

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770154

研究課題名 (和文) c-Jun 制御における転写抑制因子 Fb110 の機能解析

研究課題名 (英文) Study on the function of the transcriptional repressor Fb110 in the regulation of c-Jun

研究代表者

那須 亮 (NASU RYO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30466859

研究成果の概要 (和文)：転写抑制因子 Fb110 が、Heterochromatin Protein 1  $\gamma$  (HP1 $\gamma$ ) と協調して *c-jun* の転写を抑制していることを見出した。さらに、HP1 $\gamma$ が大腸癌細胞の腫瘍形成能に必要でないことを明らかにした。したがって HP1 $\gamma$ の抑制により生じた *c-jun* の増加は、細胞周期の G1-S 期遷移の促進ではなく、細胞死誘導に関与している可能性があると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：The transcriptional repressor Fb110 is found to cooperate with Heterochromatin Protein 1  $\gamma$  (HP1 $\gamma$ ) to repress *c-jun* transcription. Moreover, HP1 $\gamma$  is dispensable for the tumorigenicity of colon cancer cells. Therefore, the increase of c-Jun by HP1 $\gamma$  repression may be involved in the induction of cell death, rather than the promotion of G1/S transition of cell cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
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・細胞生物学

キーワード：クロマチン、細胞周期、c-Jun、JmJc、HP1

## 1. 研究開始当初の背景

*c-jun* は、ニワトリ肉腫ウイルスの持つ癌遺伝子 *v-jun* 類似の細胞遺伝子として分離された癌原遺伝子である。その遺伝子産物

*c-Jun* は、様々な細胞機能を調節している転写因子 AP-1 の主要な構成要素であり、特に細胞周期の G1-S 期遷移において重要な役割を担っていると考えられている。実際に *c-jun* 欠損マウス由来の線維芽細胞では、増

殖能の低下が観察される。反対に c-Jun を高発現させると、細胞周期 S 期の細胞の割合が多くなる事が知られている。さらに、いくつかのヒト癌では c-Jun の発現が高くなっていることが知られている。正常細胞において c-Jun の活性は、特異的転写抑制因子によって負に制御されていると考えられていた。

## 2. 研究の目的

我々は、c-Jun の転写抑制因子の探索を行い、c-Jun の結合蛋白質として Fb110/JHDM1B/FBXL10 を見出した。Fb110 は、ヒストン脱メチル化活性を持つ JmjC ドメイン、DNA 結合能を持つ CxxC ドメイン、修飾ヒストンとの結合が示唆されている PHD ドメイン、蛋白質分解に関与していると考えられている F-box ドメインとロイシンリピートを持つ。c-Jun は自らのプロモーターにある近位部位 2 カ所と結合することによって、その転写を自己調節することが知られている。我々は、Fb110 が c-Jun に結合すると同時に CxxC ドメインを介して c-jun プロモーターに直接結合し、転写を負に制御することを明らかにした。siRNA を用いて Fb110 の発現を抑制した細胞では、c-Jun の発現量増加が観察され、それに伴い S 期の細胞の割合が多くなる事が見出された (Koyama-Nasu et al. *Nat. Cell Biol.* 9, 1074-1080, 2007)。さらに、我々は Fb110 がその JmjC ドメインを介して、ヒストン H3K4 の脱メチル化反応を促進することを見出した (Frescas et al. *Nature* 450, 309-313, 2007)。ヒストン H3K4 のメチル化は、転写活性化と相関することが知られている。c-jun プロモーター上でもヒストン H3K4

のメチル化は報告されており、Fb110 が直接これを脱メチル化することにより、より効率的に c-jun の発現を抑制している可能性が推測される。

HP1 (heterochromatin protein 1) ファミリーは、ヘテロクロマチンの形成に重要な機能をもつ蛋白質である。しかし、ファミリーの中で HP1 $\gamma$ は、遺伝子を多く含むユークロマチンにも局在することが知られており、転写抑制への関与が示唆されている。我々は、Fb110 及びそのパラログス遺伝子産物である Fb111/JHDM1A/FBXL11 と HP1 $\gamma$ との相互作用を見出した (*J. Biol. Chem.* に投稿し改訂中)。したがって、Fb110 が HP1 $\gamma$ と協調して c-jun の発現を抑制している可能性が推測される。さらに、c-jun プロモーター上のヒストン H3S10 が、転写活性化時に特異的にリン酸化されることが報告されている。このリン酸化は HP1 $\gamma$ とヒストンとの結合を阻害することが知られており (Fischle et al. *Nature* 438, 1116-1122, 2005; Hirota et al. *Nature* 438, 1176-1180, 2005)、これが脱抑制による転写活性化のメカニズムの一つである可能性が推測される。

