

「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」

### 1. 研究実施の概要

本研究は、細胞がどのように増殖サイクルからの逸脱とサイクルへの再進入を行うかを明らかにすることにより、サイクルへの再進入を人工的に制御する技術の理論的基盤の構築を目指す。われわれは、特に増殖サイクルへの再進入を妨げているp27というブレーキ分子の発現制御機構を中心にして、この問題を解決しようと考えている。昨年までわれわれはp27の分解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。つまりp27はSkp2とKPCという二つのユビキチンリガーゼ（E3）によってコントロールされていることが明らかになってきた。そこで今年度は、分子実体の明らかになったKPCの詳細な機能解析と共に、Skp2の発現制御機構や、新たなSkp2の標的分子などの発見といった、この分野における大きな進歩があった。さらにユビキチン化系の酵素で新たなファミリーとして注目を集めているユビキチン鎖伸長因子（E4）について、高等生物で初めてその機能を明らかにし、驚くべきことにE4は神経変性疾患の発症に深く関与していることが示唆された。

### 2. 研究実施内容

#### (1) KPCの分子機能の解析

昨年まで、細胞周期ブレーキp27はSkp2だけでなく、KPCによってユビキチン化され、分解されることを報告してきたが、今年度はこの機構の詳細について主に二つの視点から解析を進めた。まず第一に、Skp2システムとKPCシステムが細胞周期においてどのように使い分けられているのかという問題を検討した。そのために下記の8種類の遺伝子改変細胞を作製し、細胞周期の進行とp27の分解を調べた。

- 1) 正常線維芽細胞 (Skp2+KPC+p27+)
- 2) Skp2ノックアウト線維芽細胞 (Skp2-KPC+p27+)
- 3) KPCノックダウン線維芽細胞 (Skp2+KPC-p27+)

- 4) p27ノックアウト線維芽細胞 (Skp2+KPC+p27-)
- 5) Skp2・p27ダブルノックアウトマウス線維芽細胞 (Skp2-KPC+p27-)
- 6) KPC・p27ダブルノックダウンノックアウト線維芽細胞 (Skp2+KPC-p27-)
- 7) Skp2・KPCダブルノックアウトノックダウン線維芽細胞 (Skp2-KPC-p27+)
- 8) Skp2・KPC・p27トリプルノックアウトノックダウン線維芽細胞 (Skp2-KPC-p27-)

この8種類の細胞を用いてまずp27の分解について検討を加えた。p27遺伝子が欠失した4) 6) 8)はこの検討から除外した。その結果、G1期では3) KPCノックダウン線維芽細胞 (Skp2+KPC-p27+) がp27の分解が阻害されていたが、2) Skp2ノックアウト線維芽細胞 (Skp2-KPC+p27+) ではp27の分解は正常であった。逆にS期においては、2) Skp2ノックアウト線維芽細胞 (Skp2-KPC+p27+) でp27の分解が傷害されていたが、3) KPCノックダウン線維芽細胞 (Skp2+KPC-p27+) ではp27の分解は正常であった。7) Skp2・KPCダブルノックアウトノックダウン線維芽細胞 (Skp2-KPC-p27+) はG1期、S期のどちらでもp27の分解障害を示した。この結果から、p27の分解はG1期ではKPCによって、S期においてはSkp2によって制御されていることが明らかとなった。

次にこれら8種類の細胞において細胞周期の遅延を調べた。p27の分解が傷害されている2) Skp2ノックアウト線維芽細胞 (Skp2-KPC+p27+) や3) KPCノックダウン線維芽細胞 (Skp2+KPC-p27+) は細胞周期が遅延することが予想されたが、実際にはそのような遅延は認められなかった。これはp27がG1期に核内から細胞質へ排出されるため、KPCによる分解が起こらなくてもp27の機能は失われるためであると考えられる。またSkp2がなくてもS期への進行は妨げられないが、M期への進行は障害されることがわかった。ところが7) Skp2・KPCダブルノックアウトノックダウン線維芽細胞 (Skp2-KPC-p27+) では明らかなS期への進行遅延が起こる。これは核外に蓄積したp27が核内へ再流入してくる結果だと思われる。

