

機関番号：14603

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19370087

研究課題名 (和文) Rb 経路と p53 経路を統合する哺乳類 G1 期制御の解明

研究課題名 (英文) Study of the mammalian G1 regulatory mechanism unifying Rb and p53 pathways.

研究代表者

加藤 順也 (KATO JUNYA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：00273839

研究成果の概要 (和文)：

哺乳類の細胞周期の G1 期制御において COP9 シグナロソームがどのようにして Rb 経路と p53 経路を制御するかに焦点を当てて解析を行った。その結果、COP9 シグナロソームは第 5 サブユニット (Jab1/CSN5) を介して、ヒストンメチル化酵素 SMYD3 が p16 のプロモーターに結合して発現を制御することを見いだした。これにより、Jab1-SMYD3-p16-cyclin D-Cdk4/6-Rb 経路が体性幹細胞の調節に関与する知見を得た。また、第 3 サブユニット (CSN3) が MLF1 を介して COP1-p53 経路を制御することを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：

We studied the regulatory mechanism of G1 progression of the mammalian cell cycle by focusing on how the COP9 signalosome complex regulates Rb and p53 pathways. We found that the fifth subunit of the COP9 signalosome (CSN5), through interaction with a histone methyltransferase, SMYD3, bound to the promoter region of the p16 gene and regulated its transcription, indicating that the signaling pathway consisting of CSN5, SMYD3, p16, cyclin D-Cdk4/6, and Rb plays an important role in regulation of the hematopoietic somatic stem cells. We also found that the third component, CSN3, participated in the regulation of the COP1-p53 pathway through MLF1.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2008 年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 2009 年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 2010 年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：分子生物学、細胞生物学、分子腫瘍学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：遺伝学、癌、シグナル伝達、細胞周期、哺乳類

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物細胞周期の中で、G1 期は細胞の増殖、死、分化の制御において大変重要である。G1 期制御因子の中で、Cdk インヒビ

ター、G1 サイクリン・Cdk 複合体、Rb (レチノブラストーマ) タンパク質、転写因子 E2F からなる、Rb 経路は最も重要である。しかし、多種多様な哺乳動物細胞の増殖、分化が時間空間的に厳密に制御されるときに、

どのように Rb 経路の活性化と不活性化が支配されるかについて、特に、上流側の制御機構や因子については不明な点が多い。

また、これとは別に、細胞周期が適正に進行することをモニターする機構としてチェックポイントコントロールが存在し、G1 期においては p53 を介した経路が最も重要である。p53 は、DNA 損傷ストレスや細胞がん化シグナルに呼応して活性化し、種々の標的因子の転写を調節することにより、細胞周期、DNA 修復、アポトーシスなどを制御する。p53 の制御では MDM2 によるユビキチン化とプロテアソームによる分解が重要であるが、近年、MDM2 以外に、Pirh2、COP1、ARF-BP1 のユビキチンリガーゼが p53 を基質とすることが報告され、G1 期における p53 のユビキチン化・分解制御は、従来のモデルよりもっと複雑であることが示唆されている。

我々は、G1 期制御因子の研究の中で、COP9 シグナロソーム(CSN)とその構成因子(CSN1-8)が、これら Rb 経路と p53 経路の上流で機能することを見いだした。まず、CSN5(Jab1)は、最初、転写因子 c-Jun の結合蛋白質として単離されたが、後に、COP9 シグナロソームの第五サブユニット(CSN5)と同一であることが明らかになった分子である。COP9 シグナロソームはもともと光形態形成に関わる、8つのサブユニットからなる蛋白質複合体として植物にて見いだされたものであるが、その後、酵母から哺乳動物細胞に至るまで高度に保存されていることが明らかとなり、より普遍的な生命現象に関わることが示唆されている。現在までに、CSN5(Jab1)が関わる機能として、(1)転写因子(c-Jun, JunD, E2F)と直接結合し、Specificity Factor として転写調節に関わる、(2)COP9 シグナロソームと結合したタンパクキナーゼ(PKD, CKII, PI5/6 kinase)を介して標的蛋白質(c-Jun, p53, NFkB)のリン酸化を促進する、(3)ユビキチンリガーゼ蛋白質複合体の Cullin サブユニットに結合している NEDD8 分子を切り離す(deneydylatlon)ことによりリガーゼ活性を制御する、(4)核・細胞質間の局在を制御することにより標的因子の細胞内活性や安定性を調節することが知られているが、これらの細胞内機能がいつどのように制御されているかについては全くわかっていない。また、様々なヒトの腫瘍で CSN5(Jab1)の過剰発現が報告されているが、CSN5(Jab1)が発癌にかかわるプロセスや、その過程で上記(1)□(4)の4つの機能がどのようにかかわるかについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は、CSN5(Jab1)のノックアウトマウスを作製、解析することにより、CSN5(Jab1)が胎児発生の初期に重要な働きをすることや、幹細胞の維持に必須であることを明らかにした。また、CSN5(Jab1)のトランスジェニックマウスを作製、解析することにより、CSN5(Jab1)が癌遺伝子として機能すること、その際、CSN5(Jab1)は CSN5(Jab1)結合蛋白質(Jab1-BP2)と相互作用することにより、Cdk インヒビターの発現量や機能を抑制して Rb 経路を不活性化し、幹細胞を癌化させる(癌幹細胞化)可能性を見いだした。

