

57. ユビキチン化を標的とした閉塞性肺疾患の創薬研究

沖米田 司

Key words : ユビキチンリガーゼ, 嚢胞性線維症

*関西学院大学 理工学部 生命科学科
生命医化学専攻 沖米田研究室

緒 言

CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) は肺や消化器など上皮細胞のアピカル形質膜に発現する塩素イオンチャネル (膜タンパク質) であり, その発現・機能異常は致死的な遺伝性難病である嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis: CF, 白人間で頻度が高い遺伝病, 全世界に7万人の患者) を引き起こす. また近年, CFTR の発現低下が慢性閉塞性肺疾患 (COPD, 毎年世界で300万人が死亡, 世界死因4位) の原因になる可能性が報告されている. 現在これらの疾患に対して, 抗生物質などを用いた対症療法が行われているが, 根本的な治療法がないため, 新規治療法の開発が世界中で強く望まれている. 遺伝的ストレス (遺伝子変異, 9割のCF患者は $\Delta F508$ -CFTR変異を持つ) や環境ストレス (COPDの主要原因のタバコ煙など) によるCFTR形質膜発現の低下がCFやCOPD病態発症に深く関与する事から, CFTR膜発現の改善はこれら難治性肺疾患の新規治療法になると考えられている. 我々はこれまでに構造異常を有するCFTRを形質膜から分解・除去する形質膜タンパク質品質管理機構 (Peripheral Quality Control) を世界で初めて明らかにし, 形質膜の異常CFTRは分子シャペロンHsc70およびHsp90に認識され, シャペロン結合ユビキチンリガーゼCHIPによりユビキチン化される結果, 形質膜から速やかに分解・除去される事を明らかにした^{1,2)}.

最近, 我々はCFTR形質膜発現量を規定するユビキチン化機構の全貌解明を目的に, ヒトゲノムに存在する約600種類のユビキチンリガーゼsiRNAスクリーニングを行った. その結果, CF患者由来気道上皮細胞株においてCFTR変異体の形質膜発現を劇的に改善する新規ユビキチンリガーゼ (5種類) を同定した. 同定した新規ユビキチンリガーゼはこれまで機能解析が行われておらず, その作用機構は全く不明である. そこで, 本研究では難治性肺疾患の新しい根治薬開発を目指すため, ①CFTRの膜発現を抑制する新規ユビキチンリガーゼの作用機序を解明し, ②その阻害剤開発のための評価系確立を目的とした.

方 法

1. 新規ユビキチンリガーゼ過剰発現の影響

我々が同定した新規HECT型, および, RING型ユビキチンリガーゼ (E3) 過剰発現による $\Delta F508$ -CFTR発現量への影響を検討するために, HAタグを付加した $\Delta F508$ -CFTRと共にmycタグを付加したHECT型E3またはRING型E3をCOS-7細胞に強制発現させた. $\Delta F508$ -CFTRの発現量はウエスタンブロット法により解析した. さらに, HECT型E3, または, RING型E3の作用に必要なドメインを同定するために, mycタグを付加した様々なE3変異体を作製した. これらの変異体をCOS-7細胞に $\Delta F508$ -CFTRと共発現させ, ウエスタンブロット法により $\Delta F508$ -CFTR発現量への影響を検討した.

2. 新規HECT型E3における $\Delta F508$ CFTR相互作用領域の解析

HECT型E3における $\Delta F508$ CFTR相互作用領域を同定するために, mycタグを付加した様々なHECT型E3変異体を $\Delta F508$ -CFTR安定発現HeLa細胞に一過性に発現させた. ライセート回収後, 抗myc抗体を用いて免疫沈降法を行い, 共沈した $\Delta F508$ -CFTRをウエスタンブロット法により解析した.

