

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：12501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2011  
 課題番号：20570123  
 研究課題名（和文）レギュレータープロテオミクスによる新規の筋分化因子およびユビキチン装置の探索  
 研究課題名（英文）Search for novel myogenic factors and ubiquitination machineries by regulator proteomics  
 研究代表者  
 田村 隆明 (TAKAAKI TAMURA)  
 千葉大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号：30112692

## 研究成果の概要（和文）：

TIP120B で増えるタンパク質としてマイオジェニンと MyoD が同定され、マイオジェニンの分解関連酵素の成分として MAFbx が同定された。筋芽細胞分化は TIP120B や MyoD で上昇し、一方、筋萎縮措置ではこれらのタンパク質が低下した。TIP120B プロモーターは E-box をもち、MyoD により活性化され、TIP120B の発現は MyoD レベルと相関して変化した。MyoD はプロテアソームで分解されるが、それは TIP120B によって阻害された。以上の結果から、MyoD と TIP120B の間の相互活性化機構の存在が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

It was found that myogenin and MyoD were increased by TIP120B overexpression. Moreover, we identified MAFbx as a F-box protein in the SCF1 E3 ligase. Mouse C2C12 cells subjected to the myotube differentiation contained increased amounts of TIP120B and MyoD. Muscle atrophying dexamethasone decreased those proteins. Mouse and human TIP120B promoters, which carry multiple E-box motifs, were potentiated by MyoD. In the human TIP120B, a proximal E-box binds to MyoD *in vitro* and exhibits MyoD-dependent transcription activation function. Expression of the endogenous *TIP120B* gene was correlated with the level of MyoD in different types of muscle-related cells. Furthermore, MyoD binds specifically to a proximal E-box-carrying promoter region in chromatin. Proteasome-sensitive MyoD was increased and decreased by overexpression and knockdown of TIP120B. Moreover, stability of MyoD was increased by TIP120B. Therefore, it is suggested that MyoD and TIP120B potentiate each other at gene expression and post-translation levels respectively, which may promote myogenesis cooperatively.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：筋分化、ユビキチン化、TIP120、SCF、筋萎縮、MyoD

## 1. 研究開始当初の背景

筋分化は分化を研究する優れた実験系であり、これまでに分化制御因子に関する多くの研究が行われてきたが、その大部分は筋分化因子といわれる転写制御因子に関するものであった。筋分化因子の代表的なものとしては、分化の比較的初期に働く MyoD と、その後で働くマイオジェニンがあり、これらの遺伝子がノックアウトされると筋分化や筋成熟に影響が出ることがすでに知られている。筋分化においてはこれら筋分化因子が安定に細胞に存在する事が必要であるが、我々の研究により、筋分化因子の中でも特にマイオジェニンについて、この因子が非常に代謝回転の速いタンパク質であり、細胞内での安定な濃度維持が効率的筋分化にとって重要であることが示された。この事は下記に述べる研究によって明らかになった。我々は 1996 年に TIP120A とそのパラログである TIP120B の新規遺伝子を見出した。TIP120B は筋組織に特異的に発現し、またマウス発生時には肢芽に強い発現が見られ、さらに筋芽細胞の筋管細胞への分化に伴って発現が高まることから、筋分化と関連すると考えられた。TIP120B の強制発現やノックダウン実験を行ったところ、TIP120B は培養細胞レベルでの筋分化を推進する活性がある事が明らかとなった。さらに細胞内 TIP120B タンパク質とマイオジェニンのレベルの相関がみられた。マイオジェニンは非常に半減期が短い、TIP120B が存在するとその期間が長くなったことから、TIP120B がタンパク質分解抑制に働く事が考えられた。これらと並行して、TIP120A はユビキチン化酵素 E3 である SCF 複合体中のキュリンに結合し、E3 活性に必要な Nedd8 成分の結合を阻止する事がわかっていたので、TIP120B にも類似の活性があると推察された。そして実験の結果、TIP120B がキュリン 1 に結合すること、結合によって SCF 複合体が解離すること、さらにそれによってマイオジェニンがユビキチンされなくなって安定化し、それが TIP120B によるマイオジェニンの安定化とそれに基づく筋分化の促進が起こる事が示唆された。上述の事実は、TIP120B が SCF1 複合体を介するユビキチン化とそれに続くタンパク質分解を、マイオジェニンを例にとり具体的に示した。さらには、TIP120B によるマイオジェニンの分解抑制が筋分化に必要な事を具体的に示したものである。しかし、ここで「TIP120B が分解を抑えるタンパク質はマイオジェニンのみか？」という疑問

が生ずるが、それを考えるのに参考となる以下のような実験結果が得られている。まず、マイオジェニンのための SCF1 複合体に含まれている F ボックスタンパク質が MyoD でも使われる MAFbx である事が示唆されたが、興味ある事に、MAFbx は筋萎縮で発見された因子で、筋分化因子と筋肉の維持との関連を示した点で注目すべき現象である。さらに、TIP120 に結合する因子にはキュリン 1 以外にもいくつかあり、それによって別種の SCF 複合体が形成される。これらの事から、TIP120B の標的はマイオジェニンに留まらず、たにもいろいろあり、それらが総合的に筋形成に効いていると考えられる。

