

「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

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。逆に細胞周期が静止期への脱出機能が喪失し、無限の増殖を続けるようになることが癌であると理解されているが、その分子機構についても全く明らかではない。すなわち日本人における三大死因を構成する癌、虚血性心疾患、脳虚血性疾患には全て細胞周期からの脱出・再進入が関与していると言っても過言ではない。

われわれは、細胞周期から静止期(G0期)への脱出と、G0期から細胞周期への再進入の制御過程に関する分子メカニズムを明らかにすることによって、細胞分化と増殖とのコントロール機構を解明することを目指している。細胞周期への再進入は、細胞周期ブレーキ p27 の分解因子として Skp2 および KPC を同定し、その機能について分子的詳細をほぼ明らかにすることができた。さらに細胞周期からの脱出についても Fbw7 が細胞周期アクセルである c-Myc を制御していることを最近突き止め、次第にその全貌が明らかになってきた。今後は Skp2 や Fbw7 の遺伝子変異がマウスの種々の組織の発生や分化に対してどのような影響を及ぼすか、また組織再生においてどのような役割を果たすかを中心に研究を進めていく予定である。

2. 研究実施内容

本研究の目的は、細胞周期からの脱出と、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。われわれは細胞周期への再進入に際して、p27 の分解を引き起こす Skp2 というユビキチンリガーゼに加えて、KPC という新規ユビキチンリガーゼを既にクローニングしているので、これら両分子に焦点を当てて、その分子機能を細胞学的手法と発生工学的手法によって、解明していく。細胞周期からの脱出メカニズムについても、予備的研究によって Fbw7 というユビキチンリガーゼが密接に関与している所

見が得られているので、この分子を中心として解析を進めている最中である。

今年度は KPC を構成する分子である KPC1 および KPC2 の機能解析を行った。一次構造より 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、p27 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 p27 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 p27 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 p27 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 p27 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。

さらに KPC1 と KPC2 の機能解析を行うため、各々の分子が含むドメイン構造を欠失する変異体を多数作製し、その機能的差異を調べた。KPC1 は SPRY ドメインを含む N 末端側で KPC2 及び p27 と結合し、C 末端側の RING フィンガードメインで E2 と相互作用することが示された。p27 はそのサイクリン・CDK 結合ドメイン付近において KPC1 と結合する。この所見と一致するように、p27・サイクリン・CDK 複合体には KPC1 は作用できない。つまり KPC1 は単体の p27 だけに結合しユビキチン化できると考えられる。一方、KPC2 は N 末端側の UBL ドメインで KPC1 と結合し、UBL ドメインと UBAn ドメインを含む領域で 26S プロテアソームと結合することが判明した。さらに UBAn ドメインと UBAc ドメインでポリユビキチン鎖と結合することから、KPC2 はユビキチン化された p27 を 26S プロテアソームに効率よく運搬するためのシャトル分子である可能性が示唆された。KPC2 をノックダウンすると p27 の分解効率は低下することからも、この仮説は裏付けられた。

一方で細胞周期からの脱出(G1 期から G0 期への移行)については、まず細胞周期を維持するために必要な分子を分解する因子を仮定し、それが細胞周期からの脱出の本体ではないかという仮説に基づいて脱出因子の探索を行った。特に c-Myc は細胞周期回転の維持に必須であり、細胞周期からの脱出時には破壊されること、多くの癌で分解抵抗性になるような獲得変異があること、等から細胞周期脱出時に分解される分子の候補と考えた。そして c-Myc の分解調節領域(Myc-box 1 領域)に結合し、そのユビキチン化を引き起こす分子を探索し、Fbw7 を同定した。さらに Fbw7 のノックアウトマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスを作製することによって、細胞が細胞周期から脱出する際に Fbw7 が必要かどうかを検討した。

細胞周期からの脱出(G1 期から G0 期への移行)について、まず細胞周期からの脱出を防ぎ、回転の維持に必要な c-Myc の分解機構について詳細を調べた。c-Myc は非常に半減期の短い転写因子であり、その分解性は c-Myc の N 末端にある二つの領域(Myc-box I と II)で決定されてい

る。特に Myc-box I 領域はリン酸化されることによって分解が始まること、ここに多くの癌において変異が特に多いこと、等がわかっていた。われわれは Myc-box I 領域に結合するユビキチンリガーゼを探索し、Skp2 類似の F-box タンパク質である Fbw7 を同定した。Fbw7 は Myc-box I 領域のリン酸化が起こると結合し、c-Myc のユビキチン化を誘導する。Fbw7 を強制発現させると c-Myc の転写活性化能は減弱し、逆に Fbw7 をノックアウトまたはノックダウンすることによって発現抑制をする と c-Myc は蓄積する。

