

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13802  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24570151  
研究課題名(和文) E3リガーゼSCF-Fbw7の新規機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of the novel function of SCF-Fbw7

## 研究代表者

北川 恭子 (Kitagawa, Kyoko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20299605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：GATA3へのFbw7の関与に注目し、Cdc4 phosphodegron (CPD) 領域のリン酸化に依存したFbw7のGATA3への結合、ユビキチン化および分解亢進を確認した。CPDのリン酸化はCDK2が主酵素で、細胞周期G2/M期にリン酸化、分解が誘導されることもわかった。個体でのGATA3に対するFbw7の寄与はT細胞特異的な遺伝子欠損マウスで解析した。その結果、一部の前駆細胞でのGATA3タンパク増大、前駆細胞や脾臓内T細胞の存在率の変動、前駆細胞の細胞死亢進および分化成熟遅延が観察された。よってFbw7はGATA3の量的調節を介して、胸腺細胞の分化成熟を正常化すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Fbw7 bound to, ubiquitylated, and destabilized GATA3 using overexpressed proteins in cultured cells. Cdc4 phosphodegron (CPD) candidate sequences, consensus Fbw7 recognition domains, was identified in GATA3. Fbw7-mediated ubiquitylation and degradation required for phosphorylation of Thr-156 in CPD, and CDK2 was identified as a responsive kinase. Conditional inactivation of Fbw7 in mice T-cell development resulted in reduced thymic and splenic subcell proportions, and augmented GATA3 in some lineages. Fbw7 deficiency skewed CD8 SP lineage differentiation, which exhibited a higher incidence of apoptosis. Similar perturbations during development of CD8 positive cells were reported with transgenic mice, which enforced GATA3 expression during T-cell development. These observations suggest Fbw7-mediated GATA3 regulation with CDK2-mediated phosphorylation of CPD contributes to the precise differentiation of T-cell lineages.

研究分野：分子生物学

キーワード：Fbw7 GATA3 T細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

**ユビキチン化修飾**をシグナルとするプロテアソーム依存的タンパク分解機構は、生体内のタンパク量を適時適正に調節するための重要な生体システムである。ユビキチンの結合様式は、分解へと誘導する結合型ポリユビキチン鎖と共に、転写制御、DNA 修復、シグナル伝達、細胞内局在変動等に関わる多様な結合型ポリユビキチン鎖があり、これら鎖の種類で基質の運命が変わる事が示唆されており、一部のユビキチンリガーゼ (E3) は基質に対して結合型の異なるポリユビキチン修飾を使い分けすることで、基質の活性を多様に制御する能力を持つことが報告された。

**Fbw7(Fbxw7)の機能**は基質特異性を決定する E3 のサブユニットとして、種々の多様な性質の既知の基質をユビキチン修飾する。既知の基質に対しては全てプロテアソーム依存的分解を誘導し、他の制御機能を持つことは確認されていない。Fbw7 コンディショナルノックアウト (cK0) マウスでは胸腺、脾臓、肝臓など多様な臓器で異常が発生することから、Fbw7 の担っている役割が個体の正常維持に不可欠である事に加えて、未同定の Fbw7 の基質がさらに存在していると予測され、さらに、Fbw7 は基質分解誘導以外の機能も併せ持って多様な臓器の基質を機能制御しているのではないかと推測された。

**Fbw7 の新規標的**として、申請者らは転写因子 c-Myb を同定し、c-Myb の分解制御を介した血球細胞での Fbw7 の役割の一端を明らかにしてきた。Fbw7 遺伝子は T 細胞性リンパ性白血病患者で高頻度に変異が検出され、cK0 マウスでは高発癌形質が確認されること、さらに Fbw7 の基質に癌遺伝子が多く含まれることから、癌抑制遺伝子と認識されている。申請者は更なる新規基質の同定を試み、Fbw7 が基質中のリン酸化修飾を受けた共通配列 Cdc4 Phospho-Degron (CPD) を認識することに着目し、Fbw7 の新規基質として転写因子 GATA-3 を見出した。

**GATA-3 に関する内外の知見**は次の通りである。GATA-3 の機能: T 細胞分化、血管構築、脂質代謝調節および、間充織-上皮転換 (MET) プロセスを経た臓器発生への関与。GATA-3 と癌の関係: 臨床乳癌の転移リスク予測因子となる可能性。血管新生、炎症反応などへの関与。よって癌の発症/進展に多面的な関わりを持つ可能性がある。

**GATA-3 の活性および量的制御機構**は不明の点が多いが、本研究により、Fbw7 が GATA-3 の多様な生理的機能の制御因子として位置づけられる可能性が高い。これまでに GATA-3 が Fbw7 と結合してユビキチン化修飾を受けることを確認し、他の既知の基質と同様に内因性 GATA-3 の安定性に Fbw7 が関わっていることを予測したが、意外なことにそれを示唆する結果は、複数種の細胞株での各種方法で検討しても得られていない。このことから、