*現所属 : 関西学院大学 理工学部 生命医化学科 沖米田研究室

3. 新規 E3 の細胞内局在解析

我々が同定した新規ユビキチンリガーゼは小胞体、または、post-Golgi 区画で Δ F508-CFTR をユビキチン化し、分解促進している可能性が高い。新規ユビキチンリガーゼ (HECT 型、および、RING 型 E3) の細胞内局在を検討するために、GFP 融合タンパク質を作製し、HeLa 細胞に強発現させた後、共焦点レーザー顕微鏡により細胞内局在を解析した。ユビキチンリガーゼ変異体の細胞内局在も同様に解析した。

4. 新規 RING 型 E3 結合因子の探索

我々が同定した新規 RING 型 E3 は、単独ではなく、複数の分子と複合体を形成して Δ F508-CFTR のユビキチン化を制御していることが考えられる。RING 型 E3 結合タンパク質を同定するために、BioID (proximity-dependent biotin identification) 法を行った。ビオチンリガーゼ (BirA) 融合ユビキチンリガーゼを構築し、その発現、および、近隣分子のビオチン化の有無をウエスタンブロット法、および、免疫蛍光染色法で確認した。

結 果

1. 新規ユビキチンリガーゼ過剰発現の影響

Myc タグを付加した新規 HECT 型 E3 を HA タグを付加した Δ F508-CFTR と共に COS-7 細胞に強制発現させ、 Δ F508-CFTR の発現量をウエスタンブロット法で解析した結果、HECT 型 E3 の発現量に依存して、 Δ F508-CFTR 発現量が減少した (図 1A)。一方、小胞体関連分解の基質である TCR α の発現量には影響しなかった (図 1A)。HECT 型 E3 変異体を用いて同様の実験を行った結果、HECT domain 変異体 (Δ HECT, C1018A) やアミノ末端欠失変異体 (Δ NT) ではその効果は見られなかった (図 1B)。従って、新規 HECT 型 E3 による Δ F508-CFTR 発現低下には、HECT domain およびアミノ末端の領域が必要であることが考えられた。

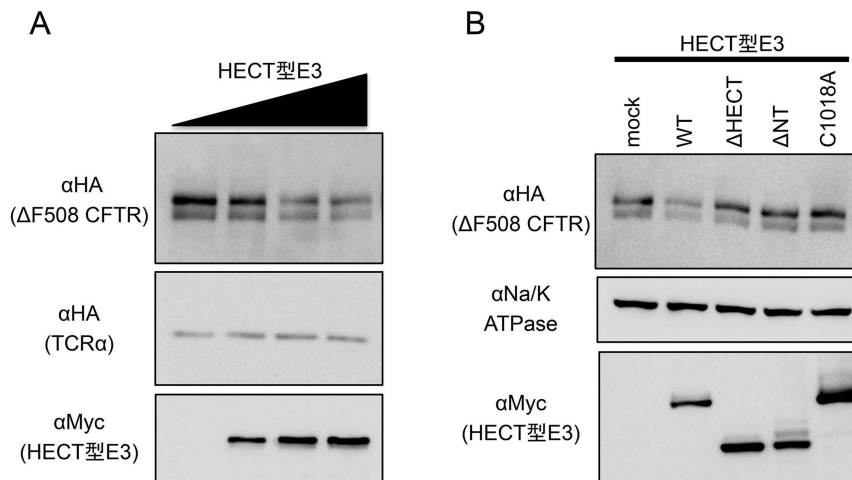


図 1. HECT 型ユビキチンリガーゼ (E3) 過剰発現による Δ F508 CFTR 発現量への影響。

HECT 型 E3 の発現量に依存して、 Δ F508 CFTR 発現量が減少したが、小胞体関連分解の基質である TCR α の発現量には影響しなかった (A)。HECT 型 E3 発現による Δ F508 CFTR 発現減少効果は、HECT domain 変異体 (Δ HECT, C1018A) やアミノ末端欠失変異体 (Δ NT) では見られなかった (B)。Na/K ATPase はローディングコントロールとして使用した。

