

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25年 5月 22日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700878

研究課題名（和文） RNAポリメラーゼII転写とリンクするp53制御機構

研究課題名（英文） Functional interaction between RNA PolII transcription and p53

研究代表者

川内 潤也 (KAWAUCHI JUNYA)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20544498

研究成果の概要（和文）：

p53はヒトがんにおいてもっとも高頻度に変異が認められるがん抑制因子である。一方、Pol IIを脱リン酸化し、新たな転写開始に向けてリセットする酵素の一つがFCP1であるが、本研究課題において、当該年度に以下の点を明らかにした。

1. HeLa CellにおけるFCP1ノックダウンによって細胞増殖が著明に抑制され、p53が蓄積し、p21が活性化していた。さらにFCP1とp53の*in vivo*での結合も示された。このことからgeneralな因子であるFCP1とp53に何らかのリンクが存在することが強く示唆された。2. FCP1には、RAP74 (TFIIF) 結合ドメイン、BRCTドメイン、FCPHドメイン、FCP1 specificドメインがあるが、このp21の誘導にはTFIIF結合ドメインは必須ではなく、BRCTドメインは必要であることが分かった。一般にBRCTドメインはリン酸化タンパクと結合することが知られており、ここにFCP1の未知の基質が結合する可能性が示唆された。3. Breast cancer cell line (MCF7)におけるDoxorubicinによるDNA傷害時には、FCP1ノックダウンによってp21誘導が抑制された。これらから、FCP1がPolIII以外に脱リン酸化の基質を持ち、p53シグナル系の中で何らかの制御に関わっていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

p53 is one of the tumor-suppressor genes which frequently have mutations in human cancer. FCP1 e-phosphorylates Pol II in order to re-cycle for the next round transcription at or after transcription termination. In this grant period, we found the connection between FCP1 and p53, detailed as below.

1. FCP1 knocking-down (siFCP1) HeLa cell showed significant growth defect along with p53 accumulation and p21 expression. Additionally, FCP1 was associated with p53 under 5-FU treatment in HeLa cell, indicating that there is the link between tumor suppressor p53 and Pol II phosphatase FCP1. 2. This p21 activation required BRCT domain, but does not required RAP74 binding domain. 3. Under doxorubicin treatment, siFCP1 MCF7 cell showed marked decrease in p21 expression. We could not detect the novel p53-related substrate of FCP1, however, these results suggested that FCP1 is involved in the p53 regulation pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん抑制遺伝子・p53

1. 研究開始当初の背景

真核細胞ではゲノム DNA から RNA への転写は3種類の RNA ポリメラーゼが行う。タンパクをコードする mRNA に加え、近年大きく注目を集める microRNA を含む small RNA などは RNA ポリメラーゼ II (Pol II) によって転写される。転写は開始・伸長・終結・リサイクルを経て再び開始に戻るサイクルを形成していると考えられており、その各 phase で co-transcriptional な転写産物 processing に大きな役割を演じているのが PolII 複合体の最大サブユニット Rpb1 の C-terminal domain(CTD)である。FCP1 は CTD を脱リン酸化する phosphatase であることから転写リサイクリング因子と考えられているが、in vivo での機能はほとんど解明されておらず、実際にリサイクリングに働いているかどうかははっきりしていない。われわれはレトロウィルスによる効率的な FCP1 ノックダウンの系を確立し、HeLa 細胞における FCP1 ノックダウンによって、細胞増殖が顕著に抑制されることを見出した。さらにその際、p53-p21 経路が活性化していることを見出した。

2. 研究の目的

p53 は DNA 損傷、各種ストレスによって核内

に迅速に蓄積し、“genome integrity” を保つべく転写因子として活性化する。その変異体はがんを誘発するが、p53 の micro RNA への関与も明らかとなり(Nature 2009)、ヒトががん制御への重要性が増している。FCP1 は RNA ポリメラーゼ(Pol) II を脱リン酸化する Pol II リサイクリング因子である。近年、FCP1 ノックアウトによる細胞休止 (*pombe* : JCS 2009) や細胞死 (*drosophila* : Cell. Mol. Life Sci. 2009) が報告され始めたが、われわれも独自にヒト細胞において FCP1 が p53 を介した細胞増殖抑制に関わることを見出している。本研究課題では、FCP1 による p53 生物機能制御についてそのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1). FCP1・p53 結合の詳細の同定、FCP1 複合体の精製と解析

