

## 論文の内容の要旨

氏名：宮本 梓

博士の専攻分野の名称：博士 (生物資源科学)

論文課題：細胞膜透過性 SOCS2 を用いた細胞増殖抑制と SOCS2 タンパク質の分解機構に関する研究

### 1. 序論

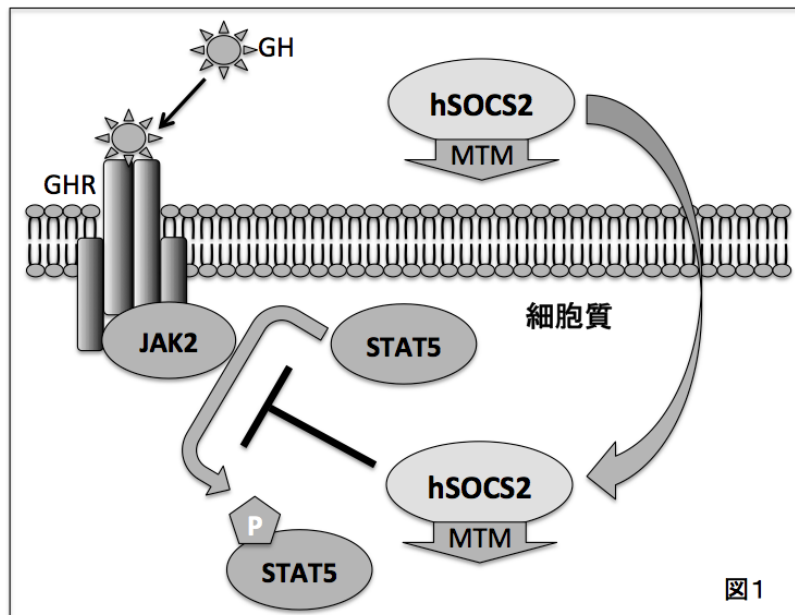
サイトカインシグナル抑制因子(Suppressor of cytokine signaling: SOCS)は、サイトカインにより誘導される JAK / STAT (Janus kinase / Signal transducers and activators of transcription)シグナルの負の制御因子である。SOCS は細胞質において、サイトカイン受容体や JAK 複合体のリン酸化チロシンに結合することや、結合タンパク質のプロテアソーム分解を促進することにより、JAK / STAT シグナル伝達を抑制する。SOCS は、SOCS1~7 および CIS (Cytokine inducible SH2 protein)からなるファミリーを形成している。

本研究の対象である SOCS2 は、成長ホルモン(Growth hormone: GH)シグナルの負の制御因子として知られている。これまでの研究から SOCS2 欠損マウスは野生型マウスより約 40%大きく成長することが報告されている。また、肝臓癌、前立腺癌、肺癌等において SOCS2 の発現低下が観察されるが、これには SOCS2 遺伝子プロモーター領域のメチル化、SOCS2 mRNA に結合する低分子 RNA による翻訳阻害が関与している。さらに、ヒトでは脳下垂体の腫瘍などによる GH の過剰分泌により、四肢先端部が過成長する先端巨大症が知られている。したがって、SOCS2 は癌や先端巨大症の治療法を開発する上で重要な標的分子と考えられる。

現在、外科的切除以外の癌治療では、主に抗がん剤や放射線が用いられるが、これらは副作用が大きい。これに対し、分子標的薬 (抗体薬も含む) の開発や個人の遺伝子情報と薬を一致させるプレシジョンメディシンの開発が進んできている。しかし、癌に関係する分子機構は非常に複雑であるため、癌の制圧は難しく、現在も日本人の死因の 1 位である。近年開発中の治療法の中には癌抑制遺伝子の補充を試みたものがある。これらはドラッグデリバリーシステムとしてウイルスや遺伝子修飾試薬を使用しているが、感染による副作用や導入効率、宿主ゲノムに対する遺伝子組換えの問題がある。一方、先端巨大症は難病指定の疾患であり、治療法に関しては脳下垂体腫瘍の切除や対処療法となる投薬のみである。以上のことから、癌や先端巨大症に関しては遺伝的に安全な分子標的薬の開発が望まれている。

