

大豆たん白質によるたん白質分解制御を介した 乳がんならびに前立腺がんの発症予防に関する分子機構の探索

浦野友彦*

東京大学医学部附属病院22世紀医療センター抗加齢医学講座

The Role of Genistein in Breast and Prostate Cancer Prevention through the Protein Modification and Degradation Pathway

Tomohiko URANO

Department of Anti-aging Medicine, 22nd Century Medical and Research Center,
Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655

ABSTRACT

Estrogen-responsive finger protein (Efp) is one of the estrogen responsive genes and belongs to a family of tripartite motif (TRIM) proteins. Here, we have shown that genistein, one of the predominant soy isoflavones, repressed the expression of Efp. We also have shown that Efp functions as a ubiquitin E3 ligase and plays crucial roles in the regulation of breast and prostate cancer cell growth. We have shown that Efp targets ubiquitin mediated proteolysis of 14-3-3 σ , a negative cell cycle regulator that causes cell cycle arrest. Next, we performed immunohistochemical analysis for breast and prostate malignant tissues, and investigated the association with patients' clinicopathological data. Positive Efp immunoreactivity significantly correlated with poor cancer-specific survival both in prostate and breast cancer patients, suggesting that Efp could play an important role in the tumorigenesis of breast and prostate cancer. The present data suggest that genistein could play an important role in the cancer prevention through the repression of Efp. We have demonstrate that Efp also targets ubiquitination of Retinoic-acid-inducible gene-I (RIG-I) is a cytosolic viral RNA receptor that induce type I interferon-mediated host protective innate immunity against viral infection. Furthermore, gene targeting demonstrates that Efp is essential not only for RIG-I ubiquitination but also for RIG-I-mediated interferon- production and antiviral activity in response to RNA virus infection. Thus, we demonstrate that Efp, genistein regulated gene, induces the ubiquitination of RIG-I, which is crucial for the cytosolic RIG-I signalling pathway to elicit host antiviral innate immunity. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 88-94, 2008.

*〒113-8655 文京区本郷7-3-1

Key words : Estrogen, Genistein, Prostate cancer, Breast cancer, Innate immunity, Interferon, Efp

TRIM (tripartite motif) ファミリーたん白質はN末端からRINGフィンガー, B boxならびにCoiled-coilドメインを有するたん白質群であり (一部のたん白質はC末端にSPRYドメインも有する), ヒトでは70種類程度のTRIMたん白質が存在する。このたん白質群の中でEfp (Estrogen-responsive finger protein : 別名TRIM25) はエストロゲンによる発現誘導をうけることが知られていた^{1,2)}。我々はEfpが乳がん細胞においてユビキチンリガーゼとして, たん白質のユビキチン化を行うことを見出した。我々はEfpの基質たん白質として14-3-3 σ を同定し, 14-3-3 σ たん白質のユビキチン化からそのたん白質分解を介して乳がん細胞の増殖を誘導することを見出した³⁾。また, ヒト乳がん検体を用いた検討によりEfpは悪性度の高い乳がんで高発現し, 予後を規定する因子であることを見出した⁴⁾。本研究では大豆たん白質の成分であるgenisteinがEfpの発現を抑制する因子であることを見出した。さらにEfpの新たな機能を検索したところ前立腺がんの増殖や自然免疫に関与することを見出した。

方 法

前立腺がん細胞におけるEfpの発現

前立腺がん細胞株であるPC3細胞はATCCより購入した。PC3細胞にGenistein (25 μ M), Interferon α , ならびに両者を同時に添加したサンプルの, 24時間後のRNAを抽出し, RT-PCR法によりヒトEfpの発現を確認した。

マウス胎児線維芽細胞におけるEfpの発現

マウス胎児より酵素処理によりマウス胎児線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblasts : MEF) を作成した。MEF細胞にGenistein (25 μ M) を添加し, 24時間後のRNAを抽出し, RT-PCR法によりマウスEfpの発現を確認した。