p53 が含まれる FCP1 複合体を精製し、その機能を明らかにする。また、結合に必須のドメインを同定する。

(2). FCP1 による p53 脱リン酸化の検討

FCP1 の p53 制御機構を同定する。特に、p53 脱リン酸化について、直接なのか間接なのか、また介在する因子を同定する。

(3). p53 との関係における、Pol II 脱リン酸化以外の FCP1 の生物機能の解析

FCP1 に制御されるコーディング RNA、および microRNA についてアレイ解析を行い、p53 とリンクする FCP1 の新たな生物機能を明らかにする。

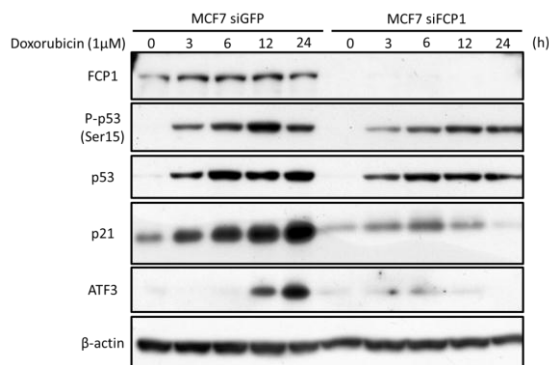
4. 研究成果

(1) (2). FCP1・p53 複合体の解析と脱リン酸化の検討

FLAG 及び His の二つの tag を持つ FCP1 を HeLa 細胞に発現させ両タグによる精製を行い複合体に含まれるタンパクについて質量分析による同定を試みた。FCP1 は検出できたが、TFIIF PolIII 以外に興味深い因子は検出できなかった。FLAG IP での western blotting では特に 5-FU ストレス時には p53 との結合がみられたが、通常状態では p53 の結合は見られなかった。また、PolIII との結合については、RAP74 結合ドメインが重要な役割を担っていることが明らかになった。現在 PolIII 以外の新規 FCP1 脱リン酸化の基質を探索すべく、抗体アレイ解析の準備を行っている。

(3). PolIII 脱リン酸化以外の FCP1 の生物機能について

DNA 傷害時における p21 の発現について、FCP1 が重要な役割を演ずることを見出した。(図参照)



FCP1 のノックダウンにより p21 に加え、ストレス誘導性転写因子である ATF3 の発現応答

も抑制されていた。この現象が Pol II 脱リン酸化の低下によるものか、FCP1 の伸長因子としての作用を失ったものかについて、PCR アレイを行い現在解析を進めている。

今後は FCP1 遺伝子の変異によって発症する congenital cataracts facial dysmorphism and neuropathy (CCFDN) についても FCP1 CCFDN type を使った様々な実験系でその発症のメカニズムに迫っていく予定である。

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 5 件)

Kawauchi J, Kitajima S: Encyclopedia of Systems Biology “Mechanism of Transcriptional Termination” Springer 2012
doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7

Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T, Kawauchi J, Takahashi H, Tsutsui A, Muraoka T, Inoue M, Tsuda M, Kitajima S, Conaway RC, Conaway JW, Trainor PA, Aso T. Transcriptional elongation factor elongin A regulates retinoic acid-induced gene expression during neuronal differentiation. Cell Rep. 2012 Nov 29;2(5):1129-36.
doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.031

Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Maehara Y, Kitajima S. Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. Oncogene. 2012 Apr 26;31(17):2210-21.
doi: 10.1038/onc.2011.397

Braglia P, Kawauchi J, Proudfoot NJ. Co-transcriptional RNA cleavage provides a failsafe termination mechanism for yeast RNA polymerase I. Nucleic Acids Res. 2011 Mar;39(4):1439-48.
doi: 10.1093/nar/gkq894

Tanaka Y, Nakamura A, Morioka MS, Inoue S, Tamamori-Adachi M, Yamada K, Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Tanaka H, Kitajima S. Systems analysis of ATF3 in stress

response and cancer reveals opposing effects on pro-apoptotic genes in p53 pathway. PLoS One. 2011;6(10):e26848. doi: 10.1371/journal.pone.0026848

〔学会発表〕(計 9 件)

井上 允, 川内 潤也他、
ストレス反応における mammalian Elongin A の特徴と役割 第 3 5 回分子生物学会 福岡、2012年12月

五嶋 大統, 川内 潤也他、
p53 非依存性 Death receptor (DR) 5 発現誘導における ATF3 の機能 第 3 5 回分子生物学会 福岡、2012年12月

枝川 真, 川内潤也他、
ストレス応答における P53-ATF3 間の機能的相互作用とその働き 第 3 5 回分子生物学会 福岡、2012年12月

安川孝史、川内潤也他
感覚神経系の発生・分化における転写伸長因子 Elongin A の役割 第 3 5 回分子生物学会 福岡、2012年12月

川内 潤也他、
ストレス誘導性転写因子 ATF3 と p53 の機能的相互作用 第 71 回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9月

小高愛未、川内潤也他、
PolII CTD 脱リン酸化酵素 FCP1 の細胞増殖に対する影響 第 3 4 回分子生物学会 横浜 2011年12月

井上 允, 川内 潤也他、
「ストレス反応における mammalian ElonginA の特徴と役割」第 3 4 回分子生物学会 横浜 2011年12月

佐々木かおり、川内潤也他、
転写因子 ATF3 による microRNA の発現制御機構 第 3 3 回分子生物学会 神戸 2010年12月

小高愛未、川内潤也他、
PolII CTD 脱リン酸化酵素 FCP1 の細胞増殖に対する影響 第 3 3 回分子生物学会 神戸 2010年12月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bgen/open.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

川内 潤也 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 助教)

研究者番号 : 20544498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし