

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370076

研究課題名 (和文)

ユビキチンリガーゼ F-box タンパク質の分子的・時空間的調節システムの解明

研究課題名 (英文)

Molecular and temporal-spatial regulation of ubiquitin ligase, F-box protein

研究代表者

中山 啓子 (NAKAYAMA KEIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60294972

研究成果の概要 (和文)：

F-box タンパク質は、SCF 複合体を構成しユビキチンリガーゼとして機能する。本研究課題では、代表的な F-box タンパク質である Fbxw7 と β -TrCP に注目し、そのノックアウトマウスの解析を中心として、生理的な役割の解明を試みた。Fbxw7 は、T 細胞や造血幹細胞では発がんを抑制するが、胎仔線維芽細胞やケラチン細胞では、むしろ増殖を促進した。 β -TrCP は増殖を促進する効果があることがわかった。

研究成果の概要 (英文)：

F-box protein functions as a ubiquitin ligase constructing SCF protein complex. In this project, I focused my interest on typical F-box proteins, Fbxw7 and β -TrCP. I analyzed their gene targeting mice to elucidate the biological function of these proteins. Although Fbxw7 suppressed tumorigenesis in T lymphocytes and hematopoietic stem cell, it facilitated cell proliferation in primary embryonic fibroblasts and keratinocytes. β -TrCP promoted cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	2,010,000	8,010,000
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,740,000	19,840,000

研究代表者の専門分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ユビキチンリガーゼ、 β -TrCP1、Fbxw7、ノックアウトマウス、ES細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質の量的制御を行う機構としてタンパク質の合成経路だけでなく、分解速度がその調節に非常に重要であると考えられるようになってきた。特に基質特異的にタンパク質分解を誘導するユビキチン・プロテアソーム系の重要性が注目されている。このユビキチン・プロテアソーム系は他の分解系と異なり非常に高い基質特異性をもって基質を分解する。このような特徴を発揮しているのは、ユビキチン付加酵素であるユビキチンリガーゼ (E3) に特異性があるためである。しかしながら、多くのユビキチンリガーゼが何を基質とし、ユビキチンを付加しているのか、真の生理的基質を明らかにする決定的な方法はない。

そこでわれわれは、ユビキチンリガーゼのノックアウトマウスを作製し、その表現型の探索から生理的基質を同定するという発生工学的手法を駆使したストラテジーで基質同定を進めてきた。

本研究課題では、SCF 複合体の構成因子である F-box タンパク質の中から 3 つのタンパク β -TrCP1、 β -TrCP2、Fbw7 に注目して研究を進める。

β -TrCP/Fbw1 (以下 β -TrCP) は、われわれを含む多くの研究室がユビキチンリガーゼとして機能する F-box タンパク質として初めて報告した分子であり、 β -catenin や I κ B α などをユビキチン化するユビキチンリガーゼである。しかしながら、われわれが作製した β -TrCP1 ノックアウトマウスでは、 β -catenin や I κ B α の分解がなお観察されることから、 β -catenin や I κ B α の分解を担うユビキチンリガーゼは β -TrCP1 のみではないことが示唆された。

β -catenin や I κ B α の分解を担うユビキチンリガーゼの候補としては β -TrCP2 が上げられる。 β -TrCP2 は、 β -TrCP1 とのアミノ酸配列の相同性が約 80%を示し、生化学的解析では β -catenin や I κ B α などを β -TrCP1 と同様に分解する。しかしながら β -TrCP2 のノックアウトマウスは、胎生 9.5 日に胎生致死であった。このことは β -TrCP1 と β -TrCP2 の間に生化学的に差違は認められていないにも関わらず、生物学的には大きな差を持っており、特に β -TrCP2 発生中期という時期に重要な機能を発揮していることを示している。