そこで細胞周期制御に果たす Fbw7 の役割を調べるために、Fbw7 ノックアウトマウスを作製した。しかしながら Fbw7 ノックアウトマウスは胎生 10 日前後で致死となり、強い血管分化の障害が認められた。これは恐らく血管分化に重要な Notch4 を分解できなくなるためであると結論された。この胎生早期の死亡によって十分な細胞周期解析ができないため、われわれはコンディショナルノックアウトマウスを作製することとした。われわれは哺乳類で最も細胞分化の研究が進んでいる T リンパ球において、特異的に Fbw7 を欠失させ、どのように分化特異的な細胞周期制御が影響されるかを検討した。T リンパ球は胸腺内において CD4-8-(DN)→CD4+8+(DP)→CD4+8-/CD4-8+(SP)という分化段階を経て成熟していくが、細胞が激しく増殖するのは DN 後期に限られ、DP 以降は細胞周期は停止する。われわれは c-Myc のユビキチン依存性分解を促進する F-box タンパク質である Fbw7 の T 細胞系列におけるコンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、胸腺が腫大しており、DP が特異的に増加していることを見出した。BrdU の取込み実験を行うと、DN では Fbw7 の有無にかかわらずその増殖率は高いが、DP では本来細胞周期が停止するべきところ、Fbw7 が欠損していると細胞周期が停止せず、増殖を続けることが判明した。このとき c-Myc の異常な蓄積が顕著に認められた。つまり Fbw7 は DP における細胞周期停止に必須であった。さらに、このマウスでは胸腺原発の T 細胞リンパ腫を発症、死亡することがわかった。これらの知見は、c-Myc が細胞周期からの脱出を阻害しており、Fbw7 が c-Myc をユビキチン化して分解を導くことにより、細胞周期から脱出して G0 期へ向かうことが示唆された。

3. 研究実施体制

「九州大学・中山 敬一」グループ

- ①研究分担グループ長：中山 敬一（九州大学、教授）
- ②研究項目：G0→G1 移行期における p27 の分解メカニズムの研究、Fbw7 による c-Myc の分解メカニズムの研究、細胞分化における細胞増殖のコントロールの研究

「東北大学・中山 啓子」グループ

- ①研究分担グループ長：中山 啓子（東北大学、教授）
- ②研究項目：Skp2 の主要な標的の探索、F-box タンパク質の系統的ノックアウトマウスの作製と解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Fujii, Y., Yada, M., Nishiyama, M., Kamura, T., Takahashi, H., Tsunematsu, R., Susaki, E., Nakagawa, T., Matsumoto, A., Nakayama, K.I.: Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Sci.*, in press. (2006). (2006).
- Fotovati, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Impaired germ cell development due to compromised cell cycle progression in Skp2-deficient mice. *Cell Div.*, in press. (2006).
- Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C.: HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27^{Kip1} and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J.*, in press. (2006).
- Sugihara, E., Kanai, M., Saito, S., Nitta, T., Toyoshima, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Fukasawa, K., Schwab, M., Saya, H., Miwa, M.: Suppression of centrosome amplification after DNA damage depends on p27 accumulation. *Cancer Res.*, **66**: 4020-4029 (2006).
- Niki, S., Oshikawa, K., Mouri, Y., Hirota, F., Matsushima, A., Yano, M., Han, H., Bando, Y., Izumi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kuroda, N., Matsumoto, M.: Alteration of intra-pancreatic target-organ specificity by abrogation of Aire in NOD mice. *J. Clin. Invest.*, in press. (2006).
- Yoshida, K., Yamaguchi, T., Shinagawa, H., Taira, N., Nakayama, K.I., Miki, Y.: Protein kinase C δ activates topoisomerase II α to induce apoptotic cell death in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, **26**: 3414-3431 (2006).
- Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Fujita, M., Lygerou, Z., Nishimoto, T.: Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J.*, **25**: 1126-1136 (2006).
- Kase, S., Yoshida, K., Ohgami, K., Shiratori, K., Suzuki, Y., Nakayama, K.I., Ohno, S.: Expression of cdc2 and p27^{KIP1} phosphorylation in mitotic cells of the human retinoblastoma. *Int. J. Mol. Med.*, **17**: 465-468 (2006).
- Iwanaga, R., Komori, H., Ishida, S., Okamura, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ohtani, K.: Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene*, **25**: 1786-1798 (2006).
- Ryer, E.J., Hom, R.P., Sakakibara, K., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Faries, P.L., Liu, B., Kent, K.C.: PKC δ is necessary for Smad3 expression and transforming growth factor β -induced fibronectin synthesis in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.*