次にKPCとp27の結合、及びユビキチン化活性に必要な分子間相互作用を解明する研究を行った。p27の欠失変異体を作製してKPC1/KPC2への結合を検討したところ、サイクリン・CDKとの結合領域である43-101の領域が結合に重要であることが明らかとなった。そこでサイクリンE・CDK2を同時に発現させてやると、p27とKPC1/KPC2の結合は阻害されることから、KPC1/KPC2はフリーのp27に結合してユビキチン化するが、サイクリン・CDKに結合したp27はユビキチン化できないことが判明した。さらにKPC1の欠失変異体を作製して、p27との結合を調べると、N末端の1-766の領域が必要であることが明らかとなった。同時にKPC1の欠失変異体とKPC2との結合を調べると、やはりN末端の1-399の領域が必要であることが示された。さらにKPC2の欠失変異体も作製したところ、N末端のユビキチン様ドメイン (1-95) がKPC1との結合に必要なことが明らかとなった。

## (2) Skp2の発現調節機構に関する解析

p27のユビキチン化を司る酵素のコンポーネントであるSkp2はS-G2期に主に発現しており、それにはmRNA転写量の調節とタンパク質分解による調節があるらしいことが

知られていた。われわれはこの転写レベルでの調節機構を詳細に調べる目的で、Skp2遺伝子をクローニングし、その上流領域を調べたところ、転写開始点より-207~-102の領域を欠損することによってプロモーター活性が著しく低下することが判明した。さらに詳細に変異実験を行うことにより、-175~-153の間にトランス因子が結合し、転写量を増大させていることが示唆された。この領域にはGA-binding protein (GABP) 結合配列が含まれており、抗GABP抗体によりEMSA解析を行うと、スーパーシフトが検出された。GABPのSkp2プロモーターへの結合は細胞周期特異的であり、GABPをある一定量比で過剰発現させるとSkp2の発現量が増大し、逆にsiRNAを用いてGABPをノックダウンするとSkp2の転写量が減少することから、GABPが細胞周期特異的なSkp2遺伝子発現量の調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### (3) Skp2の新たな標的としてのp57の発見

細胞周期ブレーキp27の類似分子であるp57については、現在までその発現制御機構がほとんど明らかになっていなかった。われわれはHeLa細胞においてp57がユビキチン依存的に分解することを見出した。p57はp27と構造的に類似し、特にその分解調節領域 (Degron) の配列がよく保存されていることから、p27と同様Skp2によって認識され、ユビキチン化されるのではないかと仮定した。まずSkp2ノックアウトマウスの中ではp57の蓄積が認められ、分解時間を計ると確かにSkp2ノックアウトマウスではp57の半減期が延長していた。さらにp57はSkp2に物理的に結合すること、それはスレオニン310番のリン酸化によること、等を生化学的に明らかにした。Skp2を過剰に発現させるとp57の分解速度は速くなる。最終的にin vitroでp57のユビキチン化反応を再構築することに成功し、恐らくスレオニン310番をリン酸化すると思われるサイクリンE・CDK2を同時に加えることにより、強力にユビキチン化が進むことが観察された。これらのことからp57もp27と同様にSkp2の標的であることが明らかとなった。またわれわれと他グループとの共同研究により、p21やp130のユビキチン化にもSkp2が重要な役割を果たしていることが示され、Skp2は多くの細胞周期ブレーキを同時に破壊することによって細胞周期を進める強力な増殖促進分子であることが判明した。

### (4) ポリグルタミン病原因産物のユビキチン化に関わるユビキチン鎖伸長因子E4B

ユビキチン鎖伸長因子 (E4) は数年前に出芽酵母で初めて同定された全く新しいタイプのユビキチン化酵素であるが、高等生物においてはその存在や機能に関しては全く未知であった。われわれはポリグルタミン病の一つマシャドジョセフ病 (脊髄小脳変性症3型) の原因遺伝子産物MJD1がユビキチン化されることを明らかにした。その酵素を探索する過程で、酵母のE4であるUfd2に類似した分子E4B/UFD2aがMJD1のユビキチン化に必須であることを明らかにした。E4BはMJD1の分解過程にとって律速段階の酵素であり、E4Bの過剰発現は異常MJD1の分解速度を飛躍的に早め、逆にドミナントネガティブ型のE4B (E4B  $\Delta$ U) の過剰発現はMJD1の分解を抑制する。この生化学的特性は細胞内でのMJD1の凝集性ともよく相関する。即ち、E4Bを過剰発現させると異常MJD1は消失し、逆にE4B  $\Delta$ Uを過剰発現させるとMJD1の凝集は明らかに促進される。さらにこの現

象を生体レベルで確認するため、ショウジョウバエの複眼に異常MJD1を発現させ、E4Bの共発現の効果を検討した。E4Bの共発現は異常MJD1による複眼の変性を抑制したことから、E4Bの効果は生体内でも有効であり、最終的にヒトにおいて患者への遺伝子治療がこの神経変性疾患の根本的治療法に成りうることが示唆された。

