

「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。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、第二のp27Kip1分解因子であるKPCをクローニングすることに成功した。また同時に、脳や免疫系で高発現している細胞周期抑制に働くシグナル伝達分子PKC- δ の遺伝子を人工的に破壊したマウス(PKC- δ ノックアウトマウス)を作製し、それが免疫系の異常を引き起こして自己免疫疾患に陥ることを明らかにした。

2. 研究実施内容

(1) p27Kip1を分解する第二の経路の発見とその因子の単離同定

Skp2はユビキチンリガーゼ(E3)の一種である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、p27Kip1を認識してユビキチンを付加する反応を媒介することが我々及び他のグループより報告された。我々はSkp2ノックアウトマウスを作製したところ、Skp2が欠損した状態においてp27Kip1の分解はS期からG2期にかけての後期分解は傷害されているものの、G0-G1移行期におけるp27Kip1の分解は正常に起こることを明らかにした。この活性はプロテアソーム阻害剤で抑制できることから、やはりユビキチン・プロテアソーム系を利用したタンパク質分解機構であることが示唆された。またin vitro系を用いた実験からは、この活性は細胞質分画に含まれていることが明らかとなった。

そこで我々は、ウサギ網状赤血球抽出液から6つの異なるカラムクロマトグラフィーを用いてこの活性を精製し、そのアミノ酸配列を同定した。これらはKPC(Kip1-ubiquitylation Promoting

Complex) 1およびKPC2と命名され、KPC1はRINGフィンガードメインを持つ触媒サブユニット、KPC2はUBLドメインとUBAドメインを有する調節サブユニットであることが推測された。KPC1とKPC2は複合体を形成し、p27Kip1をユビキチン化することができる。KPC1のRINGフィンガードメインを欠損した変異体はこのユビキチン化を起こすことができないことから、このRINGフィンガードメインがp27Kip1のユビキチン化に必須であることが証明された。

KPC1とKPC2は共に細胞質に共発現しており、KPC1とKPC2を細胞に過剰発現させるとp27Kip1のG0-G1移行期における分解が促進されること、逆にKPC1の変異体(酵素活性を持たないもの)とKPC2を過剰発現させると、その分解が遅延することなどから、KPCが細胞質に輸送されてきたp27Kip1をユビキチン化して分解していることが示唆された。そのことを最終的に証明するため、核外輸送阻害剤であるLeptomycin Bで細胞を処理すると、KPCの効果は完全に消失することがわかり、KPCの働きは核外輸送されたp27Kip1をユビキチン化することであることが明らかとなった。このことは、細胞周期のブレーキであるp27Kip1の分解は、核外輸送とそれに引き続くユビキチン依存性分解という機構で行われており、これは生物が速やかに細胞周期ブレーキを不活性化するための戦略であると考えられる。

(2) PKC- δ ノックアウトマウスにおける細胞周期異常の検討

PKC- δ は脳と免疫系に高発現しているPKCのアイソタイプである。PKC- δ は以前から過剰発現によって細胞周期を負に制御することが知られており、我々はPKC- δ とp27Kip1の関係を明らかにすべく、PKC- δ ノックアウトマウスを作製した。PKC- δ ノックアウトマウスは正常に発生し、以後に述べる自己免疫疾患の発症以外は特に異常を示さない。PKC- δ ノックアウトマウスでは脾腫やリンパ節腫大が認められ、FACS解析の結果から、B細胞の過剰増殖があることが明らかとなった。また組織染色から全身のリンパ組織に胚中心が多数形成されていることが観察された。この形質は、B細胞養子移入実験よりB細胞自体の異常であることが示唆された。またin vitroでの増殖実験でも、B細胞の過剰増殖が認められた。このときIL-6が過剰にB細胞から産生されていることを我々は突き止めた。IL-6の転写は主にNF- κ BとNF-IL6という二つの転写因子によって制御されているが、以前からNF-IL6はPKCによってリン酸化を受け、それによってDNA結合能が失われることが判明しており、PKC- δ ノックアウトマウスの結果はそれに合致するものである。

PKC- δ ノックアウトマウスは血中の免疫グロブリン値が異常を示し(特にIgG1とIgA)、6ヶ月齢を過ぎた頃から自己抗体を産生するようになる。また腎臓では自己免疫性腎炎が認められ、糸球体への免疫複合体の沈着が観察される。さらに全身の実質性臓器にリンパ球浸潤が認められる。

これらのことから、PKC- δ はIL-6の遺伝子発現調節に重要な役割を果たしていること、それによってB細胞の抗原による増殖を負に調節していること、その機構はB細胞が自己に反応しないために必須であり、それが破綻すると自己免疫性疾患に陥ること、などが明らかになった。よってPKC- δ は自己免疫性疾患の発症メカニズムに関与する重要な分子であることが判明した。

3. 研究実施体制

分子生物学グループ

グループ長:中山 敬一(九州大学生体防御医学研究所・教授)

研究項目:ユビキチン化酵素のクローニング、各種ノックアウトマウス作製

蛋白切断研究グループ

グループ長:北川 雅敏(浜松医科大学医学部・教授)