Efpと14-3-3 σ の局在, 結合ならびに発現制御

COS7細胞はATCCより購入した。COS7細胞にpcDNA3-HA-14-3-3 σ とpcDNA3-Myc-Efpをトランスフェクションし, それぞれの抗体で免疫染色により細胞内局在を確認した。また, 同様にCOS7にトランスフェクションを行い免疫沈降法によりEfpと14-3-3 σ との結合を検討した。さらにCOS7にトランスフェクションを行い, 細胞抽出液を用いてWestern blot法を行い, Efpとの共発現による14-3-3 σ の発現が減少した。

MCF7にEfpをトランスフェクションしMCF7にEfpを高発現した細胞株MCF7-Efp (クローン#1, #3) を樹立した。コントロール細胞 (MCF-Vec#2, #4) も同様に樹立した。これら細胞における14-3-3 σ の発現をWestern blot法によりアッセイした。

siRNAによるヒトEfpのノックダウン

PC3細胞にsiRNA-EfpならびにコントロールsiRNA5 nMをHi Perfect (Roche) を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション後72時間後の細胞増殖能をMTTアッセイにより評価した。MTTアッセイはPromega社, Cell Titer 96を用いた。トランスフェクション72時間後のRNAならびにたん白質を採取し, RT-PCRならびにWestern blot法により14-3-3 σ の発現を評価した。

アデノウイルスによるEfpの過剰発現

PC3細胞にEfp遺伝子をアデノウイルスを用いて過剰発現させた。コントロールとしてdsREDを用いた。ウイルス感染後72時間後の細胞増殖能をMTTアッセイにより評価した。感染後72時間後のRNAならびにたん白質を採取し, RT-PCRならびにWestern blot法により14-3-3 σ の発現を評価した。

ヒト前立腺組織におけるEfpの発現

ヒト前立腺がん組織98例ならびに良性前立腺組織よりパラフィン切片を作成した。ラビットポリクローナル抗Efp抗体を用いて免疫染色を行い予後データとの相関を検討した。

Efpとインターフェロン応答するユビキチン様たん白質であるISG15との結合の検討

293T細胞にpCI-NEO-S-Efp, pcDNA3-FLAG-Efp, pcDNA3-FLAG-Ub (ユビキチン), pcDNA3-FLAG-ISG15, pcDNA3-USP18-HAをトランスフェクションし, 免疫沈降法によりユビキチンならびにユビキチン様たん白質であるISG15との結合を確認した。

Efpの新基質RIG-IのEfpによる*in vitro*ユビキチン化アッセイ

Efp, RIG-I, Ubiquitin, UbcH5, E1のリコンビナントたん白質を大腸菌より精製した。これらたん白質とATPを37℃にて一時間インキュベートした。インキュベート後のサンプルをSDSゲルにて泳動し, 各コンポーネントの有無によるRIG-Iたん白質のユビキチン化を評価した。

結果と考察

GenisteinはEfpの発現を抑制する

GenisteinによるEfpの発現変化を検討した。PC3細胞にgenistein (25 μ M) を添加したところEfpの発現を約30%抑制した (Fig. 1A)。また、Efpはインターフェロンにより発現誘導されるがgenisteinはインターフェロンによるEfpの発現誘導を約50%抑制した (Fig. 1B)。さらにマウス胎児線維芽細胞にgenistein添加したところ約60%以上の抑制効果があった (Fig. 1C)。以上よりgenisteinはEfpの強力な抑制因子であることが明らかとなった。

Efpは14-3-3 σ と結合し、そのたん白質分解を誘導する

Efpの細胞内での機能を検索するため、Efpをbaitとして乳がん細胞株であるMCF7を用いて酵母2 ハイブリッドスクリーニングを行なった。その結果Efp結合たん白質として14-3-3 σ を同定した。酵母での結合を哺乳類細胞で確認するため、COS7細胞にEfpと14-3-3 σ を過剰発現し、結合を確認した。この両者の発現を蛍光免疫染色により確認したところ両者とも細胞質に発現した (Fig. 2A)。さらに免疫沈降法によりEfpと14-3-3 σ が結合することを確認した (Fig. 2B)。さらに

