

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891003

研究課題名(和文)細胞分化における基本転写因子の新規制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of cellular differentiation by degradation of core promoter recognition complex

研究代表者

中川 直 (NAKAGAWA, TADASHI)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30707013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の分化は発現遺伝子の大規模な変化によって引き起こされる。発現遺伝子の選択は基本転写因子と転写因子の協調的な働きによって行われるが、基本転写因子の制御機構は不明であった。本研究課題では、細胞分化過程において基本転写因子の構成タンパク質が積極的に分解され、その機能が変化すること、およびこの分解にはユビキチン・プロテアソーム系が関与することを見出した。さらに、筋分化過程と上皮間葉移行過程においては分解の標的となる構成タンパク質が異なっており、上皮間葉移行過程における構成タンパク質の分解は、分化刺激によって発現誘導されるユビキチンリガーゼの働きによって引き起こされることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cell differentiation accompanies global gene expression change. Previous studies revealed that genes to be expressed are determined by transcription factors, but emerging evidences indicate that the general transcription machinery is also involved in gene expression change. The general transcription machinery comprises several complexes, among which the promoter recognition complex TFIIID plays a pivotal role in the selection of expressed genes. During the differentiation of myoblastic cell line and the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of mammary epithelial cell line, several components of TFIIID were found to be degraded by the ubiquitin-proteasome system. Induction of EMT caused the increase in an ubiquitin ligase which promoted the degradation of the TFIIID component, leading to the reduction of translation-related gene expression. These results revealed a novel mechanism of regulation of the general transcription machinery by protein degradation during cell differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：発生・分化 上皮間葉移行 タンパク質分解 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化は、遺伝子発現の大規模な変化によって引き起こされる。発現遺伝子は専ら転写因子によって決定されると考えられ、細胞分化研究は転写因子を中心に展開してきた。しかし近年、それまで転写因子の下流で受動的な役割しか果たさないと考えられてきた基本転写因子が、その構成タンパク質を変化させることにより、細胞分化過程において能動的に発現遺伝子の選択に関わることが明らかになってきた。基本転写因子は転写の実行因子である RNA ポリメラーゼを遺伝子上に結合させるのに対し、転写因子はこれを促進するのみで、結合させる機能は持たない。これらことは、転写因子による遺伝子発現制御が基本転写因子に依存しており、転写因子のみでは細胞分化を説明できないこと、および細胞分化における基本転写因子の重要性を示している。しかし、細胞分化過程における基本転写因子制御のメカニズムは詳しく解析されていなかった。

タンパク質の機能制御は主に生成量の増減、翻訳後修飾、および分解によって行われる。真核生物における選択的タンパク質分解は、主にユビキチン-プロテアソーム系によって制御されている。この系では、分解の目印としてユビキチンが付加されたタンパク質がプロテアソームによって認識され、速やかに分解される。申請者はこれまで、ユビキチン-プロテアソーム系と遺伝子発現制御について研究を行ってきた。これを背景に、本研究計画ではユビキチン-プロテアソーム系が基本転写因子、特に DNA との結合に直接関わる TFIIID 構成タンパク質の分解を制御していると仮定し、その検証および細胞分化過程における重要性を検証することとした。

2. 研究の目的

本研究計画では、細胞分化の新しい分子メカニズムの解明を主眼とし、肥満症、筋萎縮、がん転移など分化関連疾患の治療を見据えた研究を行うことを目的とした。この目的を達成するため、以下に示す3つのことを明らかにすることを目指した。

(1) どの TFIIID 構成タンパク質がユビキチン-プロテアソーム系により制御されるか？

(2) どのユビキチンリガーゼが TFIIID 構成タンパク質のユビキチン化に関与するか？

(3) 上記の過程で明らかになった TFIIID 構成タンパク質制御が細胞の分化過程にどの程度寄与するか？

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用した細胞

筋分化のモデルとして、ATCC より購入したマウス筋芽細胞腫 C2C12 を用い、2%ウマ血清処理により筋分化誘導を行った。がんの転移に関わる上皮間葉移行のモデルとして、ATCC より購入したマウス乳腺上皮細胞 NMuMG を用い、TGF- β 刺激により上皮間葉移行の誘導を行った。

