

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570126

研究課題名（和文） ストレスMAPキナーゼによる細胞周期制御因子の分解誘発機構に関する研究

研究課題名（英文） Study for degradation mechanism of a cell cycle regulator induced by Stress-activated MAP kinases

研究代表者

内田 早苗 (UCHIDA SANAE)

金沢大学・イノベーション創成センター・博士研究員

研究者番号：50464045

研究成果の概要（和文）：私達は、ゲノムを第一標的としない非ゲノム損傷ストレスが細胞周期進行を担う Cdc25A や Cdc25B の分解を介して、細胞周期停止を引き起こす現象を発見し、その制御機構を解析している。本研究では、Cdc25B の分解が、ストレス応答性 MAP キナーゼによる Ser101/103 のリン酸化と、このリン酸化によって誘導される SCF^{βTrCP} によるユビキチン化に依存している事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We previously found that non-genotoxic stress, whose primary target is not genomic DNA, induced cell cycle arrest through the degradation of Cdc25A and Cdc25B. In this study, we discovered that Cdc25B was degraded through the ubiquitylation by SCF^{βTrCP} induced by the phosphorylation of Ser101/103 by stress-activated MAP kinases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ストレス，シグナル伝達，細胞周期，蛋白分解

1. 研究開始当初の背景

細胞周期停止に関わるチェックポイント研究は、これまでゲノム損傷やDNA複製停止に対する応答の解析として精力的に研究されてきた。本研究で対象とするCdc25AやCdc25Bは、CDK活性化因子であり、ゲノム損傷チェックポイントの標的と考えられている。実際にCdc25Aは、ゲノム損傷やDNA複製停止により活性化される細胞周期チェックポイントの標的となり、分解が誘起される結果、CDK活性が低下する。これが、ゲノムストレスに伴う細胞周期停止の初期応答であると考えられている。Cdc25Bも海外のグループにより、

UVにより活性化されたp38MAPKおよびp38MAPKにより活性化されるMK2 (Mapkinase 2) の標的となり、リン酸化されることが示された (*Nature*, 2001; *Mol Cell*, 2005)。私たちはこれまでの研究で、ゲノムを第一標的としない非ゲノム損傷ストレスによりCdc25Bが特異的に分解されることを発見し、Cdc25Bを標的化するのはゲノム損傷刺激ではないことを明らかにした。さらに、Cdc25Bを分解誘導するのはp38MAPKではなく主にJNKであるという、これまでの説とは異なる結果を得た。一方、Cdc25Aはp38MAPK系により分解が誘導される。従って、非ゲノム

損傷ストレスにより、CDK 活性化因子である Cdc25A と Cdc25B は、独立のストレス応答性 MAP キナーゼ系により分解誘導されることで、細胞周期の一時的な停止が起きると考えられた。Cdc25B が細胞外からの刺激により分解される現象は、私達が初めて発見したものであり、その分解機構は不明であった。加えて、(1) JNK 活性が低下したのちも Cdc25B の分解が継続され続けることや、(2) Cdc25A の直接的な分解誘導キナーゼである MK2 を単独で活性化させても Cdc25A は分解しないこと、(3) ストレスに反応して Cdc25A や Cdc25B が分解にいたるメカニズムが不明であること、(4) ストレスに反応して p38MAPK キナーゼや JNK を活性化に導く、MAPKKK などが不明であることなど、解決すべき問題が多い。

2. 研究の目的

これまでに、Cdc25A と Cdc25B はそれぞれ p38MAPK 系と JNK 系により制御されることを明らかにしてきた。本研究では、(1) JNK (および p38MAPK) が Cdc25B を制御する仕組みの解明、(2) ストレス応答依存的に Cdc25B を分解標的とするユビキチン化酵素 E3 の同定、を行った。