Efpは14-3-3 σ の発現を低下させることも見出した (Fig. 2C)。MCF7にEfpを過剰発現した細胞株を樹立し、この増殖を確認したところ、Efpを過剰発現した細胞は*in vivo*ならびに*in vitro*での増殖能を獲得していた。さらにこの細胞における14-3-3 σ の発現はコントロール細胞に比べて低下していた (Fig. 2D)。14-3-3 σ はサイクリンB1と結合して細胞増殖を抑制する因子であることが知られている。また、我々はEfpが14-3-3 σ のユビキチン化を誘導する因子であり、14-3-3 σ のEfpによる発現低下はプロテアソーム阻害薬で抑制されることも見出した。以上より、我々はEfpが14-3-3 σ のユビキチン化からプロテアソームによるたん白質分解を誘導し、サイクリンB1を活性化させることで細胞増殖を誘導する乳がん細胞の増殖モデルを提唱した (Fig. 3)。

Efpは前立腺がんにおいてもその増殖を制御し、予後を規定する因子である

以上よりEfpは乳がん細胞の増殖を制御する因子であることが示された。またEfpはgenisteinによる、発現抑制を受けることを我々は見出した。Genisteinは前立腺がんにおいてその増殖を抑制すること、発がんを抑制することが明らかにされている。このことはEfpが前立腺がんの発症や増殖にも関与することを示

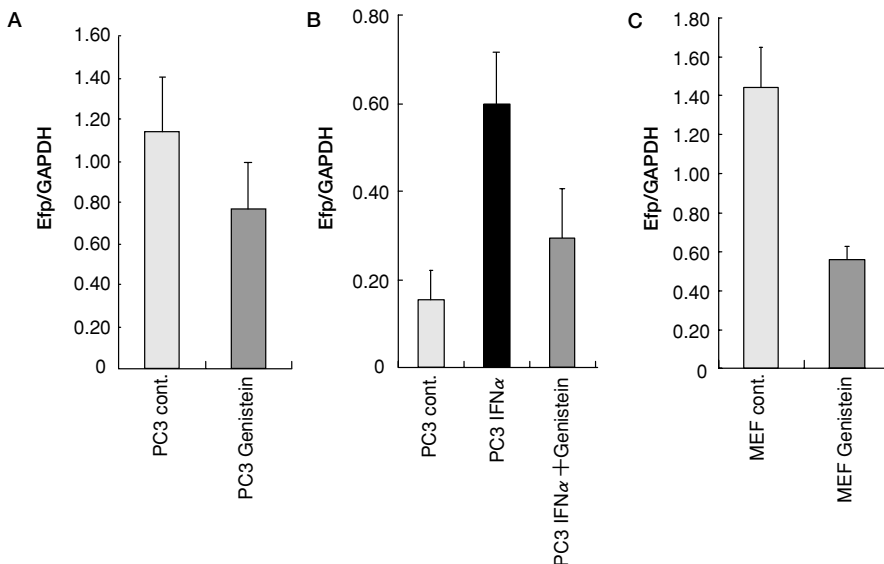


Fig. 1. Effects of genistein on Efp expression. (A) PC3 cells were treated with 25 μ M of genistein for 24 hours. (B) PC3 cells were treated with interferon α (IFN α) or combination of IFN α and 25 μ M of genistein for 24 hours. (C) Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were treated with 25 μ M of genistein for 24 hours. Real-time quantitative PCR was performed using cDNAs generated from total RNA. Experiments were repeated three times and the results are represented as means $\pm$ SD. Real-time quantitative PCR analysis shown that mRNA expression of Efp was down-regulated by genistein.

