

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570175

研究課題名（和文）

Gdxによる細胞周期M期の抑制機構の解明

研究課題名（英文）

Analysis of M phase-regulation by Gdx

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：われわれはGdx/UBL4が細胞周期M期の制御因子cyclin Fに翻訳後修飾分子として共有結合し、cyclin Fのタンパク質安定性を制御することを明らかにした。Gdx化システムを担う酵素群やGdx化を受ける新規基質の同定を達成することはできず、M期を制御するGdx化の分子メカニズムの解明には至らなかった。また、当初Gdx化E3リガーゼの最有力候補として同定したRNFは、新規ユビキチンリガーゼとして精子細胞分化で機能することがRNF欠損マウスの解析より明らかとなり、今後発展させる予定である。

研究成果の概要（英文）：We found that cyclin F was covalently conjugated with Gdx (GdXylation). Our data suggested that GdXylation of cyclin F regulated its protein stability and cell cycle progression. Although we identified 11 Gdx- and 23 RNF (candidate of GdXligase)-binding proteins by biochemical techniques, identification of E1, E2 and E3 enzymes for GdXylation could not be achieved. It was suggested that RNF is functional as a ubiquitinligase in mouse spermatogenesis by analysis of RNF-deficient mice. So we will develop the functional analysis of RNF in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：翻訳後修飾、ユビキチン様タンパク質、細胞周期、細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の分解を中心としたユビキチン様タンパク質（UBL）による翻訳後修飾システムは

生命現象に必須であり、精力的に研究されている。

(1) われわれは、X染色体上に位置するユビ

キチン様タンパク質(UBL)、GdX/UBL4 が修飾分子として基質に共有結合(GdX 化)すること、M期の制御に関わる cyclin F が基質となり GdX 化されること、GdX 化が cyclin F のタンパク質安定性を制御することを発見した。

(2) 誘導型 GdXRNAi 安定発現株を作製してより詳細な細胞周期解析を行った結果、GdX タンパク質の減少によるM期の異常やそれに伴う多核化は、cyclin F の蓄積を介した cyclin A、cyclin B の分解異常で部分的には説明できたが、過剰に蓄積する cyclin F 量を RNA 干渉法によって正常量まで減少させても、cyclin A や cyclin B の分解異常は一部しかキャンセルされないことから、GdX は cyclin F のタンパク質分解を介した経路と cyclin F を介さない経路によって cyclin A や cyclin B の分解に関わっていると示唆された。

(3) これまでに生化学的手法により同定した GdX 化リガーゼの候補遺伝子は GdX 化を促進するものの、現在までにわかっている唯一の基質、cyclin F の GdX 化を促進しないことから、cyclin F 以外の基質の存在が強く示唆された。

(4) GdX 化システムに関わる GdX 活性化酵素(E1)、GdX 結合酵素(E2)はこれまでに同定されておらず不明である。

## 2. 研究の目的

われわれは、cyclin F が GdX 化されること、GdX 化が cyclin F のタンパク質安定性を制御することを発見し、GdX は細胞周期のM期の制御に重要な役割を果たしていることが示唆されたが、その分子メカニズムは不明である。本研究では、① 生化学的手法を用いて GdX 化が cyclin F の分解を促進する分子メカニズムや GdX 化の分子メカニズムを明らかにすること、② M 期制御に関わる cyclin F 以外の新規基質タンパク質の同定・機能解析を行うこと、③ 既に同定済みである GdX 化 E3 様リガーゼ候補遺伝子のノックアウトマウスを作製し、個体レベルでの機能解析を行うことによって、GdX 化の生理的機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) GdX 化による cyclin F タンパク質分解制御の生化学的解析

(2) GdX 化システム、E3 候補遺伝子 RNF 結合因子の生化学的手法による精製

(3) GdX 化システムの活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)遺伝子のホモロジー探索

(4) GdX 化新規基質分子、及び GdX 化システムの E1、E2 の生化学的・細胞生物学的機能解

析

(5) GdX 化リガーゼ(E3) RNF のノックアウトマウス作製、及び解析

## 4 研究成果

(1) cyclin F はユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解されることは HEK293T 細胞を用いた過剰発現系、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いた結果より明らかであった。GdX が結合しない cyclin F 変異体は分解が遅延するため、様々な cyclin F 欠失変異体を作製し、GdX は結合し、GdX 化されない変異体の作製を試みたが、GdX 化部位の同定には至らなかった。したがって GdX 化が cyclin F のユビキチン化に必要であるかどうかを明らかにすることはできなかった。