## 2. 研究の目的

上の予想が正しければ、TIP120B を発現させた細胞内では、いくつかのタンパク質のレベルが変化する（減少する）と予想され、それら、すなわちプロテオーム（この状態をレギュレータープロテオームと仮称している）を同定し、その機能を明らかにすることによって、筋肉維持機構がより深く理解できると考えられた。本研究の当初の目的は TIP120B の発現を通して新たな筋分化制御因子を見出し、それらの解析を通して、より詳細な、新しい筋分化機構を提唱する事であった。

## 3. 研究の方法

- ①TIP120B を細胞に強制発現させ、その細胞からタンパク質を回収し、プロテオーム解析を行う。
- ②タンパク質を同定したら、その機能解析を行う。とりわけ、筋分化因子の発現や安定性を詳細に解析する。

## 4. 研究成果

プロテオーム解析で、レベルが低下するタンパク質として、マイオジェニン、MyoD という既知の筋分化因子が示唆された。

マイオジェニンのための SCF に使われる F ボックスタンパク質が MyoD でも使用される MAFbx である事が明確に示された。

TIP120B によって MyoD の分解が緩やかになる事が明らかとなり、TIP120B がマイオジェニンのみならず、筋分化因子一般に利用されることが示唆された。

TIP120B 遺伝子のプロモーター部分を取得してプロモーター解析を行った。その結果、MyoD が転写活性化因子として働いている事が明らかとなった。以上の結果、筋分化でもっとも重要で分化開始の実際の引き金にな

る因子と TIP120B の間で、遺伝子発現の活性化とタンパク質の安定化という、正のポジティブフィードバック機構がある事が示され、TIP120B は多角的に筋細胞内で働く事により、筋分化の促進に寄与することが考えられた。

#### 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 5 件)

- ① Hidefumi Suzuki, Ryo Ito, Kaori Ikeda, and Taka-aki Tamura (2012) TATA-Binding Protein (TBP)-like protein is required for p53-dependent transcriptional activation of an upstream promoter of the p21<sup>Waf1/Cip1</sup> gene. *J. Biol. Chem.*, 査読有、287, 19792-19803.  
DOI:10.1074/jbc.M112.369629
- ② Takuya Kitamura, Hidefumi Suzuki and Taka-aki Tamura (2012). Mouse Wee1 Gene Is Repressed by Krüppel-Like Factor 3 (KLF3) via Interaction with Multiple Upstream Elements. *Gene*, 査読有、492, 361-367.  
DOI:10.1016/j.gene.2011.11.016
- ③ Shiraishi, Naomi Tamamura, Misako Jogo, Yuji Tanaka, and Taka-aki Tamura (2009). Rapid proteasomal degradation of TFIIB in accordance with F9 cell differentiation. *Gene*, 査読有、436, 115-120.  
DOI:10.1016/j.gene.2009.01.016
- ④ Misako Jogo, Seiji Shiraishi and Taka-aki Tamura (2009). Identification of MAFbx as a Myogenin-Engaged F-box Protein in SCF Ubiquitin Ligase. *FEBS Lett.*, 査読有、583, 2715-2719.  
DOI:10.1016/j.febslet.2009.07.033
- ⑤ Yusuke Suenaga, Toshifumi Ozaki, Yuji Tanaka, Youquan Bu, Takehiko Kamijo,

Takeshi Tokuhisa, Akira Nakagawara and Taka-aki Tamura (2009). TLP Is Engaged in Etoposide-induced Apoptosis through Transcriptional Activation of Human TAp63 Gene. *J. Biol. Chem.*, 査読有、284, 35433-35440.  
DOI:10.1074/jbc.M109.050047

[学会発表] (計 6 件)

- ① 鈴木秀文、鈴木あい、前川由惟、田村隆明「筋分化制御において TIP120B と MyoD の間に見られる正の相互活性化機構」第 34 回分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、横浜
- ② 伊藤亮、池田香織、小野恵美、田村隆明「ヒト p21 プロモーターをモデルとした TBP-like protein (TLP) の機能解析」第 33 回分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ③ 熊谷友、末永雄介、田村隆明「C/EBP $\alpha$  による TLP を介した TAp63 遺伝子転写制御機構」第 33 回分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ④ 城後美沙子、白石征士、竹脇万紗、田村隆明「マイオジェニンのユビキチン化に関する F-box タンパク質の同定」第 32 回分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜
- ⑤ 池田香織、小野恵美、田村隆明「TLP によって転写が制御される細胞周期因子」第 32 回分子生物学会年会、2009 年 12 月、9 日、横浜
- ⑥ 鈴木あい、白石征士、田村隆明「筋分化過程において TIP120B と MyoD の間に見られる正の制御機構」第 32 回分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、横浜

〔図書〕（計6件）

- ① 田村隆明、南山堂、わかる身につく生物、生化学、分子生物学、2011年、308ページ
- ② 田村隆明、東京化学同人、基礎細胞生物学、2010年、328ページ
- ③ 田村隆明、裳華房、医療・看護のための生物学、2010年、180ページ
- ④ 田村隆明、山本雅（編集）、羊土社、分子生物学イラストレイテッド・改訂第3版、2009年、348ページ
- ⑤ 田村隆明、裳華房、コア講義生化学、2009年、208ページ
- ⑥ 田村隆明、裳華房、コア講義生物学、2008年、208ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

（1人）

田村 隆明 (Takaaki Tamura)  
千葉大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：30112692

### (2) 研究分担者

（0人）

研究者番号：

### (3) 連携研究者

（0人）

研究者番号：