

論文の内容の要旨

論文題目 新規 F-box protein Fbx3 の機能解析

氏 名 島 豊

[序]

細胞周期・アポトーシス・転写制御など様々な領域でタンパク質のユビキチン化が関わっている。タンパク質のユビキチン化は ubiquitin activating enzyme (E1)、ubiquitin conjugating enzyme (E2)、ubiquitin-protein ligase (E3)といわれる酵素群により、ATP 依存的におこる。E3 の一つに F-box protein、Skp1、Cul1、ROC1 からなる SCF complex があり、F-box protein が基質特異性を担っている (Fig. 1)。ヒトでは F-box protein は少なくとも数十種類あると言われているが、そのほとんどの機能はわかっていない。

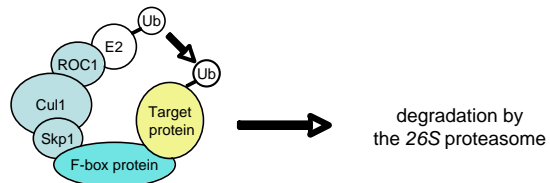


Fig.1 SCF complexによるタンパク質のユビキチン化

急性前骨髄球性白血病の主要な発症原因となっている 15 番染色体と 17 番染色体の転座のターゲットである白血病関連タンパク質 PML は、ヒストンアセチル化酵素 p300 や、p53 や p300 をリン酸化するタンパク質リン酸化酵素 HIPK2 と協調して AML1 や p53 を介した遺伝子の転写を活性化することが示されている。この PML による転写活性化は、PML が転写因子複合体を安定化するためであることが示唆されているが、その詳しい機構はわかっていない。そこで PML による転写活性化の機構を解析するため、PML 複合体を精製した結果、新規 F-box protein である Fbx3 を含む SCF complex 構成タンパク質が含まれることが明らかとなった。Fbx3 の機能については不明であるが、タンパク質分解に関与し、PML による転写活性化に関わることが期待された。Fbx3 の機能を通して PML に対する理解を深めるため、私は Fbx3 の機能解析を試みた。

[方法と結果]

1. 新規F-box protein Fbx3 はPMLと結合する

まず、N 末端側に FLAG-tag をつけた PML I を stable に発現する K562 cells を作製した。この K562 cells の lysate から抗FLAG抗体をもちいて、免疫沈降し、PML complex を精製した。SDS-PAGEによりPML complex を展開し、それぞれのバンドを LC/MS/MS で解析した結果、PML complex に Fbx3、Skp1、Cul1 が含まれることが明らかとなった (Fig. 2)。Fbx3 は N 末端側に F-box protein に特有な F-box domain を持つタンパク質

であることから、F-box protein としてユビキチンリガーゼ SCF complex を形成していることが予想された。そこで、Fbx3 をクローニングし、BOSC23 cells に Fbx3、Skp1、Cul1、ROC1 を一過性に発現させ、SCF complex を形成するか免疫沈降法で確認した結果、Fbx3 は F-box protein として SCF complex を形成することが明らかとなった (Fig. 3)。

