



Regulation of GATA binding protein 2 levels via ubiquitin-dependent degradation by Fbw7: involvement of cyclin B-cyclin-dependent kinase 1-mediated phosphorylation of Thr-176 in GATA binding protein 2

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤田, 友美 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2813

博士(医学) 藤田 友美

論文題目

Regulation of GATA binding protein 2 levels via ubiquitin-dependent degradation by Fbw7: involvement of cyclin B-cyclin-dependent kinase 1-mediated phosphorylation of Thr-176 in GATA binding protein 2

(Fbw7によるユビキチン依存的分解を介した GATA 結合タンパク質 2 レベルの制御: GATA 結合タンパク質 2 のスレオニン 176 のサイクリン B-サイクリン依存性キナーゼ 1 を介したリン酸化の関与)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ユビキチン・プロテアソームシステムは、多くの細胞内タンパク質の安定性を調節し、細胞増殖、細胞分化、シグナル伝達およびアポトーシス等の様々な生物学的プロセスの制御に関与している。Fbw7は SCF 型ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbw7}を形成し、癌遺伝子産物 c-Myc 等の細胞増殖関連タンパク質をユビキチン依存的に分解し、増殖を負に制御する癌抑制遺伝子である。Fbw7 は標的タンパク質に存在する Cdc4 phosphodegron (CPD)と呼ばれる共通配列 (T/S(PO3)-P-X-X-S/T/D/E) のリン酸化を認識して結合することが報告されている。我々はこれまでに GATA ファミリーの転写因子である GATA 結合タンパク質 3 (GATA3) に CPD 配列を見出し、GATA3 の Thr156 のリン酸化が Fbw7 のユビキチン依存的分解に必要であることを報告している。今回我々は造血幹細胞(HSC)等の細胞分化や増殖制御に関与している GATA 結合タンパク質 2 (GATA2) にも Fbw7 の CPD 配列があることを見出した。本研究では、GATA2 が Fbw7 の新規基質であるかを検証し、CPD 配列をリン酸化する酵素を同定し、GATA2 の量的制御の分子機構の解析を行なった。

[材料ならびに方法]

1. Fbw7 と GATA2 の結合と Fbw7 による GATA2 のユビキチン化の検証

HEK293 細胞に human GATA2、human Fbw7 を共に過剰発現させ、免疫沈降法後のイムノブロット法(IP-IB)で結合とユビキチン化を解析し、DiPIUS-NL 法を用いたプロテオミクス解析及び K562 細胞を用いた IP-IB により内因性の結合を検証した。

2. GATA2 のプロテアソーム依存的分解における Fbw7 の寄与の検証

HeLa 細胞に GATA2、CPD に変異を導入した GATA2-T176A 変異体、Fbw7 を過剰発現させ、シクロヘキシミドによりタンパク質合成を止め、Fbw7 の存在により GATA2 の分解が亢進するかをイムノブロットによって経時的に解析した。さらに、内因性 Fbw7 をノックダウンした時の内因性 GATA2 の安定性を解析した。

3. GATA2 の CPD 配列をリン酸化するキナーゼの同定

GATA2 の CPD 配列中の T176 のリン酸化を認識するリン酸化抗体(anti-GATA2

-pT176)を作成した。精製 GATA2 タンパク質にキナーゼ標品と ATP を加えて反応させ、anti-GATA2-pT176 抗体で T176 のリン酸化を解析した。一方でキナーゼ阻害剤を細胞に作用させ、その影響を anti-GATA2-pT176 抗体で解析した。

4. Fbw7 ノックアウトマウスを用いた骨髄細胞における GATA2 発現量の解析

FACS を用いて骨髄の Lin⁻細胞の c-Kit 発現量を指標にした分化段階と GATA2 発現との関係について Fbw7 conditional knockout (cKO)マウスとコントロールマウスを用いて比較し、Fbw7 と GATA2 の骨髄細胞分化への関与を解析した。

この研究は動物実験委員会の承認を得て行った。

[結果]

まず過剰発現した GATA2 と Fbw7 が結合することを確認した。プロテオミクス解析や内因性 GATA2 と Fbw7 の IP-IB により両者の結合が確認された。また、Fbw7 の存在により GATA2 のユビキチン化が亢進すること、プロテアソーム依存的分解が亢進する事がわかった。一方で、CPD に変異を持つ GATA2-T176A は Fbw7 と結合せず、Fbw7 依存的なユビキチン化と分解を受けない事が判明した。さらに GATA2 の CPD 配列中の T176 をリン酸化する酵素として cyclin B-CDK1 を同定した。同調した Hela 細胞を用いて解析した結果、GATA2 の Thr176 は M 期で cyclin B-CDK1 によりリン酸化され分解されていることが判明した。さらに Fbw7 cKO の骨髄前駆細胞及び幹細胞分画 Lin⁻において、未分化な Lin⁻/c-Kit^{hi} 細胞数がコントロールマウスに比べ減少していた。この Lin⁻/c-Kit^{hi} 細胞では GATA2 mRNA は増加していないが、GATA2 タンパク質の有意な蓄積が見られ、Fbw7 欠失による GATA2 タンパク質の安定化が示唆された。

[考察]

本研究により Fbw7 は GATA2 のユビキチンリガーゼである事が示された。さらに GATA2 の Thr176 を M 期でリン酸化し、Fbw7 による分解に導く CPD キナーゼが cyclin B-CDK1 である事が示唆された。これは M 期でのタンパク質分解に Fbw7 が関与する最初の報告である。これまで c-Myc、c-Jun、NFκB2、MCL-1、Notch-1 等の Fbw7 の標的の CPD キナーゼはほとんどが GSK3β で、それらの分解は細胞周期依存的でないが、今回の GATA2 は cyclin B-CDK1、GATA3 は cyclin A-CDK2 が CPD キナーゼであり、GATA ファミリーが細胞周期に依存した分解を受ける点は興味深い。

Fbw7 cKO マウスの骨髄において Lin⁻/c-Kit^{hi} 細胞で GATA2 タンパク質の蓄積と Lin⁻/c-Kit^{hi} 細胞の減少を認めた。これについては二つの可能性を考えている。一つは、過剰な GATA2 蓄積によって Lin⁻/c-Kit^{hi} 細胞のアポトーシスが誘導される可能性。一方で GATA2 の高発現は幹細胞や前駆細胞の増殖や分裂期への移行や機能を抑制しているという報告もあり、Fbw7 cKO マウスにおける GATA2 の蓄積は HSC の分裂期への移行や増殖が抑制されることで Lin⁻/c-Kit^{hi} 細胞が減少している可能性も考えられる。Fbw7 は GATA2 の分解を担い、適切な GATA2 量を調節する事により骨髄幹細胞や前駆細胞の増殖分化を制御し自己再生や維持に寄与していると考えられる。

[結論]

Fbw7は転写因子 GATA2 を cyclin B-CDK1 によるリン酸化依存的にユビキチン化し、プロテアソームで分解する GATA2 のユビキチンリガーゼである。この Fbw7 による GATA2 の分解機構は骨髄幹／前駆細胞の自己再生や維持に寄与している。