(2) タンパク質の解析

タンパク質の解析は購入可能な抗体を用いて行った。細胞内タンパク質量の解析にはウェスタンブロット法、タンパク質-タンパク質結合および細胞内ユビキチン化の解析では免疫沈降法、タンパク質-DNA 結合の解析ではクロマチン免疫沈降法を用いた。

(3) RNA の解析

細胞内 RNA 量は、RNA を cDNA に変換後、cDNA 量の定量的 PCR を行うことよって解析した。

(4) TFIIID 構成タンパク質の網羅的 DNA 結合領域の解析

ユビキチン-プロテアソーム系によって制御されていることが明らかとなった TFIIID 構成タンパク質の結合 DNA 領域を網羅的に同定するため、クロマチン免疫沈降法によって得られた DNA の塩基配列を HiSeq 2500 (Illumina) によって読み取った。

4. 研究成果

(1) 分化誘導刺激によってタンパク質量が減少する TFIIID 構成タンパク質の同定

C2C12 細胞の筋分化刺激および NMuMG 細胞の上皮間葉移行刺激によってタンパク質量が減少する TFIIID 構成タンパク質を同定した。さらにこれらのうち、速やかに減少するタンパク質はプロテアソームによって分解されることを見出した。興味深いことに、刺激によって分解される TFIIID 構成タンパク質は、筋分化と上皮間葉移行で異なっていた。これまでの研究から、プロテアソームによって分解されるタンパク質は、分解の目印であるユビキチンがユビキチンリガーゼによって付加されることが知られている。このことから、刺激依存的に分解される TFIIID 構成タンパク質の種類の選択には、刺激依存的に活性化されるユビキチンリガーゼが関与することが示唆された。

(2) 上皮間葉移行刺激による TFIIID 構成タンパク質の分解を引き起こすユビキチンリガーゼの同定

C2C12 細胞の筋分化刺激によって活性化されるシグナル伝達系は多岐にわたり、全貌がいまだに解明されていない。それに対し、

NMuMG 細胞の上皮間葉移行刺激によって活性化されるシグナル伝達系は比較的明らかにされていたことから、TFIID 構成タンパク質を分解に導くユビキチンリガーゼの同定には、NMuMG 細胞の上皮間葉移行刺激によるものを優先することとした。

今回同定された TFIID 構成タンパク質の分解は、刺激直後ではなく刺激後 1 日から認められたため、この分解に関与するユビキチンリガーゼは上皮間葉移行刺激によって発現誘導されると仮定した。上皮間葉移行刺激 2 日目の遺伝子発現変化をマイクロアレイによって大規模に解析したデータが公開されていたため、このデータから上皮間葉移行刺激によって発現誘導されるユビキチンリガーゼを探索し、6 種類を同定した。このうち、上皮間葉移行刺激 1 日以内に誘導されること、核に局在すること、および TFIID 構成タンパク質と結合することを条件にさらに絞り込みを行い、これらすべてに該当する 1 種類のユビキチンリガーゼに注目した。さらなる解析により、このユビキチンリガーゼは、TGF- 刺激により活性化された SMAD タンパク質によって発現誘導されること、直接 TFIID 構成タンパク質と結合してユビキチン化を引き起こすことが明らかとなった。