### 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

#### 発生工学研究グループ

グループ長：中山 啓子（東北大学大学院医学系研究科・教授）

研究項目：マウス発生に関わるKPCの役割の研究

### 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

- Kitamura, K., Mizuno, K., Etoh, A., Akita, Y., Miyamoto, A., Nakayama, K.I., Ohno, S.: The second phase activation of protein kinase C delta at late G1 is required for DNA synthesis in serum-induced cell cycle progression. *Genes Cells*, 8: 311-324 (2003).
- Oshikawa, K., Matsumoto, M., Yada, M., Kamura, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I.: Preferential interaction of TIP120A with Cull1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303: 1209-1216 (2003).
- Zhang, Y.W., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Morita, I.: A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res.*, 63: 1623-1630 (2003).
- von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydbring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Soderberg, O., Kerppola, T.K., Larsson, L.G.: The F-Box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol. Cell*, 11: 1189-1200 (2003).
- Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M., Hershko, A.: Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J. Biol. Chem.*, 278: 25752-25757 (2003).
- Watahiki, J., Yamaguchi, T., Irie, T., Takahashi, K., Nakano, H., Yagasaki, Y., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Maki, K., Tachikawa, T.: The role of

p57Kip2 on mandibular growth in mice: By means of laser microdissection for hard tissues. *Orthod. Waves*, 62: 201-206 (2003).

- Nakayama, K., Hatakeyama, S., Maruyama, S., Kikuchi, A., Onoe, K., Good, R.A., Nakayama, K.I.: Impaired degradation of inhibitory subunit of NF-kappa B (I kappa B) and beta-catenin as a result of targeted disruption of the beta-TrCP1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100: 8752-8757 (2003).
- Imaki, H., Nakayama, K., Delehouzee, S., Handa, H., Kitagawa, M., Kamura, T., Nakayama, K.I.: Cell cycle-dependent regulation of the Skp2 promoter by GA-binding protein. *Cancer Res.*, 63: 4607-4613 (2003).
- Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100: 10231-10236 (2003).
- Foster, J.S., Fernando, R.I., Ishida, N., Nakayama, K.I., Wimalasena, J.: Estrogens down-regulate p27Kip1 in breast cancer cells through Skp2 and through nuclear export mediated by the ERK pathway. *J. Biol. Chem.*, 278: 41355-41366 (2003).
- Chang, T.S., Kim, M.J., Ryoo, K., Park, J., Eom, S.J., Shim, J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Tomita, M., Takahashi, K., Lee, M.J., Choi, E.J.: p57KIP2 modulates stress-activated signaling by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein Kinase. *J. Biol. Chem.*, 278: 48092-48098 (2003).
- Kato, K., Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Aoki, K., Ishikawa, F., Takase, K., Ariyama, H., Matsuda, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nakayama, K.I., Harada, M.: Intracellular signal transduction of interferon on the suppression of haematopoietic progenitor cell growth. *Br. J. Haematol.*, 123: 528-535 (2003).
- Aoki, K., Shimoda, K., Oritani, K., Matsuda, T., Kamezaki, K., Muromoto, R., Numata, A., Tamiya, S., Haro, T., Ishikawa, F., Takase, K., Yamamoto, T., Yumioka, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nagafuchi, S., Nakayama, K.I., Harada, M.: Limitin, an interferon-like cytokine, transduces inhibitory signals on B-cell growth through activation of Tyk2, but not Stat1, followed by induction and nuclear translocation of Daxx. *Exp. Hematol.*, 31: 1317-1322 (2003).
- Tsukuba, T., Okamoto, K., Okamoto, Y., Yanagawa, M., Kohmura, K., Yasuda, Y., Uchi, H., Nakahara, T., Furue, M., Nakayama, K., Kadowaki, T., Yamamoto, K., Nakayama, K.I.: Association of cathepsin e deficiency with development

of atopic dermatitis. *J. Biochem.*, 134: 893-902 (2003).

- Uchida, D., Hatakeyama, S., Matsushima, A., Han, H., Ishido, S., Hotta, H., Kudoh, J., Shimizu, N., Doucas, V., Nakayama, K.I., Kuroda, N., Matsumoto, M.: AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J. Exp. Med.*, 199: 167-172 (2004).
- Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K.I.: Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J.*, 23: 659-669 (2004).
- Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y.A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K.I., Aaronson, S.A., Lee, S.W.: ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat. Cell Biol.*, 6: 121-128 (2004).
- Tsunematsu, R., Nakayama, K., Oike, Y., Nishiyama, M., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., Nakayama, K.I.: Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for Notch degradation during vascular development. *J. Biol. Chem.*, 279: 9417-9423 (2004).

(2) 特許出願

なし