

## 論文審査の結果の要旨

氏名：宮本 梓

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題目：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

審査委員：（主査） 教授 関 泰一郎  
（副査） 教授 花澤 重正  
（副査） 教授 高橋 恭子  
（副査） 教授 司馬 肇  
（副査） 准教授 舩廣 善和

本学位論文では、細胞膜透過性のアミノ酸配列を付与したタンパク質の発現ベクターの構築、細胞内への効率的なタンパク質のデリバリーシステムの確立を目的とし、将来的に病気の治療法などへの応用が可能な分子細胞生物学的な技術に関する基礎研究を実施した。

本研究では、サイトカインにより活性化される Janus kinase / Signal transducers and activators of transcription (JAK / STAT) シグナルを制御する Suppressor of cytokine signaling (SOCS) に着目している。SOCS は各種サイトカイン受容体, JAK 複合体のリン酸化チロシンに結合し、また、プロテアソームによるその複合体の分解を促進することにより JAK / STAT シグナルを抑制する。SOCS は、SOCS 1-7 をはじめいくつかの分子種から構成されるファミリーを形成している。これらの分子のうち本研究では、成長ホルモン (Growth hormone, GH) シグナルを制御する SOCS2 をターゲットとしている。SOCS2 の遺伝子欠損マウスは、野生型マウスと比較してより大きく成長すること、肝臓癌、前立腺癌、肺癌など、いくつかの癌において SOCS2 の発現低下が報告されている。

第一章では、SOCS2 を直接細胞に導入することができる細胞膜透過性タグの応用を考え、SOCS2 との融合タンパク質をデザインし、その発現系の確立を行った。細胞膜透過性タグは、近年活発に開発されており、脂溶性アミノ酸、塩基性アミノ酸を中心とした 8-25 アミノ酸残基から構成されるペプチドが報告されている。本研究では FGF4 の小胞体移行シグナルペプチド由来の配列である AAVLLPVLLAAP を参考にした MTM タグを選択している。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採用し、精製の 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 末に配置したユニークな組換え体を構築した。IPTG 添加によりこれらの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、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う調製方法を確立した。本研究でデザインした各種細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質はいずれも良好な発現を示し、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することが可能となった。また、精製過程における各タンパク質の安定性についても詳細に検討しており、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なども明らかにしている。これらのデータは、基本的な細胞内でのタンパク質の安定性、分解機構を考える上でも興味深い知見である。

上述の方法で調製した細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質の細胞内への導入については、MCF-7 細胞を用いて評価している。共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメーター、ウエスタンブロット解析から、MTM 融合 SOCS2 タンパク質は効率よく細胞内に導入され、主に細胞質に局在することを明らかにした。さらに、ヒト由来肝癌細胞 HepG2 をはじめ MCF-7, A-549, SK-MEL-28, PC-3 細胞の GH 依存増殖性の増殖に対する影響について検討した。その結果、細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質、特に C 末端に MTM を配置した細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質は細胞増殖を強力に抑制したが、これらの細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質による影響を受けない細胞種も存在した。細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質の GHR との相互作用については免疫沈降により解析を行い *in vitro* 及び細胞内に

において、細胞膜透過性 SOCS2 と 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を明らかにした。さらに、GH/JAK2/STAT5 シグナルについてウエスタンブロット、ルシフェラーゼアッセイ、定量 PCR により解析を行い、細胞膜透過性 SOCS2 タンパク質が GH シグナルを抑制することを証明している。

第二章では SOCS2 タンパク質の翻訳後修飾と分解機構について解明した。SOCS2 タンパク質の細胞内での安定性や分解機構に関しては、GHR と SOCS2 が相互作用すると GHR のプロテアソーム分解が促進されること、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、各種翻訳阻害剤、プロテアソーム阻害剤を用いて、細胞内における SOCS2 タンパク質の分解速度を解析し、特に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可能性を明らかにした。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追究している。既報の網羅的プロテオーム解析の結果から SOCS2 の 30 番目のセリン残基のリン酸化に注目し、30 番目の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、これらの置換体タンパク質の分解速度を野生型と比較した。その結果、アラニン置換体は半減期が 10 倍以上延伸したが、アスパラギン酸置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、また、各種阻害剤を利用した検討から 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を世界に先駆けてはじめて明らかにしている。

以上のように本論文では、タンパク質療法の開発を最終目的として、細胞膜透過性 SOCS2 の発現系を確立し、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た。さらに、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追究し、これまでに明らかにされていなかった SOCS2 の細胞内での分解機構の一端をはじめて明らかにした。今後、これらの知見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。

本論文は、将来的に医療や創薬などへの応用にも繋がる基礎的な知見を多く提供するものであることを審査員一同確認し、これらの知見は学術上、応用上貢献するところも大きく、博士(生物資源科学)の学位を授与されるに値するものと認めた。

以 上

平成 31 年 2 月 21 日