

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590272

研究課題名 (和文) ユビキチン (様) 修飾による DNA 複製・修復の制御とがん化との関連

研究課題名 (英文) Regulation of DNA replication and repair by ubiquitin or ubiquitin-like modification in cancer cells.

研究代表者

内田 千晴 (UCHIDA CHIHARU)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60223567

研究成果の概要：

癌抑制遺伝子産物 RB タンパク質 (pRB) は、細胞増殖を正に制御している E2F 依存性の遺伝子発現を抑制する。最近 pRB は細胞周期進行の抑制に働くのみならず、DNA 複製制御因子との結合を介する複製反応阻害や、DNA ダメージで誘導される細胞周期停止にも関与することが分かってきた。また DNA および染色体ヒストンのメチル化を介し、遺伝子発現を負に制御すると考えられている jumonji は、pRB と結合することが知られている。これらは pRB と染色体(クロマチン)関連因子との相互作用が、適切な細胞機能の維持に重要であることを意味している。我々は pRB および pRB 結合蛋白質のユビキチン様修飾とクロマチン制御との関連に注目し、次の 2 項目を目的として研究を進めた。1) RB タンパク質のユビキチン (様) 修飾が DNA 複製・修復関連因子との相互作用に関与し、複製・修復の過程を制御もしくは攪乱する可能性を検証する。2) pRB と結合する染色体制御関連因子のユビキチン化による細胞周期依存的な量的制御機構を解明し、がん化との関連を検証する。

本研究期間内では以下のような成果を得た。

- ① 2005 年に我々は pRB が Mdm2 によってユビキチン化され、プロテアソーム依存的分解を受けることを報告した (Uchida et al. *EMBO J.*)。本研究では pRB が新規の修飾を受けることにより、pRB-E2F 結合が抑制されることを見出した。この修飾はユビキチン様修飾因子の一つによるものであった。
- ② Mdm2 はユビキチン化以外の働きによって、pRB の染色体への結合を制御している可能性が示された。
- ③ jumonji は Mdm2 によってユビキチン化されることが分かった。しかし、そのユビキチン化と jumonji の安定性制御との関連性を示す結果は得られず、Mdm2 による jumonji のユビキチン化は蛋白質分解以外のシグナルとなる可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：pRB, クロマチン、ユビキチン、DNA複製、がん化

### 1. 研究開始当初の背景

RBタンパク質 (pRB) は、主に E2F 依存性転写活性の阻害作用によって細胞周期 G1-S 進行の抑制に働くとされてきた。しかし最近では、pRB が MCM4、MCM7 や ORC などの複製開始制御因子を介して複製前複合体 pre-RC と直接結合し、複製反応を阻害することが分かってきた。また、SWI/SNF 複合体の構成因子 Brg-1 と pRB の結合が、DNA ダメージで誘導される細胞周期停止に必要であると報告された。さらに、PCNA の DNA へのロードに必須である RFC1 と pRB の結合が証明された。また DNA メチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる jumonji は pRB と結合する。これらは pRB とクロマチン関連因子との相互作用が、適切な細胞機能の維持に重要であることを意味している。我々は、pRB が Mdm2 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、プロテアソーム依存的分解を受けることを報告した (Uchida et al. *EMBO J.* 2005)。以上の背景から我々は、pRB および pRB 結合蛋白質のユビキチン様修飾とクロマチン制御との関連に注目した。

### 2. 研究の目的

- 1) RB タンパク質のユビキチン(様)修飾が DNA 複製・修復関連因子との相互作用に

関与し、複製・修復の過程を制御もしくは攪乱する可能性を検証する。

- 2) pRB と結合するクロマチン制御関連因子のユビキチン化による細胞周期依存的な量的制御機構を解明し、がん化との関連を検証する。これら 2 点に関して、具体的には次の 2 項目を明らかにしたいと考えた。

- 1) pRB のユビキチン様修飾はクロマチン構造制御を介した細胞核内動態にどのような影響を与えるのか。
- 2) jumonji の翻訳後修飾と安定性制御機構。pRB-jumonji 相互作用の細胞増殖制御における重要性。

### 3. 研究の方法

- 1) U2OS 細胞に pRB を、HA-標識されたユビキチン様タンパク質 UBLx (HA-UBLx) を発現導入し、抗 UBLx または抗 HA 抗体を用いて UBLx 修飾された pRB の検出を行った。また HA-UBLx のみを細胞内に強発現させ、内因性 pRB の修飾を調べた。さらにリコンビナント pRB および UBLx を細胞抽出液と共にインキュベーションし、pRB の *in vitro* UBLx 化を試みた。*In vivo* および *in vitro* での pRB の UBLx 化が pRB 結合蛋白質との相互作用に影響を与えるか調べるため、免疫沈降実験を行って比較検討した。