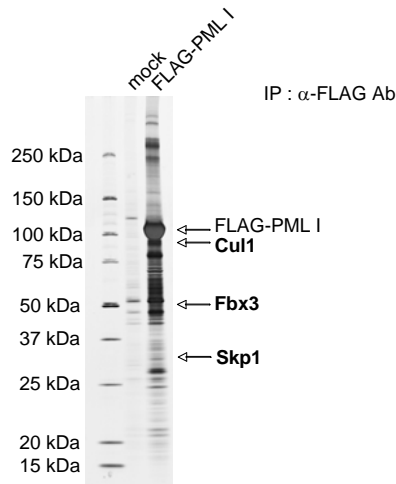


Fig. 2 PML complexにFbx3、Skp1、Cul1が含まれる

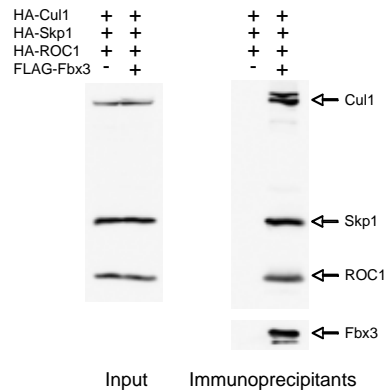


Fig. 3 Fbx3はSCF complexを形成する

2. SCF^{Fbx3} complexはp300、HIPK2のプロテアソームを介する分解を誘導する

次にFbx3の機能を検討するため、SCF^{Fbx3} complexが標的としているタンパク質について探索した。PML complexにFbx3、Skp1、Cul1が含まれることが明らかとなったこと (Fig. 2)、さらにPMLはp300やHIPK2と協調してAML1やp53を介した遺伝子の転写を活性化することから、SCF^{Fbx3} complexはPMLを含む転写因子複合体の構成タンパク質を標的として分解を誘導していると予想され、その可能性について検討した。実験は転写因子複合体構成タンパク質とFbx3をBOSC23 cellsに一過性に発現させ、転写因子複合体構成タンパク質の発現量に与えるFbx3の影響をWestern blottingで調べた。その結果、PML I、PML IV、AML1b、p53の発現量には変化が見られなかったが (Fig. 4A)、p300とHIPK2はFbx3を共発現させるとその発現量が減少した (Fig. 4B,C)。さらにこの発現量減少はプロテアソーム阻害剤MG132を処理すると回復したことから、Fbx3はp300やHIPK2のプロテアソームを介した分解に関与していることが示された (Fig. 4B,C)。また、Fbx3のF-box domainを欠損させた、SCF complexを形成できないΔF-box mutantを用い、p300の分解に与える影響を同様に調べた結果、ΔF-box mutantはp300のプロテアソームを介する分解を誘導しなかったことから、Fbx3はSCF complexを形成し、p300やHIPK2のプロテアソームを介する分解を制御していることが示唆された。

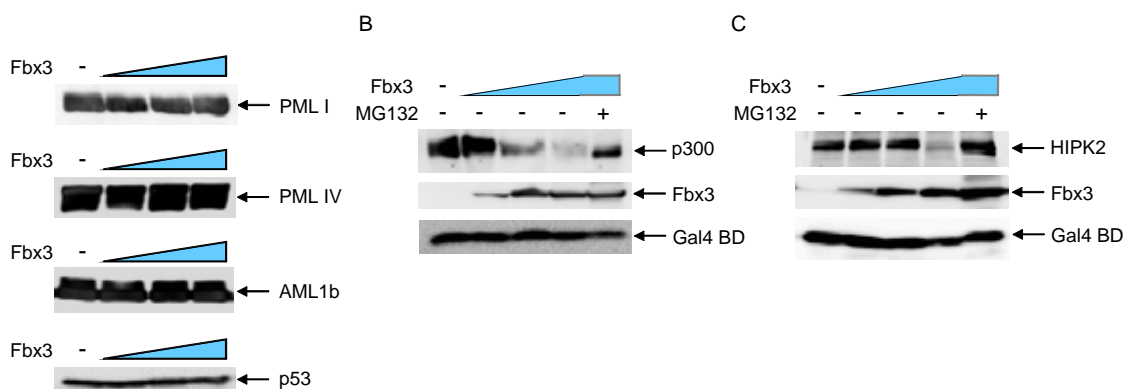


Fig. 4 Fbx3はp300、HIPK2のプロテアソームを介した分解を誘導する

また、F-box proteinがSCF complexの基質と結合することが知られている。Fig. 4の結果からSCF^{Fbx3} complexはp300やHIPK2を基質とすることが予想されたので、Fbx3とp300、あるいはHIPK2を一過性に発現させ、免疫沈降を行うことで検討した。その結果、いずれの場合もMG132を処理したときのみ結合が検出できた (Fig. 5A,B)。この結果は、SCF^{Fbx3} complexのターゲットがp300やHIPK2であることを示すと同時に、Fbx3に結合したp300やHIPK2は速やかにプロテアソームを介した分解を受けることを示しているものだと考えられる。

3. PMLはSCF^{Fbx3} complexによるp300の分解を阻害し、p300を安定化する

PML complexにはFbx3、Cul1、Skp1が含まれていたことから、PMLがSCF^{Fbx3} complexの機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、SCF^{Fbx3} complexによるp300の分解に及ぼすPMLの影響について以下検討した。

実験はFbx3、p300、PML IVをBOSC23 cellsに一過性に発現させ行った。その結果、PML IVを発現させることで、SCF^{Fbx3} complexによるp300の分解が抑制され、PMLはp300を安定化させることが明らかとなった (Fig. 6)。

PMLは核内で nuclear bodies (NBs)を形成して、斑点状に局在することが知られている。そこで、Fbx3、p300、PML IVをMCF7 cellsに一過性に発現させ、これらタンパク質の局在を免疫染色法で検討した。その結果、PML IVを発現させないとFbx3とp300は核全体に拡散して局在したが、PML IVを発現させるとPML IVはNBsを形成して斑点状の局在を示し、Fbx3とp300もPML IVとともにNBsに局在することが明らかとなった (Fig. 7A)。しかし、MG132を処理すると、PML IVは核内でNBsを形成して局在しているにもかかわらず、Fbx3とp300はPML IVを発現させなかった時と同様に核全体に拡散した局在をとることが明らかとなった (Fig. 7B)。これは、MG132を処理することで、核内のNBs以外の場所でプロテアソームによって分解されていたp300やFbx3が安定化したためではないかと考えられた。