3. 研究の方法

(1) 変異導入解析による、分解に関わるリン酸化部位の同定

Cdc25B において、ストレス応答性 MAP キナーゼに対する応答部位は N-末端から約 150 アミノ酸までに存在することが予備実験により分かっており、この断片内のリン酸化部位を解析した。この配列内には、p38MAPK/JNK のリン酸化基質のコンセンサス配列 (SP/TP) が 6 ヶ所存在したため、これらの Ser を Ala に変えた変異体を作成し、HeLa 細胞で、JNK と共発現することにより、その安定性を解析した。JNK による分解に抵抗性を持つ変異体については、恒常発現細胞を作成し、ストレス応答性 MAP キナーゼを活性化する蛋白合成阻害剤である anisomycin を添加し、この薬剤存在下における安定性、および、M 期へ進入する細胞の割合を野生型と比較し、非遺伝毒性による Cdc25B 分解の意義を明らかにした。また、分解に重要な Ser のリン酸化抗体を作成し、anisomycin や食塩添加時、UV 照射時などの非遺伝毒性下におけるリン酸化状態を解析した。

(2) ユビキチン化酵素 E3 の同定と基質のリン酸化と関係の解析

前述の変異体解析の結果、分解に重要な Ser 周辺配列が β TrCP の認識配列と類似していたことから、ユビキチン化酵素 E3 の第一候補は SCF $^{\beta$ TrCP であることが推測された。そこで、まず、① Cos7 細胞に共発現することに

より、 β TrCP と Cdc25B の N-末端断片との結合を p38MAPK/JNK 存在下・非存在下で比較した。次に、② siRNA により、内在の β TrCP の発現を抑制し、anisomycin や JNK 過剰発現による Cdc25B の発現量を比較した。また、③ β TrCP を含む SCF 複合体を Cos7 細胞に強発現後、 β TrCP に付加したタグを利用して免疫沈降法により調製し、*in vitro* におけるユビキチン化を JNK 存在下・非存在下において比較した。

次に、分解に重要な Ser、および、その周辺配列において β TrCP との結合に重要と思われるアミノ酸を Ala に変えた変異体を作成し、① HeLa 細胞を用いた JNK 共発現による分解、② Cos7 細胞を用いた共発現による β TrCP との結合検出、③ *in vitro* ユビキチン化実験を行い、 β TrCP による認識機構を詳細に解析した。

4. 研究成果

本研究開始時点において、インヒビターを用いた解析の結果、非ゲノム損傷ストレスによる Cdc25B の分解は、ストレス応答性 MAP キナーゼの活性 (主として JNK の活性) と、プロテアソームによる蛋白分解機構に依存している事が示されていた。

本研究では、(1) 分解に重要なリン酸化部位の同定、(2) 分解を担うユビキチン化 E3 の同定、(3) ユビキチン化とリン酸化との関係 (E3 による基質認識機構) の解明を行った。以下に詳細を示す。

(1) 分解に重要なリン酸化部位の同定

これまでの研究から、分解に必要な部位が N-末端から約 150 アミノ酸までに存在することが分かっていた。そこで、この断片内に存在する 6 個の p38MAPK/JNK のリン酸化基質のコンセンサス配列 (SP/TP) の Ser を Ala に変えた変異体を作成し、HeLa 細胞で、JNK と共発現することにより、安定性を比較した。6 種類の変異体のうち、Ser101, Ser103 を Ala に置換した変異体において、JNK による分解が見られなくなった (図 1)。

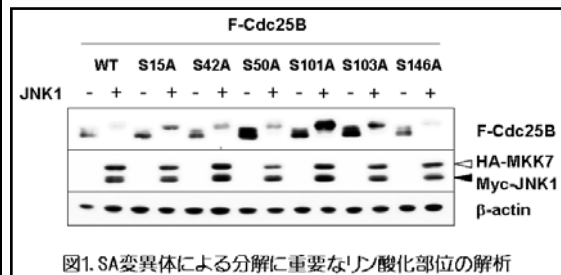


図1. SA変異体による分解に重要なリン酸化部位の解析

そこで、これらの変異体の恒常発現細胞を作成し、ストレス応答性 MAP キナーゼ活性化剤である anisomycin 存在下での、①安定性と、②M 期進行細胞の割合を、野生型 Cdc25B 恒常発現細胞と比較した。anisomycin 存在下での変異体の安定性は、野生型のそれと比べ

