

みにれびゅう

1 回膜貫通タンパク質 EphB2 のユビキチン-プロテアソーム系による分解

奥村 文彦¹, 嘉村 巧²

1. はじめに

さまざまなタンパク質がユビキチン修飾を受け、プロテアソームに認識され分解されることが知られている。一方、膜タンパク質がプロテアソームに認識され分解されるためには、膜から引き抜く機構が必要となるが我々はその機構に依存しない分解経路を報告したので紹介したい。受容体型チロシンキナーゼ Erythropoietin-producing human hepatocellular (Eph) B2 は、さまざまながん細胞で高発現している 1 回膜貫通タンパク質であるが、興味深いことにがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子として真逆の役割が報告されている^{1,2)}。この EphB2 の細胞外ドメインはリガンドであるエフリン (ephrin) 刺激依存的にメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP-2/MMP-9) で切断除去される。一方、残りの部分は細胞膜貫通領域が残っているために細胞膜に局在するが、その後、γセクレターゼにより切断されチロシンキナーゼ活性を持つ細胞内ドメインは細胞質に遊離する。細胞内ドメインはプロテアソーム依存的に分解されることが知られていたが、対応するユビキチンリガーゼは不明であった。

我々は SPRY domain and SOCS box-containing protein (SPSB) 4 が EphB2 を認識するユビキチンリガーゼであることを最近報告したので紹介したい³⁾。また、EphB2 は細胞間反発運動を引き起こす受容体であることが知られていたが (エフリン発現細胞と EphB2 発現細胞が接触すると互いに

遠ざかる方向へ移動する)⁴⁾、SPSB4 ノックダウンにより EphB2 細胞内ドメインの蓄積と細胞間反発運動の亢進がみられた。これらのことは SPSB4 が EphB2 を介した細胞間反発運動を抑制し、適切な細胞内局在やがん浸潤などに関与している可能性を示唆している。

2. ユビキチンリガーゼ SPSB4 は EphB2 を認識しポリユビキチン修飾する

ユビキチンリガーゼ SPSB4 は SPRY [repeats in spore lysis A (splA) and ryanodine receptor (RyR)] ドメインと SOCS (suppressor of cytokine signaling) ボックスを有するタンパク質であり、SPSB1, SPSB2, SPSB3, SPSB4 からなるファミリーの一員である (図 1)。SPRY ドメインはタンパク質間相互作用に寄与し、SOCS ボックスはユビキチンリガーゼ活性に寄与する^{5,6)}。我々は SPSB ファミリーの基質タンパク質を探索するため、FLAG タグを付加した SPSB1, SPSB2, SPSB3, SPSB4 をヒト胎児腎細胞 293T (HEK293T) にそれぞれ発現させ、FLAG-SPSB1, FLAG-SPSB2, FLAG-SPSB3, FLAG-SPSB4 に結合するタンパク質を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降により精製した。免疫沈降サンプルを SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) で分離し、トリプシン消化後、質量分析機を用いて各結合タンパク質を同定した。その結果、SPSB1 と SPSB4 の基質候補として EphB2 を同定した。質量分析

¹ 福岡女子大学国際文理学部食・健康学科 (〒813-8259 福岡県福岡市東区香住ヶ丘 1-1-1)

² 名古屋大学大学院理学研究科 (〒464-8602 愛知県名古屋市中種区不老町)

Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of single-pass transmembrane protein EphB2

Fumihiko Okumura¹ and Takumi Kamura² (¹Department of Food and Health Sciences, International College of Arts and Sciences, Fukuoka Women's University, A-603 Fukuoka Women's University, 1-1-1 Kasumigaoka, Higashi-ku, Fukuoka, 813-8529, Japan, ²Department of Biological Science, School of Science, Nagoya University Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi 464-8602, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910681

© 2019 公益社団法人日本生化学会

ユビキチンリガーゼ活性 ← SOCS ボックス

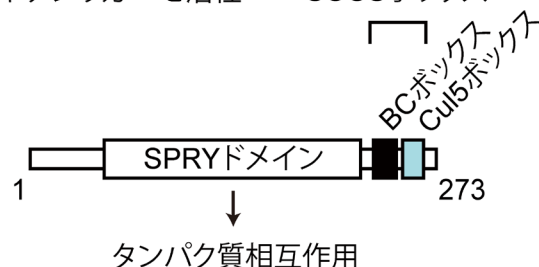


図 1 SPSB4 の構造

273 アミノ酸からなる。SPRY ドメインはタンパク質間相互作用に寄与すると考えられる。BC ボックスは Elongin B, Elongin C と結合する。Cul5 ボックスは Cullin 5 と結合する。BC ボックスと Cul5 ボックスを合わせて SOCS ボックスという。SOCS ボックスを有するタンパク質はユビキチンリガーゼ活性を持つことが多い。

