

「生命活動のプログラム」  
平成7年度採択研究代表者

新井 賢一

(東京大学医科学研究所 所長・教授)

## 「細胞増殖における染色体複製の型の多様性と 複製装置の活性化の分子機構」

### 1. 研究実施の概要

#### 研究の狙い

細胞複製機構の解明は、細胞増殖制御の分子機構を理解するために必須であるだけでなく、個体の発生、分化、恒常性の維持など基本的な生命現象の理解、さらには癌など、細胞増殖異常によって引き起こされる数々の疾患の分子基盤を理解するためにも重要である。本研究では細胞増殖における複製活性化機構を解明することを目的として、大腸菌、酵母、動物細胞を材料として研究をすすめてきた。とくに、増殖因子による複製誘導の細胞内シグナル伝達機構、複製起点での複製装置の活性化の分子機構、また環境変化、特に DNA 損傷など複製の一時的停止により誘導される新規な複製様式の解析、種々の細胞型における複製や転写の様式の多様性についての分子基盤について明かにすることを目標にしている。

#### これまでの研究の概要

サイトカインによりその増殖分化が制御される血液、免疫細胞をモデル系として用いて増殖因子による複製誘導の分子機構を解析してきた。また、複製起点の活性化機構を解明するために複製装置の活性化因子を同定し解析した。また DNA 損傷による組み換え依存性の複製機構を解析した。さらに、細胞型、あるいは組織によって変化する複製、転写の様式についてその分子基盤について免疫担当 T 細胞をモデル系として解析した。

#### 成果

これまでにサイトカイン受容体の変異体の解析から、サイトカインに応答して複製を開始するために必要な受容体の領域を決定し、そこに会合するチロシンキナーゼ JAK2 の重要性をしめした。さらに、サイトカインに応答して複製誘導に関与する新規細胞内シグナル伝達分子を同定し解析している。また、動物細胞の新規のリン酸化酵素 (Cdc7 類似キナーゼ) を同定しこれが、複製起点で複製装置の活性化を触媒する重要な制御因子であることを示した (図1)。また、DNA 損傷や複製

停止によって誘導される組み換え依存性の複製機構について解析した。さらに、2種類のT細胞(Th1とTh2)における転写と複製活性化の制御機構を解析し、Th2特異的に発現されるサイトカイン遺伝子領域に細胞型特異的な染色体構造が存在することを示した(図2)。

#### 今後の見通し

単離されたシグナル伝達分子を用いてサイトカイン受容体の複製誘導のより詳細な分子機構を解析をすすめるとともに、Cdc7キナーゼによる複製装置活性化に至る分子機構の全貌を明かにすることを旨とする。また、DNA損傷により誘導される組み換え依存性複製の機構と生理的意義について真核細胞において検討する。細胞種特異的な染色体構造の変化と、細胞種特異的な転写と複製の活性化の機能的連関について明かにする。これらの努力により複製装置活性化の一般的な分子機構とともに、環境変化に伴う複製様式の変化、さらに細胞種特異的な複製と転写を可能にする分子基盤が明かになることが期待される。本研究の応用的側面として、同定されたシグナル伝達分子の改変による幹細胞の増殖と分化の人為的操作法の開発、DNA複製に特異的に関与するCdc7類似キナーゼを標的とした、阻害分子の探索とその抗癌剤としての応用を目指している。また、Th1-Th2細胞群のバランスの異常はアレルギーや自己免疫疾患などを起こすことが知られており、ナイーブT細胞からTh1-Th2細胞への分化のしくみの解明はこれらの疾患の発症機序の解明、さらには治療法の開発につながることを期待される。

