

「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。G0期からG1期にかけては細胞周期アクセルの活性化とブレーキの不活化が行われるが、われわれは、この両システム共にユビキチン依存性タンパク質分解が深く関与していることを明らかにしてきた。まずアクセルの活性化制御には、Fbw7というユビキチンリガーゼが深く関与していることを突き止めた。Fbw7はサイクリンE、c-Myc、c-Jun、Notch等の細胞周期を回転させる方向に働くアクセル分子を分解することによって増殖を負に制御する癌抑制遺伝子であることを発見した。一方でp27、p21、p57等の分解を誘導するユビキチンリガーゼであるSkp2は多くの基質が報告され混乱していたが、われわれはSkp2・p27ダブルノックアウトマウスを作製することによって、遺伝学的にp27がSkp2の主要な標的であることを明らかにした。

2. 研究実施内容

(1) Fbw7ノックアウトマウスの作製と解析

Fbw7はF-boxタンパク質の一つでSCF複合体というユビキチンリガーゼ (E3) の基質認識コンポーネントである。Fbw7はサイクリンEやNotchを標的とすることが示唆されていたが、個体レベルでどのような機能を有しているかは不明であった。そこでわれわれはマウスFbw7遺伝子を破壊した場合にどのような異常が生じるかを検討することによって、Fbw7の機能を探索した。In situ hybridization法によって、Fbw7は主に血管前駆細胞に強く発現していることが明らかとなった。Fbw7ノックアウトマウスは胎生中期 (胎生10.5-11.5日) で死亡し、多くの個体で頭蓋内出血を認め、血管異常が疑われた。血管内皮マーカー染色によって、血管リモデリングが正常に起こっていないことがわかった。また主要な体幹静脈の形成が不全で、動静脈分化障害が示唆された。血管原基の体外培養法 (P-sp培養法) でもFbw7ノックアウトマウス由来の培養はほとんど血管を形成できず、血管前駆細胞自体に異常があることが強く疑われた。Notch1、2、3の発現量に変化はなかったが、Notch4が過剰に発現しており、その下流

で働く転写因子HRT1が異常に広汎な領域で発現していた。Fbw7欠損ES細胞にNotch1とNotch4を発現させてその安定性を測定したが、正常ES細胞に比較してFbw7ノックアウトES細胞ではNotch4が異常に安定化していた。予想に反してサイクリンEのレベルは正常であった。これらの結果は、少なくとも胎生中期まではFbw7の主要な調節標的は血管形成に関わるNotch4-HRT1経路であり、サイクリンEの量的制御には必須でないことが明らかになった。

(2) c-Mycのユビキチン化機構に関わる二つのF-boxタンパク質Skp2とFbw7の解析

c-Mycは細胞周期の回転開始に必要な転写因子であり、多くのヒト癌においてその発現量が異常に上昇していることが知られている。c-Mycは非常に不安定なタンパク質であり、常にユビキチン・プロテアソーム系によって分解を受けているとされている。c-Mycの安定化を決定しているのは主に転写活性化ドメイン内にある二つの領域（MycBox1及び2）であり、ヒト癌においてはこの部分の変異が圧倒的に多いことから、この領域を介するc-Mycの制御機構の解明が待たれていた。われわれはまずユビキチンリガーゼ（E3）であるSCF複合体の基質認識コンポーネントF-boxタンパク質の一つであるSkp2がc-MycのMycBox2に結合し、その分解に関わっていることを明らかにした。しかし同時にSkp2はc-Mycの活性化に必要であることも明らかとなった。この一見矛盾するデータは現在転写因子のユビキチン化によるライセンス説として受け入れられている。つまりある種の転写因子はユビキチン化されることで活性化するが、それは同時に短時間で分解するシグナルとなるという説であり、c-Mycもその一員であることが判明した。

一方でMycBox1はMycBox2よりもヒト癌において変異の多い領域であり、特にその中のスレオニン58とセリン62のリン酸化がc-Mycの分解を早めるのに重要であることが示唆されてきた。われわれはこの二箇所のリン酸化を認識するようなユビキチンリガーゼ（E3）があると想定し、その探索を行ってきたが、この部位がサイクリンEのFbw7による認識配列と類似していることからc-MycのMycBox1もFbw7の標的ではないかと考え、実験を行った。Fbw7はc-MycのMycBox1のスレオニン58とセリン62のリン酸化依存的に結合し、これはこの部位のリン酸化酵素と考えられているGSK-3 β の阻害薬でFbw7とc-Mycの結合が抑制されたことから証明された。またFbw7は試験管内ユビキチン化法においてc-Mycをリン酸化依存的にユビキチン化する活性があることを証明した。Fbw7の過剰発現はc-Mycの半減期を短縮し、逆にFbw7のRNA干渉法によるノックダウンではc-Mycの半減期は延長した。Fbw7ノックアウトマウス由来細胞ではc-Mycは安定化しており、その発現量は上昇していた。これらの結果から、細胞周期の正の制御因子c-MycはSkp2とFbw7の二つのユビキチンリガーゼによって複雑にコントロールされていることが明らかとなった。