の結果を確認するため、EphB2を発現させたHEK293T細胞にそれぞれのSPSBファミリータンパク質を同程度発現させ、EphB2との結合を比較した結果、SPSB1あるいはSPSB4との結合が確認できた。特にSPSB4が強くEphB2と結合した。SPSBファミリーのうちSPSB1とSPSB4のアミノ酸配列の類似性が高いこともこの結果を支持すると考えられる⁷⁾。EphB2のリガンドの一種であるephrin-B2刺激による影響を解析したところ、リガンド刺激はSPSB4とEphB2の結合に影響しないことが明らかとなった。次に内在性EphB2との結合を確認するためにさまざまな細胞株を解析した結果、大腸がん細胞株Colo201がEphB2を発現していることを見いだした。SPSB1あるいはSPSB4を安定発現させたColo201細胞を用いて内在性EphB2との結合を比較したが、SPSB4の発現がSPSB1よりも強かったため比較することはできなかった。しかしながら、すべてのデータを考慮すると主にSPSB4がEphB2を認識するユビキチンリガーゼであると推測された。すでに報告されているようにephrin-B2刺激はEphB2の切断を引き起こすが、プロテアソーム阻害剤存在下ではいくつかの長さの違うフラグメント (long fragment: LF, C-terminal fragment: CTF, EphB2/LF, EphB2/CTF1, EphB2/CTF2) が確認される^{8,9)} (図2)。そこでEphB2細胞内ドメイン (EphB2-CD)

に対するユビキチン修飾を*in vivo*で解析した。HEK293T細胞にFLAG-タグを付加したEphB2-CD-FLAG, HAタグを付加したSPSB1 (HA-SPSB1), HA-SPSB2, HA-SPSB3, HA-SPSB4, ヒスチジンタグを付加したユビキチン (His₆-Ub) を発現させ、8 Mol/L尿素存在下でニッケルビーズを用いてHis₆-Ubを精製した。SDS-PAGEで分離後ウェスタンブロットティングを行い、抗FLAG抗体を用いてEphB2-CD-FLAGを検出し、ユビキチン化による分子量の増加を解析した。HA-SPSB1, HA-SPSB2, HA-SPSB3, HA-SPSB4を同程度発現させることができなかったため単純に比較できなかったが、HA-SPSB4を発現させるとEphB2-CD-FLAGのユビキチン化が亢進したため、SPSB4はEphB2-CD-FLAGを標的とするユビキチンリガーゼであることが示された。EphB2の597番目と603番目のチロシン残基はキナーゼ活性に必要であることが報告されており¹⁰⁻¹²⁾、キナーゼ活性の有無がSPSB4との結合に関与しているかを調べた結果、野生型とY597/603F二重変異体どちらもSPSB4と結合したため、EphB2のキナーゼ活性はSPSB4との相互作用に影響しないことが明らかとなった。この結果はリガンド刺激がEphB2とSPSB4の結合に影響しないことと一致する。これらの結果より、SPSB4がEphB2細胞内ドメインに対する主要なユビキチンリガーゼであると結論づけた。

3. SPSB4は細胞間反発運動を抑制する

SPSB4によるEphB2の分解誘導がどのような生理的役割を担っているのかを明らかにするために、SPSB4ノックダウンColo201細胞を樹立した。リガンド刺激により全長EphB2は細胞膜内で切断され、細胞外ドメインと細胞内ドメインに分かれるがSPSB4ノックダウンはこの切断に影響しなかった。また、リガンド刺激なくともEphB2細胞内ドメイン (EphB2-CD) の切断産物 (EphB2/LF, EphB2/CTF1, EphB2/CTF2) が検出されたので、Colo201細胞は通常培養条件下で何らかの微弱な刺激を受けていると考えられた。予想どおりSPSB4ノックダウンによりEphB2細胞内ドメインの切断産物 (EphB2/LF, EphB2/CTF1, EphB2/CTF2) が蓄積したが、EphB2/CTF1あるいはCTF2の蓄積はリガンド刺激しない場合においてのみ有意差が確認できた (リガンド刺激すると有意差はなかった) (図3)。一方、EphB2/LFはSPSB4ノックダウンにより顕著に蓄積した。これらのEphB2切断産物 (EphB2/LF, EphB2/CTF1, EphB2/CTF2) はSPSB4ノックダウン細胞内においてもリガンド刺激により徐々に分解されたので、SPSB1を含む他のユビキチンリガーゼが関与していることが示唆された。これらの結果より、SPSB4はEphB2切断産物を認識しユビキチン修飾するユビキチンリガーゼであると考えられた。

