

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23770218
研究課題名（和文）
DNA 損傷による細胞周期抑制の新規メカニズム
研究課題名（英文）
SCF^{Fbx112} modulates the abundance of p21 in concert with proteasome activator PA28 γ
研究代表者
鶴田 文憲 (TSURUTA FUMINORI)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：30571450

研究成果の概要（和文）：SCF^{Fbx112} は Cul1、Rbx1、Skp1、Fbx112 からなるユビキチンリガーゼ複合体で、DNA 損傷や細胞分化に関与することが示唆されている。本申請者は、SCF^{Fbx112} がプロテアソーム活性化因子 PA28 γ と複合体を形成し、相反する機能で増殖抑制因子 p21 の細胞内量を調節していること、またこの機構が UV 刺激によって減弱することを明らかにした。さらに Fbx112 のイントロン領域にプロモーター活性が存在し、UV 刺激依存的に N 末端を欠いた Fbx112 を発現させることを新たに見出した。

研究成果の概要（英文）：The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays an important role for the regulation of cell cycle and DNA damage response. The SCF complexes are the major ubiquitin ligases that control these processes. In this study, we found that SCF^{Fbx112} associates with proteasomal subunit PA28 γ and cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21, and is involved in the regulation of p21 abundance in cell. In addition, this complex-forming ability is attenuated by UV stimulation. We also found that the intronic regions of Fbx112 acts as an alternative promoter and induces expression of short form of Fbx112 in response to UV irradiation. Taken together, these data demonstrate that Fbx112 is a key mediator that links UV irradiation to p21 degradation, and this novel function of Fbx112 may provide an insight into the mechanisms by which DNA damage mediates p21 stabilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期、タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

紫外線照射による環境ストレスは、DNA の突然変異やゲノムの不安定性を誘発し、細胞癌化を引き起こす。一方、細胞はDNA 損傷による癌化を抑制するため、細胞増殖を停止させ、その間に損傷を受けたDNA を修復する機構を併せ持つことが知られている。通常、紫外線照射などでDNA 損傷が起こると、ATM やATR といったセリン/スレオニンキナーゼが活性化して転写因子p53を安定化し、細胞周期抑制因子であるp21を誘導する。それゆえp21はDNA 損傷による増殖抑制の主要なメディエーターとして考えられている。その一方で、異なった条件下ではp21は紫外線刺激後、速やかに分解されるなど、p21の細胞内での発現量を調節するメカニズムは不明な点が数多く残されていた。実際、p21分解を制御するユビキチンリガーゼやプロテアソーム関連因子が複数報告されていたものの、これらがどのようにしてp21の分解制御に関与しているのか、詳細な分子メカニズムは明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

DNA 損傷によるp21の代謝制御は、通常の細胞周期制御のみならず、癌を始めとする様々な疾患と関連があると考えられている。本申請者は、ユビキチンリガーゼSCF^{Fbx112}の機能解析を行なっていく過程で、ユビキチンリガーゼSCF^{Fbx112}の基質認識タンパク質であるFbx112がp21と結合すること、Fbx112が紫外線刺激により自身のイントロンをプロモーターとして、N末端(F-box領域)を欠損したFbx112(Fbx112ΔF)を発現させことを

見出した。そこで、(1)SCF^{Fbx112}によるp21分解機構の解析、(2)Fbx112ΔFによるSCF^{Fbx112}制御機構の解析を中心に検証を行った。

3. 研究の方法

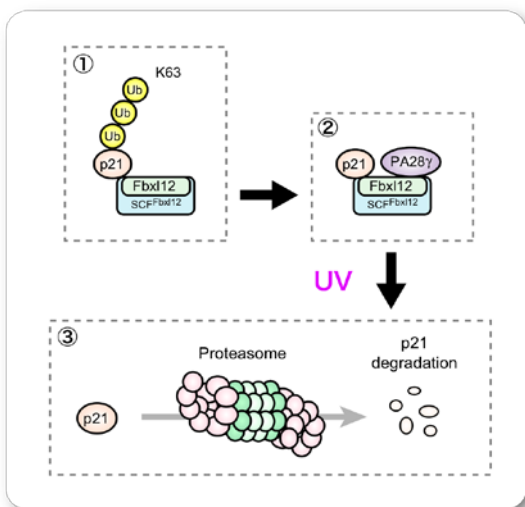
(1)これまでの研究からp21の分解制御には、ユビキチン依存的ならびにユビキチン非依存的経路が報告されていた。ユビキチン依存的経路にはSCF^{skp2}やCu14^{DB1}などのユビキチンリガーゼの関与が示唆されており、ユビキチン非依存的経路にはプロテアソーム活性化因子であるPA28γ、あるいは20Sプロテアソームによるデフォルト分解が考えられている。Fbx112がp21と結合することを見出したことから、まずSCF^{Fbx112}がp21をユビキチン依存的に分解するか、同様にFbx112がPA28γ(後述)によるユビキチン非依存的なp21の分解制御に関与するか検討した。さらに、p21はUV照射依存的に発現量の動的制御を受けることから、この経路にFbx112が関与するか検証した。

