

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05845

研究課題名(和文) AMPKの新規基質DDB1を介したユビキチン化修飾に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of AMPK on ubiquitination modification via novel substrate DDB1

研究代表者

鈴木 司 (Suzuki, Tsukasa)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20714588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：AMPKは同化作用を抑制し異化作用を活性化することで、細胞内のエネルギー恒常性を調節するキナーゼである。本研究では、CUL4 E3ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子であるDDB1をAMPKの新規基質として同定し、AMPKはDDB1のセリン残基を直接リン酸化することを明らかにした。また、このリン酸化修飾により、DDB1とその結合因子であるDDB2との相互作用を抑制することが示された。また、AMPKによるDDB1のリン酸化はDDB1を核から細胞質へと局在を変化させることも明らかとなった。以上のことから、AMPKはDDB1のリン酸化を介してCUL4 E3ユビキチンリガーゼを制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMPKが関与するDDB1の新たな翻訳後修飾を明らかにしたことで、DDB1を構成因子とするCUL4 E3ユビキチンリガーゼの活性制御をより詳細なレベルで理解することができる。また、DDB1を含むCUL4ユビキチンリガーゼは核内および細胞質の両方にて基質のユビキチン化をおこなうが、本研究により、AMPKがDDB1をリン酸化することでCUL4の局在を細胞質へと変化させることがわかり、CUL4が核・細胞質にと多くある基質に対する選択性がAMPKによって制御されることが示された。また、DDB1は紫外線によるDNAダメージを修復する機能もある。したがって、これらの知見がDNA修復に対する一助になる。

研究成果の概要(英文)：AMPK is a kinase that regulates intracellular energy homeostasis by inhibiting anabolism and activating catabolism. In this study, we identified DDB1, a component of the CUL4 E3 ubiquitin ligase complex, as a novel substrate for AMPK and showed that AMPK directly phosphorylates the serine residue of DDB1. This phosphorylation was also shown to inhibit the interaction between DDB1 and its binding factor, DDB2. The phosphorylation of DDB1 by AMPK was also shown to alter the localization of DDB1 from the nucleus to the cytoplasm. Taken together, these results indicate that AMPK regulates the CUL4 E3 ubiquitin ligase via phosphorylation of DDB1.

研究分野：栄養生化学

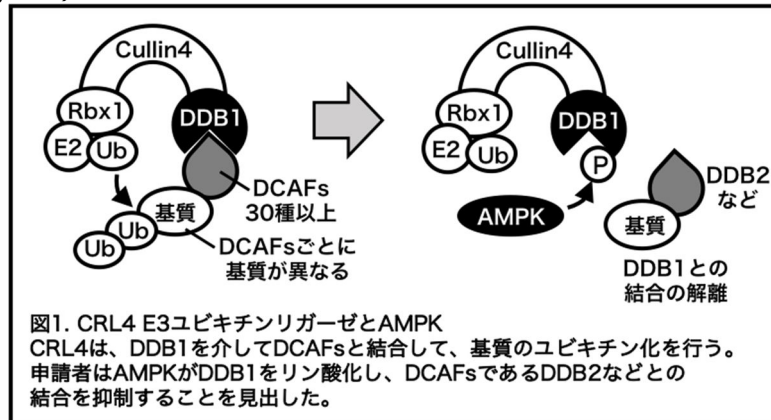
キーワード：AMPK DDB1 ユビキチン化修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のユビキチン化は、単に不要なタンパク質分解の目印として作用するだけでなく、様々な生命現象を制御するためにも必須である。このユビキチン化は、E1、E2、E3の三種類の触媒酵素群を介して行われ、E3 ユビキチンリガーゼは基質を認識する役割を担っており、その種類は多岐にわたる。代表的な E3 ユビキチンリガーゼとして、Cullin を母体とする CRLs (Cullin-Ring ubiquitin Ligases) が存在する。

本研究で着目する CRL4 は、DDB1-Cullin4-Rbx1 を恒常的な構成因子としており、これに 30 種以上の基質認識サブユニットである DCAFs が DDB1 を介して結合する(図 1)。DCAFs の一つに DNA の損傷部位を認識する DDB2 が存在し、これを介して損傷部位に局在する XPC やヒストン H3 などがユビキチン化されることで DNA 修復を促進する。このように DDB1 と