Fbw7 が分解誘導以外の寄与をもたらす可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

以下の研究を遂行することで、Fbw7 による GATA-3 のユビキチン化の生物学的意義を解明するとともに、基質分解誘導以外の Fbw7 の新機能を、分子/細胞から個体レベルで明らかにする。

- 1) Fbw7 による GATA-3 ユビキチン化修飾の様式の解明
- 2) Fbw7 がもたらす GATA-3 機能への影響の解析
- 3) Fbw7-GATA-3 経路の細胞周期依存性の評価
- 4) 遺伝子改変マウスを用いた Fbw7 による GATA-3 機能制御の個体レベルでの意義の検討

### 3. 研究の方法

1) Fbw7 によるユビキチン化修飾の様式を明らかにする。 ポリユビキチン鎖結合様式はユビキチン化シグナルの機能との相関性が高いので、まず GATA-3 のポリユビキチン化の様式を同定する。

2) Fbw7 によるユビキチン化がもたらす GATA-3 の機能への影響を明らかにする。 種々の組織や細胞株で報告されている GATA-3 の転写調節機能を Fbw7 が亢進、或いは阻害するのか、Fbw7 の強制発現細胞および siRNA による内在性 Fbw7 の発現抑制 (ノックダウン) 細胞を用いて、下流因子の転写レベルの変動を中心に解析、評価する。

3) Fbw7-GATA-3 経路の細胞周期依存性を解析する。 Fbw7 の GATA-3 認識に CDK2 が関与することに注目し、CDK2 と協調するサイクリンの同定および細胞周期依存性の有無を検討する。

4) Fbw7 による GATA-3 機能制御の意義を個体レベルで明らかにする。 Fbw7cK0 および GATA-3 ノックイン (KI) の 2 種類の遺伝子改変マウスを対象に、上記細胞レベルで得た結果がマウスの獲得した形質に投影されているかどうか調べる。

### 4. 研究成果

#### Fbw7 が GATA3 を認識する機構

GATA3 内に存在する CPD に注目し、Fbw7 の GATA3 との結合およびユビキチン化は、他の基質と同様に CPD 配列依存的であった。GATA3 には CPD は連続して 2 カ所存在するが、Fbw7 の関与に関わっているのは N 末側のみで、さらにこの配列中 (Thr156) のリン酸化が重要であることを見出した。多くの Fbw7 の基質ではこのリン酸化を担う酵素は Ser/Thr kinase の一つである GSK3 であることがわかってはいるが、GATA3 では GSK3 によるリン酸化は起こらず、代わりに CDK2 がその機能を持つ事が *in vitro* および *in vivo* 解析から判明した。このことは、Fbw7 の結合が増殖

中の細胞で起こっている事を示唆し、リン酸化 Thr156 は G2/M 期細胞で特異的に検出された。

#### GATA3 に対する Fbw7 の機能

既知の基質同様、Fbw7 は GATA3 をユビキチン分解に誘導する働きがあることが強制発現系を用いて細胞レベルで確かめられた。一方細胞株の内因性 GATA3 の分解に対する Fbw7 の寄与は検出する事ができなかったが、胸腺細胞の分化途中で Fbw7 タンパク発現を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスでは、CD4/CD8 ダブルネガティブ、および CD8 シングルポジティブの分化過程にある胸腺細胞で GATA3 の異常増大が認められた。このことから生体内での GATA3 の量的調節に Fbw7 が重要な役割を果たしている事が確認された。GATA3 は免疫細胞の分化および増殖を正常に進行させる為に機能する転写因子であり、胸腺内では胸腺細胞の分化過程ではそのタンパク量が厳密に調節されることが重要であることがわかっている。今回 GATA3 の異常増大を認めたコンディショナルノックアウトマウスの CD8 シングルポジティブ細胞が、何らかの機能異常をきたしていないか解析したところ、アポトーシスを起こしている細胞存在率の顕著な増大、および細胞分化成熟の遅延が発生している事を示唆する結果が得られた。Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスでは、GATA3 以外の Fbw7 分解基質も蓄積していることが予想される。しかし今回確認された胸腺細胞での異常は、先行研究による GATA3 高発現トランスジェニックマウスが獲得した表現系と類似していたことから、責任因子は異常蓄積した GATA3 であるとの考察が可能となった。

以上の結果より、Fbw7 は GATA3 の量的調節を介して、胸腺細胞の分化成熟を正常化させるために重要な働きを担っているタンパク分解因子であることが明らかになった。

#### 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)

##### [雑誌論文](計 7 件)

1. Kotake, Y., Naemura, M., Kitagawa, K., Niida, H., Tsunoda, T., Shirasawa, S. and Kitagawa, M.: Oncogenic Ras influences the expression of multiple lncRNAs. *Cytotechnology*. 2014.
2. Kitagawa, K., Shibata, K., Matsumoto, A., Matsumoto, M., Ohhata, T., Nakayama, K.I., Niida, H. and Kitagawa, M.: Fbw7 targets GATA3 through CDK2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development. *Mol. Cell. Biol.* **34(14)**: 2732-44, 2014.
3. Harada, M., Kotake, Y., Ohhata, T., Kitagawa, K., Niida, H., Matsuura, S., Funai, K., Sugimura, H., Suda, T. and

Kitagawa, M.: YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells* **19(6)**: 504-16, 2014.