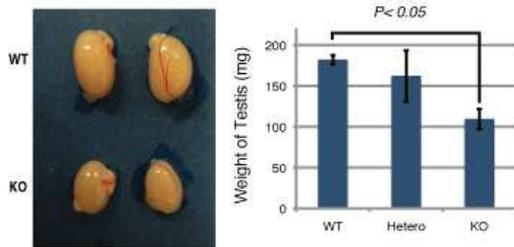
(2) GdX、及び GdX 化システム、E3 候補遺伝子 RNF 結合因子の生化学的手法による精製を行った結果、11 個の新規 GdX 結合タンパク質と 23 個の新規 RNF 結合タンパク質の同定に成功した。しかしこれらの中には E1 ユビキチン活性化酵素や E2 ユビキチン連結酵素にホモロジーを持つ、GdX システムの E1 や E2 様酵素候補タンパク質は含まれていなかった。また、GdX の新規基質候補遺伝子をクローニングし、細胞株を用いた共発現実験により、新規基質分子かどうかの判定を行った結果、明らかに陽性なタンパク質は含まれていなかった。

(3) 23 個の新規 RNF 結合タンパク質の中にはプロテアソームサブユニットや E2 ユビキチン連結酵素 E2D3、E3 ユビキチンリガーゼ構成因子 DDB1 などが含まれていた。これらはユビキチン化との関連を強く示唆するため、RNF のユビキチン化活性を調べた結果、RNF は新規ユビキチンリガーゼであることが判明した。また、結合タンパク質の中には RNF の基質である DNA 二重鎖切断修復に関わる Ku80 やヒストン H2A/H2B のシャペロンである NAP1L1 も含まれており、別の研究課題への発展が期待された。

(4) 生化学的手法による結合タンパク質の同定からは GdX 化システムの活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)遺伝子を同定できなかったため、in silico のホモロジーサーチを行い、得られた3つの E1 候補遺伝子について、細胞に GdX と共発現させて判定を行ったが、GdX とジエステル結合する E1 候補タンパク質は見つからなかった。以上より、GdX 化システムを担う酵素の同定には至らなかった。

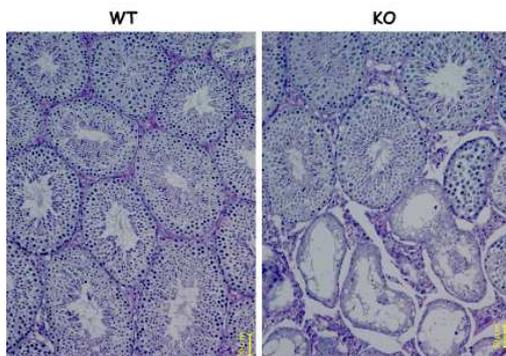
(5) GdX 化リガーゼ(E3)候補 RNF のノックアウト(KO)マウスを作製し解析を行った。RNF KO マウスは正常に生まれ、肉眼的な異常はほとんど見られない。しかし明らかな精巣の矮小化(図1)と精細管内の精母細胞脱落による精子低形

図 1. RNF KO マウスの精巣は小さい



成(図 2)が観察された。

図 2. RNF KO マウスの精巣は精子低形成を示す



また、実際に雄の RNF KO マウスの繁殖能力は有為に低いことも明らかとなった。

RNF KO マウスの作製を開始した時点では RNF は GdX 化システムの E3 リガーゼの最有力候補であったが、その後の解析により RNF はユビキチンリガーゼとして機能することが明らかになり、基質も複数同定することができた。したがって得られた RNF KO マウスの表現型は GdX 化に関わらないユビキチンリガーゼとしての RNF の機能に依存する可能性が高いと考えられた。そこで精巣において RNF の基質タンパク質の蓄積の有無を調べたところ、NAPIL1 の蓄積が明らかとなった。NAPIL1 のタンパク質分解異常による蓄積で表現型を説明できるかは不明である。しかし、ヒストン H2A/H2B のシャペロンである NAPIL1 が精子細胞の分化に伴い RNF により分解されていることが示唆され、この NAPIL1 の分解時期と精子細胞におけるヒストンからプロタミンへの置換時期が一致することが明らかになった。今後はこれらの関係について解析を進める予定である。

以上より、GdX 化による細胞周期 M 期の制御機構については GdX 化システムの分子メカニズムをはじめ、新規基質分子の同定は結局達成できなかった。GdX 化の E3 リガーゼ候補分子についても当初期待した機能とは別の機能を果たしていることが示された。したがって今後は得られたデータを基に新規ユビキチンリガーゼ RNF の機能解析へと発展させる予定である。