また、Myc タグを付加した新規 RING 型 E3 においても同様の実験を行った結果、RING 型 E3 の発現量に依存して、 Δ F508-CFTR 発現量が減少した (図 2A)。一方、野生型 (WT) CFTR や小胞体関連分解の基質である TCR α の発現量には影響しなかった (図 2A)。変異体を用いて同様の実験を行った結果、RING domain 変異体 (Δ RING, H496A) で

はその効果は見られなかった (図 2B). 従って, 新規 RING 型 E3 による Δ F508-CFTR 発現低下には, RING domain が必要であることが考えられ, ユビキチン化による制御が強く示唆された.

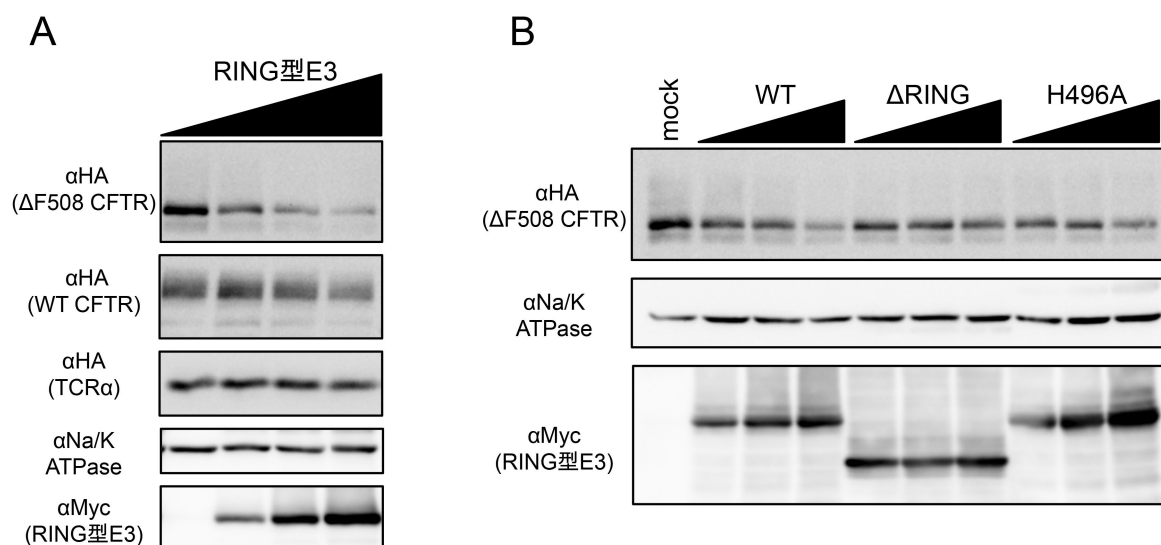


図 2. 新規 RING 型ユビキチンリガーゼ (E3) 過剰発現による Δ F508 CFTR 発現量への影響.

A) RING 型 E3 の発現量に依存して, Δ F508 CFTR 発現量が減少したが, WT CFTR や小胞体関連分解の基質である TCR α の発現量には影響しなかった. B) RING 型 E3 発現による Δ F508 CFTR 発現減少効果は, RING domain 変異体 (Δ RING, H496A) では見られなかった. Na/K ATPase はローディングコントロールとして使用した.

2. 新規 HECT 型 E3 における Δ F508 CFTR 相互作用領域の解析

HECT 型 E3 における Δ F508 CFTR 相互作用領域を同定するために, myc タグを付加した様々な HECT 型 E3 変異体を Δ F508-CFTR 安定発現 HeLa 細胞に一過性に発現させ, 抗 myc 抗体を用いて免疫沈降法を行い, 共沈した Δ F508-CFTR をウエスタンブロット法により解析した. その結果, 野生型 (WT) HECT 型 E3 と Δ F508-CFTR のわずかな相互作用が観察された (図 3, lane 2). 興味深い事に, HECT domain 変異体 (Δ HECT, C1018A) は野生型に比較して Δ F508-CFTR と強く相互作用することが観察された (図 3, lane 3, 5). 一方, アミノ末端欠失変異体 (Δ NT) は Δ F508-CFTR との相互作用が観察されなかった (図 3, lane 4). 従って, 新規 HECT 型 E3 はアミノ末端領域を介して Δ F508-CFTR と相互作用する可能性が考えられた.