- 2) pRB のユビキチンリガーゼである Mdm2 をプロテアソーム阻害剤存在下で細胞に強発現させ、界面活性剤を含むバッファー洗浄にて細胞質および核質を除去し、クロマチン画分のみを残して細胞を固定した。内因性のクロマチン結合型 pRB を免疫染色によって解析した。
- 3) Mdm2 は pRB と結合し、pRB をユビキチン化-プロテアソーム依存性分解に導く。したがって pRB 結合蛋白質である jumonji も Mdm2 によるユビキチン化を受ける可能性があると考えた。そこで HEK293 細胞に jumonji および Mdm2 を異所性に発現させ、両者の結合および jumonji のユビキチン化を免疫沈降実験によって調べた。また、Mdm2 を含め、種々のユビキチンリガーゼを siRNA でノックダウンし、jumonji の半減期の変化を調べた。Jumonji は神経、心筋細胞の分化に必須であることが Takeuchi らによって報告されているが、増殖中の細胞周期制御における重要性については明らかではない。これを検証するため、ヒトがん細胞またはヒト正常繊維芽細胞の jumonji を siRNA によってノックダウンし、細胞周期進行への影響を調べた。

#### 4. 研究成果

- 1) U2OS 細胞に pRB とユビキチン様タンパク質 UBLx を異所性に発現させると、pRB は UBLx 修飾を受けることが分かった。細胞内に UBLx を過剰発現させると、内因性 pRB の修飾が弱いながら観察された。リコンビナントの pRB, UBLx, E1, および E2 と、細胞から免疫沈降によって精製した UBLx 修飾酵素の候補とを共に反応させたが、*in vitro* での UBLx 化 pRB を検出できなかった。pRB の UBLx 化を触媒する細胞内因子の同定については今後の課題である。一方、細胞に UBLx を一過性に過剰発現させると pRB と E2F1 の結合が阻害された。これまでのところ E2F1 の UBLx 化については検出していない。この結果は、pRB の E2F 依存的遺伝子発現に対する阻害作用が pRB の UBLx 修飾によって抑制される可能性を示している。すなわち、UBLx 修飾により、pRB-E2F 相互作用を介する細胞増殖、アポトーシスが制御され得ると考えられる。以上のように我々は pRB の新規の修飾を発見し、これが細胞周期における pRB の活性を負に制御する可能性を示した。この発見は pRB 経路を介したがん抑制のメカニズムにおいて重要であると考えられる。
- 2) プロテアソーム活性を阻害した条件下でも、Mdm2 の過剰発現によりクロマチン結合型 pRB の発現量が減少した。我々は Mdm2 が pRB のユビキチン-プロテアソーム系分解を促進することを報告したが、pRB とクロマチン相互作用に関わる別の制御があるのかもしれない
- 3) HEK293 細胞に jumonji と Mdm2 を異所性に発現させると、Mdm2 は jumonji のユビキチン化を著しく亢進した。免疫沈降実験により Mdm2 と jumonji の結合も観察された。しかしながら、内因性 Mdm2 のノックダウンは、jumonji の半減期に影響を与えなかった。すなわち Mdm2 によるユビキチン化は jumonji の安定性以外の機能制御に関わっている可能性が考えられた。その他幾つかユビキチンリガーゼをノックダウンしたが、jumonji の発現量に影響を与えなかった。一方、同調細胞を用いた実験において、jumonji が細胞周期依存的に発現する傾向が見られた。また jumonji をノックダウンすると、細胞周期進行の異常が観察された。これらについてはさらに慎重な解析が必要である。jumonji はヒスト

ンH3K9のメチル化酵素と相互作用することが知られており、クロマチン構造変化に関わるとも考えられる。上記の結果は jumonji が正常な細胞増殖制御に必要であることを示唆しており、jumonji がどのようにエピジェネティックな遺伝子発現と細胞増殖の制御に関わるのか興味深い。