延長しており、また、anisomycin 存在下における M 期進行細胞の割合も増加していた。これらのことから、Cdc25B の分解を抑制することにより、非遺伝毒性ストレスによる G2 期停止が破綻することが示された。

次に、個々の Ser リン酸化抗体を作成し、anisomycin, 高濃度食塩, UV 照射におけるリン酸化状態を調べた。図2にはanisomycin 添加後のリン酸化状態を経時的に比較した結果を示した。いずれのストレスにおいても、Ser101 に関しては、定常状態でもリン酸化が検出されたが、ストレスによりそのリン酸化シグナルが増強した。Ser103 に関しては、定常時には、リン酸化が検出されず、ストレス特異的にリン酸化が起こることが示された。また、インヒビターを用いた実験から、Ser101 は、p38MAPK および JNK の両方の基質となっている一方で、Ser103 は JNK 特異的にリン酸化されることが明らかになった。

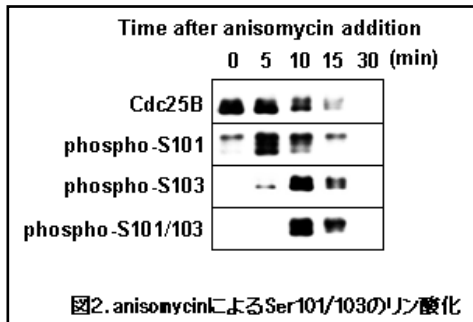


図2. anisomycinによるSer101/103のリン酸化

(2) 分解を担うユビキチン化 E3 の同定

Ser101/103 周辺配列が、Cdc25A がストレス依存的に分解されるために必要な配列と類似していたことから、ユビキチン化酵素 E3 の第一候補は SCF^{βTrCP} であることが推測された。Cos7 細胞を用いて、N-末端から 150 アミノ酸を含む断片 (N 末断片) と、βTrCP1 との結合を JNK 存在下・非存在下で比較したところ、βTrCP1 と Cdc25B N 末断片との結合が JNK 依存的に上昇した (図3)。

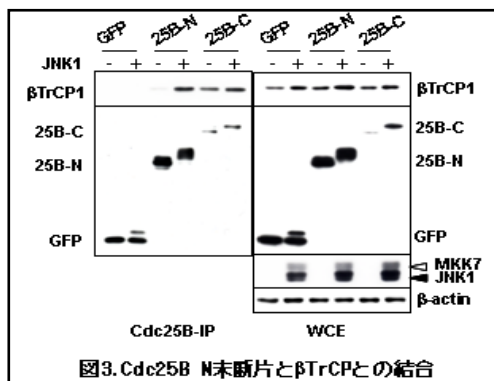


図3. Cdc25B N末断片とβTrCPとの結合

次に、RNAi 法により内在性のβTrCP の発現を抑制し、anisomycin (図4)、および、JNK による Cdc25B の分解が抑制された。

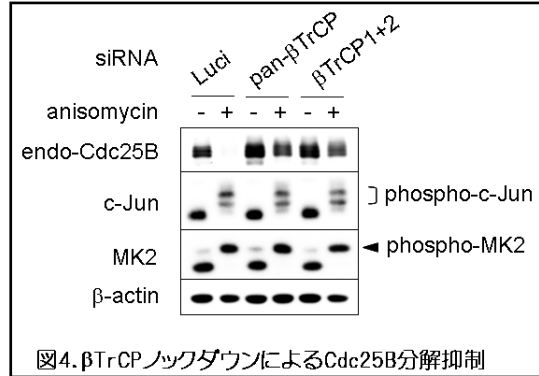


図4. βTrCP ノックダウンによるCdc25B分解抑制

また、Cos7 細胞に強発現し、βTrCP1 蛋白に付加した myc タグによる免疫沈降を行うことにより調製した SCF^{βTrCP1} をもちいて、*in vitro* ユビキチン化反応を行ったところ、JNK 依存的に Cdc25B のユビキチン化が促進された (図5)。Cdc25B は、254 番目のアミノ酸から始まる DDG 配列を介して、恒常的に SCF^{βTrCP} の基質となっているため、この実験では、DDG → DAA に変えた変異体を用いた。