## 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 20 件) 全て査読有

1. Matsumoto A, Tateishi Y, Onoyama I, Okita Y, Nakayama K, Nakayama KI: Fbxw7  $\beta$  resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci.* 102, 749-755 (2011)
2. Funaki T, Kon S, Ronn RE, Henmi Y, Watanabe T, Nakayama K, Tanabe K, Satake M Localization of SMAP2 to the TGN and its Function in the Regulation of TGN Protein Transport. *Cell Struct.Funct.* 36, 83-95(2011)
3. Fotovati A, Abu-Ali S, Nakayama K, Nakayama KI :Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *J Anat.* in press, 2011
4. Kunimoto Y, Nakano S, Kataoka H, Shimada Y, Oshimura M, Kitano H :Deleted in Esophageal Cancer 1(DEC1) is down-regulated and contributes to migration in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *ORL J Otorhinolarygol. Relat. Spec.* 73, 17-23 (2010)
5. Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, Katagiri H, Oike Y, Nakayama K, Nakayama KI. :Fbxw7 controls lipid metabolism and cell fate decision in the liver in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 342-354 (2010).
6. Wang H, Bauzon F, Ji P, Xu X, Sun D, Locker J, Sellers RS, Nakayama K, Nakayama KI, Cobrinik D, Zhu L. :Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1(+/-) mice. *Nat. Genet.* 42, 83-88 (2010).
7. Tsuchiya Y, Asano T, Nakayama K, Kato T, Jr Karin M, Kamata H. :Nuclear IKK $\beta$  is an adaptor protein for I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination and degradation in UV-induced NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell* 39, 570-582 (2010).
8. Masuda K, Ishikawa Y, Onoyama I, Unno M, de Alboran IM, Nakayama KI, Nakayama K. :Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* 29, 1798-1809 (2010).
9. Susaki E, Nakayama K, Yamasaki L, Nakayama KI. : Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5192-5197 (2009).
10. Kimura T, Sakai M, Tabu K, Wang L, Tsunematsu R, Tsuda M, Sawa H, Nagashima K, Nishihara H, Hatakeyama S, Nakayama K, Ladanyi M, Tanaka S, Nakayama KI. : Human synovial sarcoma proto-oncogene

- Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab. Invest.* 89, 645-656 (2009).
11. Jiang X, Austin PF, Niederhoff RA, Manson SR, Riehm JJ, Cook BL, Pengue G, Chitaley K, Nakayama K, Nakayama KI, Weintraub SJ. : The mechanoregulation of proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5104-5114 (2009)
  12. Chari R, Getz T, Nagy B, Jr, Bhavaraju K, Mao Y, Bynagari YS, Murugappan S, Nakayama K, Kunapuli SP. : Protein kinase C[delta] differentially regulates platelet functional responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 699-705 (2009).
  13. Wu YJ, Sala-Newby, GB, Shu KT, Yeh HI, Nakayama KI, Nakayama K, Newby AC, Bond MJ. : S-phase kinase-associated protein-2 (Skp2) promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in vivo. *J. Vasc. Surg.* 50, 1135-1142 (2009)
  14. Qi J, Nakayama K, Gaitonde S, Goydos JS, Krajewski S, Eroshkin A, Bar-Sagi D, Bowtell D, Ronai Z. : The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 16713-16718 (2008)
  15. Ohsaki K, Oishi K, Kozono Y, Nakayama K, Nakayama KI, Ishida N. The Role of {beta}-TrCP1 and {beta}-TrCP2 in Circadian Rhythm Generation by Mediating Degradation of Clock Protein PER2. *J. Biochem.* 144, 609-618 (2008).
  16. Song MS, Song Sj, Kim Sj, Nakayama K, Nakayama KI, Lim DS. Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSF1A via ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene* 27, 3176-3185 (2008).
  17. Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, Suda T. : Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev.* 22, 986-991 (2008).
  18. Ishikawa Y, Onoyama I, Nakayama KI, Nakayama K. : Notch-dependent cell cycle arrest and apoptosis in mouse embryonic fibroblasts lacking Fbxw7. *Oncogene* 27, 6164-6174 (2008).
  19. Gallegos JR, Litersky J, Lee H, Sun Y, Nakayama K, Lu H. : SCF TrCP1 activates and ubiquitylates TAp63gamma. *J. Biol. Chem.* 283, 66-75 (2008).
  20. Chen Q, Xie W, Kuhn DJ, Voorhees PM, Lopez-Girona A, Mendy D, Corral LG, Krenitsky VP, Xu W, Moutouh-de Parseval L, Webb DR, Mercurio F, Nakayama KI, Nakayama K, Orłowski RZ. : Targeting the p27 E3 ligase SCFSkp2 results in p27- and Skp2-mediated cell cycle arrest, and activation of autophagy. *Blood* 111, 4690-4699 (2008)
- [学会発表] (計 24 件)
1. Masaki Hosogane, Ryo Funayama, Yuichiro Nishida, Keiko Nakayama : Ras-mediated regional silencing around Fas gene locus. 東北大学グローバルCOE Network Medicine創生拠点 冬の合宿2011、仙台、2011年2月5日
  2. Seiji Nakano, Yousuke Sasaki, Hozumi Motohashi, Keiko Nakayama : Geminin deletion in hematopoietic stem cells promotes differentiation of megakaryocytes and platelets. 東北大学グローバルCOE Network Medicine創生拠点 冬の合宿2011、仙台、2011年2月5日
  3. 中野星児, 佐々木陽丞, 本橋ほづみ, 中山啓子 : Gemininは造血幹細胞の維持と巨核球の分化を制御する. 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、神戸、2010年12月9日
  4. 舟山亮, 細金正樹, 西田有一郎, 中山啓子 : 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. 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、神戸、2010年12月8日
  5. 細金正樹, 舟山亮, 西田有一郎, 中山啓子 : 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. 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、神戸、2010年12月8日
  6. Keiko Nakayama : Geminin negatively regulates thrombopoiesis. MEXT Priority Research Project "Cell Proliferation Control" International Symposium Cell Cycle and Cell Differentiation From A to Z, 名古屋、2010年11月4日
  7. 細金正樹, 舟山亮, 中山啓子 : がん遺伝子Rasは複数の遺伝子を含む広範囲な染色体領域を抑制する. 日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、松島、2010年6月7日
  8. Masaki Hosogane, Ryo Funayama, Jafar Sharif, Haruhiko Koseki, Keiko Nakayama : Ras-mediated regional silencing around Fas gene locus. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES, Epigenetics, Chromatin & Transcription 蘇州、中国、2010年5月18日
  9. 石田典子, 家村俊一郎, 安井明, 夏目徹, 中山啓子 : Ku80のユビキチン化を介したDNA二重鎖切断修復制御. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月12日