EphB2発現細胞がephrin-B2発現細胞と接触すると互い

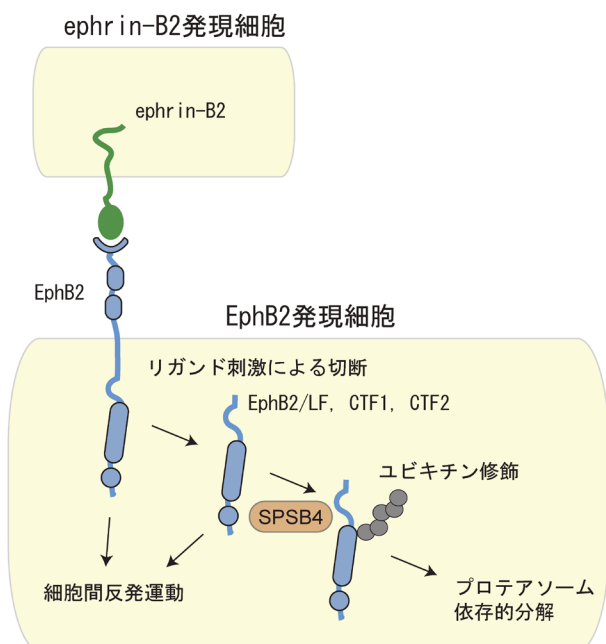


図2 リガンド刺激によるEphB2の切断とプロテアソーム依存的分解

EphB2がリガンドであるエフリン (図中ではephrin-B2) と結合すると細胞膜外や細胞膜内で切断され、いくつかの断片を生じる。これらはその長さによってEphB2/LF, EphB2/CTF1, EphB2/CTF2に分類される。これらの断片はSPSB4に認識されユビキチン修飾を受けた後、プロテアソーム依存的に分解される。また、EphB2刺激は細胞間反発運動を誘導する。

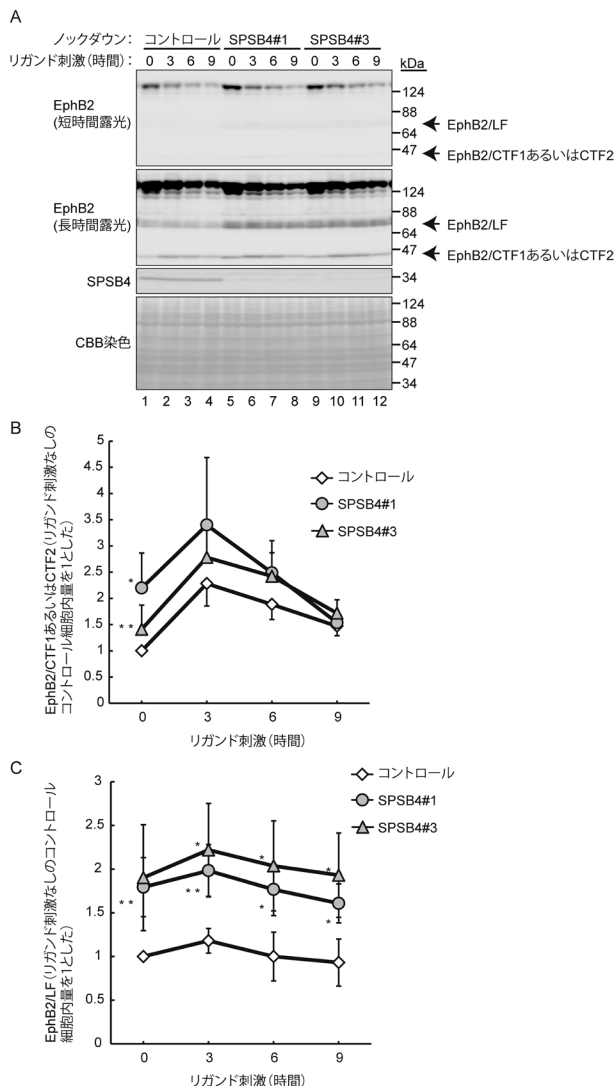


図3 SPSB4 ノックダウンによる EphB2/LF, EphB2/CTF1, EphB2/CTF2 の蓄積³⁾
 (A) コントロールあるいは SPSB4 ノックダウン Colo201 細胞をエフリン (ephrin-B2) 刺激した。経時的に細胞を回収し EphB2 量を定量した。全長 EphB2 は刺激依存的に切断され減少する。
 (B) EphB2/CTF1 あるいは CTF2 の定量データ。(C) EphB2/LF の定量データ。*: $p < 0.03$, **: $p < 0.01$ 。