DCAFs との結合は、CLR4 によるユビキチン化を介した様々な生命現象の制御において重要であるが、この結合がどのように制御されるかについては不明な部分が多い。

申請者はこれまでに、細胞内のエネルギー恒常性を制御する AMPK キナーゼについて、その結合タンパク質を解析してきた。その結果、解析した結合タンパク質の中に DDB1 が存在したため、DDB1 が AMPK の新規基質であるか申請者らは予備的検討を行ったところ、次のような結果が得られた。AMPK が DDB1 を直接リン酸化することを *in vitro* kinase assay および、作製した部位特異的リン酸化抗体によって明らかにし、DDB1 が新規基質であることを同定した。DDB2 を含む数種の DCAFs と DDB1 との結合は、AMPK によるリン酸化修飾によって阻害されることが示された。

DCAFs は共通する DDB1 結合モチーフを持つことや、DDB1 のリン酸化部位が DCAFs との結合に関与するドメインであることから、予備的検討を行った DCAFs 以外においても DDB1 との結合は AMPK によって変動することが考えられる。そのため、AMPK は CRL4 依存的なユビキチン化修飾を幅広く制御する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまでの研究では、DDB1 と結合する DCAFs の同定について数多く報告されているものの、どのようなシグナルによって DCAFs と DDB1 との相互作用が制御されるかについては十分な解析が行われていない。また DNA 損傷部位を認識する DDB2 は、XPC などのユビキチン化に関与する過程で、DCAFs である DDB2 自身も CRL4 によってユビキチン化され分解される。しかし、DDB2 が分解される生理学的意義や、DNA が損傷を受ける前後で DDB1 と DDB2 の結合がどのように制御されるかについても不明な点が多い。

本研究では申請者が見出した AMPK による DDB1 のリン酸化修飾が、CRL4 依存的なユビキチン化修飾に及ぼす影響を解明する。そのために DDB2 以外に、どのような DCAFs が AMPK によって影響を受けるか網羅的に明らかにする。また、AMPK が DDB1-DDB2 複合体の形成を阻害することで DNA 修復にどのような影響を及ぼすかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

AMPK による DDB1 のリン酸化修飾の解析

[³²P]ATP を用いた *in vitro* kinase assay を行い、AMPK が DDB1 を直接リン酸化するか解析を行う。また、それと同時に、そのリン酸化部位も同定を行う。さらに、*in vivo* における目的部位のリン酸化修飾を検出するために、抗リン酸化 DDB1 抗体を用いた western blotting を行う。目的の抗体が市販されていないため、抗体を作成する。作成した抗体が目的部位のリン酸化修飾を検出できるか確かめる。そのために、野生型 (WT) または目的部位のアミノ酸をアラニンに変異させた変異体 (A 変異体) の DDB1 をそれぞれ 293T 細胞に発現させ、DDB1 のリン酸化を検出する。さらに、脱リン酸化酵素を用いてリン酸化修飾が消失することを確かめる。

次に、検出されたリン酸化修飾が AMPK によるものか調べる。そのために、培養細胞に AMPK の活性化剤や阻害剤を処理したりすることで、リン酸化の増減が認められるか確認する。

AMPK による DDB1 と DCAFs との結合性の解析

これまでに同定されている DCAFs の発現プラスミドを作製し、培養細胞を用いた強制発現系にて免疫沈降法による DDB1 と DCAFs との結合を解析する。その際、メトホルミンなどの AMPK 活性化剤や DDB1 のリン酸化模倣変異体などを用いて解析する。結合に変化が認められた DCAFs については、その特異的抗体を用いて内因性においても変動するか免疫沈降法などで確認をする。

リン酸化 DDB1 が細胞内局在性に与える影響の解析

DDB1 は紫外線照射を受けることによって細胞質から核内に移行し、DNA 損傷部位にて DDB2 と強く共局在する。そこで、DDB1 のリン酸化状態の違いによって、DDB1 の核移行ならびに DDB2 との局在がどの様に変化するかを蛍光顕微鏡にて経時的に観察する。DDB2 は核内に局在するため、DDB1 のリン酸化が核移行にも影響を及ぼすか示すことができる。また、DDB1 自身には核移行シグナルがないため、DDB1 の核局在は結合因子により制御されることが知られている。そこで DDB1 と結合する CUL4 のアイソフォームの 1 つであり、核移行シグナルを持つ CUL4B を用いて解析を行う。

