

ヒトパピローマウイルス E6 タンパク質による p53 ユビキチン化の分子機構の解析

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学

環境医学研究所 准教授 増田雄司

1. 研究の背景・目的

子宮頸がんは女性生殖器の中では子宮体がん仅次于いで 2 番目に頻度の高い疾患である。最近では 20~30 歳代女性の罹患者が増加しており、25~34 歳の女性の浸潤がんでは乳がん仅次于いで 2 番目に多い。国内では、毎年約 1 万人の女性が罹患、約 3000 人が死亡しており、どちらも増加傾向にある。子宮頸がんは、主に子宮頸部にヒトパピローマウイルス (HPV) が感染することによって発症する。欧米諸国のデータからワクチン接種の有効性は明らかなもの、罹患率を継続的にどこまで下げることができるかは不明である。若い女性の罹患はその後の人生に及ぼす影響が大きく、有効な治療法開発の期待は大きい。

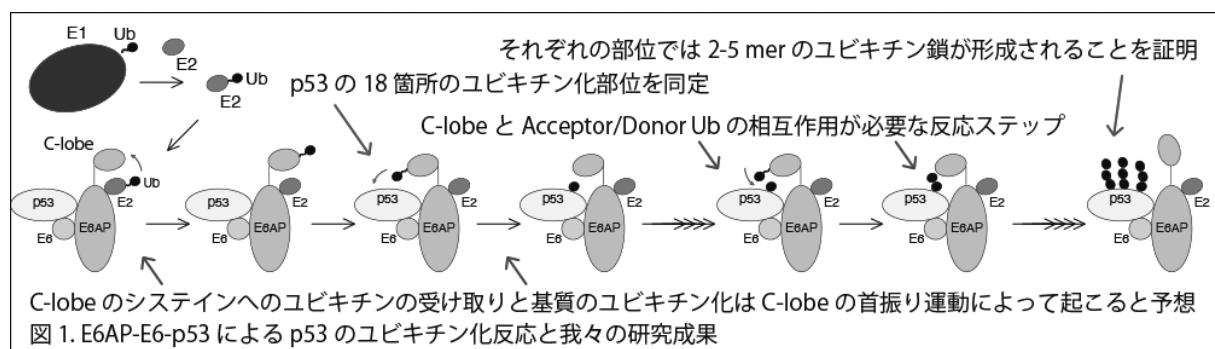
HPV が感染するとその遺伝子産物 E6 がヒト細胞内で発現するユビキチンリガーゼ E6AP に結合し、p53 をポリユビキチン化する酵素にすり替えられる。この p53 のポリユビキチン化による分解が子宮頸がん発症の重要なステップである。したがって、HPV によって誘導されたがん細胞では、野生型 p53 が存在しており、このユビキチンリガーゼの機能を消失させることで p53 が再活性化し、がん細胞が死滅することが細胞レベルの実験で示されている [1-3]。この知見は、子宮頸がんの治療戦略に極めて重要な proof-of-principle としての意味を持つ。何らかの方法で E6 の機能を消失させることができれば、p53 の機能によってがん細胞死を誘導することができる可能性を強く示唆しているからである。

E6 タンパク質は E6AP の限定された領域に結合し、この E6AP-E6 複合体が p53 との結合活性を持つ。2016 年、E6 タンパク質全長と E6AP、p53 の結合領域部分のペプチドからなる結晶構造が Nature に報告された [4]。E6 の機能を消失させる有効な手段の一つが、この複合体構造の阻害であることは間違いなく、そうした薬剤開発に向けた研究が世界各地で進められている。

