

「脳を守る」

平成9年度採択研究代表者

中山 敬一

(九州大学生体防御医学研究所 教授)

「神経細胞における増殖制御機構の解明」

1. 研究実施の概要

神経細胞は胎児期に一過性に分裂・増殖するが、生後はほとんど増殖することなく100年近い寿命を有する特殊な細胞である。しかしながら脳血管障害、脳腫瘍、外傷、アルツハイマー病等の神経変性疾患等によって神経細胞が死に至るとき、神経細胞は増殖しないために組織の再生が起こらず、医学的・社会的に重大な問題となっている。本プロジェクトの目的は神経細胞における増殖制御機構の特殊性を解明することであり、特に細胞周期を制御する分子群の量的制御機構を明らかにすることを主眼とする。この量的制御の点で最も重要と思われるユビキチン依存性蛋白分解機構について、私達は基礎レベルでの知見を集積しており、 $I\kappa B\alpha$ 等のモデル分子におけるユビキチン化酵素を世界で初めてクローニングすることに成功した。現在は細胞周期のコントロールに必須な分子のユビキチン化を特異的に媒介する酵素の単離同定を目指している。また多くの神経変性疾患では細胞内封入体が高度にユビキチン化されていることが知られており、これらを特異的に認識、ユビキチン化する酵素の同定も同時に行っている。

2. 研究実施内容

細胞周期の進行は非常に多くの正負の制御因子によってコントロールされている。正の制御因子としてその中心的な役割を果たすのはサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ (CDK) である。サイクリンはその名の通り細胞周期に従ってその発現量が周期的に増減し、CDKの活性を制御している。逆に負の制御因子として注目を集めているのがCDK阻害分子である。サイクリンもCDK阻害分子もその発現量は合成量ではなく、主に分解速度によって規定されており、その分解を司るシステムはユビキチン・プロテアソーム系というエネルギー要求性の特殊な蛋白修飾・分解機構に依存している。この系はまず分解の標的となる蛋白にユビキチンという小さな蛋白を多数共有結合させ、それを認識するプロテアソームという巨大蛋白分解酵素複合体によって破壊するというシステムを採用している。では何故ユビキチン化という現象がある蛋白質特異的に起こるのか、その分子メカニズムはまだ明らかでない。

かにはなっていない。即ち細胞周期の制御機構を理解することは、このユビキチン化の特異性を決定する機構を明らかにすることであるとも言える。その理解なくして細胞周期が胎児期以降完全に停止してしまう神経細胞の特殊性を語ることはできないであろう。

私達はこの「標的蛋白に特異的なユビキチン化」がどのように達成されるのかを調べるために、まずユビキチン化が特定の条件下で起こり、かつその検出が比較的簡単な蛋白をまずモデルシステムとして選び、そのメカニズムを明らかにすることを試みた。そのモデルとして選んだのは $I\kappa B\alpha$ と β カテニンという分子である。 $I\kappa B\alpha$ は生体に対する感染・ストレス等に反応して免疫反応を惹起する NF- κB という転写因子の活性化を抑制している蛋白質で、細胞外より種々のサイトカインシグナル (TNF や IL-1 等) が来るとユビキチン依存的に破壊される。今までの研究から $I\kappa B\alpha$ はユビキチン化に先行して $I\kappa B\alpha$ キナーゼ (IKK) によってリン酸化されることが判明しており、このリン酸化はユビキチン依存性分解にとって必須である。私達はこのリン酸化 $I\kappa B\alpha$ に結合してそのユビキチン化を促進する分子 FWD1 をクローニングすることに成功した。この FWD1 は F-box と WD40 リピートという特徴的な配列を有している。F-box とは Skp1 という蛋白質の結合モチーフであり、この蛋白質が SCF 複合体の一員であることを示している。SCF 複合体とは Skp1, Cull1, F-box 蛋白からなる 3 量体ユビキチン化酵素 (正確にはユビキチンリガーゼという) である。FWD1 は WD40 リピートでリン酸化 $I\kappa B\alpha$ と結合する。つまり FWD1 は SCF 複合体の基質認識コンポーネントである。ちなみにこの F-box 蛋白というのは非常に多数あり、各々の F-box 蛋白が別々の標的蛋白をユビキチン化して破壊していると考えられている。FWD1 を IKK と共に細胞に発現させると $I\kappa B\alpha$ のユビキチン化が引き起こされ、 $I\kappa B\alpha$ の分解が亢進した。逆に優性変異体を細胞に発現させると $I\kappa B\alpha$ の安定化が認められた。

