

研究報告書  
令和2年度：A課題

2022年 4月18日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 北海道大学大学院医学研究院

住 所 札幌市北区北15条西7丁目

研究者氏名 渡部 昌

(研究課題)

がんドライバーユビキチンE3リガーゼの基質探索

令和3年 3月 17日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

<目的>

がんの発生、悪性化及び転移などのさまざまな過程にユビキチン化が関与することが明らかになってきており、治療の標的として注目を集めている。ユビキチンを標的基質に付加する酵素であるユビキチンリガーゼ(E3)が基質特異性と多様性を担っているため、E3は有望な薬剤標的であると考えられている。近年米国のThe Cancer Genome Atlas (TCGA)プロジェクトが、がんの発生・進展に直接的に重要な役割を果たすドライバー遺伝子をリスト化して

報告している。一方基質の同定に関しては、ヒトゲノム中に約 600 という膨大な E3 酵素の数に比して成功例は極めて少なく、検証に多大な時間を要するのが現状であった。研究代表者は、近年開発された技術に着目した新規基質同定法の確立に取り組み、飛躍的な同定効率の向上に成功した。本研究ではこの新規手法をがんドライバーE3 に適用し基質を網羅的に同定することを目的とする。がんドライバーE3・基質関係を元にした創薬のための基盤研究として発展させることを目標に掲げる。

#### <方法>

本基質同定手法では、1. E3 とユビキチン高親和性ドメイン(TUBE)を融合させたプローブを作製し、2. プローブを安定に発現する細胞を樹立し、3. プローブが捕獲するユビキチンリガーゼの基質を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、4. トリプシンによって消化した後、5. ユビキチンレムナント抗体 (K-ε GG 抗体) を用いて、ユビキチン化されたペプチドのみ再精製し、6. Ion Trap-Orbitrap 型質量分析器にて検出する。比較的未解明のがんドライバーE3 を中心に解析を行った。

#### <結果と考察>

##### (1)がん関連ユビキチンリガーゼ基質同定プローブの作製と安定発現細胞株の樹立

解析対象のユビキチンリガーゼ遺伝子を手し、TUBE と共に基質同定プローブとしてレトロウイルス発現ベクター上に組み込んだ。作製したプローブベクターを用いてレトロウイルスを作製し、プローブを安定に発現する細胞株作製を試みたところ、約 7 割のプローブについて細胞株作製に成功した。残り 3 割のプローブについては細胞毒性のために作製できなかった。

##### (2)質量分析器による基質・結合分子同定

樹立した細胞からユビキチン化ペプチドを精製し、質量分析計にて網羅的な同定を行った。得られた結果について、過去に我々が行い蓄積している同様の基質同定結果と比較してスコアを算出することで、個々のユビキチンリガーゼ特異的な基質候補を抽出した。その結果、多くの E3 について、数個から数十個程度の基質候補を得た。得られた基質候補は多種多様な分子が含まれていたが、一例を挙げると、一次繊毛の制御因子、タンパク質のフォールディング複合体、細胞接着因子、糖代謝制御因子など、がん進展への関与が示唆される分子が含まれていた。今後は、これら因子を介したがんドライバーE3 のがん進展制御機構の解明に取り組み、創薬標的の基盤確立を目指していく予定である。

#### <発表論文>

なし

#### <謝辞>

本研究の遂行をご支援くださった公益財団法人がん研究振興財団に心より感謝申し上げます。