(3) p27がSkp2の主要な標的であることの発見

ユビキチンリガーゼ（E3）であるSCF複合体の基質認識コンポーネントF-boxタンパク質の一つであるSkp2は、多くの細胞周期制御因子を標的とすることが報告されてい

るが、その標的は細胞周期を正に制御する分子群と負に制御する分子群があり、果たしてSkp2は何が生理的に主要な標的なのか現在混沌としている。われわれはこの疑問に答えるためにマウス遺伝学を用いた。つまりSkp2ノックアウトマウスとp27ノックアウトマウスを交配して、Skp2・p27ダブルノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析することによって遺伝学的にこの両者の関係を明らかにしようと試みた。p27ノックアウトマウスは個体・臓器は大きくなるが、細胞そのものは小さくなりその数が増加するのに対し、Skp2ノックアウトマウスでは、個体・臓器は小さくなるが、細胞そのものは大きくなりその数が減少するという正反対の表現型を呈する。Skp2・p27ダブルノックアウトマウスではp27ノックアウトマウスに近い表現型を呈し、Skp2ノックアウトマウスにおける異常は消失した。この結果よりSkp2の主要な標的はp27であり、Skp2ノックアウトマウスにおいてはp27の異常な蓄積が細胞・臓器・個体の異常を引き起こすものであることが遺伝学的に示された。この原因を追及するため、われわれは正常マウス、p27ノックアウトマウス、Skp2ノックアウトマウス、Skp2・p27ダブルノックアウトマウスにエストジオールを投与、または部分肝切除を行って肝細胞を増殖させ、その細胞周期を観察したところ、Skp2ノックアウトマウスではS期に進行するものの、M期には進行できず、過剰な複製を起こすことによって倍数性や中心体数の異常を来すことが示唆された。この異常はやはりSkp2・p27ダブルノックアウトマウスで消失したことにより、p27の過剰な蓄積が原因であることがわかった。p27の異常蓄積を起こすのは予想に反してG1期ではなく、S-G2期であり、その時期においてp27は主にCdc2キナーゼと結合し、その活性を阻害していることが明らかとなった。

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

- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., Nakayama, K.I.: Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev. Cell*, 6: 661-672 (2004).

- Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.*, 23: 2116-2125 (2004).
- Nishiyama, M., Nakayama, K., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Kikuchi, A., Nakayama, K.I.: Early embryonic death in mice lacking the beta-catenin-binding protein Duplin. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 8386-8394 (2004).
- Oh, K.J., Kalinina, A., Wang, J., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Bagchi, S.: The papillomavirus E7 oncoprotein is ubiquitinated by UbcH7 and Cullin 1- and Skp2-containing E3 ligase. *J. Virol.*, 78: 5338-5346 (2004).
- Yoshida, K., Kase, S., Nakayama, K., Nagahama, H., Harada, T., Ikeda, H., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S., Nakayama, K.I.: Distribution of p27(KIP1), cyclin D1, and proliferating cell nuclear antigen after retinal detachment. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 42: 437-441 (2004).
- Yoshida, K., Nakayama, K., Kase, S., Nagahama, H., Harada, T., Ikeda, H., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S., Nishi, S., Nakayama, K.I.: Involvement of p27(KIP1) in proliferation of the retinal pigment epithelium and ciliary body. *Anat. Embryol.*, 208: 145-150 (2004).
- Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K.I.: Interaction of U-box-type ubiquitin-protein ligases (E3s) with molecular chaperones. *Genes Cells*, 9: 533-548 (2004).
- Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Kato, S., Takahashi, R.: CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *J. Neurochem.*, 90: 231-244 (2004).
- Yoshida, K., Kase, S., Nakayama, K., Nagahama, H., Harada, T., Ikeda, H., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Ilieva, I.B., Ohno, S., Nishi, S., Nakayama, K.I.: Involvement of p27KIP1 in the proliferation of the developing corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45: 2163-2167 (2004).
- Li, B., Wang, X., Rasheed, N., Hu, Y., Boast, S., Ishii, T., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Goff, S.P.: Distinct roles of c-Abl and Atm in oxidative stress response are mediated by protein kinase C delta. *Genes Dev.*, 18: 1824-1837 (2004).
- Akiyoshi, H., Hatakeyama, S., Pitkanen, J., Mouri, Y., Doucas, V., Kudoh, J., Tsurugaya, K., Uchida, D., Matsushima, A., Oshikawa, K., Nakayama,