に遠ざかる方向へ移動する (細胞間反発運動) ことが知られている⁴⁾。したがって SPSB4 ノックダウンによる EphB2 切断産物の蓄積は細胞間反発運動に影響を与えることが予想された。それを検証するために ephrin-B2 を発現する HEK293T 細胞と、緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein: EGFP) を発現する SPSB4 ノックダウン Colo201 細胞を共培養した (蛍光を放つ細胞は Colo201 細胞である) (図4)。 2×10^5 個の HEK293T 細胞と Colo201 細胞を混合して 6 穴プレートで 3 日間培養を行い、細胞間反発運動を観察した。このアッセイ系においては、0 日目は低密度であるので細胞は自由に移動しながら増殖できる。

細胞間反発運動により ephrin-B2 を発現する HEK293T 細胞と、EphB2 を発現する Colo201 細胞が接触すると互いに離れる向きに移動する。3 日目には高密度になっており、細胞間反発運動の結果 HEK293T 細胞と Colo201 細胞はそれぞれの細胞集団を形成する。Colo201 細胞を ephrin-B2 発現 HEK293T 細胞と共培養すると予想どおり Colo201 細胞集団の形成が確認できた。細胞間反発運動により ephrin-B2 発現 HEK293T 細胞と Colo201 細胞が互いに逃げるように動くため、それぞれの細胞集団が形成されるが一部の Colo201 細胞は逃げ遅れ、HEK293T 細胞集団の中に取り込まれコロニーを形成できない。ランダムな視野を選び、コロニーを形成していない Colo201 細胞の数を数え比較した (図4B)。コントロール HEK293T 細胞あるいは ephrin-B2 発現 HEK293T 細胞から逃げ遅れ、HEK293T 細胞集団に取り込まれた Colo201 細胞数に大きな変化はみられなかった。一方、SPSB4 ノックダウン Colo201 細胞を ephrin-B2 発現 HEK293T 細胞と共培養すると、コントロール Colo201 細胞の場合よりも大きな細胞集団を形成した。また、HEK293T 細胞集団に取り込まれたコロニーを形成していない SPSB4 ノックダウン Colo201 細胞数はコントロール Colo201 細胞の場合に比べて少なかった。これらの結果は細胞間反発運動が SPSB4 ノックダウンにより増強されていることを示している。すなわち、SPSB4 は EphB2 切断産物 (特に EphB2/LF) の分解を誘導することで細胞間反発運動を抑制していることが示唆された。

4. おわりに

EphB2 は 1 回膜貫通タンパク質であるが、ユビキチン修飾依存的に分解される過程において膜から引き抜かれる必要はなく、細胞膜内における切断が重要であることが示された。細胞間反発運動は細胞の適切な配置やシナプス形成、がん細胞の浸潤や転移などに関与する重要なメカニズムの一つである。TCGA データベース (<https://cancergenome.nih.gov/>) を用いて EphB2, SPSB1, SPSB2, SPSB3, SPSB4 それぞれの発現をさまざまな種類のがんで比較したところ、SPSB4 を除いてがんの種類による大きな違いは認められなかった。SPSB4 の発現は大腸がん、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、肝細胞がん、皮膚黒色腫、前立腺腺がん、甲状腺がん、ぶどう膜メラノーマ、腎細胞がんなどで低下していることが示された。一方、SPSB4 の発現は星状細胞腫、グリア芽腫、乏突起膠腫で亢進している¹³⁾。したがってこれらのがん細胞では EphB2 細胞内ドメインの切断産物 (EphB2/LF, EphB2/CTF1, EphB2/CTF2) が蓄積あるいは減少していることが推測される。EphB2 はがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子として真逆の役割が報告されており^{1,2)}、解析条件や解析に用いた細胞の違い、未知の