以上の結果から、PMLはp300をNBsに局在させることでp300の安定化を誘導し、NBsはp300の安定化の場として働くことが示唆された。

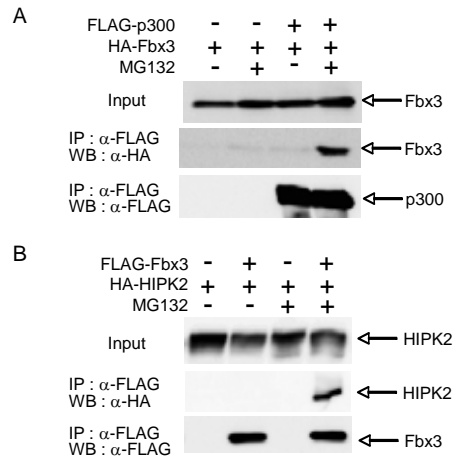


Fig. 5 Fbx3とp300、HIPK2の結合

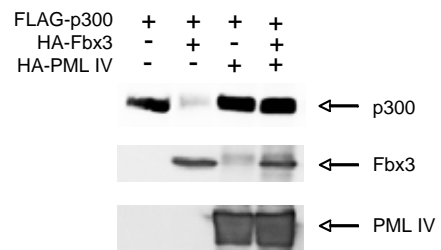


Fig. 6 PMLはSCF^{Fbx3} complexによるp300の分解を阻害する

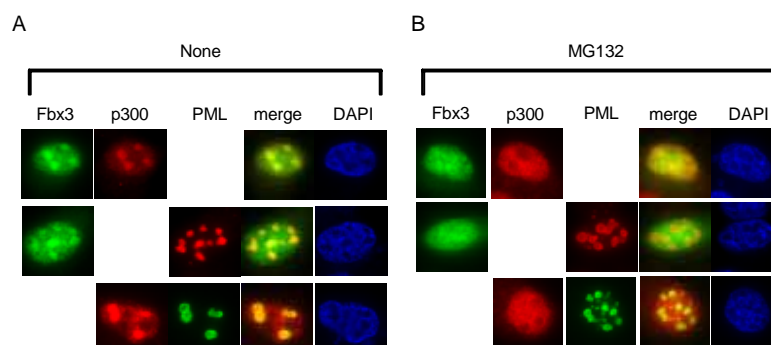


Fig. 7 Fbx3、p300、PML IVの局在

[まとめと考察]

PMLと結合するタンパク質として同定した Fbx3 は機能未知であったが、本研究で F-box protein として SCF complex を形成し、p300 や HIPK2 をターゲットとしてタンパク質分解を制御することを示した。

そして、PMLがSCF^{Fbx3} complexによるp300のプロテアソームを介する分解を阻害し、p300を安定化することが明らかとなり、NBsに局在したp300が安定化することが示唆された。本研究の結果はPMLが形成するNBsはタンパク質安定化の場として機能していることを提示するものである。

以上の結果より、PMLによる転写因子複合体の安定化はSCF^{Fbx3} complexによるp300やHIPK2の分解をPMLが阻害することによることが示唆された。そして、生物学的にはSCF^{Fbx3} complexはPMLと協調して迅速な転写のon/offを可能にするために働いているのではないかと仮説を立てている。PMLはNBsを形成して、転写因子 (TF)、p300 やHIPK2 といった転写調節因子、そしてSCF^{Fbx3} complexとNBsで転写因子複合体を形成する。そして、迅速にNBsの近傍で転写が活性化され、転写を活性化した後にPMLが複合体から遊離して、SCF^{Fbx3} complexによるp300やHIPK2のプロテアソームを介する分解が促進し、転写が抑制される機構が働いていると考えている (Fig. 8)。

急性前骨髄球性白血病で見られるPML-RAR α はNBsの形成を阻害することが知られており、またこの転写因子複合体を安定化しないことが示唆されている。従って、PML-RAR α はSCF^{Fbx3} complexによるp300やHIPK2の分解誘導を抑制できず転写因子複合体を安定化できないことが、正常骨髄細胞の分化阻害につながっている可能性が考えられる。

今後はこのSCF^{Fbx3} complexがどのように白血病発症に関与しているかについて検討を進めていきたい。

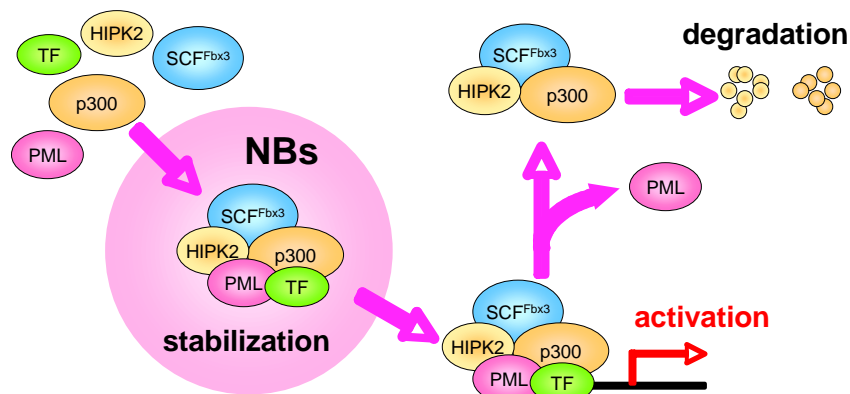


Fig. 8 SCF^{Fbx3} complexとPMLが制御する転写機構のモデル