我々は 2013 年から E6AP-E6 複合体による p53 のポリユビキチン化反応を試験管内で再

現する実験に着手し、極めて効率的な反応系の構築に成功した[5]。そこで、この反応系を利用した薬剤のスクリーニングにより、E6AP-E6-p53 複合体の形成を阻害する分子標的薬の開発を考案し、製薬会社と協議を行なったところ、いくつかの問題点が浮上した。まず、子宮頸がんはワクチンの開発により世界的には罹患者が減少傾向であり、市場規模が小さいことから、多額の開発経費を回収できないことが指摘された。また、結晶構造より明らかとなった E6-E6AP-p53 複合体の相互作用が広い領域に及んでおり[4]、低分子化合物では有効な阻害効果が期待されず、ヒット化合物が得られない可能性が高いとされ、研究開発への進展には至らなかった。特に二つ目の指摘は重要で、E6-E6AP-p53 複合体の相互作用を阻害するような分子標的薬開発の発想を転換することの重要性を認識させられた。そこで、E6AP-E6 複合体による p53 のユビキチン化反応それ自体を阻害するような分子標的薬であれば、ヒット化合物を得られるのではないかと考えた。我々は、世界に類を見ない極めて効率的な反応系を有している[5]。そこで、この実験系で p53 のユビキチン化反応に必要なタンパク質間相互作用部位を同定することで、安価で有効な薬剤開発に向けて大きく前進することができると考えた。

E6AP は HECT-タイプのユビキチンリガーゼに分類される。HECT-タイプのユビキチンリガーゼでは、まず、E1 によって活性化された E2~Ub (~はチオエステル結合、Ub はユビキチンを表す) から、自身のシステイン残基にユビキチンを受け取り、HECT(Cys)~Ub 反応中間体を生成する(図 1)。次に、このユビキチンを標的タンパク質のリジン残基もしくは、標的タンパク質に結合したユビキチンの特定のリジン残基に転移する。これらの反応過程でユビキチンリガーゼは、E2~Ub のユビキチン、HECT(Cys)~Ub のユビキチン(Donor ユビキチン)、基質に結合したユビキチン(Acceptor ユビキチン)を認識する。これらの相互作用においては、活性ドメイン内の C-lobe と呼ばれる領域の重要性が指摘されている(図 1)。したがって、p53 のポリユビキチン化反応を分子標的薬によって阻害するにあたり、これら多くの相互作用部位がターゲットとなり得る。しかし、分子標的薬開発のためには、



これらの相互作用部位をアミノ酸レベルで同定し、その相互作用領域が局所的でなければならず、そこをまず明らかにしなければならない。

我々はこれまでに、E6AP の C-lobe とユビキチンとの相互作用を NMR により解析し、C-lobe と相互作用するユビキチンのアミノ酸残基を同定している(未発表)。そこで本研究では、それらのアミノ酸残基の変異体を作成し、我々が開発した反応系を使って活性測定を行うことで、ユビキチンリガーゼ活性に影響を及ぼすアミノ酸残基の同定を行った。

2. 研究の対象ならびに方法

1) 実験対象

変異体ユビキチンの作成は、まずユビキチンの特定のアミノ酸を置換する変異体遺伝子を作成し、組み換えタンパク質を大腸菌で発現させた。次に、大腸菌の粗抽出液からユビキチンを硫酸沈殿により分画し、各種クロマトグラフィーを用いて、文献[6]に記載の方法により変異体ユビキチンを精製した。その他の実験材料は文献[5]に記載の通りである。