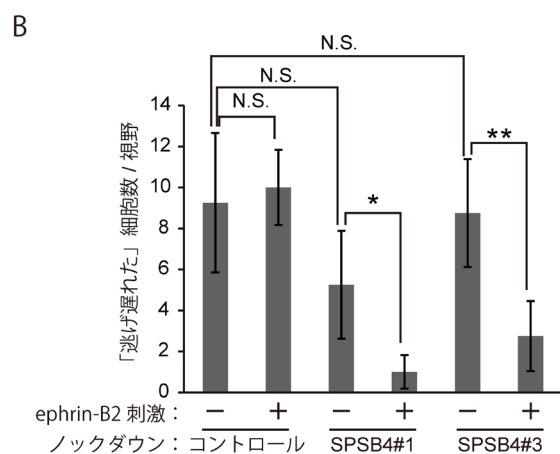
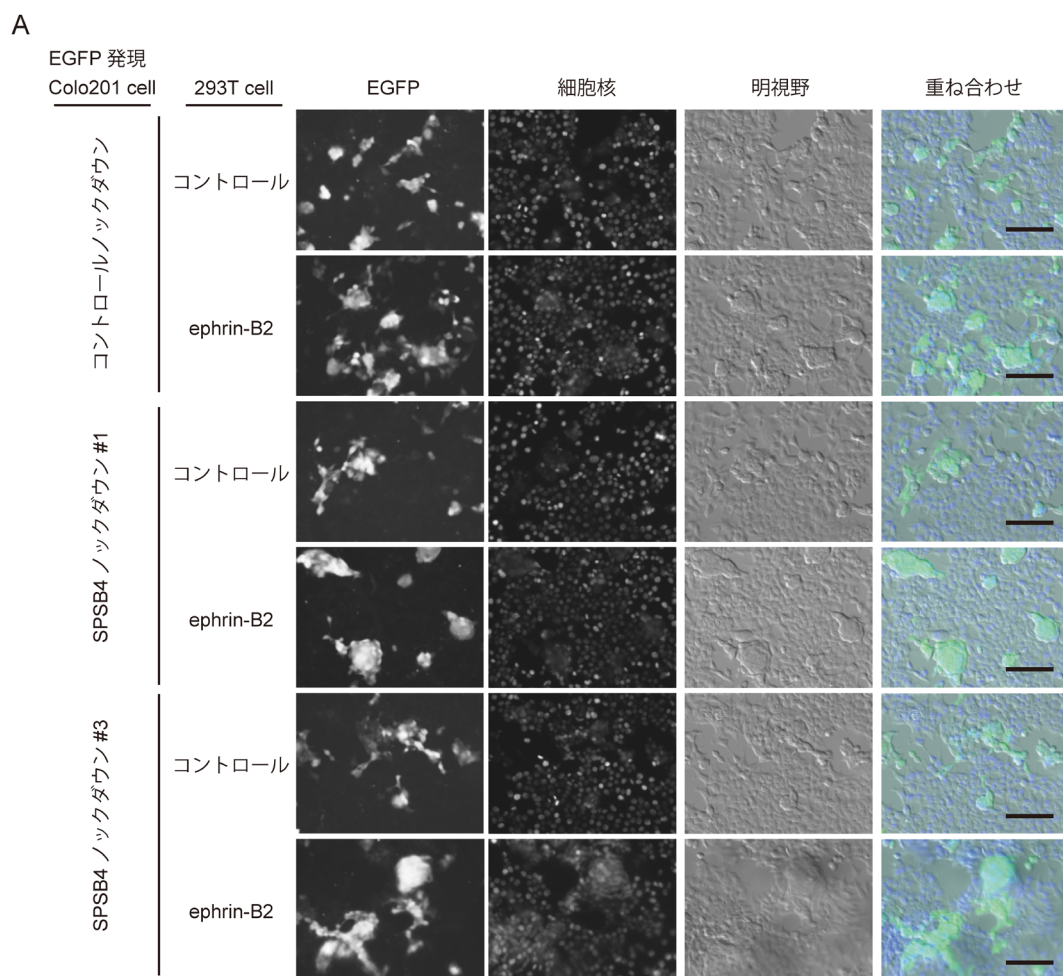


図4 SPSB4による細胞間反発運動の抑制³⁾

(A) Colo201細胞はEGFP発現により蛍光を発する。コントロールあるいはSPSB4ノックダウンColo201細胞をコントロールあるいはephrin-B2発現HEK293T細胞と3日間共培養した。スケールバー: 100 μ m. (B)「逃げ遅れた」Colo201細胞数の比較。細胞集団を形成していないColo201細胞を「逃げ遅れた」細胞として数えた。*: $p < 0.03$, **: $p < 0.01$. N.S.: 有意差なし。四つの視野をカウントした。平均値 \pm 標準偏差。