ユビキチン化解析ならびにその生理学的影響の解析

AMPK によって制御される DCAFs において、その基質がユビキチン化修飾も変化するか調べる。そのために、基質とユビキチンのそれぞれの発現プラスミドを培養細胞に発現させ、AMPK の活性によるユビキチン化修飾の変動を western blotting により検出する。また、ユビキチン化によって分解されることが既知の基質においては、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド等を用いて分解まで促進されているか解析する。そして、そのユビキチン化修飾によって生じる生理学的影響が AMPK の活性状態によって変化するか解析する。

DDB1 のリン酸化修飾が DNA 修復に及ぼす影響の解析

DDB2 は紫外線等によって生じるシクロブタン型ピリジンダイマー (CPD) を認識し、その後、CRL4 によってユビキチン化されることで DNA 修復が次のステップへと移行する。DDB2 との結合を阻害する DDB1 のリン酸化修飾が、DNA 修復にどのような影響を及ぼすか調べる。DNA 複製による損傷の希釈を防ぐためにチミジンを過剰処理した後、培養細胞に紫外線を照射し、一定時間培養後の修復の割合を抗 CPD 抗体による ELISA 法にて解析する。

4. 研究成果

AMPK による SRSF1 のリン酸化修飾の解析

AMPK リン酸化モチーフのコンセンサス配列をもとに、DDB1 のアミノ酸配列を解析した結果、DDB1 の Ser757 の周囲のアミノ酸配列のみが AMPK リン酸化モチーフのコンセンサス配列と一致した。AMPK が Ser757 を直接リン酸化するか調べるために、大腸菌から精製した Ser757 を含むポリペプチドを基質として *in vitro* キナーゼアッセイを行った結果、AMPK は DDB1 野生型ポリペプチドをリン酸化したが、Ser757 をアラニンに変異させると (S757A)、AMPK によるリン酸化は完全に阻害された。そのため、AMPK が DDB1 の Ser757 を直接リン酸化することが *in vitro* で示された。培養細胞において AMPK が DDB1 をリン酸化するかどうかを確認するために、p-Ser757 DDB1 抗体 (pS757-DDB1) を作製し、これを用いて解析を行った。その結果、AMPK 過剰発現は野生型 DDB1 の Ser757 リン酸化を促進したが、このリン酸化は脱リン酸化酵素で処理することで完全に消失した。さらに、AMPK が内因性 DDB1 をリン酸化するかどうかを調べた結果、AMPK 阻害剤である Compound C は DDB1 の Ser757 のリン酸化を抑制したが、AMPK 活性化剤である A769662 はリン酸化レベルを上昇させた。

AMPK による DDB1 と DCAFs との結合性の解析

AMPK による DDB1 のリン酸化部位は DCAFs の一つである DDB2 との結合部位が近いいため、DDB1 と DDB2 との結合性に AMPK が関与するか検討を行った。HEK293T 細胞に AMPK と DDB1 を過剰発現させ、その破砕液を用いて DDB1 と DDB2 の結合を免疫沈降法にて解析した。その結果、AMPK の過剰発現により、DDB1 と DDB2 の結合能が減少した。また、AMPK によるリン酸化修飾がこの結合能の低下に関与しているか確認するために、DDB1 の S757 残基をアスパラギン酸に置換した DDB1 のリン酸化模倣体である S757D 変異体を用いて同様の解析を行った。その結果、DDB1 S757D 変異体においても同様に DDB2 との結合が減少した。

リン酸化 DDB1 が細胞内局在性に与える影響の解析

DDB2 は核局在性のタンパク質であり、核移行シグナルを持たない DDB1 を核に局在させる。そこで、リン酸化修飾による DDB2 との結合能の低下が、DDB1 の細胞内局在性にも影響を及ぼすか検討を行った。蛍光免疫染色法を用いて DDB1 の局在の解析を行った結果、DDB2 との結合が減少した DDB1-S757D、リン酸化 DDB1 は細胞質に留まり、DDB2 との共局在も確認されなかった。以上の結果より、AMPK は DDB1 をリン酸化することにより DDB2 との結合能を低下させ、DDB1 を細胞質に局在させることが明らかになった。

次にリン酸化 DDB1 と CUL4B との結合性を解析するために、HEK293T 細胞に DDB1 と CUL4B を過剰発現させ、免疫沈降法を行い、そのサンプルを Western Blotting 法 (WB) にて解析した。その結果、DDB1 のリン酸化修飾にかかわらず、DDB1 は CUL4B との結合が示された。