2) 方法

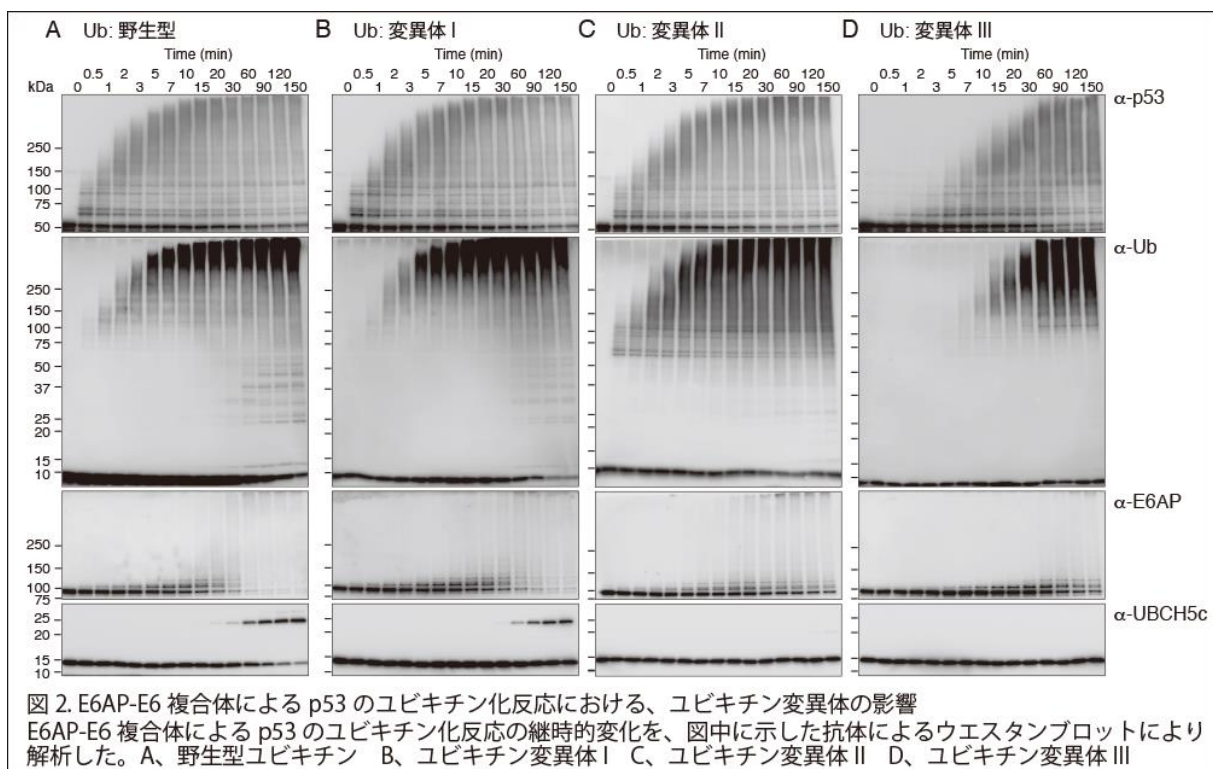
ユビキチンリガーゼ活性の測定は我々が開発した文献[5]に記載の方法により実施した。酵素反応は、25 μ l の酵素反応液[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.02 mg/ml BSA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, his-p53 (1 pmol as a tetramer), E1 (0.85 pmol), UBCH5c (E2) (1.25 pmol), E6AP-E6 複合体 (0.8 pmol), and Ub (174 pmol)]を 30 °C で加温し、SDS-PAGE 用のサンプルバッファー25 μ l を添加することで反応を停止した。反応産物は、SDS-PAGE により分離し、ウェスタンブロットにより解析した。抗-E6AP 抗体は、GeneTex, UBE3A antibody GTX10487 または我々が作成したウサギ抗血清、抗-p53 抗体は Calbiochem, anti-p53 (Ab-6) mouse mAb (D0-1) OP43、抗-UBCH5c 抗体は、Ab Frontier, anti-UBE2D3 (4C1-1E3) LF-MA10362、抗-Ub 抗体は、Santa Cruz Biotechnology, Inc., Ub (P4D1) sc-8017 を使用した。

3. 研究結果

まず、C-lobe と相互作用することが期待されるユビキチンのアミノ酸残基を置換する変異体遺伝子を作成し、組換えタンパク質を精製した。次に、このユビキチン変異体を用いて、E6AP-E6 複合体が p53 をユビキチン化する際の、ユビキチンリガーゼ活性の効率を検討した(図 2)。野生型のユビキチンでは、反応開始から 10 分間までに高分子量のユビキチン化 p53 が生成することが、抗-p53 抗体によるウェスタンブロットによって観察される

(図 2A 上段)。この高分子量の反応産物がユビキチン化体であることは、抗-Ub 抗体のウエスタンブロットによって確認される (図 2A 二段目)。また、E6AP 自身の自己ユビキチン化は、反応開始後 10 分以降から増え始め、60 分間までにはほぼ全ての E6AP が高分子量のユビキチン化体となる (図 2A 三段目)。これらの結果から、E6AP 自身の自己ユビキチン化は p53 のユビキチン化反応が飽和状態に達した後に促進されると考えられる。さらに、E2 である UBCH5c のモノユビキチン化は 60 分以降に顕著に観察され (図 2A 下段)、p53 と E6AP のユビキチン化が飽和状態に達した後に起こる反応であり、*in vitro* の副反応であると思われる。これらの結果は、我々がすでに発表した研究結果[5]をよく再現している。

次に本研究では、野生型のユビキチンの代わりに、C-lobe と相互作用することが期待される変異体ユビキチンで同様の実験を行った。図 2B-C に代表的な 3 つのタイプの変異体の結果を示している。変異体 I では、野生型ユビキチンと比較して、顕著な差は観察されなかった (図 2B)。一方、変異体 II では、抗-p53 抗体によるウエスタンブロットの結果から