そこで、本研究では標的タンパク質を直接細胞に導入することができる細胞膜透過性タグを SOCS2 タンパク質に応用することを考えた (第 1 章)。細胞膜透過性タグに関しては、近年活発に開発されており、脂溶性アミノ酸や塩基性アミノ酸を多く含む 8-25 アミノ酸残基からなるペプチドが報告されている。本研究では SOCS2 と相同性が高い SOCS3 に関して成功例がある MTM タグ (FGF4 の小胞体移行シグナルペプチド由来 ; AAVLLPVLLAAP) を選択した。細胞膜透過性タンパク質は主にエンドサイトーシスで細胞に導入されるため、オートファジーによる分解を受けやすい。また、細胞質に導入できた場合も、プロテアソームやプロテアーゼにより分解され短寿命となる可能性がある。細胞膜透過性タンパク質をタンパク質療法に応用する場合、患者への投与回数を減らすためには、投与タンパク質を長寿命化する必要がある。しかし、SOCS2 タンパク質の細胞内での分解機構はほとんど明らかにされていない。

そこで、本研究では SOCS2 タンパク質の分解機構に関しても解明を試みた（第2章）。特に、分解に重要なアミノ酸残基やその修飾状態を解明できれば、当該アミノ酸を置換することで長寿命化タンパク質の作製が期待できる。



## 2. 細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質発現系の確立

### 2.1 大腸菌発現系および精製系の構築

細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質の発現系は、将来的にタンパク質療法への応用を視野に入れ、工業的スケールでの生産が可能な大腸菌発現系を用いた。精製用の His タグが融合可能な pET システムベクターに、ヒト SOCS2 及び MTM を N 末、C 末に配置した組換え体を構築した。IPTG 添加により目的タンパク質を封入体に発現させ、超音波破碎と遠心分離により封入体を粗精製した後、グアニジン塩酸により可溶化した。変性状態において Ni レジンをを用いて精製した後、透析によりリフォールディングを行った。各種細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質は良好な発現を示した。精製過程のタンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、C 末端側に MTM を融合した SOCS2 タンパク質は、分解されやすいことが判明したが、いずれの組換えタンパク質も機能解析の実施には十分な精製度とタンパク質量を確保できる産生系を確立することができた。

### 2.2 細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質の機能解析

細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質の細胞内への導入について MCF-7 細胞を用いて検討した。共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメーター、導入細胞抽出液のウエスタンブロット解析から、MTM 融合 SOCS2 タンパク質は細胞内に効率よく導入され、細胞質に局在することが明らかになった。次に GH 依存増殖性癌細胞株の増殖に対する影響を検討した。その結果、細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質は細胞増殖を抑制した。しかしながら、細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質添加による影響を受けない細胞種も存在した。次に、細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質の GHR との相互作用について免疫沈降／ウエスタンブロットングにより解析した。その結果、*in vitro* 及び細胞内において、細胞膜透過性 SOCS2 は GHR の 595 番目のチロシン残基のリン酸化依存的な相互作用が明らかになった。しかし、C 末端側に MTM を融合した SOCS2 タンパク質の GHR との結合能は弱かった。これは、C

末端側に MTM を融合したことにより SOCS2 の SH (Src homology) 2 ドメイン (リン酸化チロシンに結合) の構造が変化したためと考えられる。さらに、GH / JAK2 / STAT5 シグナルについてウエスタンブロット、ルシフェラーゼ解析、定量 PCR により確認した結果、細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質は、GH シグナルを抑制することが明らかになった。

### 3. SOCS2 タンパク質の翻訳後修飾と分解機構の解明

SOCS2 タンパク質が関与する細胞内タンパク質の分解機構に関しては、GHR と SOCS2 が相互作用し GHR のプロテアソーム分解を促進すること、SOCS box を介して elongin B/C と結合して安定化することなどが報告されている。しかしながら SOCS2 自体の分解機構に関しては明らかにされていない。そこで本研究では、翻訳阻害剤とプロテアソーム阻害剤を用いて、細胞内における SOCS2 タンパク質存在量の経時的な変化を測定し、プロテアソームによる SOCS2 分解機構について検討した。その結果、SOCS2 タンパク質の 60-70% がプロテアソームにより分解されることが推察された。さらに、SOCS2 タンパク質の修飾とプロテアソーム分解について検討を行った。既報の網羅的プロテオーム解析により、SOCS2 は 30 番目のセリン残基がリン酸化されることが知られている。一部のタンパク質では、リン酸化依存的にユビキチンリガーゼがリクルートされ、プロテアソーム分解が誘導されることが報告されていることから、SOCS2 に関しても同様な分解機構を推定した。そこで、30 番目セリン残基をアラニン (非リン酸化型) とアスパラギン酸 (電荷的なリン酸化模倣型) に置換した変異体を作製し、その分解速度を野生型と比較した。これらの変異体を発現した細胞に翻訳阻害剤シクロヘキシミドを添加し、経時的にタンパク質存在量を測定するパルスチェイスアッセイを行った結果、アラニン置換体は半減期が 10 倍以上延伸したが、アスパラギン酸換体の半減期は野生型とほぼ同様であった。このことから 30 番目のセリン残基のリン酸化が、SOCS2 タンパク質のプロテアソームによる分解に関与することが推測された。次に、SOCS2 の 30 番目のセリン残基をリン酸化する酵素について検討した。周辺のアミノ酸配列から推定されるキナーゼを検索した結果、細胞増殖や細胞周期に関与する ERK1/2 や CDK (サイクリン依存性キナーゼ) の関与が推察された。本研究では各種阻害剤を利用して ERK 経路を中心に解析を行った。EGF 刺激により Ras / MEK / ERK シグナルを活性化する実験系において、MEK 阻害剤を使用して解析した結果、SOCS2 の 30 番目セリン残基が ERK1/2 によりリン酸化されることが明らかになった。

