ドメインを欠いた変異体とは結合しなかった。この結果より、protein X との結合には Lunapark の coiled-coil ドメインが必要であることがわかった。

### 3-2) Lunapark 結合タンパク質による Lunapark のユビキチンリガーゼ活性調節

組換えタンパク質 His-Lunapark および HA-ユビキチンを用いて *in vitro* ubiquitination assay を行った。Lunapark のユビキチンリガーゼ活性により Lunapark が自己ユビキチン化されるが、このユビキチン化は MBP-protein X の添加により顕著に抑制された。

次に培養細胞内での Lunapark のユビキチンリガーゼ活性を *in cell* ubiquitination assay により測定した。Lunapark-FLAG を発現した HEK293 細胞の抽出液を denature, renature 処理することによって Lunapark-FLAG を結合タンパク質から乖離させた後に抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。この方法を用いることにより、イムノブロットにより検出される免疫沈降画分中のユビキチンが Lunapark 由来であると限局することができる。Lunapark-FLAG のみを発現した場合、Lunapark-FLAG の免疫沈降画分に自己ユビキチン化によるラダー状のバンドが検出された。Lunapark-FLAG と HA-protein X を共発現させたところ、ラダー状のバンドが減弱していた。以上の結果より、protein X は Lunapark のユビキチンリガーゼ活性を抑制することがわかった。

### 3-3) Lunapark 結合タンパク質のノックダウンによる Lunapark のプロテアソームによる分解

siRNA を用いて HeLa 細胞内の protein X をノックダウンしたところ、protein X をノックダウンした細胞ではスクランブル siRNA をトランスフェクションしたコントロールの細胞に比べて内在性の Lunapark のタンパク量が有意に減少した。Protein X による Lunapark タンパク量の減少はプロテアソーム阻害剤 clasto-Lactacystin  $\beta$ -lactone により回復した。以上の結果より、protein X のノックダウンによってプロテアソームによる Lunapark の分解が亢進することがわかった。

### 3-4) Lunapark 結合タンパク質による Lunapark の多量体の促進

Lunapark は多量体を組むことが知られている。Lunapark の多量体化に対する protein X の効果を *in vitro* で検討した。His-Lunapark をショ糖密度勾配遠心法により多量体と単量体とに分離した。His-Lunapark はその多くが単量体であるが、一部は多量体を形成していた。次に His-Lunapark を MBP-protein X と 1 時間混合した後にショ糖密度勾配遠心法により分離した。その結果、His-Lunapark の多量体が顕著に増加した。以上の結果より protein X は Lunapark の多量体を促進することがわかった。

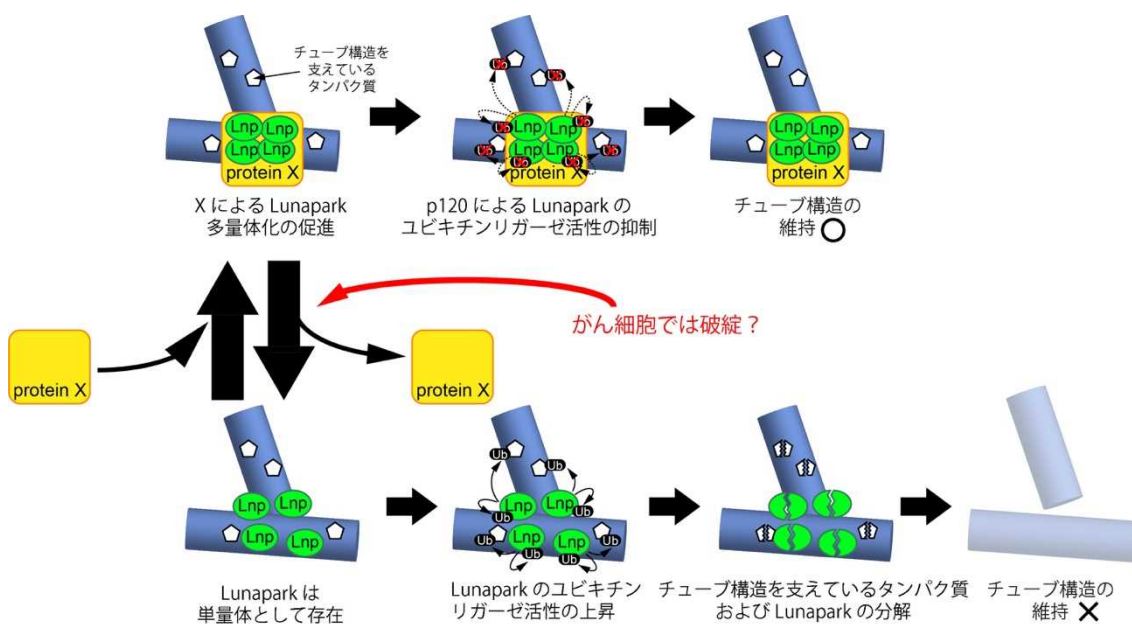
### 3-5) Lunapark 結合タンパク質のノックダウンによる小胞体の形状変化

Protein X をノックダウンした際に小胞体の形状が変化するかを観察した。粗面小胞体と滑面小胞体が両方とも染色される ER-RFP を COS-7 細胞に発現させ共焦点顕微鏡により観察した。コントロール細胞の小胞体は核の近辺に密に分布し、細胞膜近辺ではチューブ状に分布した。一方、protein X をノックダウンした細胞ではチューブ状の小胞体が見られなくなり、細胞質全体に小胞体が分布した。

次に粗面小胞体のマーカーである CLIMP-63 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。コントロール細胞では CLIMP-63 は核近辺にのみ分布したのに対して、protein X をノックダウンした細胞では細胞質に広く分布した。この結果より protein X のノックダウンに

より小胞体の形状がチューブ型からシート型へと変化することがわかった。

以上の研究結果より、**protein X**は**Lunapark**の多量体化を促進しユビキチンリガーゼ活性を抑制することが分かった。この時、小胞体では**Lunapark**はチューブ構造を支えているタンパク質をユビキチン化して分解することができないため、チューブ構造は安定していることが考えられる。一方**protein X**がない時には**Lunapark**が単量体になりユビキチンリガーゼ活性が上昇するため、チューブ構造を支えているタンパク質および**Lunapark**自身の分解が起こり、チューブ構造が不安定になる。その結果、チューブ構造の減少とシート構造の増加という小胞体の形状変化が起こると考えられる(図3)。一方、粗面小胞体上のリボソームで合成されたタンパク質は各オルガネラへ小胞によって輸送されることから、シート構造を持つ粗面小胞体とチューブ構造を持つ滑面小胞体のバランスを調節することが細胞内小胞輸送の制御に大きく関わることを考えられる。細胞内小胞輸送はがんの悪性化に密接に関わっていることから、**Lunapark**と**protein X**による小胞体の形状調節機構ががん化の抑制に果たす役割についてさらに研究を進めることは非常に有意義であると考えられる。



(図3) Lunapark と protein X による小胞体の形状変化の調節機構

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により小胞体の形状変化の新たな分子機構として、**protein X**による**Lunapark**のユビキチンリガーゼ活性調節機構を世界に先駆けて発見した。小胞体の形状の可塑性とがん化についての研究は例がなく、本研究を今後推し進めていくことにより新たながんに対する創薬のターゲットとしての展開も考えられる。従って本研究の波及効果は学術的のみならず、医学的にも極めて大きいと考えている。

がんに対する防御システムを解明できれば、創薬への貢献のみならず、がんを予防するために適した生活習慣の改善の研究など多方面に波及効果が見られると期待される。