次に、CUL4B との共発現によりリン酸化 DDB1 は核移行するか検討するために、HeLa 細胞に CUL4B と DDB1 WT、S757D を過剰発現させ、免疫染色法にて局在性を解析した。その結果、野生型の DDB1 は CUL4B によって核移行するものの、リン酸化模倣体は CUL4B によっても核移行しないことが示された。また、通常では核局在する CUL4B も DDB1 のリン酸化模倣体により細胞質へ

の局在が示され、DDB1 のリン酸化修飾は DDB1 結合タンパク質による核移行の働きを抑制することが示唆された。

AMPK による DDB1 のリン酸化が Cullin4 E3 ユビキチンリガーゼに及ぼす影響

DDB1 のリン酸化模倣体と DDB2 の結合減少が示されたため、実際の AMPK による DDB1 のリン酸化においても同様の結果が得られるか解析した。HEK293T 細胞に DDB1、DDB2、AMPK を過剰発現させ、免疫沈降し、そのサンプルを WB にて検出した結果、AMPK の DDB1 リン酸化により、DDB2 との結合が減少した。DDB2 は DDB1 を介して Cullin4 E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、プロテアソーム分解される。そのため、DDB1 のリン酸化によって DDB2 のユビキチン化に変化が生じるのか解析を行った。その結果、AMPK の過剰発現によって、DDB2 のユビキチン化は減少することが示された。

次に、AMPK による DDB2 の安定性に対する影響を検討するために DDB2 のタンパクレベルを解析した。HEK293T 細胞に AMPK を過剰発現させ、内因性 DDB2 のタンパクレベルを調べた結果、DDB2 のタンパクレベルの上昇が見られた。したがって、AMPK は DDB1 のリン酸化を介して DDB2 の安定化に寄与することが示唆された。

DDB1 のリン酸化修飾が DNA 修復に及ぼす影響の解析

紫外線照射が DDB1 のリン酸化状態に変化を及ぼすか、また、そのリン酸化状態の変化が DNA 修復に及ぼす影響を検討した。予備検討の結果、HEK293T 細胞に UVB(302 nm)を 10 mJ/cm² 照射した後、6 時間後から CPD が減少し、24 時間後で CPD の著しい減少を確認した。そこで、CPD の減少が確認できた照射後 6 時間培養した細胞における AMPK 及び DDB1 のリン酸化状態を解析した。その結果、UVB 照射によって AMPK の活性化に重要なリン酸化および DDB1 のリン酸化レベルの低下が確認された。そこで内因性の DDB1 をノックダウンさせた上で DDB1 のリン酸化模倣体を再発現させ、この細胞を用いて UVB 照射後の CPD 修復の解析を行った。その結果、DDB1 WT を発現させた細胞と比較して DDB1 のリン酸化模倣体を発現させた細胞においては、CPD 修復が遅延した。以上の結果より、DNA 修復の開始には DDB1 のリン酸化レベルの低下が重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Izumi Akiko, Hiraguchi Haruka, Kodaka Manami, Ikeuchi Emina, Narita Junko, Kobayashi Rina, Matsumoto Yu, Suzuki Tsukasa, Yamamoto Yuji, Sato Ryuichiro, Inoue Jun	4. 巻 567
2. 論文標題 MIG12 is involved in the LXR activation-mediated induction of the polymerization of mammalian acetyl-CoA carboxylase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 138 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Eri, Matsumoto Yu, Inoue Jun, Yamamoto Yuji, Suzuki Tsukasa	4. 巻 534
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase regulates β -catenin protein synthesis by phosphorylating serine/arginine-rich splicing factor 9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 347 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Eri, Akiyama Kaho, Saito Takuya, Matsumoto Yu, Kobayashi Ken-Ichi, Inoue Jun, Yamamoto Yuji, Suzuki Tsukasa	4. 巻 477
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase regulates alternative pre-mRNA splicing by phosphorylation of SRSF1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 2237 ~ 2248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Tsukasa, Kojima Momoko, Matsumoto Yu, Kobayashi Ken-Ichi, Inoue Jun, Yamamoto Yuji	4. 巻 533
2. 論文標題 Niclosamide activates the AMP-activated protein kinase complex containing the β 2 subunit independently of AMP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 758 ~ 763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------