

「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るが、Skp2/p27ダブルノックアウトマウスの作製によって、この原因はp27Kip1の過剰蓄積による細胞分裂の阻害の結果、細胞内構成物が通常の数倍になることに起因するものであることを突き止めた。さらにSkp2ノックアウトマウスの解析から、p27Kip1の分解にはSkp2非依存的な経路が存在することが明らかになり、その因子p140/p50をクローニングすることに成功した。また同時に、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、特にユビキチン鎖伸長因子(E4)と呼ばれる未同定の新規酵素がタンパク質分解過程に深く関与していること、この機能不全がその病因形成に重要であること、さらにその人為的な発現がポリグルタミン病にとって有効な治療法になる可能性が期待できることなどを明らかにした。

2. 研究実施内容

(1) Skp2/p27ダブルノックアウトマウスにおける細胞周期異常の検討

Skp2はSCF複合体のレセプターサブユニット(F-boxタンパク質)であり、サイクリンEやp27Kip1を認識してユビキチンを付加する反応を媒介する分子である。Skp2ノックアウトマウスを作製したところ、生化学的実験と一致してサイク

リンE及びp27Kip1の異常蓄積が認められた。Skp2ノックアウトマウスは正常に発生するが、成長が遅れ、体重は正常マウスの約2/3しかない。肉眼的な解剖学的異常は認められない。しかし肝臓、腎臓、肺、精巣、線維芽細胞において異常な核の腫大が認められ、染色体が多倍数体化し、さらに中心体の異常複製が認められた。この細胞学的異常は癌細胞の特徴である核腫大や染色体倍数性異常、中心体の過剰複製と類似しているため、その分子機構について解析を行った。

まずこの異常がサイクリンEの蓄積によるものか、それともp27Kip1の過剰によるものかを検討するために、Skp2/p27ダブルノックアウトマウスを作製した。このマウスにおいてはp27Kip1遺伝子そのものが欠損しているために、Skp2欠損下においてもp27Kip1の蓄積は起こらない。このダブルノックアウトマウスにおいてはサイクリンEが過剰蓄積しているものの、細胞学的にはほとんど正常であり、全体としてp27ノックアウトマウスに酷似していた。このことから次の結論を導くことができる。1) p27Kip1の過剰蓄積がSkp2ノックアウトマウスにおける核腫大・染色体倍数性異常・中心体の過剰複製の原因である、2) サイクリンEの蓄積はp27Kip1の過剰蓄積による二次的なものではない、3) サイクリンEの過剰蓄積とp27Kip1の欠損だけでは自然発癌に十分ではない。

(2) Skp2ノックアウトマウスにおける細胞周期異常の検討

次にSkp2ノックアウトマウスに見られるp27Kip1の過剰発現がどのようにしてその細胞学的異常につながっていくのかを検討するために、種々の生化学的検討を行ったところ、Cdc2キナーゼ活性が低下していることが明らかとなった。しかしながらサイクリンBやCdc2キナーゼの量は変化していないことから、分解されなかったp27Kip1がCdc2キナーゼ活性を阻害していることが考えられた。実際にFT210というCdc2温度感受性変異株を用いてCdc2キナーゼ活性を低下させると、Skp2ノックアウトマウスに見られる異常と類似の異常が再現することができた。このことから分解されないp27Kip1はG2/M期においてCdc2活性を阻害し、M期への進行が起こらないまま、次のS期へ進行することが考えられた。このことはSkp2ノックアウトマウスに女性ホルモン(エストロール)を投与して肝細胞を一過性に増殖刺激を与えたときに、肝細胞はS期へは進行するものの、M期へは進行できないという事実と一致するものである。

(3) Machado-Joseph病におけるMJD1のユビキチン化酵素の単離同定

神経変性疾患における封入体を構成している物質は、ほとんどがユビキチン化されていることが知られている。そこで私達はその物質のユビキチン化機構の詳細を調べるために、それらの物質に特異的にユビキチン化を起こす酵素の精製及び遺伝子の単離同定を試みた。私達はポリグルタミン病の一つであるMachado-Joseph disease(MJD/SCA3)において、その原因遺伝子産物であり封入体の主成

分であるMJD1(ataxin-3) が細胞内において強くユビキチン化される事実を見出した。病気の原因であるMJD1中のポリグルタミンの伸長はMJD1の分解を強く抑制し、その安定性を著しく延長させる働きがあることが明らかとなった。我々はMJD1のユビキチン化反応を試験管内で再構築することに成功した。そこでこの反応系によるMJD1のユビキチン化能を活性の指標として、MJD1のユビキチン化を引き起こす活性分画からユビキチン化因子を生化学的に精製することを試みた。

まずウサギ網状赤血球抽出液から種々のカラムクロマトグラフィー等を組み合わせ、活性と共に挙動を共にする97kDaのタンパク質の存在をSDS-PAGEで確認した。このタンパク質のアミノ配列決定を行ったところ、AAA-typeのATPaseでシャペロン機能を持つVCPというタンパク質であることが明らかとなった。さらに出芽酵母におけるVCPのホモログであるCdc48は、ユビキチン鎖伸長因子(E4)であるUfd2と結合することが最近報告されていたので、私達はUfd2の哺乳類ホモログUFD2aをクローニングした。UFD2aは予想通りVCPと結合し、VCPを介してMJD1とも結合した。