一方、Fbw7 は、われわれ及び他のグループがユビキチンリガーゼとして報告した分子である。Fbw7 はサイクリン E・c-Myc・Notch・c-Jun などのがん遺伝子産物とリン酸化依存的に結合し、それらをユビキチン化する。また、多くのがん細胞で変異が報告されていることからがん抑制遺伝子と考えられている。しかし、われわれが作製した Fbw7 のノックアウトマウスでは、胎生中期に血管形成異常のために死亡し、遺伝子変異の発がんへの寄与について考察することができなかった。そこでコンディショナルノックアウトマウスを作製しその解析を行ったところ、(1) 未熟な T リンパ球では過剰な増殖が、(2) 成熟 T リンパ球では抗原刺激依存的にアポトーシスが、(3) 胎仔線維芽細胞では増殖停止が、(4) 表皮細胞では過剰な増殖と分化の促進が観察されていた。

2. 研究の目的

このような 3 つのノックアウトマウスから得られる情報を基盤に時期依存的・組織依存的なタンパク質の蓄積とそれにもなった表現型をもたらす原因を分子レ

ベルから個体レベルまで解析し、タンパク質分解の分子機構が個体の恒常性維持にどのように関与するのかを解明する。

3. 研究の方法

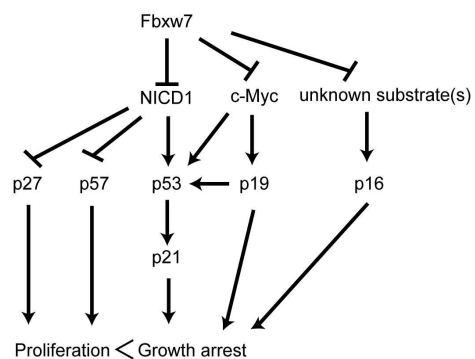
本研究は、以下の方法を用いて行った。

(1) ノックアウトマウスと野生型マウスから調製される細胞のタンパク質プロファイルと比較することによって、分解が抑制されているために蓄積しているタンパク質を同定する。プロファイルの比較には、MRM proteomics を用いたタンパク質絶対定量法を用いた。(2) 遺伝子破壊による効果をノックアウト細胞と野生型の比較だけでなく、組織間の比較を行うことによって、遺伝子破壊によって組織特異的な表現型の出現に関わっている可能性のあるタンパク質を決定する。F-box の組織特異的な機能発現様式を決定する。

4. 研究成果

Fbxw7 はユビキチンリガーゼ SCF 複合体を構成し、基質認識を担う F-box タンパク質であり、細胞周期を正に制御する蛋白質をユビキチン化し分解を誘導することが知られている。Fbxw7 コンディショナルノックアウト (CKO) マウス由来の胎仔線維芽細胞 (MEF) では、基質である Notch1 の細胞内ドメイン (NICD1) と c-Myc の蓄積を認め、細胞周期停止が誘導された。しかしながら、NICD1 と c-Myc の蓄積が、細胞周期停止を引き起こすメカニズムは明らかにはされていない。Fbxw7 欠損 MEF における CDK インヒビターの発現を解析したところ、p27^{Kip1} と p57^{Kip2} の発現量が奇妙にも減少していることが分かった。この現象は野生型 MEF への NICD1 の過剰発現によっても認めることや、

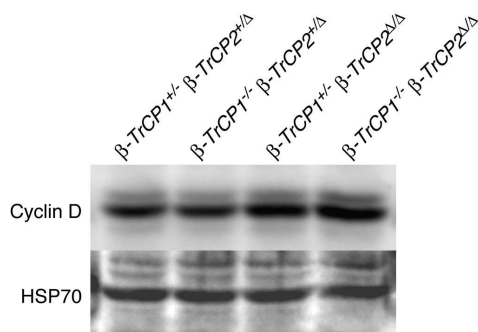
Fbxw7^{ΔΔ}Rbpj^{ΔΔ}MEF で解消されることから、p27^{Kip1} と p57^{Kip2} の発現量の減少は、基質である NICD1 に依存していた。一方で、Fbxw7 欠損 MEF では、p16^{Ink4a} と p19^{ARF} の発現上昇を認めたが、それらの上昇は NICD1 に依存していなかった。MEF における p19^{ARF} の発現上昇は、c-Myc の過剰発現で再現でき、c-Myc のノックアウトにより回復した。これらのことから、p19^{ARF} の増加は c-Myc の蓄積によるものであると考えられた。それとは異なり、p16^{Ink4a} の発現上昇は、c-Myc に依存しなかった。これらの結果は、CDK インヒビターは、Fbxw7 による蛋白分解システムによる複雑な制御を受けていることを示している(図 1)。