は顕著な違いが観察されないが (図 2C 上段)、抗-Ub 抗体のウエスタンブロットの観察結果から、高分子のユビキチン化体の蓄積の割合が低いことがわかった (図 2C 二段目)。この結果は、p53 のユビキチン化が飽和状態にまでは達していないことを示唆している。さらに、E6AP の自己ユビキチン化も不完全であることから (図 2C 三段目)、p53 のユビキチン化自体が飽和状態には達していないとの推測と一致する。これらの観察と一致して、こ

の変異体では、UBCH5c のモノユビキチン化も観察されなかった (図 2C 下段)。変異体 III は抗-p53 抗体によるウェスタンブロットの結果から、明らかに p53 のユビキチン化の効率が減弱した (図 2D 上段)。高分子のユビキチン化体の生成時間が 60 分まで遅延すると共に、その生成効率 (高分子のユビキチン化体の蓄積の割合) も低下していることが、抗-Ub 抗体のウェスタンブロットの観察結果から明らかとなった (図 2D 二段目)。これらの結果は、E6AP の自己ユビキチン化の効率がさらに低下する結果と一致している (図 2D 三段目)。以上の結果から、変異体 III に代表されるタイプの変異を持つユビキチンでは、E6AP-E6 複合体による p53 のユビキチン化に著しい欠陥を生じることが明らかとなった。

4. 考察

本研究では、E6AP-E6 複合体による p53 のユビキチン化に欠陥を生じるユビキチンの変異体の同定に成功した。今後これらのユビキチン変異体を利用して、E6AP の C-lobe 側の相互作用部位を明らかにする予定である。我々はこれまでに、E6AP の C-lobe 側に変異を導入した多数の変異体を作成し、精製タンパク質を使った活性測定を並行して行っている。その E6AP 変異体の中には、ユビキチン変異体 III に代表されるタイプと同様に、ユビキチン化活性が減弱する変異体も得られている。今後は、E6AP 変異体とユビキチン変異体の様々な組み合わせで活性測定を行う予定である。互いに相互作用する部位に変異がある場合は、活性低下の割合が少なく、別々の相互作用部位に変異がある場合には、活性の著しい低下が期待されるので、そのような指標を使って互いの相互作用部位を推定することができると考えている。E6AP の C-lobe 内にユビキチンとの相互作用に重要なアミノ酸が同定できれば、その相互作用部位については製薬会社と更なる協議を行い、分子標的薬の候補としての可能性について検討していきたい。また、それ以外の原因により活性が低下した変異体についてもその原因を究明し、分子標的薬の候補としての可能性を探究する。

5. 文献

[1] Rosa Anna DeFilippis, Edward C Goodwin, Lingling Wu, and Daniel DiMaio, Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells, *J Virol*, **77**(2):1551-1563, 2003.

[2] Stacy M Horner, Rosa Anna DeFilippis, Laertes Manuelidis, and Daniel DiMaio, Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent,

telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells, *J Virol*, **78**(8):4063-4073, 2004.

[3] Edward M Kennedy, Anand V R Kornepati, Michael Goldstein, Hal P Bogerd, Brigid C Poling, Adam W Whisnant, Michael B Kastan, and Bryan R Cullen, Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease, *J Virol*, **88**(20):11965-11972, 2014.

[4] Denise Martinez-Zapien, Francesc Xavier Ruiz, Juline Poirson, André Mitschler, Juan Ramirez, Anne Forster, Alexandra Cousido-Siah, Murielle Masson, Scott Vande Pol, Alberto Podjarny, Gilles Travé, and Katia Zanier, Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53, *Nature*, **529**(7587):541-554, 2016.

[5] Yuji Masuda, Yasushi Saeki, Naoko Arai, Hidehiko Kawai, Iwao Kukimoto, Keiji Tanaka, and Chikahide Masutani, Stepwise multipolyubiquitination of p53 by the E6AP-E6 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, **294**(41):14860-14875, 2019.

[6] Yuji Masuda, Jinlian Piao, and Kenji Kamiya, DNA replication-coupled PCNA mono-ubiquitination and polymerase switching in a human *in vitro* system, *J Mol Biol*, **396**(3):487-500, 2010.

6. 論文発表

今後論文発表に向けて更なる解析を推進する。