#### 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 15 件)

全て査読あり

1. Yamamoto, M., Kikuchi, H., Ohta, M., Kawabata, T., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Kitagawa, M., Konno H. TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the pre-metastatic niche. *Cancer Res.* 68: 9754-9762, 2008.
2. Ohashi, N., Yamamoto, T., Huang, Y., Misaki, T., Fukasawa, H., Suzuki, H., Togawa, A., Suzuki, S., Fujigaki, Y., Nakagawa, T., Nakamura, Y., Suzuki, F., Kitagawa, M., Hishida, A. Intrarenal RAS activity and urinary angiotensinogen excretion in anti-thymocyte serum nephritis rats. *Am J. Physiol Renal Physiol.* 295: F1512-1518, 2008.
3. Hayakawa, M., Matsushima, M., Hagiwara, H., Oshima, T., Fujino, T., Ando, K., Kikugawa, K., Tanaka, H., Miyazawa, K., Kitagawa, M. Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCFFWD1/ $\beta$ -TrCP-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes to Cells* 13: 329-442, 2008.
4. Abe, K., Hattori, T., Isobe, T., Kitagawa, K., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, M. Pirh2 interacts with and ubiquitylates signal recognition particle receptor beta subunit. *Biomed Res.* 29:53-60. 2008.
5. Kurata, K., Yanagisawa, R., Ohira, M., Kitagawa, M., Nakagawara, A., Kamijo, T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene* 27: 741-754, 2008.
6. Fukasawa, H., Yamamoto, T., Kitagawa, M. and Hishida, A. Regulation of TGF-beta signaling by Smads and its roles in tissue fibrosis. *Current signal transduction therapy (review article)* 3: 1-6, 2008.
7. Hattori, T., Isobe, T., Abe, K., Kikuchi, H., Kitagawa, K., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, M. Pirh2 Promotes Ubiquitin-Dependent Degradation of the CDK Inhibitor p27Kip1. *Cancer Research* 67:10789-10795, 2007.
8. Ohoka, N., Hattori, T., Kitagawa, M., Onozaki, K. and Hayashi H. Critical and functional regulation of CHOP (C/EBP homologous protein) through the N-terminal portion. *J Biol Chem.* 282: 35687-35694, 2007.
9. Arakawa, T., Yamamura, T., Hattori, T., Hayashi H., Mori, A., Yoshida, A., Uchida, C., Kitagawa, M., Onozaki, K. Contribution of Extracellular Signal-Regulated Kinases to the IL-1-induced Growth Inhibition of Human Melanoma Cells A375. *International Immunopharmacology* 8: 80-89, 2007.
10. Kono, S., Suzuki, H., Oda, T., Takahashi, Y., Shirakawa, K., Takahashi, Y., Kitagawa, M., Miyajima, H. Cys-881 is essential for the trafficking and secretion of truncated mutant ceruloplasmin in aceruloplasminemia. *J.*

- Hepatology 47:844-850, 2007.
11. Kikuchi, H., Yamamoto, M., Hiramatsu, Y., Baba, M., Ohta, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Suzuki, S., Sugimura, H., Kitagawa, M., Kanai, T., Kitayama, Y., Kanda, T., Nishikura, K., Konno, H. Effect of loss of heterozygosity of the c-kit gene on prognosis after hepatectomy for metastatic liver gastrointestinal stromal tumors. Cancer Sci. 98: 1734-1739, 2007.
  12. Kikuchi, H., Uchida, C., Hattori, T., Isobe, T., Hiramatsu, Y., Kitagawa, K., Oda, T., Konno, H., Kitagawa, M. ARA54 is involved in transcriptional regulation of the cyclin D1 gene in human cancer cells. Carcinogenesis 28:1752-1758, 2007.
  13. Suzuki, S., Fukasawa, H., Kitagawa, K., Uchida, C., Hattori, T., Isobe, T., Oda, T., Misaki, T., Ohashi, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Hishida, A., Yamamoto, T., Kitagawa, M. Renal damage in obstructive nephropathy is decreased in Skp2-deficient mice. Am. J. Pathol. 171:473-483, 2007.
  14. Inoue, Y., Kitagawa, M., Taya, Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. EMBO J. 26:2083-2093, 2007.
  15. Li, S., Gao, Y., Tokuyama, T., Yamamoto, J., Yokota, N., Yamamoto, S., Terakawa, S., Kitagawa, M., Namba, H. Genetically engineered neural stem cells migrate and suppress glioma cell growth at distant intracranial sites. Cancer Letters, 251(2): 220-227, 2007.

[学会発表] (計 6件)

1. 小田敏明 服部隆行 磯部智康 北川恭

- 子 内田千晴 横田貞記 北川雅敏 タンパク質過剰発現誘導性小胞体の構造と機能、第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸
2. 磯部智康 島田真衣 劉寧 北川恭子 鈴木小由里 小田敏明 服部隆行 内田千晴 北川雅敏 GPR48 による癌転移機構の解析、第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸
3. 北川雅敏 細胞周期制御分子 p27 のユビキチン依存的分解機構と病態、第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会合同大会、2007 年 12 月 12 日、横浜
4. 鈴木小由里 深澤洋敬 北川恭子 戸川証 大橋温 小田敏明 内田千晴 服部隆行 中山敬一 山本龍夫 菱田明 北川雅敏 腎障害進行における Skp2 発現亢進の解析:Skp2KO マウスを用いた検討、第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会合同大会、2007 年 12 月 7 日、横浜
5. Kitagawa, M. et al. Novel regulatory mechanisms of Cyclin D1 expression、第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 5 日、横浜
6. 北川雅敏 癌関連核内因子のユビキチン依存的制御機構、Nuclear Signaling JAPAN 2007 シンポジウム、2007 年 7 月 13 日、東京

[その他]

ホームページ

<http://www2.hama-med.ac.jp/wla/biol/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 千晴 (UCHIDA CHIHARU)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号:60223567

### (2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

北川 雅敏(KITAGAWA MASATOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号:50294971