



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1531号
学位記番号	第1102号
氏名	孫 佳
授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>SCF(Fbxo22)-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence (細胞老化過程における p53 標的遺伝子 Fbxo22 の機能解析)</p> <p>Nature communications. 2016 Feb 12;7:10574</p>
論文審査担当者	<p>主査： 近藤 豊</p> <p>副査： 岡本 尚, 中西 真</p>

論文内容の要旨

細胞老化は不可逆的な細胞増殖の停止を特徴とする、重要な抗腫瘍化機構の一つであることが知られている。最近になって、老化細胞が SASP と呼ばれる、サイトカインなどの生理活性因子を分泌する細胞形質を発現し、腫瘍形成促進にも働くことが明らかにされつつある。がん抑制因子 p53 の活性化の調節が、細胞老化の誘導や SASP の発現に重要であることは分かっているが、その制御メカニズムについては不明な点が多い。

本研究では、細胞老化の誘導や機能に重要な制御因子を同定するために、まず初めに DNA マイクロアレイ法を用いて、老化細胞特異的に発現変化を示す因子を解析した。その結果、老化細胞において発現が上昇する因子の一つに Fbxo22 が含まれていた。Fbxo22 は、タンパク質分解を制御するユビキチンリガーゼとして機能する F-box ファミリーに属しており、脱メチル化酵素 KDM4A と複合体を形成することは知られていたが、その詳細については不明であった。そこで、Fbxo22 の発現変化の制御機構について解析したところ、Fbxo22 は細胞老化過程において p53 依存的に発現が増加する因子であることが分かった。

次に、Fbxo22 の基質の同定を行ったところ、Fbxo22 が p53 のユビキチンリガーゼであることを見出した。Fbxo22 による p53 の分解制御機構を解析した結果、Fbxo22 は FIST-C ドメインを介して KDM4A と複合体を形成して、メチル化 p53 を分解することが明らかになった。

さらに、細胞老化過程における Fbxo22 の機能を解析した。その結果、Fbxo22 の発現抑制は、細胞老化の誘導には大きな影響を与えない一方、老化形質維持の重要な因子 p16 や SASP の発現を抑制することが分かった。さらに p53 の活性化剤の処理や KDM4A の発現抑制でも同様の結果が得られたことから、Fbxo22 はメチル化 p53 の分解を介して、p16 の発現や SASP といった重要な細胞老化形質を正に制御することが示された。

最後に、CRISPR-Cas9 システムを用いて Fbxo22 ノックアウトマウスを樹立し、解析した。その結果、Fbxo22 ノックアウトマウスにおいてメチル化 p53 の発現上昇が認められ、野生型マウスの約半分程度の大きさであることがわかった。

以上より、Fbxo22 は KDM4A と複合体を形成し、メチル化 p53 を分解するユビキチンリガーゼとして機能することによって、p16 や SASP といった細胞老化形質の発現を制御することが分かった。本研究は p53 の活性化の調節による細胞老化制御メカニズムの一端を明らかにしたものであり、今後のさらなる解析につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨

【諸言】

細胞老化は不可逆的な細胞増殖の停止を特徴とする、重要な抗腫瘍化機構である。p53 の活性化の調節が、細胞老化の誘導や形質維持に重要であることは分かっているが、その制御メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、老化細胞で高い発現を示す機能未知の因子として単離された Fbxo22 の機能を解析することによって、細胞老化の分子機構の解明を試みた。

【方法・結果】

DNA マイクロアレイ法を用いて、老化細胞特異的に発現変化を示す因子を解析した。その結果、老化細胞において発現が上昇する因子として Fbxo22 を同定した。Fbxo22 の発現制御機構について解析したところ、Fbxo22 は細胞老化過程において p53 依存的に発現が増加する因子であることが分かった。RNAi 法を用いてヒト正常細胞における Fbxo22 の発現を抑制したところ、Fbxo22 発現抑制細胞では、p53 およびその標的因子 p21 の発現が上昇し、細胞周期 G1 期停止による細胞増殖の阻害が認められた。そこで、Fbxo22 が p53 をユビキチン化するか否かを過剰発現系により検討したところ、Fbxo22 が p53 のユビキチンリガーゼであることを見出した。Fbxo22 および p53 の様々な変異体を用いて免疫沈降法により解析したところ、Fbxo22 は中央領域にある FIST-N ドメインを介して p53 の C 末端領域と相互作用する一方、FIST-C ドメインを介して KDM4A と相互作用することが分かった。さらに、Fbxo22 は KDM4A と協調して、メチル化 p53 を特異的に分解することが明らかになった。Fbxo22 発現抑制細胞では、誘導された老化細胞の割合には大きな差が認められない一方、老化形質維持の重要な因子 p16、ならびに SASP の主要因子 IL-6 と IL-8 の発現が抑制されることが分かった。このことから、Fbxo22 はメチル化 p53 の分解を介して、p16 の発現や SASP といった重要な細胞老化形質を正に制御することが示された。最後に、CRISPR-Cas9 システムを用いて Fbxo22 ノックアウトマウスを樹立して解析したところ、Fbxo22 ノックアウトマウスにおいてメチル化 p53 の発現上昇が認められ、野生型マウスの約半分程度の大きさであることがわかった。

【考察】

Fbxo22 は KDM4A と複合体を形成し協調的に働くことによって、メチル化 p53 を分解するユビキチンリガーゼであることが明らかになった。さらに、その機能は、p16、ならびに SASP といった細胞老化形質の発現に重要であることが分かった。

（審査の内容）

主査の近藤教授から、老化過程における p53 の役割について等 8 項目、第一副査の岡本教授から、mitosis skipping の生理的意義について等 11 項目、第二副査の中西教授から、老化誘導かていにおける mitosis skipping の分子基盤、細胞老化以外の p53 の機能について等 3 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、細胞生化学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、細胞老化過程を解明する目的で、新たな p53 分解制御因子 Fbxo22 を同定し、Fbxo22 が細胞老化形質維持に重要な p16 の発現誘導と SASP に必須の役割を果たしていることを明らかにした。本研究は細胞老化機構を理解する上で意義のある研究と言える。以上を持って本論文の著者は博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 近藤豊

副査 岡本尚 中西真