## 2. 研究実施内容

### サイトカイン受容体による染色体複製誘導のシグナル伝達機構の解析(図3)

平成9年度までにサイトカイン受容体の一種であるGM-CSF受容体の種々の変異体を作成し、血液、線維芽細胞などに再構成し、その生物活性、シグナル伝達について検討を加えた。その結果、細胞増殖、抗アポトーシスなどのすべての活性にJAK2が必須であることがあきらかになった。さらにPI3-K、Shc、SHP-2、MAPK cascadeなど種々の細胞内シグナル伝達分子・経路の活性化を検討するとこれらのすべての活性化にJAK2が必要であった。GM-CSF受容体β鎖細胞内に存在する8個のチロシン残基は種々のシグナル伝達分子の活性化に必須あるいは重複した機能を果たしているが、増殖すなわち複製促進には必須ではないことを明らかにした。さらに、細胞の生存にはMEK1を介する経路、あるいはチロシンキナーゼ阻害剤であるゲニスタインに感受性の経路のいずれかがあれば十分であることを示した。これらの知見をもとづき平成10年度は増殖に重要であるGM-CSF受容体膜貫通領域直下部分(box1/box2)に会合する分子あるいは特定の領域によって発現が誘導される遺伝子を複数を単離し、その発現パターンなどについて解析を加えた。

box1/box2 に会合することで単離された MAD2 は G2/M 期の細胞周期の進行に重要であることが知られている分子で現在どのように GM-CSF がこの分子の制御を介して細胞周期に関与しているのか検討を加えている。さらに Gyrase、Estrogen receptor などを用いて JAK2、STAT などの分子との融合たんぱく質を作成すると二量体化を誘導することにより、活性化が起こり種々の細胞応答を引き起こすことが明らかになった。この手法を応用し二量体化を誘導できるライブラリーシステムを開発し、細胞増殖を指標としてシグナル伝達分子の単離を試みた。現在単離された新規遺伝子の解析を行っている。

#### 複製装置を活性化する Cdc7 類似キナーゼ複合体の解析と DNA 損傷により誘導される組み換え依存性の DNA 複製機構

われわれは数年前から真核細胞の染色体複製制御機構の一般像を明かにするために、出芽酵母において複製開始に必須であることが明らかになっていた Cdc7-Dbf4 キナーゼ複合体に類似した制御因子が、より高等な真核生物においても存在するかどうかを検討してきた。平成9年度までに、触媒サブユニットである Cdc7 類似遺伝子をヒトを含む各種真核生物から単離し、その機能解析を行い、さらに分裂酵母とヒトの Cdc7 ホモログ（触媒サブユニット；それぞれ Hsk1 および huCdc7）の活性制御サブユニット（それぞれ Him1 および ASK）を単離した。平成10年度は、これら単離された Cdc7 類似キナーゼ複合体の詳細な機能解析をおこない、これによる染色体複製制御の分子機構を明かにし、さらに高等生物の増殖分化を制御するシグナル伝達ネットワークにおける位置づけを解明することを試みた。Hsk1/Him1 および huCdc7/ASK の転写とタンパク質の細胞周期における変動を検討した結果、いずれの生物種においても、触媒サブユニットは細胞周期を通じてほぼ一定のレベルで発現されること、制御サブユニットの発現は G1 期で低下し G1 後期から S 期にかけて上昇し S 期を通じて高く保たれることが示された。hsk1(ts) 株の解析および、him1 変異体の解析から、Hsk1/Him1 複合体は、体細胞分裂および減数分裂時の DNA 複製の他に、ヒドロキシ尿素などによる DNA 複製阻害時のチェックポイント制御に Rad3/Cds1 キナーゼの活性制御を通じて関与することが明らかとなった。また、Cohesin 複合体の一員である Rad21 タンパク質との相互作用を通じて姉妹染色分体の接着を制御する可能性も示された。G1 期のヒト正常繊維芽細胞に ASK の抗体を微注入すると、80%以上の細胞で DNA 複製が阻害された。この事実は ASK の機能がヒト細胞の DNA 複製の開始に必須であることを示す。また、muCdc7（マウス Cdc7 類似キナーゼ）遺伝子の 2 つの allele を欠損したマウスは胎生 3.5 日から 6.5 日の間に死亡した。さらに、ES 細胞レベルで conditional に muCdc7 遺伝子破壊を誘導できる変異細胞を作製した。これらの解析から、Cdc7-ASK の機能は動物細胞の増殖に必須であることが証明された。一方