唆させる。そこで、我々はEfpが前立腺がんの増殖に果たす役割も検討した。前立腺がん細胞株であるPC3においてsiRNAを用いてEfpをノックダウンしたところ、PC3の増殖は強力に抑制された。この時14-3-3 σ の発現はたん白質レベルでのみ亢進した。また、アデノウイルスを用いてPC3細胞にEfpの発現を導入した

ところ増殖能が亢進し、14-3-3 σ の発現がたん白質レベルでのみ低下した。以上より前立腺がん細胞の増殖においてもEfpから14-3-3 σ のたん白質分解を介した増殖システムが重要な役割をはたしていることが示された。したがってGenisteinはEfpの発現を抑制し14-3-3 σ のたん白質分解を抑制することで前立腺がん細胞の

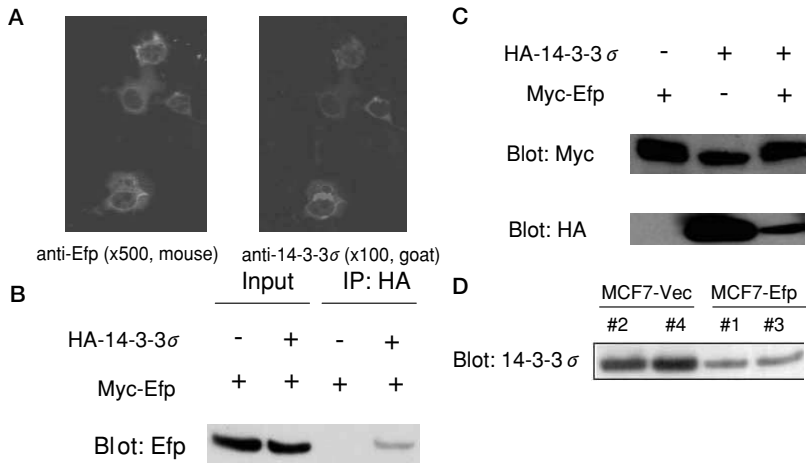


Fig. 2. Efp conjugates to and down-regulate 14-3-3 protein. (A) Immunoreactivities of Efp (fluorescein isothiocyanate (FITC), left panel) and 14-3-3 σ (rhodamin, right panel) expressed in COS7 cells were co-localized in the cytoplasm. (B) Interaction of Efp with 14-3-3 σ . Lysates of COS7 cells transfected with indicated plasmids were analysed by immunoblotting using anti-Efp antibody (WB: Efp), combined without (input) or with (IP: HA) immunoprecipitation using anti-HA. (C) Specific interaction of Efp with 14-3-3 σ . Lysates of transfected COS7 cells were immunoprecipitated with anti-Myc and analysed by immunoblotting using anti-HA (middle panel; IP: Myc, WB: HA). The amounts of Myc-Efp mutants (WB: Myc) are shown in the bottom panel. (D) Efp overexpression downregulates 14-3-3 σ protein in MCF7 cells. Efp-MCF7 cells stably express Efp.

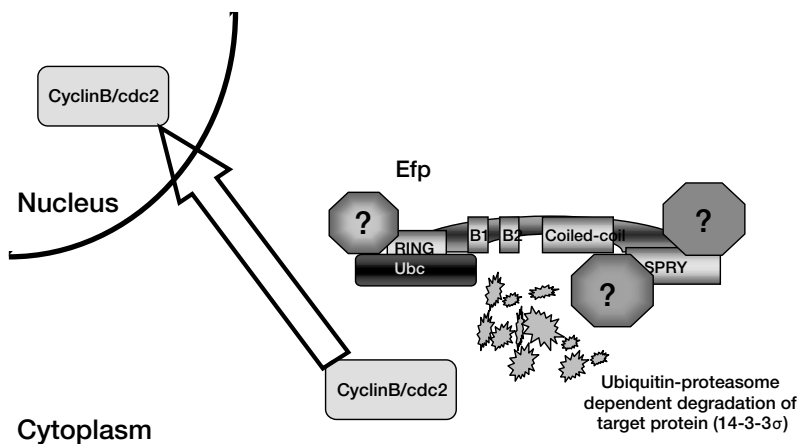


Fig. 3. Efp and 14-3-3 σ regulation and function in cancer cells. 14-3-3 σ expression is regulated through proteasome-dependent proteolysis, which is mediated by the E3 ubiquitin ligase Efp and the E2 ubiquitin conjugating enzyme (Ubc). Efp has a structure of TRIM protein, containing RING finger, B-box-coiled-coil, and SPRY domains. Ubc interacts with the RING finger domain of Efp. Repression or lack of 14-3-3 σ expression through cancer-associated mechanisms leads to deregulated cell cycle progression and promotes tumor growth.