ファクターなどが関与していると考えられるが詳細は明らかとなっていない。特にEphB2/LFの蓄積や減少が予想されるので、下流のシグナル伝達経路や、がん遺伝子として働くのか、あるいはがん抑制遺伝子として働くのかを含めて今後解析することは、さまざまな種類のがんの性質を理解する上で重要であると思われる。今後、解析が進むことでEphB2の生理的役割が解明されるはずである。

文 献

- 1) Pasquale, E.B. (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, **133**, 38–52.
- 2) Nuberini, R. & Pasquale, E.B. (2009) Proliferation and tumor suppression: not mutually exclusive for Eph receptors. *Cancer Cell*, **16**, 452–454.
- 3) Okumura, F., Joo-Okumura, A., Obara, K., Petersen, A., Nishikimi, A., Fukui, Y., Nakatsukasa, K., & Kamura, T. (2017) Ubiquitin ligase SPSB4 diminishes cell repulsive responses mediated by EphB2. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 3532–3541.
- 4) Poliakov, A., Cotrina, M.L., Pasini, A., & Wilkinson, D.G. (2008) Regulation of EphB2 activation and cell repulsion by feedback control of the MAPK pathway. *J. Cell Biol.*, **183**, 933–947.
- 5) Nicholson, S.E. & Hilton, D.J. (1998) The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J. Leukoc. Biol.*, **63**, 665–668.
- 6) Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K., & Kamura, T. (2012) The Role of Elongin BC-Containing Ubiquitin Ligases. *Front. Oncol.*, **2**, 10.
- 7) Kleiber, M.L. & Singh, S.M. (2009) Divergence of the vertebrate sp1A/ryanodine receptor domain and SOCS box-containing (Spsb) gene family and its expression and regulation within the mouse brain. *Genomics*, **93**, 358–366.
- 8) Litterst, C., Georgakopoulos, A., Shioi, J., Ghersi, E., Wisniewski, T., Wang, R., Ludwig, A., & Robakis, N.K. (2007) Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J. Biol. Chem.*, **282**, 16155–16163.
- 9) Lin, K.T., Sloniowski, S., Ethell, D.W., & Ethell, I.M. (2008) Ephrin-B2-induced cleavage of EphB2 receptor is mediated by matrix metalloproteinases to trigger cell repulsion. *J. Biol. Chem.*, **283**, 28969–28979.
- 10) Holland, S.J., Gale, N.W., Gish, G.D., Roth, R.A., Zhou, S.Y., Cantley, L.C., Henkemeyer, M., Yancopoulos, G.D., & Pawson, T. (1997) Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *EMBO J.*, **16**, 3877–3888.
- 11) Zisch, A.H., Kalo, M.S., Chong, L.D., & Pasquale, E.B. (1998) Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene*, **16**, 2657–2670.
- 12) Wybenga-Groot, L.E., Baskin, B., Ong, S.H., Tong, J., Pawson, T., & Sicheri, F. (2001) Structural basis for autoinhibition of the EphB2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell*, **106**, 745–757.
- 13) Sun, L.X., Hui, A.M., Su, Q., Vortmeyer, A., Kotliarov, Y., Pastorino, S., Passaniti, A., Menon, J., Walling, J., Bailey, R., et al. (2006) Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell*, **9**, 287–300.

著者寸照

●奥村 文彦 (おくむら ふみひこ)



公立大学法人福岡女子大学国際文理学部食・健康学科生物化学研究室准教授。博士(医学)。

■略歴 1999年神戸学院大学卒業(薬剤師免許取得)。同年九州大学大学博士課程。2005年米国スク립ス研究所ポスドク。08年北海道大学助教。11年名古屋大学助教。16年同講師。19年福岡女子大学准教授。

■研究テーマと抱負 タンパク質のユビキチン修飾依存的分解は非常に重要であり、その破綻はさまざまな疾患を引き起こす。一方、ユビキチン類似タンパク質ISG15もユビキチンと同様にタンパク質の修飾に用いられる(ISG15修飾)。これら二つのタンパク質修飾を軸に今後も解析を進める。

■ウェブサイト <http://www.fwu.ac.jp/teachersdatabase/detail/?masterid=145&gakkaid=203&gakubuid=20>

■趣味 実験。