ヒストン脱メチル化酵素の基質特異性の制御は、未だ明らかになっていない。我々は、非常に相同性の高い JmjC ドメインをもつ Fb110 と Fb111 が、H3K4 と H3K36 という全く異なる基質特異性を示すことを見出した (Frescas et al. *Nature* 450, 309-313, 2007)。両者の修飾ヒストン結合ドメインである PHD は有意に異なっており、この違いが基質特異性に反映していると推測している。

Fb110 は、その F-box ドメインを介して蛋

白質のユビキチン化を促進することが推測されている。さらに、我々は Fb110 の F-box ドメインが、転写抑制に関与していることを見出した (Koyama-Nasu et al. *Nat. Cell Biol.* 9, 1074-1080, 2007)。

本研究はこれらの実験結果をふまえて、Fb110 による *c-Jun* の抑制のメカニズムをさらに明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 1) 転写活性化時の *c-jun* プロモーター上でのヒストンメチル化の観察

*c-Jun* は、UV 照射等のストレスシグナル後に迅速に活性化され、その標的遺伝子の発現を誘導することが知られている。*c-jun* の転写は自己調節され、UV 照射によって最も強く発現が誘導される遺伝子の一つとして知られている。HeLa 細胞を UV 照射処理した後に、各種抗メチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、*c-jun* プロモーター上のヒストンメチル化状態を観察する。*c-jun* は血清刺激によっても強く発現が誘導されることが知られている。血清飢餓状態におかれた T98G 細胞を血清で活性化した後に上記の実験を行い、結果を比較検討する。

#### 2) Fb110 による、*c-jun* プロモーター上でのヒストン脱メチル化の検討

HeLa 細胞に i) 野生型 Fb110 及び脱メチル化活性を持たない Fb110 変異体を強制発現させた後、及び ii) siRNA を導入して Fb110 の発現を抑制した後に、各種抗メチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、*c-jun* プロモーター上のヒストンメチル化状態を観察する。同時に *c-jun* の発現を RT-PCR

にて観察し、ヒストンメチル化との相関を検討する。同様な実験を Fb111 についてもを行い、結果を比較検討する。

#### 3) HP1 $\gamma$ の *c-jun* プロモーター上への局在の検討

HeLa 細胞を用いて、抗 HP1 $\alpha$ 、HP1 $\beta$ 、HP1 $\gamma$  抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、各々の *c-jun* プロモーター上への局在を解析する。HeLa 細胞を UV 照射処理した後に、抗リン酸化ヒストン抗体及び抗 HP1 $\gamma$  抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、*c-jun* プロモーター上のヒストンリン酸化状態と HP1 $\gamma$  の局在との相関を検討する。ヒストン H3 のセリン 10 番を、アラニン及びアスパラギン酸に置換した変異体を細胞内に強制発現させ、HP1 $\gamma$  の *c-jun* プロモーター上への局在を解析する。

#### 4) Fb110 の HP1 $\gamma$ との機能的相互作用の検討

*c-jun* プロモーターを用いたリポーターアッセイにおいて、i) HP1 $\gamma$  を強制発現させた場合、及び ii) siRNA を導入して HP1 $\gamma$  の発現を抑制した場合の Fb110 の転写抑制能を検討する。HeLa 細胞に i) HP1 $\gamma$  を強制発現させた場合、及び ii) siRNA を導入して HP1 $\gamma$  の発現を抑制した場合の Fb110 の *c-jun* プロモーター上への局在を、抗 Fb110 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法にて解析する。さらに HeLa 細胞に i) HP1 $\gamma$  を強制発現させた場合、及び ii) siRNA を導入して HP1 $\gamma$  の発現を抑制した場合の *c-jun* の発現を RT-PCR にて観察する。