huCdc7-ASK 複合体を精製し、*in vitro* リン酸化反応による解析を行った結果、MCM 複合体の中の MCM2 サブユニットが特異的にリン酸化され *in vivo* で観察されるリン酸化パターンと類似したリン酸化パターンが得られた。リン酸化された MCM2 タンパク質は主に、可溶性画分に回収されることから MCM2 のリン酸化により MCM 複合体の集合状態が変化し、その結果 MCM 複合体 (DNA ヘリカーゼ活性?) が活性化され複製が開始するというモデルを提出した。大腸菌で観察される、組み換え依存性の DNA 複製はヘリカーゼドメインと Zn フィンガーモチーフを有する PriA タンパク質に依存する。変異 PriA タンパク質の解析から、組み換え依存性 DNA 複製には PriA タンパク質のヘリカーゼ活性と Zn フィンガーモチーフのいずれも必要とされることが明らかとなった。また、組み換え中間体 (D ループ) 結合に必要な PriA タンパク質上のドメインを推定した。これらの知見に基づいて、真核細胞において PriA と同様な機能を有するタンパク質の探索を行っている。

#### 細胞種特異的な複製と転写の機構：染色体構造の変化の影響

T 細胞系を研究対象として、特にナイーブヘルパー T 細胞が抗原刺激を受け、免疫反応の型を規定する Th1 と Th2 細胞へ分化する過程と、胸腺において、T 細胞受容体を介する刺激が T 細胞の生存と死を左右する *thymic selection* の過程を中心に、転写と複製の制御機構を解析してきた。Th1 細胞は IFN $\gamma$  などのサイトカインを産生し、細胞性免疫を誘導する。Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-6、IL-13 などのサイトカインの産生を通して、IgE などの抗体産生を制御し液性免疫において中心的役割を担う。Th1 と Th2 細胞は、ナイーブ T 細胞が、抗原刺激により活性化されることにより分化するが、どちらに分化するかは、サイトカイン刺激の種類、補助刺激の種類、抗原刺激の強度など様々な要因が影響すると考えられている。Th2 細胞が特異的に産生し、Th2 細胞の機能発現に必須である IL-4 と IL-13 は、同一染色体上に非常に近接して存在する。2つの遺伝子間領域 (12kb) に、Th2 細胞にのみ見いだされる DNase I に対する高感受性領域を発見した。この DNase I に対する高感受性領域は、ナイーブ T 細胞から Th2 細胞に分化する過程で誘導され、活性化刺激を受けておらず、サイトカイン遺伝子を発現していない細胞でも存在することから、Th2 細胞への分化を反映した染色体構造の変化であると考えられる。ナイーブ T 細胞から Th2 細胞への分化は、抗原刺激と IL-4 によるシグナルにより誘導される。IL-4 受容体からのシグナル伝達には STAT6 が必要である。我々は STAT6 とエストロゲン受容体の融合タンパク質を人為的にダイマー形成を誘導して活性化することにより、IL-4 非存在下で Th2 細胞への分化を誘導することを見出した。さらにこの時、IL-4/IL-13 遺伝子間領域に、Th2 細胞に特異的に見いだされる DNase I に対する高感受性領域の誘導も確認された。これは、STAT6

が、Th2 細胞分化に必要な染色体構造の変化を誘導することを示している。現在、我々は、STAT6 がどのような分子機構により染色体構造の変化を誘導するのかについて解析をすすめるとともに、この領域近傍での複製起点活性化のパターンを Th1 細胞と Th2 細胞で比較して、染色体構造の変化、転写活性化、起点活性化の機能的相関関係について検討している。NFAT 転写因子ファミリーは、細胞内カルシウムの増大により活性化され、細胞質から核へ移行して、標的遺伝子の制御領域に結合し、転写を制御する。我々は NFAT 転写因子ファミリーの中で、NFATx が、胸腺での T 細胞の分化過程において、CD4 と CD8 の両分子を発現している、ダブルポジティブ細胞にかなり特異的に発現していることを示した。これは thymic selection が誘導される過程であり、NFATx が thymic selection に関与する可能性が示唆された。我々はカルシウムに依存せず構成的に活性化されている NFATx を作製し、トランスジェニックマウス系などを利用して、NFATx の T 細胞分化における役割と、この過程における転写と複製の活性化について解析している。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Itoh, T., Liu, R., Yokota, T., Arai, K., Watanabe, S. (1998) Definition of the role of tyrosine residues of the common b subunit regulating multiple signaling pathways of GM-CSF receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18, 742-752
- Mohi, G., Arai, K., Watanabe, S. (1998) Activation and functional analysis of Jak2 in BA/F3 cells using the coumermycin/GyrB system. *Mol. Biol. Cell.* 9, 3299-3308
- Liu, C.-B., Itoh, T., Arai, K., Watanabe, S. (1999) Constitutive activation of JAK2 confers mIL-3-independent survival and proliferation of BA/F3 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6342-6349
- Itoh, T., Liu, R., Arai, K., Watanabe, S. (1999) Differential influence of tyrosine residues of the common receptor b subunit on multiple signals induced by human GM-CSF. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 462-470
- Ohtoshi, A., Arai, K. and Masai, H. (1998) "Two recessive modes of growth inhibition by exogenously introduced mutant genes: Analysis of mutant CDC28 and CDC7 genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 1, 253-263
- Jung Min Kim, Sato, N., Yamada, M., Arai, K., and Masai, H. (1998) "Mouse cDNA and gene encoding a serine/threonine kinase related to *S. cerevisiae* CDC7 essential for G1/S transition: Growth regulation of its expression" *J. Biol. Chem.* 273, 23248-23257

- Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D., Seghezzi, W., Lees, E., Arai, K., and Masai, H. (1999) "A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells." *Mol. Cell. Biol.* 19, 5083-5095.
  - Takeda, T., Ogino, K., Matsui, E., Cho, M-K., Kumagai, H., Miyake, T., Arai, K., and Masai, H. (1999) "A Fission yeast gene, *him1+/dfp1+*, encoding a regulatory subunit for Hsk1 kinase, plays essential roles in S phase initiation as well as in S phase checkpoint control and recovery from DNA damages." *Mol. Cell. Biol.* 19, 5535-5547.
  - Takemoto, M., Koyano-Nakagawa, N., Yokota, T., Arai, N., Miyatake, S. and Arai, K.:Th2 specific DNase I hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *Int. Immunol.* 10: 1981-5, 1998.
  - Kamogawa, Y., Lee, H.J., Johnston, J.A., McMahon, M., O'Garra, A. and Arai, N.: Cutting Edge:Conditionally active form of STAT6 can mimic certain effects of IL-4. *J. Immunol.* 161:1074-7, 1998.
  - Imamura, R., Masuda, E.S., Naito, Y., Imai, S., Fujino, T., Takano, T., Arai, K. and Arai, N.:Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J. Immunol.* 161: 3455-63, 1998.
  - Amasaki, Y., Masuda, E.S., Imamura, R., Arai, K. and Arai, N.:Distinct NFAT family proteins are involved in the nuclear NFAT-DNA binding complexes from human thymocyte subsets. *J. Immunol.* 160: 2324-33, 1998.
  - Pan, S., Koyano-Nakagawa, N., Tsuruta, L., Amasaki, Y., Yokota, T., Mori, S., Arai, N. and Arai, K.:Molecular cloning and functional characterization of murine cDNA encoding transcription factor NFATc. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 240: 314-23, 1998.
  - 渡辺すみ子、新井賢一 サイトカインレセプターとシグナル伝達系 *Clinical Neuroscience* 16, 370-373, 1998.
  - 正井久雄、新井賢一 遺伝子の複製 岩波講座、現代医学の基礎 「分子、細胞の生物学 I ー遺伝子とタンパク質」 岩波書店 pp35-52、1999
- 他 16 件