- K.I., Shimizu, N., Peterson, P., Matsumoto, M.: Subcellular expression of autoimmune regulator is organized in a spatiotemporal manner. *J. Biol. Chem.*, 279: 33984-33991 (2004).
- Terunuma, M., Jang, I.S., Ha, S.H., Kittler, J.T., Kanematsu, T., Jovanovic, J.N., Nakayama, K.I., Akaike, N., Ryu, S.H., Moss, S.J., Hirata, M.: GABAA receptor phosphor-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein. *J. Neurosci.*, 24: 7074-7084 (2004).
- Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Matsuda, T., Nakayama, K.I., Harada, M.: The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *Int. Immunol.*, 16: 1173-1179 (2004).
- Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Yamamoto, H., Kikuchi, A., Morohashi, K.: Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Mol. Endocrinol.*, 18: 2451-2462 (2004).
- Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Murayama, M., Chui, D.H., Planel, E., Takahashi, R., Nakayama, K.I., Takashima, A.: U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J. Neurochem.*, 91: 299-307 (2004).
- Yamaguchi, T., Kubota, T., Kanematsu, T., Nakayama, K.I., Hirata, M., Yamamoto, T.: Hypersensitivity to pentylenetetrazol-induced convulsion in mice lacking the PLC-related inactive protein-1. *Brain Res.*, 1025: 237-240 (2004).
- Tamamori-Adachi, M., Hayashida, K., Nobori, K., Omizu, C., Yamada, K., Sakamoto, N., Kamura, T., Fukuda, K., Ogawa, S., Nakayama, K.I., Kitajima, S.: Down-regulation of p27Kip1 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4. Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation. *J. Biol. Chem.*, 279: 50429-50436 (2004).
- Tokarz, S., Berset, C., La Rue, J., Friedman, K., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Zhang, D.E., Lanker, S.: The ISG15 isopeptidase UBP43 is regulated by proteolysis via the SCFSkp2 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, 279: 46424-46430 (2004).
- Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama,

- S., Yoshida, M., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27^{Kip1} at G1 phase. *Nat. Cell Biol.*, 6: 1229-1235 (2004).
- Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Nakayama, K.I.: VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.*, 18: 3055-3065 (2004).
- Mao, J.H., Perez-Losada, J., Wu, D., Delrosario, R., Tsunematsu, R., Nakayama, K.I., Brown, K., Bryson, S., Balmain, A.: Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature*, 432: 775-779 (2004).
- Blaschke, F., Leppanen, O., Takata, Y., Caglayan, E., Liu, J., Fishbein, M.C., Kappert, K., Nakayama, K.I., Collins, A.R., Fleck, E., Hsueh, W.A., Law, R.E., Bruemmer, D.: Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ. Res.*, 95: e110-123 (2004).
- Mirza, A.M., Gysin, S., Malek, N., Nakayama, K.I., Roberts, J.M., McMahon, M.: Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 10868-10881 (2004).
- Okumura, F., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Nakayama, K.I.: Functional regulation of FEZ1 by the U-box-type ubiquitin ligase E4B contributes to neuritogenesis. *J. Biol. Chem.*, 279: 53533-53543 (2004).
- Rodier, G., Makris, C., Coulombe, P., Scime, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Meloche, S.: p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein Skp2. *J. Cell Biol.*, 168: 55-66 (2005).
- Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N., Nakayama, K.I.: Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *J. Biol. Chem.*, 280: 1095-1102 (2005).
- Harada, K., Takeuchi, H., Oike, M., Matsuda, M., Kanematsu, T., Yagisawa, H., Nakayama, K.I., Maeda, K., Erneux, C., Hirata, M.: Role of PRIP-1, a novel Ins(1,4,5)P(3) binding protein, in Ins(1,4,5)P(3)-mediated Ca(2+) signaling. *J. Cell. Physiol.*, 202: 422-433 (2005).
- Uchida, T., Nakamura, T., Hashimoto, N., Matsuda, T., Kotani, K., Sakaue, H., Kido, Y., Hayashi, Y., Nakayama, K.I., White, M.F., Kasuga, M.: Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory

hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat. Med.*, 11: 175-182 (2005).

- Takahashi, H., Hatakeyama, S., Saitoh, H., Nakayama, K.I.: Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein. *J. Biol. Chem.*, 280: 5611-5621 (2005).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：3件）