#### 5) Fb110 の PHD ドメインに結合する修飾ヒストンの探索

NURF (nucleosome remodeling factor) の PHD ドメインは、メチル化されたヒストンを特異的に認識することが報告されている

(Wysocka et al. *Nature* 442, 86-90 2006; Li et al. *Nature* 442, 91-95 2006)。Fb110 及び Fb111 も PHD ドメインを有し、メチル化ヒストンへの結合が推測される。両者の PHD ドメインを GST に融合させた組換え蛋白質を作製し、HeLa 細胞から精製したヌクレオソームを基質とした結合実験を行う。これらを各種抗修飾ヒストン抗体を用いたウエスタンブロッティングにて比較検討する。さらに、各種合成ペプチドを用いて上記の実験結果を確認する。

#### 6) Fb110 の標的基質の探索

我々は、F-box 型のユビキチンリガーゼにも適用可能な標的基質の探索法を確立した。293T 細胞に HA タグを付加した Fb110 を強制発現させた後に、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行う。FLAG タグを付加したユビキチンを用いてユビキチン化アッセイを行い、抗 FLAG 抗体を用いて再び免疫沈降を行う。その後質量分析法によってユビキチン化された蛋白質を同定する。同様の実験を Fb111 及び最も研究されている F-box 型のユビキチンリガーゼである Skp2 についても行い、それぞれの結果を比較検討することにより、特異的な基質候補を同定する。

### 4. 研究成果

#### 1) HP1 $\gamma$ 特異的な *c-jun* の転写抑制

HeLa 細胞に siRNA を導入して、HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , HP1 $\gamma$  の発現を抑制した場合の *c-jun* の発現を RT-PCR にて観察した。その結果、HP1 $\gamma$  の発現を抑制した細胞では、顕著な *c-jun* の発現量増加が観察された (図)。それに対し、HP1 $\alpha$  および HP1 $\beta$

の発現を抑制した細胞では、*c-jun* の発現量に有意な変化は観察されなかった。特異的 siRNA の導入によって HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , HP1 $\gamma$  の発現が 20% 以下に抑制されていることは RT-PCR にて確認した。これらの結果と、Fb110 と HP1 $\gamma$  の特異的相互作用とを合わせると、Fb110 による *c-jun* の転写抑制に HP1 $\gamma$  が関与していることを示唆していると考えられる。

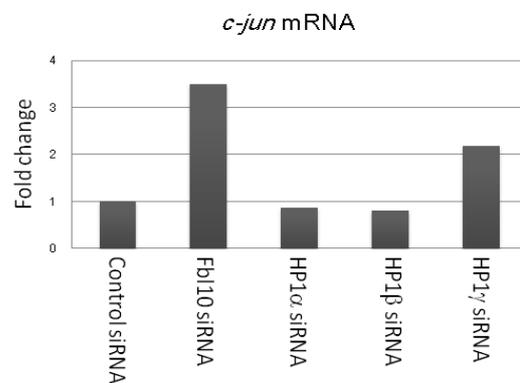


図 *c-jun* mRNA の RT-PCR 解析

#### 2) HP1 $\gamma$ による *c-jun* 抑制の腫瘍形成における意義

ヒト癌では c-Jun の発現亢進が頻繁に認められることから、HP1 $\gamma$  の発現を siRNA により抑制した大腸癌細胞の腫瘍形成能を観察した。予想に反して、HP1 $\gamma$  の発現抑制は腫瘍形成を促進しないことを見出した。したがって HP1 $\gamma$  の抑制により生じた *c-jun* の増加は、細胞周期の G1-S 期遷移の促進ではなく、細胞死誘導に関与している可能性があると考えられた。

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)

[学会発表] (計1件)

Ryo Koyama-Nasu, Gregory David, Michele Pagano, Naoko Tanese

The F-box protein Fbl10 is a novel transcriptional repressor of c-Jun

第21回内藤コンファレンス「細胞核ダイナミクスとRNA[ I ]」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 亮 (NASU RYO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30466859

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：