

「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り、種々の疾病によって神経細胞が死に至っても、通常はほとんど再生することはない。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、サイクリンEやp27Kip1といった細胞周期調節に最も大切な分子群の発現量をコントロールする機構を明らかにした。この機構の中心的分子であるSkp2をクローニングし、さらに発生工学的手法を用いて、Skp2遺伝子を人工的に破壊したマウス(Skp2ノックアウトマウス)を作製した。このマウスにおいては、染色体や中心体の複製機構に異常があり、さらなる解析が待たれる。同時に、今まで培ってきたユビキチン化蛋白質の解析技術を用いて、ポリグルタミン病の原因遺伝子産物が高度にユビキチン化することを試験管内で再現することに成功し、ユビキチン化に関わる分子群の同定に成功した。これらの分子は、ポリグルタミン病における細胞内封入体(高度にユビキチン化されている)の形成に関わっていることが明らかになりつつある。

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であり、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。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。

私達は昨年まで、ユビキチン化のメカニズムを解明する第一歩として、敢えて細胞周期に直接関係ないシグナル伝達分子、I B と カテニンのユビキチン化メカニズムをモデルシステムとして研究し、その分子機構を明らかにしてきた。この結果、SCF複合体という1000以上の多様性を有する酵素（ユビキチンリガーゼ）の基本骨格を同定した。この成果を応用して、細胞周期に重要な役割を果たすサイクリンEとp27Kip1のユビキチン化機構を研究し、やはりSCF複合体の一つであるSCFSkp2がこの両者のユビキチン化依存性の蛋白質分解に関与していることを突き止めた。Skp2はSCFSkp2の一つのコンポーネントで、直接サイクリンEやp27Kip1に結合・認識する分子である。Skp2を細胞に導入すると、サイクリンEのユビキチン化が促進され、分解が亢進してサイクリンEの半減期は著明に短縮する。さらにSkp2の生理的重要性を調べるために、Skp2遺伝子を人工的に破壊したマウス（Skp2ノックアウトマウス）を作製した。このマウスには成長障害が認められ、体重は正常の約2/3しかないが、寿命は現在までのところ正常であり、特に発がん等の疾病に罹患することもない。細胞内には予想通り、サイクリンEとp27Kip1の高度の蓄積が認められ、サイクリンEとp27Kip1の分解が障害されていることが示された。細胞学的には核の大きさが異常に増大し、その中に含まれる染色体や中心体の数が増加するといった、著明な異常が認められた。

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、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。私達はまずモデルシステムとしてポリグルタミン病の一つであるMJD/SCA3の原因遺伝子産物MJD1を試験管内でユビキチン化させることに成功した。さらにこの系を用いて、MJD1をユビキチン化する活性を指標にしてユビキチン化酵素の同定を行った。その酵素複合体の中でMJD1に特異的に結合する分子を発見し、これをMJD-BPと名付けた。MJD-BPを細胞内に導入すると、通常は凝集体を形成しない完全長MJD1蛋白質（ポリグルタミン領域が伸長したもの）が著しい凝集体形成を起こすようになることから、この因子がポリグルタミン領域が異常伸長したMJD1のユビキチン化を起こすことによって、ポリグルタミン病MJD/SCA3の発症に関与している可能性が高いと考えている。現在、他のユビキチン化に関わる酵素群も同定中で、この中にはユビキチン化を促進して、プロテアソームによる破壊を亢進させる因子も含まれており、この因子をMJD1凝集体に作用させると、MJD1は速やかに分解されて封入体が消失してしまう。これらの細胞内での現象が本当に疾患と関連があるかどうかについてはまだ検討の余地があるが、その阻害剤を探索したり、遺伝子治療によってこの系

を修飾してやれば、神経変性疾患の発症や進行を阻害する治療法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)

Nakamura, S., Tatuno, I., Noguchi, Y., Kitagawa, M., Kohn, L. D., Saito, Y., Hirai, A.: 73-kDa heat shock cognate protein interacts directly with P27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor, during G1/S transition. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 257: 340-343 (1999).

Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i., Kitagawa, M.: Down-regulation of p27^{Kip1} by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J. Biol. Chem.*, 274: 13886-13893 (1999).

Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K.-i., Nakayama, K.: An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *EMBO J.*, 18: 2401-2410 (1999).

Nagafuchi, S., Katsuta, H., Kogawa, K., Akashi, T., Kondo, S., Sakai, Y., Tsukiyama, T., Kitamura, D., Niho, Y., Watanabe, T.: Establishment of an embryonic stem (ES) cell line derived from a non-obese diabetic (NOD) mouse: in vivo differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission. *FEBS Lett.*, 455: 101-104 (1999).

Nishimura, M., Tanaka, T., Yasuda, T., Kurakata, S., Kitagawa, M., Yamada, K., Saito, Y., Hirai, A.: Effect of pravastatin on type IV collagen secretion and mesangial cell proliferation. *Kidney Int.*, 56: S97-S100 (1999).

Kohzaki, H., Ito, K., Huang, G., Wee, H. J., Murakami, Y., Ito, Y.: Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO(MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. *Oncogene*, 18: 4055-4062 (1999).

Urase, K., Momoi, T., Fujita, E., Isahara, K., Uchiyama, Y., Tokunaga, A., Nakayama, K.-i., Motoyama, N.: Bcl-xL is a negative regulator of caspase-3 activation in immature neurons during development. *Dev. Brain Res.*, 116: 69-78 (1999).

Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S. Y., Ong, A. M., Hatakeyama, S., Weissman, A. M.: RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 11364-11369 (1999).

Watanabe, Y., Watanabe, T., Kitagawa, M., Taya, Y., Nakayama, K.-i., Motoyama, N.: pRb phosphorylation is regulated differentially by cyclin-dependent kinase (Cdk) 2 and Cdk4 in retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells. *Brain Res.*, 842: 342-350 (1999).

Shirane, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K., Nakayama, K.-i.: Common pathway for the ubiquitination of I B , I B , and I B mediated by the F-box protein FWD1. *J. Biol. Chem.*, 274: 28169-28174 (1999).

Hattori, K., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.-i.: Molecular dissection of the interactions among I B , FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of I B . *J. Biol. Chem.*, 274: 29641-29647 (1999).

Miura, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K.-i.: Structure and expression of the gene encoding mouse F-Box protein, Fwd2. *Genomics*, 62: 50-58 (1999).

Kohzaki, H., Ito, Y., Murakami, Y.: Context-dependent modulation of replication activity of *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences by transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 7428-7435 (1999).

Takahashi, K., Nakayama, K.-i., Nakayama, K.: Mice lacking a CDK inhibitor, p57^{Kip2}, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J. Biochem.*, 127: 73-83 (2000).

Ato, M., Iwabuchi, K., Matsuki, N., Mukaida, N., Iwabuchi, C., Takahashi, A., Takayanagi, T., Dondog, E. A., Hatakeyama, S., Ishikura, H., Kato, M., Negishi, I., Nishihori, H., Watano, K., Ogasawara, K., Matsushima, K., Onoe, K.: Delayed clearance of zymosan-induced granuloma and depressed phagocytosis of macrophages with concomitant up-regulated kinase activities of Src-family in a human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse. *Immunobiol.*, 201: 432-449 (2000).