4. Miyazaki, S., Kikuchi, H., Iino, I., Uehara, T., Setoguchi, T., Fujita, T., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Kitagawa, K., Kitagawa, M., Baba, S. and Konno, H.: Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. *Int. J. Cancer* **135(2)**: 295-307, 2014.
5. Kotake, Y., Ozawa, Y., Harada, M., Kitagawa, K., Niida, H., Morita, Y., Tanaka, K., Suda, T. and Kitagawa M.: YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene. *Genes Cells* **18(11)**: 999-1006, 2013.
6. Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H. and Ohhata, T.: Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell Mol. Life Sci.* **70(24)**: 4785-94, 2013.
7. Egawa, K., Kitagawa, K., Inoue, K., Takayama, M., Takayama, C., Saitoh, S., Kishino, T., Kitagawa, M. and Fukuda, A. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of angelman syndrome. *Sci. Transl. Med.* **4(163)**, 163ra 157, 2012.

##### [学会発表](計 16 件)

1. Masatoshi Kitagawa, Kyoko Kitagawa: GATA3 is a novel target for an E3 ligase SCF-Fbw7 in T-cell development. **The FEBS EMBO 2014 Conference** (2014) Paris.
2. Kyoko Kitagawa, Masatoshi Kitagawa: Fbw7 targets GATA3 and contributes to regulation of T-cell development. **FASEB Science Research Conferences, Ubiquitin and Cellular Regulation** (2014) Saxtons River.
3. Masatoshi Kitagawa, Kyoko Kitagawa, Naro Ohashi, Hirofuka Fukasawa, Hiroyuki Niida, Sayuri Suzuki: Involvement of the Skp2/p27 axis in the progression of chronic nephropathy. **GTC bio Conference 4th Ubiquitin Research and Drug Discovery**. (2014) San Diego.
4. 北川恭子 柴田清 大畑樹也 丹伊田 浩行 北川雅敏 「T細胞分化過程における GATA3 分解機構」第 37 回日本分子生物学会年会 (2014)
5. 北川雅敏、北川恭子: T 細胞分化過程における GATA3 の Fbw7 依存的分解の分子

- 機構 第 87 回日本生化学学会大会 (2014)
6. 北川恭子 丹伊田浩行 北川雅敏「Fbw7 の T 細胞分化の制御における新規基質 GATA3 の分解の寄与」第 73 回日本癌学会学術総会 (2014)
  7. 原田 雅教 神武 洋二郎 北川 恭子 丹伊田 浩行 梶村 春彦 北川 雅敏「非小細胞肺癌において Y-box binding protein 1 (YB-1) はサイクリン D1 に直接結合し転写活性を亢進させる」第 73 回日本癌学会学術総会 (2014)
  8. 北川恭子「T 細胞分化制御因子 GATA3 のリン酸化依存的分解機構」新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」平成 25 年度第 2 回領域班会議 (2013)
  9. 北川恭子 柴田清 北川雅敏 「Fbw7 contributes to regulation of T-cell development and targets GATA3」第 36 回日本分子生物学会年会 (2013)
  10. 北川 恭子 柴田清 北川雅敏 「Analysis of the regulation of the stability of transcription factor GATA3」第 75 回日本血液学会学術集会 (2013)
  11. 北川雅敏 北川恭子 「癌抑制ユビキチンリガーゼ Fbw7 の新規基質」第 72 回日本癌学会学術総会 (2013)
  12. 北川恭子 北川雅敏「リン酸化とユビキチン化修飾による転写因子 GATA3 タンパク質の安定性制御機構」第 65 回日本細胞生物学会大会 (2013)
  13. 北川恭子 松本雅記 北川雅敏 「転写因子 GATA3 の安定性の制御に関わるリン酸化とユビキチン化修飾機構」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012)
  14. 鈴木小由里 深澤洋敬 三崎太郎 戸川証 大橋温 北川恭子 神武洋二郎 Liu Ning 丹伊田浩行 山本龍夫 北川雅敏 「Skp2 ノックアウトマウスで見られた腎障害の軽減は Skp2-p27 ダブルノックアウトマウスで解除される」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012)
  15. 原田雅教 神武洋二郎 鈴木小由里 大畑樹也 北川恭子 丹伊田浩行 北川雅敏 「転写因子 YB-1 の新規標的遺伝子としての Cyclin D1 の解析と非小細胞肺癌における解析」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012)
  16. 北川恭子 中嶋友美 北川雅敏 「リン酸化を介した GATA3 転写因子の制御機構」第 71 回日本癌学会学術総会 (2012)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等  
[http://www.hama-med.ac.jp/uni\\_education\\_igakubu\\_igaku\\_seika1.html](http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seika1.html)

6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
     北川 恭子 (KITAGAWA, Kyoko)  
     浜松医科大学 医学部・助教  
     研究者番号： 20299605

(2) 研究分担者 ( )  
 研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )  
 研究者番号：