一方、β-TrCP1 KO より調整される MEF は、すでに増殖能が低下していることが報告されているが、β-TrCP2 KO MEF の増殖能はよりいっそう低下していた。β-TrCP で報告されている基質の発現量を調べてみると特にサイクリン D の蓄積が認められた。(図 2) サイクリン D は CDK4 と結合し CDK4 を活性化して細胞周期を S 期へ進める作用があるが、過剰に存在すると、CDK4 だけでなく CDK2 に結合しサイクリン E による CDK2 の活性化を阻害することが知られている。実際、β-TrCP2 MEF は、CDK4 活性は維持され

ているが、CDK2 活性の低下が認められ、それによって細胞周期の進行が抑制されていると考えられた。

なお、明らかなβ-catenin の分解抑制は認められないが、IκBαの TNFα による分解に遅延が認められた。このような傾向は、MRM proteomics によるタンパク質定量によっても確認された。



【図2】β-TrCP2 KO MEF におけるサイクリン D の蓄積

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件) ※すべて査読有

1. Onoyama, I., A. Suzuki, A. Matsumoto, K. Tomita, H. Katagiri, Y. Oike, K. Nakayama, K.I. Nakayama: Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J Clin Invest* 2011, 121: 342-354.
2. Matsumoto, A., Y. Tateishi, I. Onoyama, Y. Okita, K. Nakayama, K.I. Nakayama: Fbxw7beta resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci* 2011, 102: 749-755.
3. Funaki, T., S. Kon, R.E. Ronn, Y. Henmi, Y. Kobayashi, T. Watanabe, K. Nakayama, K. Tanabe, M. Satake: Localization of SMAP2 to the TGN and its Function in the Regulation of TGN Protein Transport. *Cell Struct Funct* 2011, 36: 83-95.
4. Fotovati, A., S. Abu-Ali, K. Nakayama, K.I. Nakayama: Impaired ovarian

development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *J Anat* 2011, 218 : 668-677.

5. Wang, H., F. Bauzon, P. Ji, X. Xu, D. Sun, J. Locker, R.S. Sellers, K. Nakayama, K.I. Nakayama, D. Cobrinik, L. Zhu: Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1+/- mice. *Nat Genet* 2010, 42: 83-88.
6. Tsuchiya, Y., T. Asano, K. Nakayama, T. Kato, Jr., M. Karin, H. Kamata: Nuclear IKKbeta is an adaptor protein for IκappaBα ubiquitination and degradation in UV-induced NF-κappaB activation. *Mol Cell* 2010, 39: 570-582.
7. Masuda, K., Y. Ishikawa, I. Onoyama, M. Unno, I.M. de Alboran, K.I., Nakayama, K. Nakayama: Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* 2010, 29: 1798-1809.
8. Wu, Y.J., G.B. Sala-Newby, K.T. Shu, H.I. Yeh, K.I. Nakayama, K. Nakayama, A.C. Newby, M. Bond: S-phase kinase-associated protein-2 (Skp2) promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in vivo. *J Vasc Surg* 2009, 50: 1135-1142.
9. Susaki, E., K. Nakayama, L. Yamasaki, K.I. Nakayama: Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106: 5192-5197.
10. Kimura, T., M. Sakai, K. Tabu, L. Wang, R. Tsunematsu, M. Tsuda, H. Sawa, K. Nagashima, H. Nishihara, S. Hatakeyama, K. Nakayama, M. Ladanyi, S. Tanaka, K.I. Nakayama: Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab Invest* 2009, 89: 645-656.
11. Jiang, X., P.F. Austin, R.A. Niederhoff, S.R. Manson, J.J. Riehm, B.L. Cook, G. Pengue, K. Chitale, K. Nakayama, K.I. Nakayama, S.J. Weintraub: Mechanoregulation of proliferation. *Mol Cell Biol* 2009, 29: 5104-5114.

