

「生物の発生・分化・再生」
平成14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)

「細胞周期の再活性化による再生能力の賦活化の研究」

1. 研究実施の概要

成人において細胞周期に入っている細胞は1%以下の少数の細胞であり、その他大部分の細胞は細胞周期から逸脱して休止状態にある。幹細胞は細胞周期に再進入する能力を有するが、最終分化を遂げた神経・心筋細胞は、傷害があってもほとんど再生せず、その組織の欠損は生命の危機に直結する。なぜ分化と共に細胞周期への再進入能力が失われるかという謎に対しては、全くわかっていないのが現状である。細胞周期への再進入は細胞周期のブレーキ分子p27によって妨げられており、これは増殖時にp27が分解されることによって解除される。本研究の目的は、細胞周期への再進入のメカニズムを分子レベル、細胞レベル及び個体レベル解析して明らかにし、その知見を基盤として心筋細胞や神経細胞などの静止細胞を、人工的に再び細胞周期へ再進入させることを可能にすることである。われわれは既に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。

2. 研究実施内容

(1) KPCの発見と機能解析

p27Kip1はSkp2を中心とするユビキチンリガーゼ（E3）であるSCF複合体によってユビキチンを付加されることがわれわれ及び他のグループより報告された。われわれは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。

そこでわれわれは、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) p27の主要リン酸化部位Ser-10に関する生化学的・細胞生物学的解析

われわれは以前にp27のリン酸化部位を特定し、Ser-10が全体の70%近くを占める主要リン酸化部位であること、さらにそのSer-10リン酸化の程度はG0-G1期において高く、S期やG2-M期においては低いことを報告してきた。このSer10のリン酸化における生理的意義を検討するため、種々の解析を行っていたところ、Ser10がリン酸化されたp27は有意に核外排出されて分解されることが明らかとなった。この現象の分子メカニズムを探索するために、核外排出のトランスポーターであるCRM1とリン酸化p27の結合状態を調べたところ、Ser10がリン酸化されたp27とのみCRM1は結合することが明らかとなった。そこでSer10をAlaに置換した変異体（S10A）やリン酸化状態を模擬すべくAspやGluに置換した変異体（S10DやS10E）を作製すると、S10A変異体ではp27の核外排出が遅延し、逆にS10DやS10E変異体ではp27の核外排出が促進されていた。このことにより、p27はSer10がリン酸化されると効率的に核外排出され、そこで何らかのメカニズムによって分解を受けることが明らかとなった。

(3) マロリー小体の形成に関わる分子機構の解明

マロリー小体はアルコール性肝障害等の病態に付随して認められる病理像であり、肝細胞の核近傍にできる無構造的な封入体である。この封入体は好酸性でエオジンで染色され、またユビキチン抗体による免疫染色で染まることが知られている。この凝集物の主要成分はケラチン8及びケラチン18であり、マウスに抗真菌剤グリセオフルビンを経口投与すると、肝臓にマロリー小体が形成されることが知られていた。しかしながらその

形成の分子機構はin vitro系がないために長らく不明であった。われわれはマロリー小体をin vitroで作製する試みとして、肝細胞株をグリセオフルビン存在下で培養を行い、低頻度ながらマロリー小体を形成することに成功した。このときケラチン18がケラチン8に対して増加していることが判明したので、ケラチン18/ケラチン8のバランスが狂うことによってマロリー小体が形成されるという仮説を立てた。ケラチン18を過剰発現させると、エオジン好性でユビキチン抗体によって染まるマロリー小体様の封入体が生じた。この封入体形成によって細胞内の微小管走行に異常を生じ、細胞分裂の障害からアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。さらにケラチン8を同様に発現させると、この封入体は消失し、アポトーシスも減少することから、ケラチン18とケラチン8の比が安定な中間径フィラメントを形成するのに重要で、何らかの病的状態によってその発現比が狂うとマロリー小体が形成されることが示唆された。