同様にして私達は既にE1、E2についても同定しており、さらにE3についてはほぼ精製を完了しつつある。E3は現在まだ同定されていないが、E3をかなり豊富に含む分画(分画17)を用いてE3の代用として種々の実験に供している。

UFD2aは、E1-E2-E3(分画17)によって数個のユビキチンが付加されたMJD1に、さらに多数のユビキチンを付ける活性(ユビキチン鎖伸長活性=E4活性)があることが明らかとなった。UFD2aはこの反応系の律速段階であり、UFD2aの量とMJD1の分解速度はほぼ比例して変動することがわかった。驚くべきことにUFD2aの量を増やしてやるだけで、細胞内で非常に安定な異常MJD1タンパク質の分解速度を正常MJD1の分解速度並に促進することが可能となった。実際に細胞内に過剰蓄積しているMJD1はUFD2aによって消失することがわかった。逆にUFD2aの機能を阻害するようなドミナントネガティブ型変異体による内在性UFD2aの活性抑制は、MJD1による封入体形成を促進することがわかった。

以上のことより、私達はMJD1のユビキチン化因子として、E1、E2、E4を分子的に同定し、遺伝子クローニングに成功した。E3についてもほぼ精製を終了しつつある。E4はUFD2aという分子で、VCPという分子を介してMJD1に結合する。このUFD2aはMJD1の分解速度を決定する最も重要な因子で、細胞内で過剰に発現させるとMJD1の消失を起こし、逆にその機能を抑制するとMJD1が蓄積して封入体形成を起こすことが明らかとなった。このことからUFD2aを人為的に発現させることにより、ポリグルタミン病の治療に応用する可能性が期待できる。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i., Hatakeyama, S.: Targeted disruption of *Skp2* results in accumulation of cyclin E and p27^{Kip1}, polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.*, 19 : 2069-2081 (2000)

Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., Nakanishi, M.: NAK is an IκB kinase-activating kinase. *Nature*, 404 : 778-782(2000)

Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh, E. A., Kominami, K., Toda, T., Suzuki, T., Chiba, T., Tanaka, K., Kato, S.: Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J.*, 19 : 3475-3484(2000)

Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y. A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, N., Nakayama, K.-i. : Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in *Chk1*^{-/-} mice. *Genes Dev.*, 14 : 1439-1447(2000)

Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Ueno, H., Minamishima, Y. A., Farber, J. L., Tanaka, M. : A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death. *Oncogene*, 19 : 5281-5290(2000)

Hara, H., Kishihara, K., Matsuzaki, G., Takimoto, H., Tsukiyama, T., Tigelaar, R. E., Nomoto, K. : Development of dendritic epidermal T cells with a skewed diversity of γδTCRs in Vδ1-deficient mice. *J. Immunol.*, 165 : 3695-3705(2000)

Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i. : Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27^{Kip1}, increases its protein stability. *J. Biol. Chem.*, 275 : 25146-25154(2000)

Yamanaka, A., Hatakeyama, S., Kominami, K.-i., Kitagawa, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.-i.: Cell cycle-dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase-promoting Complex/Cyclosome. *Mol. Biol. Cell*, 11 : 2821-2831 (2000)

Tanaka, T., Tatsuno, I., Uchida, D., Moroo, I., Morio, H., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Saito, Y., Hirai, A.: Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J. Neurosci*, 20 : 2852-2859(2000)

Dobashi, Y., Shoji, M., Kitagawa, M., Noguchi, T., Kameya, T. : Simultaneous

suppression of cdc2 and cdk2 activities induces neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 275 : 12572-12580 (2000)

Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A., Kitagawa, M. : Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.*, 275 : 16235-16241 (2000)

Kitagawa, K., Kawamoto, T., Kunugita, N., Tsukiyama, T., Okamoto, K., Yoshida, A., Nakayama, K., Nakayama, K.-i. : Aldehyde dehydrogenase (ALDH)2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh 2 gene targeting mouse. *FEBS Lett.*, 476 : 306-311 (2000)

Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., Kobayashi, S., Shibata, S., Asano, Y., Gondo, H., Sekiguchi, K., Nakayama, K., Nakayama, T., Okamura, T., Okamura, S., Niho, Y., Nakayama, K. : Tyk 2 plays a restricted role in IFN α signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity*, 13 : 561-571 (2000)

Yamano, H., Kitamura, K., Kominami, K., Lehmann, A., Katayama, S., Hunt, T., Toda, T. : The spike of S phase cyclin Cig2 expression at the G1-S border in fission yeast requires both APC and SCF ubiquitin ligases. *Mol. Cell*, 6 : 1377-1387 (2000)

Tsukiyama, T., Ishida, N., Shirane, M., Minamishima, Y. A., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Nakayama, K.-i. : Down-regulation of p27^{Kip1} expression is required for development and function of T cells. *J. Immunol.*, 166: 304-312 (2001)

Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M., Tomita, K., Nakayama, K.-i.: Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27^{Kip1} and p57^{Kip2} during mouse development. *Anat. Embryol.*, 203 : 77-87 (2001)