12. Chari, R., T. Getz, B. Nagy, Jr., K. Bhavaraju, Y. Mao, Y.S. Bynagari, S. Murugappan, K. Nakayama, S.P. Kunapuli: Protein kinase C[delta] differentially regulates platelet functional responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, 29: 699-705.

[学会発表] (計 10 件)

1. Yuichiro Nishida, Winter Camp of GCOE 2011 ~The Cultivation of New Generation of Scientists~ Tohoku University Global COE for Conquest of Singal Transcution Diseases with "Network Medicine" "Genome-wide comprehensive and comparative analysis of next-generation sequencing data between CHIP-seq and RNA-seq" 仙台, 2011年2月5日.
2. Seiji Nakano, Yousuke Sasaki, Hozumi Motohashi, Keiko Nakayama, Winter Camp of GCOE 2011 ~The Cultivation of New Generation of Scientists~ Tohoku University Global COE for Conquest of Singal Transcution Diseases with "Network Medicine" "Geminin deletion in hematopoietic stem cells promotes differentiation of megakaryocytes and platelets" 仙台, 2011年2月5日.
3. Masaki Hosogane, Ryo Funayama, Yuichiro Nishida, Keiko Nakayama, Winter Camp of GCOE 2011 ~The Cultivation of New Generation of Scientists~ Tohoku University Global COE for Conquest of Singal Transcution Diseases with "Network Medicine" "Ras-mediated regional silencing around Fas gene locus" 仙台, 2011年2月5日.
4. 中野星児, 佐々木陽丞, 本橋ほずみ, 中山啓子, 第33回分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, "Gemininは造血幹細胞の維持と巨核球の分化を制御する" 神戸, 2010年12月9日.
5. 舟山亮, 細金正樹, 西田有一郎, 中山啓子, 第33回分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, "がん遺伝子RASによる広範囲染色体領域の遺伝子サイレンシング機構の解析" 神戸, 2010年12月8日.
6. 細金正樹, 舟山亮, 西田有一郎, 中山啓子, 第33回分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, "Ras-mediated

gene silencing によるFas遺伝子領域のエピジェネティック制御" 神戸, 2010年12月8日.

7. Keiko Nakayama, CSI Singapore, NUS-Tohoku University GCOE Joint Symposium, "Cell cycle control during differentiation: regulation by two F-box protein, Fbw7" Singapore, 2009年9月9日.
8. 中山啓子, 東北大学Network Medicine創生拠点冬の合宿, "タンパク質の翻訳後修飾制御機構とその破綻による疾患発症メカニズムの解明" 仙台, 2009年2月14日.
9. 山田秀俊, 中山啓子, 東北大学Network Medicine創生拠点冬の合宿, "GemininはMouse Embryonic Stem CellにおけるDNA複製と遺伝子発現を制御している" 仙台, 2009年2月14日.
10. 山田秀俊, 中山啓子, 第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, "Gemininはmouse Embryonic Stem CellにおけるDNA複製と遺伝子発現を制御する" 仙台, 2009年6月16日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 啓子 (NAKAYAMA KEIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60294972

(2) 研究分担者

石田 典子 (ISHIDA NORIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10361073

舟山 亮 (FUNAYAMA RYO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20452295

中野 星児 (NAKANO SEIJI)

東北大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：00529448

デル カルピオ ムニョス カルロス ア
ドリエル (DEL CARPIO MUNOZ CARLOS ADRIEL)

東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：20231053

西田 有一郎 (NISHIDA YUICHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00551821

(3) 連携研究者

なし