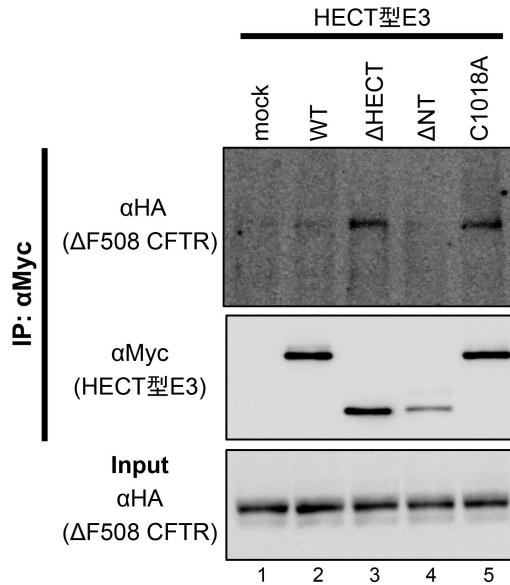


図3. HECT 型ユビキチンリガーゼ (E3) と ΔF508 CFTR の相互作用解析.

ΔF508 CFTR との結合は、HECT 型 E3 のアミノ末端領域 (NT) は必要であるが、HECT domain は必要ないと考えられる。

3. 新規 E3 の細胞内局在解析

新規ユビキチンリガーゼ (HECT 型 E3, RING 型 E3) の細胞内局在を検討するために、GFP 融合タンパク質を作製し、HeLa 細胞に強発現させた後、共焦点レーザー顕微鏡により細胞内局在を解析した結果、HECT 型 E3 は主に細胞質に局在することが考えられた。一方、RING 型 E3 は細胞内に点状に局在し、オルガネラマーカを用いた二重染色法を行った結果、エンドソームマーカと共局在することから、エンドソームに局在することが考えられた。

4. 新規 RING 型 E3 結合因子の探索

BirA (R118G) 融合 RING 型 E3 発現コンストラクトを作製し、その発現確認を免疫蛍光染色法で行った結果、BirA (R118G) 融合 RING 型 E3 はエンドソームに局在していた (図4)。従って、BirA (R118G) 融合により RING 型 E3 の細胞内局在は影響を受けないことがわかった。さらに、BirA (R118G) 融合 RING 型 E3 に相互作用するタンパク質がビオチン化されているか否かを、Alexa-568 標識ストレプトアビジンを用いて蛍光染色法を行った結果、BirA (R118G) 融合 RING 型 E3 の染色像と、Alexa-568 標識ストレプトアビジン染色像の共局在が確認された (図4)。従って、BirA (R118G) 融合により、RING 型 E3 に結合するタンパク質は選択的にビオチン化されることが考えられた。さらに、アビジンビーズにより、ビオチン化されたタンパク質の単離にも成功した。