研究項目:p27Kip1タンパク質切断酵素の精製・単離・解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., Kitamura, T., Kato, H., Nakayama, K.-I., Yoshimura, A.: The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J. Biol. Chem.*, 276: 12530-12538 (2001).
- Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Maehara, N., Minamishima, Y. A., Nishio, S., Nagai, E., Tanaka, M.: Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 126: 13-19 (2001).
- Kamura, T., Burian, D., Khalili, H., Schmidt, S. L., Sato, S., Liu, W. J., Conrad, M. N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Shilatifard, A.: Cloning and characterization of ELL-associated proteins EAP45 and EAP20 - A role for yeast EAP-like proteins in regulation of gene expression by glucose. *J. Biol. Chem.*, 276: 16528-16533 (2001).
- Ageta, H., Kato, A., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I., Isojima, Y., Sugiyama, H.: Regulation of the level of Vesl-1S/Homer-1a proteins by ubiquitin-proteasome proteolytic systems. *J. Biol. Chem.*, 276: 15893-15897 (2001).
- Morishita, H., Makishima, T., Kaneko, C., Lee, Y. S., Segil, N., Takahashi, K., Kuraoka, A., Nakagawa, T., Nabekura, J., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Deafness due to degeneration of cochlear neurons in caspase-3-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284: 142-149 (2001).
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Nakayama, K.-I.: U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.*, 276: 33111-33120 (2001).
- Kamura, T., Burian, D., Yan, Q., Schmidt, S. L., Lane, W. S., Querido, E., Branton, P. E., Shilatifard, A., Conaway, R. C., Conaway, J. W.: Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, 276: 29748-29753 (2001).
- Shono, M., Sato, N., Mizumoto, K., Minamishima, Y. A., Nakamura, M., Maehara, N., Urashima, T., Saimura, M., Qian, L., Nishio, S., Nagai, E., Tanaka, M.: Effect of serum

- depletion on centrosome overduplication and death of human pancreatic cancer cells after exposure to radiation. *Cancer Lett*, 170: 81–89 (2001).
- Malek, N. P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakidis, T. R., Roberts, J. M.: A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27^{Kip1} in G1 and S phase. *Nature*, 413: 323–327 (2001).
 - Kiernan, R. E., Emiliani, S., Nakayama, K., Castro, A., Labbe, J. C., Lorca, T., K.-I., N., Benkirane, M.: Interaction between Cyclin T1 and SCF^{SKP2} Targets CDK9 for Ubiquitination and Degradation by the Proteasome. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 7956–7970. (2001).
 - Maruyama, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ishida, N., Kawakami, K., Nakayama, K. I.: Characterization of a Mouse Gene (*Fbxw6*) That Encodes a Homologue of *Caenorhabditis elegans* SEL-10. *Genomics*, 78: 214–222. (2001).
 - Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I.: Degradation of p27^{Kip1} at the G₀-G₁ transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 48937–48943. (2001).
 - Doira, N., Kanematsu, T., Matsuda, M., Takeuchi, H., Nakano, H., Ito, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., Hirata, M.: Hyperinsulinemia in *PRIP-1* gene deleted mice. *Biomed. Res.*, 22: 157–165 (2001).
 - Murillas, R., Simms, K. S., Hatakeyama, S., Weissman, A. M., Kuehn, M. R.: Identification of developmentally expressed proteins that functionally interact with Nedd4 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, 277: 2897–2907 (2002).
 - Ikebe, C., K.-i., K., Toda, T., Nakayama, K.-I.: Isolation and Characterization of a Novel F-Box Protein Pof10 in Fission Yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: 1399–1407 (2002).
 - Yamanaka, A., Yada, M., Imaki, H., Koga, M., Ohshima, Y., Nakayama, K.-I.: Multiple Skp1-Related Proteins in *Caenorhabditis elegans*. Diverse Patterns of Interaction with Cullins and F-Box Proteins. *Curr. Biol.*, 12: 267–275 (2002).
 - Minamishima, Y. A., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice. *Cancer Res.*, 62: 995–999 (2002).
 - Yoshida, K., Nakayama, K., Nagahama, H., Harada, T., Harada, C., Imaki, J., Matsuda, A., Yamamoto, K., Ito, M., Ohno, S., Nakayama, K.-I.: Involvement of p27^{KIP1} degradation by Skp2 in the regulation of proliferation in response to wounding of corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43: 364–370 (2002).
 - Kanematsu, T., Jang, I. S., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Nakayama, K., Yamamoto, T., Akaike, N., Hirata, M., Nakayama, K.-I.: Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA_A

receptor function. *EMBO J.*, 21: 1004-1011 (2002).

- Shimoda, K., Tsutsui, H., Aoki, K., Kato, K., Matsuda, T., Numata, A., Takase, K., Yamamoto, T., Nukina, H., Hoshino, T., Asano, Y., Gondo, H., Okamura, T., Okamura, S., Nakayama, K.-I., Nakanishi, K., Niho, Y., Harada, M.: Partial impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice. *Blood*, 99: 2094-2099 (2002).

(2) 特許出願

なし