# サイトカイン受容体から染色体複製開始にいたるシグナル伝達経路とCdc7キナーゼの活性化

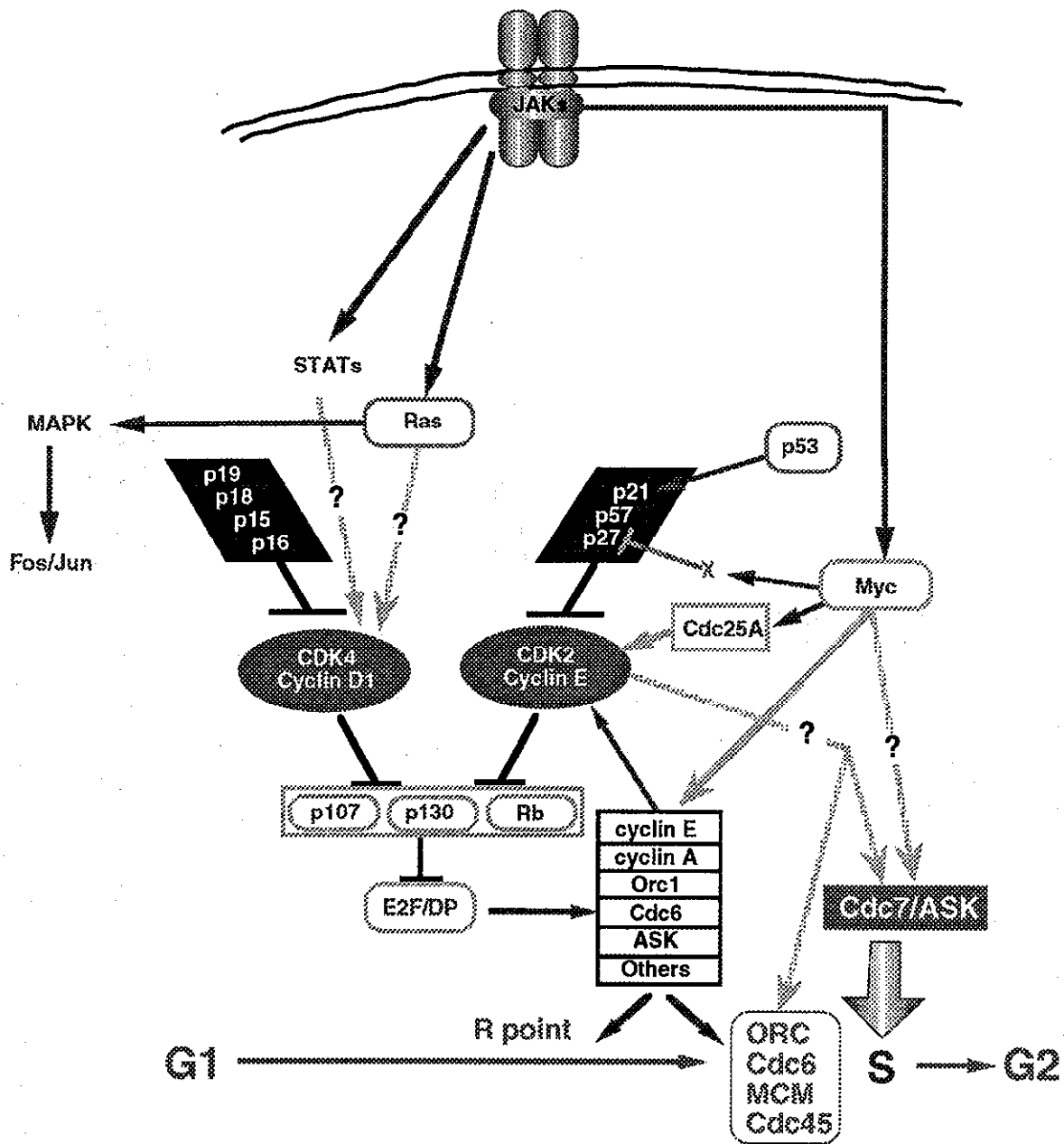


図 1 矢印は活性化あるいは発現の誘導を示す。点線はまだ厳密に証明されていない経路を示す。JAKは受容体の膜近傍領域に結合するチロシンキナーゼである。

# 転写因子によるIL-4/IL-13遺伝子領域の染色体構造の改変とその転写と複製活性化に及ぼす影響

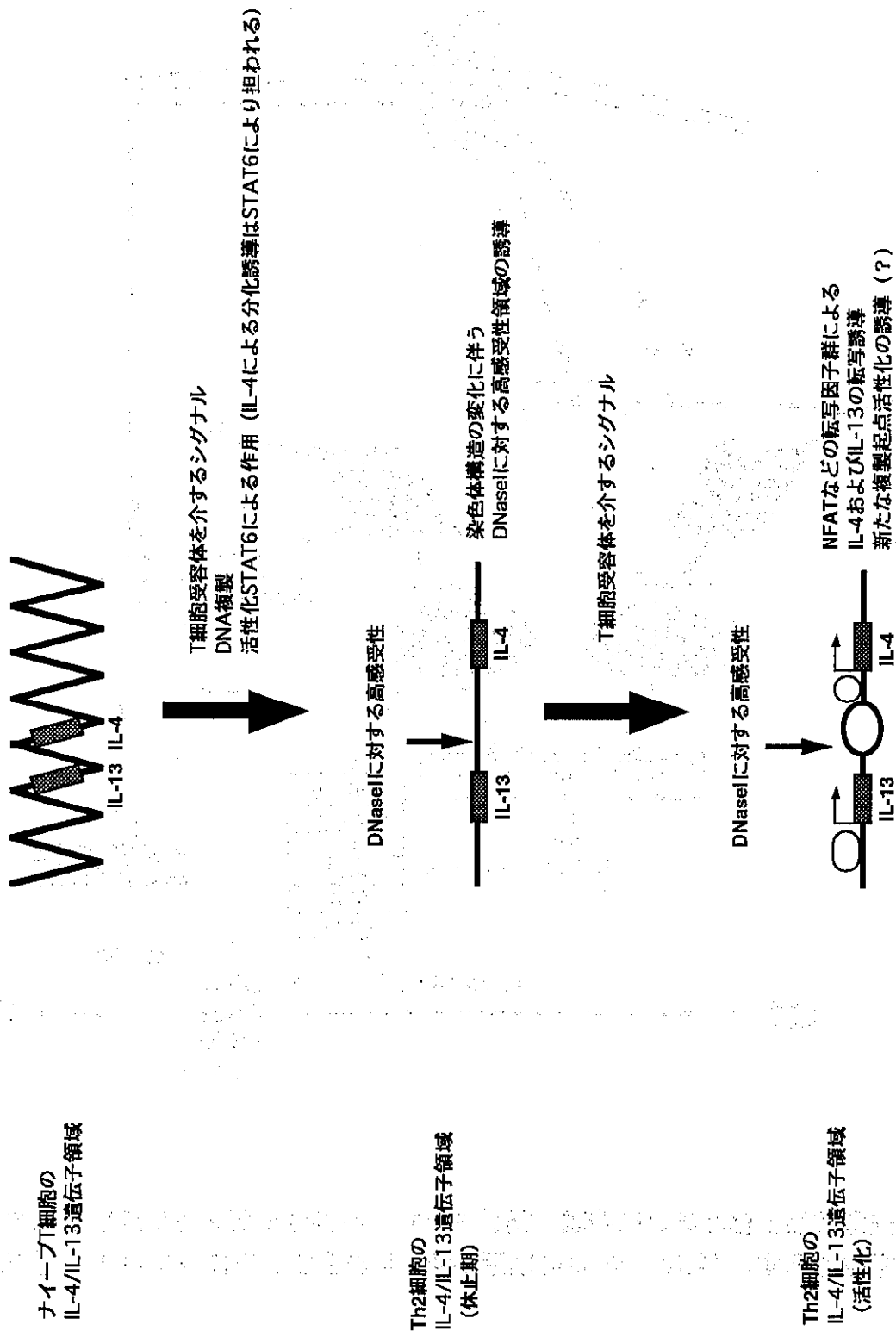