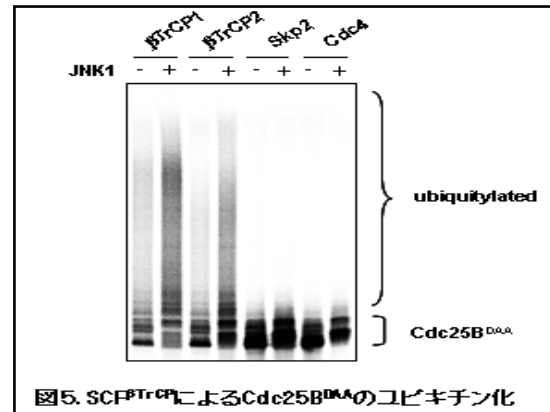


図5. SCF^{βTrCP1}によるCdc25B^{DAA}のユビキチン化

(3) ユビキチン化とリン酸化との関係 (E3 による基質認識機構) の解明

Ser101/103 周辺配列において、Cdc25A がストレス依存的に分解されるために重要なアミノ酸と同一のアミノ酸である Asp94, Gly96, を Ala に変えた変異体は、HeLa 細胞における JNK 共発現による分解、Cos7 細胞におけるβTrCP1 との結合 (図6)、および、*in vitro* での SCF^{βTrCP1} によるユビキチン化も見られなかった。また、Ser101/103Ala 変異体も、同様であった。

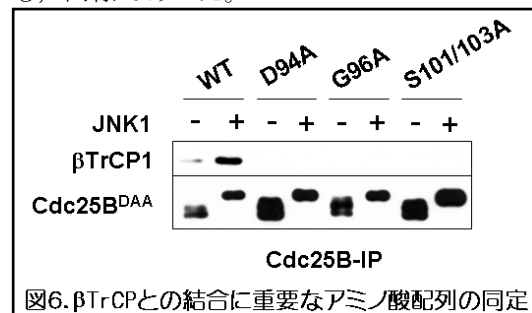


図6. βTrCPとの結合に重要なアミノ酸配列の同定

しかし、上記の実験から予測されたβTrCP結合配列由来の、94-DAGLCMDpSpSM (pS はリン酸化 Ser) ペプチドとβTrCP との結合は検出できなかった。そこで、DAG 上流の PEST 様配列内の 8 個の Ser に着目し、変異体を作成した。8 個の Ser を全て Ala に変異したところ (8SA 変異体)、βTrCP との結合が見られなくなり (図 7)、加えて、JNK 共発現による分解も、*in vitro*でのユビキチン化も見られなくなった。また、PEST 様配列内の 8 個の Ser と Ser101/103 の全てを、Ser の疑似リン酸化型アミノ酸である Asp に変えたペプチド (EDD) はβTrCP1 と、*in vitro*でリン酸化非依存的に結合し (図 8)、さらに、上記の 10 個全ての Ser を Asp に変えた変異体 Cdc25B の細胞における発現量は、野生型に比べ低下する一方で、全てを Ala に変えた変異体の発現量は増加した。以上の結果から、Cdc25B は PEST 様配列および Ser101/103 配列を含む新規結合配列のリン酸化を介して、βTrCP により安定性が制御されていることが明らかになった。