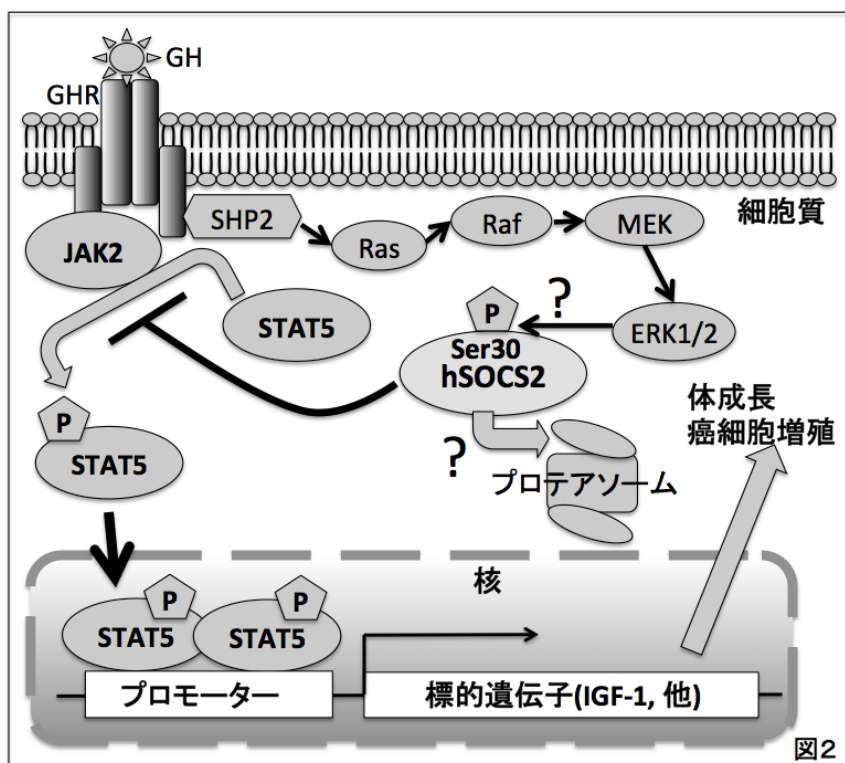


図2

#### 4. 総括

タンパク質療法の開発を目的として、細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質の生産方法とその機能について基礎的な研究を実施し、以下のようないくつかの新知見を得た。

- 1) 細胞膜透過性 SOCS2 の大腸菌発現系を構築し、効率的に細胞膜透過性タンパク質を調製する方法を確立した。
- 2) 細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質は高効率で細胞内に導入されること、GHR との結合能および GH シグナル依存的な細胞増殖を抑制することを明らかにした (図1)。
- 3) より安定性の高い SOCS2 タンパク質の創生を目的として、SOCS2 タンパク質の細胞内での分解機構について検討した。その結果、30 番目のセリン残基が ERK1/2 によりリン酸化されることで SOCS2 はプロテアソーム分解を受けることをはじめて明らかにした。これらの結果から GH は ERK を介したシグナル伝達経路を利用して、ERK シグナルの阻害タンパク質である SOCS2 を分解し、自身の増殖シグナルを増強する可能性が明らかになった (図2)。

以上の細胞膜透過性 SOCS2 の発現系の確立や SOCS2 の分解機構の解明ははじめての報告であり、今後これらの細胞膜透過性タンパク質を応用した癌や先端巨大症の新しい治療法の開発が期待される。