増殖を制御している可能性が示された。Efpの前立腺がん細胞での役割の臨床的な重要性を明らかにするためにヒト前立腺組織を用いてEfpの発現を免疫染色により検討した。その結果Efpは良性前立腺組織に比べ、前立腺がんで高発現していた。さらにEfpが高発現している前立腺がんでは生命予後が不良であることが明らかとなった。以上より、乳がんならびに前立腺がんにおいてEfpはがんの悪性化に関与していること、ならびにgenisteinからEfpの抑制化の経路が発がんやがんの進展の予防において重要な役割をはたしている可能性がある。

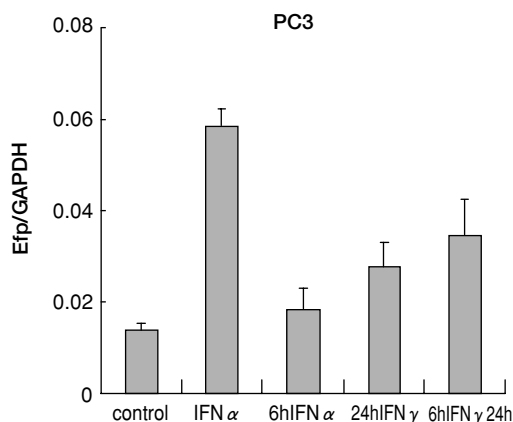


Fig. 4. Interferon-induced expression of Efp. (A) Interferon (IFN)-induced expression of Efp mRNA. PC3 cells were treated with IFN α or the vehicle (PBS) for the indicated times. Real-time quantitative PCR was performed using cDNAs generated from total RNA. Experiments were repeated three times and the results are represented as means + SD.

Efpはインターフェロンに応答する

次にEfpの新たな誘導因子としてインターフェロンを見出した。インターフェロンは抗ウイルス作用や炎症に関与する因子として知られている。Efpにインターフェロンを添加したところその発現が誘導されることを見出した (Fig. 4)。このEfpのインターフェロンによる発現誘導はEfpのイントロン1に存在する応答部位にSTAT1が結合することにより発現誘導が行なわれることも我々は見出した⁵⁾。次にEfpはインターフェロンにより誘導されるユビキチン様たん白質である

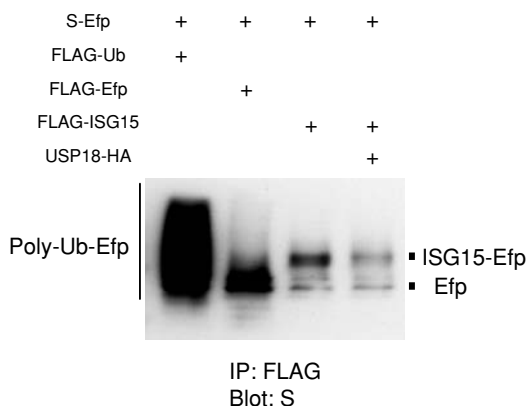


Fig. 5. ISG15-conjugation of Efp protein. ISGylation and ubiquitination of Efp protein. 293T cell extracts transiently transfected with Flag-tagged Efp (Flag-Efp), Flag-tagged ubiquitin (Flag-Ub), Flag-tagged ISG15 (Flag-ISG15) and HA-tagged USP18 (USP18-HA) were subjected to immunoprecipitation with anti-Flag antibody and, subsequently, to Western blot analysis probed with anti-S antibody. Signals for poly-Ub-Efp, ISG15-Efp, and Efp are indicated. ISG15-Efp conjugation was disrupted by USP18 which is an ISG15-specific protease.