- Vasc. Biol., [26: 780–786 \(2006\)](#).
- Humphries, M.J., Limesand, K.H., Schneider, J.C., Nakayama, K.I., Anderson, S.M., Reyland, M.E.: Suppression of apoptosis in the PKC δ null mouse in vivo. *J. Biol. Chem.*, [281: 9728–9737 \(2006\)](#).
 - Kaneko-Oshikawa, C., Nakagawa, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Mammalian E4 is required for cardiac development and maintenance of the nervous system. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 10953–10964 (2005).
 - Hara, T., Kamura, T., Kotoshiba, S., Takahashi, H., Fujiwara, K., Onoyama, I., Shirakawa, M., Mizushima, N., Nakayama, K.I.: Role of the UBL–UBA Protein KPC2 in Degradation of p27 at G1 Phase of the Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 9292–9303 (2005).
 - Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T., Nakayama, K.I.: Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics*, 5: 4145–4151 (2005).
 - Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Miyoshi, H., Kohsaka, S., Akazawa, C.: Ubiquitylation and degradation of polo-like kinase SNK by hVPS18, a RING–H2 type ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, [280: 41619–41627 \(2005\)](#).
 - Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K.I., Kikuchi, A.: Phosphorylation of β -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes β -catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 9063–9072 (2005).
 - Hatakeyama, S., Watanabe, M., Fujii, Y., Nakayama, K.I.: Targeted destruction of c-Myc by an engineered ubiquitin ligase suppresses cell transformation and tumor formation. *Cancer Res.*, 65: 7874–7879 (2005).
 - Kase, S., Yoshida, K., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Ikeda, H., Harada, T., Harada, C., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S.: Phosphorylation of p27KIP1 in the developing retina and retinoblastoma. *Int. J. Mol. Med.*, 16: 257–262 (2005).
 - Chen, Z., Foster, M.W., Zhang, J., Mao, L., Rockman, H.A., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Hess, D.T., Stamler, J.S.: An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 12159–12164 (2005).
 - Kase, S., Yoshida, K., Harada, T., Harada, C., Namekata, K., Suzuki, Y., Ohgami, K., Shiratori, K., Nakayama, K.I., Ohno, S.: Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and p27KIP1 after retinal detachment. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1–7 (2005).
 - Wang, H.Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M., Takebayashi, K., Noda, Y., Nakayama, K.I., Nishimura, M.: Interaction of presenilins with

- FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. *Hum. Mol. Genet.*, 14: 1889-1902 (2005).
- Pushkarsky, T., Yurchenko, V., Vanpouille, C., Brichacek, B., Vaisman, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Sherry, B., Bukrinsky, M.I.: Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60. *J. Biol. Chem.*, 280: 27866-27871 (2005).
 - Kase, S., Yoshida, K., Ikeda, H., Harada, T., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Ohno, S.: Disappearance of p27KIP1 and increase in proliferation of the lens cells after extraction of most of the fiber cells of the lens. *Curr. Eye Res.*, 30: 437-442 (2005).
 - Jiang, H., Chang, F.C., Ross, A.E., Lee, J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Desiderio, S.: Ubiquitylation of RAG-2 by Skp2-SCF links destruction of the V(D)J recombinase to the cell cycle. *Mol. Cell*, 18: 699-709 (2005).
 - Kotoshiba, S., Kamura, T., Hara, T., Ishida, N., Nakayama, K.I.: Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *J. Biol. Chem.*, 280: 17694-17700 (2005).
 - He, C.H., Waxman, A.B., Lee, C.G., Link, H., Rabach, M.E., Ma, B., Chen, Q., Zhu, Z., Zhong, M., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Homer, R., Elias, J.A.: Bcl-2-related protein A1 is an endogenous and cytokine-stimulated mediator of cytoprotection in hyperoxic acute lung injury. *J. Clin. Invest.*, 115: 1039-1048 (2005).
 - Jackson, D., Zheng, Y., Lyo, D., Shen, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Humphries, M.J., Reyland, M.E., Foster, D.A.: Suppression of cell migration by protein kinase C δ . *Oncogene*, 24: 3067-3072 (2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 5 件)