10. 中野星児, 山田秀俊, 村井寛子, 佐竹正延, 中山啓子: T-cell differentiation and proliferation in Geminin gene-deleted mouse. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月11日
11. 青山慧, 石川善則, 小野山一郎, 中山敬一, 中山啓子: ユビキチンリガーゼSCF<sup>Fbw7</sup>はNotchタンパク質分解によりB細胞の分化を制御する. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月10日
12. Keiko Nakayama: Differential tissue specificity of ubiquitinligase SCF<sup>Fbw7</sup>. 東北大学グローバルCOE Network Medicine創生拠点国際シンポジウム、仙台、2009年12月7日
13. Seiji Nakano, Keiko Nakayama : Defect of T-cell differentiation and proliferation in Geminin gene deleted mouse. 東北大学グローバルCOE Network Medicine創生拠点国際シンポジウム、仙台、2009年12月7日
14. Keiko Nakayama : Cell cycle control during differentiation: regulation by two F-box protein, Fbw7. CSI Singapore, NUS- Tohoku University GCOE Joint Symposium、シンガポール、2009年9月9日
15. Keiko Nakayama : Differential specificity of substrate accumulation in ubiquitinligase SCFFBXW7 deficient cells. Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB) Cell Cycle Regulation and Tumorigenesis Symposium、シンガポール、2009年9月7日
16. 山田 秀俊, 中山啓子: Gemininはmouse Embryonic Stem CellにおけるDNA複製と遺伝子発現を制御する. 第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台、2009年6月16日
17. 石田典子, 家村俊一郎, 夏目徹, 中山啓子: 新規ユビキチンリガーゼによるヒストンシヤペロンNAP1L1の分解を介した細胞増殖制御. 東北大学グローバルCOE Network Medicine創生拠点 冬の合宿2009、仙台、2009年2月12日
18. 石田典子, 家村俊一郎, 夏目徹, 中山啓子: 新規RING-Fingerタンパク質はNAP1L1のユビキチン化を介して細胞増殖を抑制する. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008年12月11日
19. 青山 慧, 石川善則, 小野山一郎, 中山敬一, 中山啓子: ユビキチンリガーゼSCF<sup>Fbw7</sup>はBリンパ球の分化・生存の抑制因子である. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008年

12月10日

20. 石川善則, 小野山一郎, 中山敬一, 中山啓子: ユビキチンリガーゼSCF<sup>Fbw7</sup>は表皮角化細胞において増殖と分化を抑制する. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008年12月10日
21. 州崎悦生, 中山啓子, 中山敬一: ノックインマウスを用いたp27とp57の機能的類似性と特異性の検討. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008年12月10日

[図書] (計1件)

中山敬一、中山啓子 (監訳)、メディカル・サイエンス・インターナショナル、細胞周期 細胞増殖の制御メカニズム、2008、1-302

[その他]

ホームページ

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

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