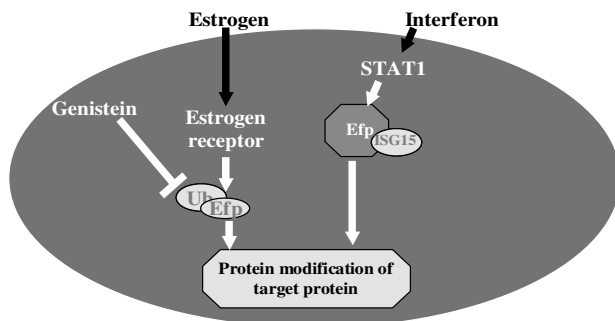


Fig. 6. Schematic representation of Efp-mediated signal transduction.

ISG15と結合することも見出した (Fig. 5)。したがって、Efpはエストロゲンばかりでなくインターフェロンならびにその応答たん白質であるISG15との結合を介してシグナル伝達を制御している可能性がある。このことはEfpががん以外にも免疫系での役割をはたしている可能性を示唆させるものである。

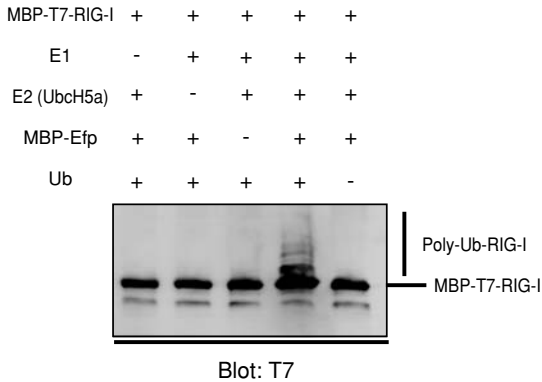


Fig. 7. Efp is a primary E3 ubiquitin ligase of RIG-I. Purified MBP-T7-RIG-I and MBP-Efp derived from *Escherichia coli* were incubated in a reaction buffer with ubiquitin, human recombinant E1 and human recombinant UbcH5a at 32°C for 2 hours and subjected to immunoblotting with anti-T7 antibody. Efp protein mediated the ubiquitination of RIG-I.

Efpの新たな基質RIG-Iと自然免疫における役割

Efpの免疫系における役割を明らかにするため、我々はEfpの新たな結合たん白質、特にユビキチン化を受ける基質たん白質を探索した結果RIG-Iを同定した⁶⁾。RIG-IはRNAウイルス感染時にRNAウイルスを感知しインターフェロン産生を行なうことが明らかにされていた。我々はリコンビナントたん白質を用いた *in vitro* ユビキチン化アッセイを行いEfpがRIG-Iのユビキチン化に必須なたん白質であることを見出した (Fig. 7)。またEfpとRIG-Iの共存によりインターフェロン産生が活性化されることを発見した。さらにEfpノックアウトマウス由来の線維芽細胞ではRNAウイルス感染に伴うインターフェロン産生が激減し、ウイルスに対する易感染性を示した。以上よりEfpは正常細胞においてはRNAウイルス感染時にRIG-Iを介したインターフェロン産生から抗ウイルス効果をもたらすために必須な因子であることが明らかとなった (Fig. 8)。今後、genisteinをはじめとした大豆たん白質による自然免疫の制御機構を明らかにするにあたってgenisteinからEfpを介した経路を検討する必要があると考える。