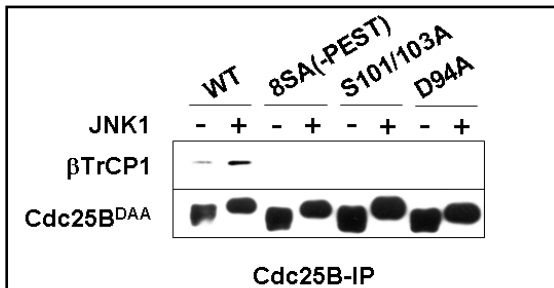


図7. βTrCPとの結合におけるPEST様配列の重要性

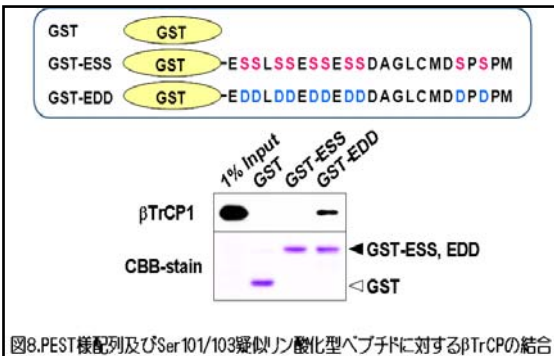


図8. PEST様配列及びSer101/103疑似リン酸化型ペプチドに対するβTrCPの結合

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 2 件)

- ① Uchida, S., Yoshioka, K., Kizu, R., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Poon, R., Y., Yamashita, K. Stress-activated mitogen-activated protein kinase c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 target Cdc25B for

degradation., Cancer Research, 69 (2009), 6438-6444, 査読有

- ② Isoda, .M., Kanemori, Y., Nakajo, N., Uchida, S., Yamashita, K., Ueno, H., Sagata, N., The extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF^{βTrCP}-dependent degradation for cell cycle arrest., Molecular and Cellular Biology, 20 (2009), 2186-2195, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 内田早苗, SCF^{βTrCP}によるCdc25B分解におけるPEST配列の役割. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学学会大会合同会, 2010年12月9日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ② 山下克美, 環境発がん物質による細胞周期制御因子Cdc25の分解機構, 日本環境変異原学会第39回大会, 2010年11月16日, つくば国際会議場(茨城県)
- ③ 内田早苗, Sequence requirement for degradation of Cdc25B by SCF^{βTrCP} in response to cellular stress. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月12日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ④ 内田早苗, Cdc25Bの分解制御機構: 上流PEST配列の寄与. 第4回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 2009年11月14日, 熊本大学(熊本県)
- ⑤ 内田早苗, Degradation of Cdc25B induced by cellular stresses. 第82回日本生化学学会大会, 2009年10月23日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ⑥ 山下克美, Application of bioimaging to detect genotoxic and non-genotoxic carcinogens. 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月3日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑦ 内田早苗, Mechanism of JNK-initiated and SCF^{βTrCP}-dependent ubiquitination of Cdc25B. 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月1日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑧ 内田早苗, SCF^{βTrCP}によるCdc25Bの制御. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学学会大会合同大会, 2008年12月10, 11日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ⑨ 山下克美, CDK活性化フォスファターゼCdc25の機能制御機構. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学学会大会合同大会, 2008年12月11日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)

- ⑩ Yamashita, K., JNK-and SCF ^{β TrCP}-mediated destruction of Cdc25B controls cell cycle arrest by non-genotoxic stress. 8th International Conference on Protein Phosphatase, 2008年11月12日, 前橋テルサ (群馬県)
- ⑪ 内田早苗, Cdc25B の JNK および SCF ^{β TrCP} 依存的分解. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008年10月28日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑫ Uchida, S., Degradation of Cdc25B by JNK-initiated and SCF ^{β TrCP}-mediated Ubiquitination. 第 60 回日本細胞生物学会大会, 2008年6月29日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Cdc25B と β TrCP との特異的結合を利用した検出系

発明者 : 山下克美, 内田早苗

権利者 : 金沢大学

種類 : 特許

番号 : 特開 2010-124818

出願年月日 : 2008年12月1日

国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

○新聞記事

北國新聞, 2009年1月4日朝刊, 1頁, 見出し「発がん物質光らせ発見」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 早苗 (Uchida Sanae)

金沢大学・イノベーション創成センター・

博士研究員

研究者番号 : 50464045

(2) 研究分担者

無 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

山下 克美 (Yamashita Katsumi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号 : 10191280

工藤 保誠 (Kudo Yasusei)

広島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号 50314753