(2)本申請者は、UV照射依存的にFbx112のイントロン領域がプロモーターとして機能し、F-box domainを欠損したFbx112ΔFのmRNA量が増加することを見出した。そこで本研究では、イントロンのどの領域にUV刺激依存的なプロモーター活性を有しているのか、またFbx112ΔFがSCF^{Fbx112}に対してどのような働きを持つのか検証した。

4. 研究成果

(1)まずFbx112とp21が相互作用することから、SCF^{Fbx112}がp21の発現量制御に関与しているか検討したところ、SCF^{Fbx112}の活性がp21

の K63 連結型ユビキチン鎖の量を増加させること、Fbx112 の過剰発現が細胞内での p21 量を増加させることを見出した。次に Fbx112 のターゲットを同定するため、結合タンパク質をスクリーニングしたところ、p21 をユビキチン非依存的に分解することが報告されている制御因子 PA28 γ を同定していた。興味深いことに、PA28 γ はプロテアソームの構成因子として SCF^{Fbx112} とは結合しているのではなく、PA28 γ 単独で複合体に取り込まれていること示唆するデータを得られた。また PA28 γ を過剰発現させることで p21 のユビキチン化、ならびに発現量も減少することから、おそらく PA28 γ の分子メカニズムとして、p21 をユビキチン非依存的に分解するのではなく、p21 の K63 連結型ユビキチン鎖を減少させることで p21 の安定性を低下させるのではないかと考えられた。



- ① p21 は SCF^{Fbx112} と結合し、K63 型ユビキチン修飾が増加することで安定化する。
- ② PA28 γ が p21 のユビキチン化を抑制し、p21 が不安定化状態になる。
- ③ UV 照射によって p21 のプロテアソーム依存的な分解が促進する。

(2) Fbx112 のイントロンで UV 刺激に応答する領域を同定するため、ヒトとマウス間でホモロジーのある領域ごとに分割し、レポーターアッセイを行ったところ、それぞれの領域で

UV 刺激依存的、非依存的にプロモーター活性を有する領域を同定することができた。また UV 刺激で発現したと考えられる Fbx112 Δ F が SCF^{Fbx112}、p21、PA28 γ との三者複合体形成能を顕著に低下させることを見出した。このことから UV 刺激によって発現誘導された Fbx112 Δ F が複合体形成能を低下させ、p21 安定化に寄与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

木越悠、鶴田文憲、千葉智樹

The ubiquitin E3 ligase activity of Cul3-KLHL7 is attenuated by an autosomal dominant Retinitis Pigmentosa causative mutation.

J. Biol. Chem. 286:33613-33621(2011) (査読あり、DOI: 10.1074/jbc.M111.245126)

[学会発表] (計 4 件)

(1). 鶴田文憲、千葉智樹

SCF^{Fbx112} Is a Novel Mediator that Controls p21 Degradation

1st Workshop between POSTECH and UT
Apr. 11-12, 2012, Pohang, Korea

(2). 鶴田文憲、武部愛、海老名真度、阿部光、千葉智樹.

SCF^{Fbx112} controls DNA damage-induced cell cycle arrest

Keystone symposia, Ubiquitin Signaling
Mar. 18-23, 2012, Whistler, British Columbia, Canada

(3). 鶴田文憲、千葉智樹

SCF^{Fbx112} controls DNA damage-induced cell cycle arrest

日本分子生物学会 Dec. 13-16, 2011, 横浜

(4). 鶴田文憲, 千葉智樹

A Ub ligase that target p21 is
transcriptionally regulated by
UV-irradiation.

Bio-Rheumatology International Congress
Tokyo, The 8th GRAN meeting
Nov. 14-16, 2011, 浦安

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴田 文憲 (TSURUTA FUMINORI)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号 : 30571450