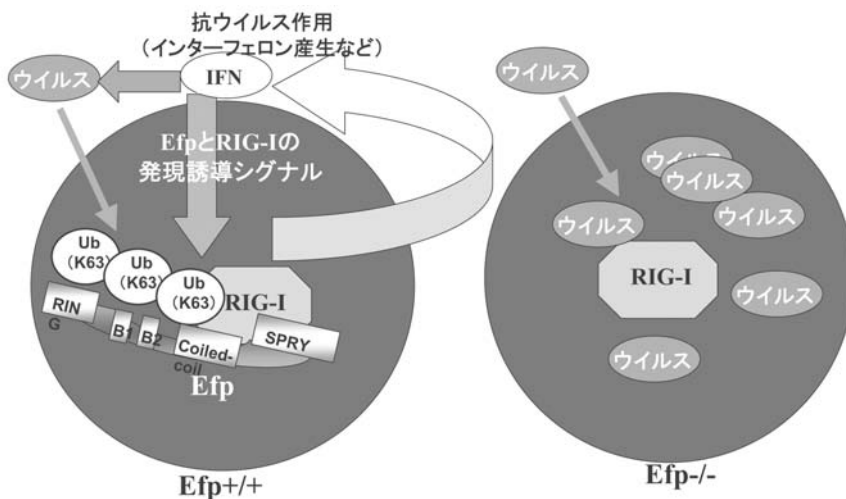


Fig. 8. Efp is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. On RNA virus infection in Wild-type (*Efp*^{+/+}) cells, interferon (IFN) induced Efp protein significantly accelerates the ubiquitination of RIG-I, increases the IFN production and suppresses RNA virus replication in positive feedback loop system. Whereas, *Efp*^{-/-} cells dramatically decrease IFN production and increase virus replication compared with *Efp*^{+/+} cells. Collectively, these results indicate that Efp is critical for cytosolic RIG-I signal transduction that mediates the induction of the IFN response on viral infection.

要 約

乳がんと前立腺がんは女性ならびに高齢男性の健康をおびやかす重要な課題となっている。一方、大豆たん白質は乳がんならびに前立腺がんの予防効果が知られている。特に大豆たん白質の構成成分であるGenisteinはがん細胞に対する増殖抑制効果が知られている。その分子機構においては、Genisteinがエストロゲン受容体と結合し、その下流シグナルを制御することが示唆されているが、がん発症抑制効果を有する標的因子は同定されていない。我々は乳がんにおける発がんに関わるエストロゲン応答遺伝子としてEfpを同定した。我々はEfpが標的たん白質のユビキチン化を行うユビキチンリガーゼとして機能し、細胞増殖抑制因子である14-3-3 σ のユビキチン化とたん白質分解を促進し、乳がん細胞の増殖を誘導することを発見した。また、ヒト乳がん検体を用いた探索により、Efpは悪性度の高い乳がんを高発現し、予後を規定する因子であることも見出した。興味深いことにこのEfpを介した増殖システムは前立腺がんにおいても作用していることを前立腺細胞株やヒト前立腺サンプルを用いた検討で我々は明らかにした。さらにEfpの発現を低下させたがん細胞株ではGenisteinによる細胞増殖停止が増強されたことから、大豆たん白質による乳がんならびに前立腺がんの発症予防においてはEfpと大豆たん白質によるシグナル伝達のクロストークが重要な役割を果たすことが示唆された。また、我々はEfpがユビキチン化を行う新たな標的たん白質としてRIG-Iを同定した。EfpによるRIG-Iのユビキチン化はインターフェロン産生をはじめとした免疫システムにおいて重要な役割を果たしていることを見出しており、Efpと大豆たん白質のクロストークを介した免疫システムの制御に関しても今後の解明が期待される。

文 献

- 1) Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T, Ikegami A, Ouchi Y, Orimo H and Muramatsu M (1993): Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 11117-11121.
- 2) Inoue S, Urano T, Ogawa S, Saito T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y and Muramatsu M (1999): Molecular cloning of rat efp: expression and regulation in primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 412-418.
- 3) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y and Inoue S (2002): Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature*, **417**, 871-875.
- 4) Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H and Inoue S (2005): Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 6148-6154.
- 5) Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Takeda S and Inoue S (2006): A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**, 540-546.
- 6) Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S and Jung JU (2007): TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*, **446**, 916-920.