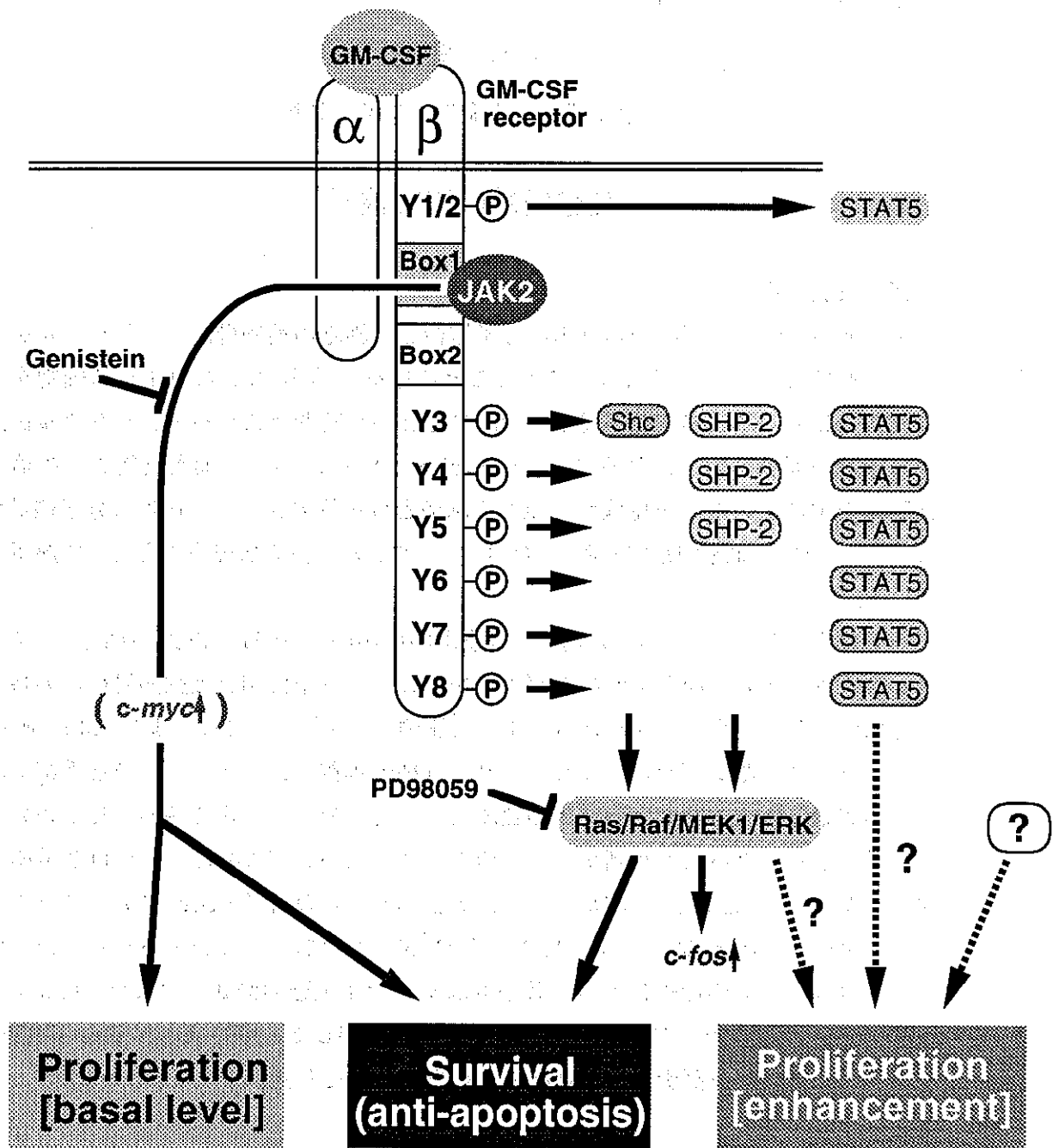


図2 転写因子により誘導される染色体構造の変化（ジグザグから直線状に模式的に変化を示している）が遺伝子の転写とDNAの複製に影響を及ぼす。一番下の染色体上の楕円は複製複製起点の存在を示しているが、これは仮想的なもので実験的にまだ示されていない。



# GM-CSF受容体シグナル伝達機構のモデル図



**図3** GM-CSFレセプター $\beta$ 鎖細胞内のBox1モチーフには、チロシンキナーゼJAK2が会合している。GM-CSF刺激によりJAK2が活性化されると、 $\beta$ 鎖のチロシン(Y)残基のリン酸化(Ⓟ)が誘導され、それらのリン酸化部位を介してShc、SHP-2、STAT5などのシグナル伝達分子が活性化される(図の右半分)。一方、JAK2の下流には、 $\beta$ 鎖のチロシンリン酸化を介さない経路も存在し、c-mycの転写活性化等に関与している(図の左半分)。GM-CSFによる細胞死の抑制には、Genistein感受性で $\beta$ 鎖チロシン残基非依存性の経路と、MEK1阻害剤PD98059に感受性で $\beta$ 鎖チロシン残基依存性の経路の、少なくとも2つのシグナルが関与している。