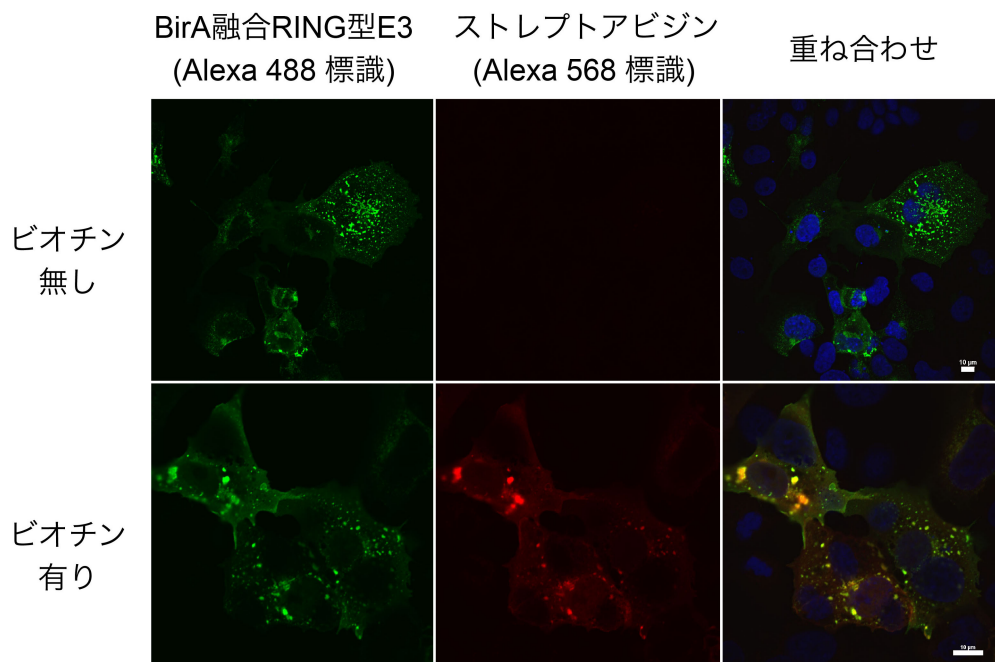


図4. BirA 融合 RING 型ユビキチンリガーゼ (E3) による近隣タンパク質のビオチン化.

ビオチン存在下において, BirA (R118G) 融合 RING 型 E3 が局在する細胞内領域には, Alexa 568-ストレプトアビジンにより標識されたビオチン化タンパク質が存在した. 従って, BirA (R118G) 融合 RING 型 E3 は近隣タンパク質を選択的にビオチン化することが考えられた. Scale bar: 10 μ m.

考 察

本研究成果より, 新規 HECT 型 E3, および, 新規 RING 型 E3 による Δ F508-CFTR 発現減少には, それぞれ HECT domain, RING domain が必要であることから, これらの分子はユビキチン化を介して Δ F508-CFTR 発現制御を行っていると考えられる. 変異体解析, および, 免疫沈降法の結果, HECT 型 E3 はアミノ末端領域を介して Δ F508-CFTR と結合していると考えられる. 細胞内局在解析の結果, 新規 HECT 型 E3 は細胞質で, 新規 RING 型 E3 はエンドソームにおいて Δ F508-CFTR のユビキチン化を制御していると考えられる. HECT 型 E3 は Δ F508 CFTR 未成熟型を減少されることから, 特に小胞体の細胞質側で機能していると考えられる. BirA (R118G) 融合 E3 により, 近隣タンパク質の選択的なビオチン化に成功したことから, 今後, 新規 HECT 型 E3, および, 新規 RING 型 E3 の結合タンパク質を網羅的に解析することにより, その詳細なユビキチン化機構の解明を行う予定である. また, Δ F508-CFTR 結合領域の解析を進めることで, 新規 HECT 型 E3, および, 新規 RING 型 E3 の基質認識領域を同定し, Δ F508-CFTR と E3 相互作用を定量する *in vitro* 評価系を確立し, Δ F508-CFTR ユビキチン化阻害薬の探索へ応用する予定である.

文 献

- 1) Okiyoneda, T., Barrière, H., Bagdány, M., Rabeh, W. M., Du, K., Höhfeld, J., Young, J. C. & Lukacs, G. L. : Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*, **5993** : 805-810, 2010.
- 2) Okiyoneda, T., Apaja, P. M. & Lukacs, G. L. : Protein quality control at the plasma membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23** : 483-491, 2011.