(3) 上皮間葉移行に対する TFIID 構成タンパク質分解の機能の解析

上皮間葉移行に対する TFIID 構成タンパク質分解の機能を解析するため、今回同定された TFIID 構成タンパク質の発現を抑制したところ、細胞の生存が著しく減少した。このことから、このタンパク質は細胞の生存に必須であることが明らかとなった。次に、今回同定されたユビキチンリガーゼを発現抑制することによって、上皮間葉移行過程における TFIID 構成タンパク質の分解を抑制したが、上皮間葉移行に対する影響は認められなかった。このことから、今回同定された TFIID 構成タンパク質の分解は上皮間葉移行過程には関与しないことが示唆された。

TFIID 複合体は遺伝子のプロモーター領域に結合し、遺伝子の発現を制御することが知られている。上皮間葉移行に対する TFIID 構成タンパク質分解の機能をより詳細に調べるため、今回同定された TFIID 構成タンパク質が結合する DNA 領域を、クロマチン免疫沈降法によって得られた DNA の塩基配列を読み取ることで網羅的に同定した。予想された通り、これらのうちの大部分 (86%) は、遺伝子の転写開始点近傍のプロモーター領域に同定された。これらのプロモーター領域に近接する遺伝子が今回同定された TFIID 構成タンパク質によって制御されるターゲット遺伝子と考えられることから、これらの遺伝子から生成されるタンパク質を機能面から

分類したところ、タンパク質の翻訳に関わるタンパク質の遺伝子が有意に多いことが明らかになった。さらに TFIID 構成タンパク質の発現を抑制すると、これらの遺伝子発現が減少したことから、TFIID 構成タンパク質はこれらの遺伝子の発現を正に制御することが示唆された。

今回用いた TGF- 刺激は、上皮間葉移行とともに、細胞増殖の停止と細胞死を引き起こすことが知られている。タンパク質の翻訳は細胞増殖と生存に必須であることから、今回観察された TFIID 構成タンパク質の分解は、これらの過程に関与していることが示唆された。実際、今回同定されたユビキチンリガーゼを発現抑制すると、TGF- 刺激によるタンパク質の翻訳関連遺伝子の発現低下、細胞増殖の停止、および細胞死が抑制されたことから、この仮説が支持された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Nakagawa, T. & Nakayama, K. Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes Cells* (in press).
査読有

Nakagawa, T., Lv, L., Nakagawa, M., Yu, Y., Yu, C., D'Alessio, A.C., Nakayama, K., Fan, H.Y., Chen, X. & Xiong, Y. CRL4(VprBP) E3 ligase promotes monoubiquitylation and chromatin binding of TET dioxygenases. *Mol. Cell* 57, 247-60 (2015).
査読有
DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.002.

Vulto-van Silfhout, A.T., Nakagawa, T., Bahi-Buisson, N. et al. Variants in CUL4B are associated with cerebral malformations. *Hum. Mutat.* 36, 106-17 (2015).
査読有
DOI: 10.1002/humu.22718.

Nakagawa, T., Mondal, K. & Swanson, P.C. VprBP (DCAF1): a promiscuous substrate recognition subunit that incorporates into both RING-family CRL4 and HECT-family EDD/UBR5 E3 ubiquitin ligases. *BMC Mol. Biol.* 14, 1-12 (2013).
査読有
DOI: 10.1186/1471-2199-14-22.

[学会発表](計5件)

Nakagawa, T. & Nakayama, K. : TFIID complex changes accompany epithelial-mesenchymal transition (EMT).

第 37 回日本分子生物学会年会，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市），（2014/11/25）.

中川直：ユビキチンリガーゼ -TrCP2 による p19Arf の分解を介した細胞増殖制御. 第 20 回がん・エピゲノム研究会，長陵会館（宮城県仙台市），（2014/4/23）.

中川直，荒木孝明，中山啓子：p19Arf の分解を介したユビキチンリガーゼ -TrCP2 による細胞増殖制御. 第 36 回日本分子生物学会年会，神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市），（2013/12/5）.

〔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

中川 直 (NAKAGAWA, Tadashi)
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30707013

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

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

細金 正樹 (HOSOGANE, Masaki)

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号 30734347