β カテニンもまたユビキチン化される蛋白の中で最も注目されている分子である。 β カテニンは Wnt シグナルの伝達分子として発生や器官形成に重要な役割を果たしているのみならず、その分解の異常は大腸癌の主な原因でもある。 β カテニンのユビキチン依存性分解も $I\kappa B\alpha$ と同様にリン酸化によって制御されている。興味深いことに $I\kappa B\alpha$ とは全く生理機能を異にする分子である β カテニンは部分的に $I\kappa B\alpha$ と類似したアミノ酸配列 (DSGXSS モチーフと呼ぶ) を有しており、この配列は分解に必要なリン酸化が起こる部位である。私達は FWD1 が β カテニンにも結合すること、その結合部位は β カテニンと $I\kappa B\alpha$ で共通した DSGXSS モチーフであることを発見した。さらに FWD1 の発現は β カテニンのユビキチン化を促進し、その分解を亢進させることが明らかとなった。

これらの結果を踏まえて本研究の目的である細胞周期の制御蛋白のユビキチン化

について現在精力的に分子の単離同定を進めている。未発表データながら、サイクリン E と p27Kip1 という CDK 阻害分子に結合し、そのユビキチン化を促進する分子をクローニングすることに成功した。驚くべきことにその分子も F-box 蛋白の一員であった。その F-box 蛋白のノックアウトマウスを作製すると、その組織内にはサイクリン E や p27Kip1 が異常に蓄積しており、種々の組織に特徴的な巨大核形成を起こすことが示された。

私達は今までに多くのユビキチン化酵素をクローニングしてきたが、その資源と技術の集積を活用して神経変性疾患（アルツハイマー病・パーキンソン病・ハンチントン舞踏病等）における細胞内凝集体のユビキチン化という現象の分子レベルでの成因についても調べている。これらの疾患では細胞内に異常な不溶物が蓄積し、神経細胞死を引き起こすがこの不溶物は必ずユビキチン化されていることがわかっている。このユビキチン化は疾患の直接の原因ではないかも知れないが、ユビキチン化されることによって集積を亢進させている可能性が考えられている。このユビキチン化を起こす酵素を単離同定し、その阻害剤を探索すれば神経変性疾患の発症や進行を阻害する薬剤の開発につながる可能性があると期待される。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., Nakayama, K.-i., Hatakeyama, S.: Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J. Exp. Med.* 188: 1985-1992 (1998).
- Hatakeyama, S., Hamasaki, A., Negishi, I., Loh, D. Y., Sendo, F., Nakayama, K., Nakayama, K.-i.: Multiple Gene Duplication and Expression Of Mouse Bcl-2-Related Genes, A1. *Int. Immunol.* 10: 631-637 (1998).
- Nagata, M., Nakayama, K.-i., Terada, Y., Hoshi, S., Watanabe, T.: Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. *Am. J. Pathol.* 153: 1511-1520 (1998)
- Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Shirane, M., Matsumoto, M., Hattori, K., Higashi, H., Nakano, H., Okumura, K., Onoe, K., Good, R. A., Nakayama, K.-i.: Ubiquitin-dependent degradation of $I\kappa B\alpha$ is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul 1/F-box protein FWD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3859-3863 (1999)

他 1 件