(4) イムノフィリンFKBP38によるBcl-2のミトコンドリア局在化とアポトーシス抑制

Bcl-2やBcl-xLがミトコンドリアへ局在することは、その抗アポトーシス作用に重要である。われわれはBcl-2やBcl-xLに結合するタンパク質としてイムノフィリンFKBP38を同定した。FKBP38はミトコンドリアに局在し、その局在はBcl-2やBcl-xLと一致した。FKBP38の変異体を作製して、人工的にFKBP38の局在を変化させると、変異FKBP38に引き寄せられるようにしてBcl-2やBcl-xLの局在も変化した。またFKBP38の発現をsiRNAで抑制するとBcl-2やBcl-xLはミトコンドリアに局在しなくなった。つまりFKBP38はBcl-2やBcl-xLをミトコンドリアに引き寄せる作用があることが明らかとなった。一方FKBP38はFKBP12と部分的に類似しており、FKBP12は免疫抑制剤FK506と結合して、このFKBP12-FK506複合体がカルシニューリンを抑制する。興味深いことにFKBP38はFK506非存在下でもカルシニューリンを阻害することが判明し、カルシニューリンの生理的なインヒビターであることが示唆された。現在まで何故生理的には生体内に存在しないFK506という薬物がFKBP12とカルシニューリンという関係ない二つの分子を結びつけているのか全くの謎であったが、われわれはFKBP12+FK506という構造がカルシニューリンの生理的インヒビターであるFKBP38の構造に類似しているためであろうと推測している。FKBP38は過剰発現するとアポトーシスを抑制する。逆にドミナントネガティブ変異体の発現やsiRNAによるFKBP38の発現抑制は細胞をアポトーシスに対して感受性にすることがわかった。これらのことから、ミトコンドリア局在イムノフィリンFKBP38はBcl-2のミトコンドリア局在作用及びカルシニューリン阻害作用の二つの機能を持ち、アポトーシスの制御に重要な役割を果たしていることが示された。

3. 研究実施体制

細胞周期制御研究グループ

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：細胞周期制御メカニズムの解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J. Biol. Chem.*, 277: 14355-14358 (2002).
- Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I.: Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature*, 416: 865-869 (2002).
- Chi, T.H., Wan, M., Zhao, K., Taniuchi, I., Chen, L., Littman, D.R., Crabtree, G.R.: Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature*, 418: 195-199 (2002).
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I., Takahashi, R.: CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell*, 10: 55-67 (2002).
- Masuda, T.A., Inoue, H., Sonoda, H., Mine, S., Yoshikawa, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Mori, M.: Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res.*, 62: 3819-3825 (2002).
- Kamura, T., Brower, C.S., Conaway, R.C., Conaway, J.W.: A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of the VHL ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, 277: 30388-30393 (2002).
- Brower, C.S., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Kamura, T., Pause, A., Stearman, R., Klausner, R.D., Malik, S., Lane, W.S., Sorokina, I., Roeder, R.G., Conaway, J.W., Conaway, R.C.: Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 10353-10358 (2002).
- Nakamichi, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I.: Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18. *Mol. Biol. Cell*, 13: 3441-3451 (2002).
- Garcia-Fernandez, L.F., Losada, A., Alcaide, V., Alvarez, A.M., Cuadrado, A., Gonzalez, L., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Fernandez-Sousa, J.M., Munoz, A., Sanchez-Puelles, J.M.: Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C

- delta. *Oncogene*, 21: 7533-7544 (2002).
- Shimoda, K., Kamesaki, K., Numata, A., Aoki, K., Matsuda, T., Oritani, K., Tamiya, S., Kato, K., Takase, K., Imamura, R., Yamamoto, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nagafuchi, S., Nakayama, K.I., Harada, M.: Tyk2 is required for the induction and nuclear translocation of Daxx which regulates IFN-alpha-induced suppression of B lymphocyte formation. *J. Immunol.*, 169: 4707-4711 (2002).
 - Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., Littman, D.R.: Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*, 111: 621-633 (2002).
 - Taniuchi, I., Sunshine, M.J., Festenstein, R., Littman, D.R.: Evidence for distinct CD4 silencer functions at different stages of thymocyte differentiation. *Mol. Cell.*, 10: 1083-1096 (2002).
 - Kanayama, N., Takahashi, K., Matsuura, T., Sugimura, M., Kobayashi, T., Moniwa, N., Tomita, M., Nakayama, K.: Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol. Hum. Reprod.*, 8: 1129-1135 (2002).
 - Matsuura, T., Takahashi, K., Nakayama, K., Kobayashi, T., Choi-Miura, N.H., Tomita, M., Kanayama, N.: Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57(Kip2) null embryos. *FEBS Lett.*, 532: 283-288 (2002).
 - Tomari, S., Nagahama, H., Shu, Y., Hoshi, S., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Nagata, M.: Glomerular differentiation in p27 and p57 double-mutant metanephroi. *Anat. Embryol.*, 206: 31-36 (2002).
 - Shirane, M., Nakayama, K.I.: Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nature Cell Biol.*, 5: 28-37 (2003).
 - Seto, Y., Nakajima, H., Suto, A., Shimoda, K., Saito, Y., Nakayama, K.I., Iwamoto, I.: Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J. Immunol.*, 170: 1077-1083 (2003).
 - Kaneko, C., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Characterization of the mouse gene for the U-box-type ubiquitin ligase UFD2a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300: 297-304 (2003).

(2) 特許出願

なし