また、一方で、我々は、COP9 シグナロソームの第三サブユニット(CSN3)が白血病関連因子である MLF1 と相互作用し、ユビキチンリガーゼ COP1 を阻害することにより、この経路の標的因子である p53 を活性化し細胞周期を停止、場合によってはアポトーシスを誘導することを見いだした。COP1 は当初、植物の光形態形成にかかわる因子として同定され、光受容体の下流で転写因子(HY5 など)の発現を制御することが発見されが、その後、動物にも高度に保存されていることが明らかとなり、動物細胞における機能が注目されていた。2004年に Dornan たちは COP1 が癌抑制たんぱく質 p53 をユビキチン化することを報告し COP1 が細胞周期制御にかかわることを示した。動物における COP1 の上流は未知であったが、光形態形成のアナロジーから、動物においても COP9 シグナロソームが COP1 の上流で機能することが考えられ、実際、我々の研究結果により、細胞癌化抑制や DNA 損傷チェックポイントコントロールにおける p53 の活性化過程において COP9 シグナロソームの第三サブユニット(CSN3)が必須の働きをすることが明らかとなった。このことは、COP9 シグナロソームが第3サブユニット(CSN3)を介して p53 経路の上流で機能すると位置づけられる。

以上のことから、COP9 シグナロソームとその構成蛋白質は、Rb 経路と p53 経路の上流で機能する因子であることがわかる。しかしながら、COP9 シグナロソームが、いつどのようにして Rb 経路と p53 経路の調節を行うかについての詳細はまだ明らかでない。

そこで、本申請研究では、哺乳類の細胞周期の G1 期制御において COP9 シグナロソームがどのようにして Rb 経路と p53 経路を制御するかを、Jab1(CSN5)-Jab1BP2-Cdk インヒビター-Rb 経路と、CSN3-COP1-p53 経路に焦点を当てて詳しく解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究では、哺乳類の細胞周期の G1 期制御において COP9 シグナロソームがどのようにして Rb 経路と p53 経路を制御するかを、CSN5(Jab1)-Jab1BP2-Cdk インヒビター-Rb 経路と、CSN3-COP1-p53 経路に焦点を当てて詳しく解析した。この際、必要に応じて多面的なアプローチを取り入れ、COP9 シグナロソームのサブユニット (CSN5, CSN2, CSN3) のノックアウトマウスやノックアウト細胞、トランスジェニックマウスやそれから樹立した培養細胞系を実験材料として用い、あくまでも生体内の状況を反映させた実験系での検証を重視した。研究期間の後半では、CSN5(Jab1)-Jab1BP2-Cdk インヒビター-Rb 経路と、CSN3-COP1-p53 経路のそれぞれの解析で得られた実験結果をもとに、両経路間でのクロストークを研究テーマの主体ととらえ、Rb 経路と p53 経路を統合するシグナル経路の実態を解明するべく努力した。

4. 研究成果

哺乳類の細胞周期の G1 期制御において COP9 シグナロソームがどのようにして Rb 経路と p53 経路を制御するかを、CSN5(Jab1)-Jab1BP2-Cdk インヒビター-Rb 経路と、CSN3-COP1-p53 経路に焦点を当てて解析した。

(1) CSN5(Jab1)-Rb 経路の解析
CSN5(Jab1)が Cdk インヒビターを制御し Rb 経路の上流で機能する具体的機構を知るために、酵母のツーハイブリッド法を利用し、CSN5(Jab1)と相互作用する因子を網羅的にスクリーニングした。その結果、既知の因子に加えて、多くの CSN5(Jab1)の新規相互作用因子 (Jab1BP) を単離することに成功した。

また一方で、CSN5(Jab1)トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは正常に発生し生まれるが、生後 6-12ヶ月で骨髄性増殖疾患を発症した。骨髄細胞を詳細に解析した結果、Cdk インヒビターp16の発現が減少し造血幹細胞のプールが増大していた。我々が単離していた新規 CSN5(Jab1)相互作用因子を検索した結果、ヒストンメチル化酵素 SMYD3が p16のプロモーターに結合して発現を制御することを見いだした。これにより、CSN5(Jab1)-SMYD3-p16-cyclin D-Cdk4/6-Rb 経路が体性幹細胞の調節に関与する知見を得た。

また、COP9 シグナロソームの機能を解析する目的で、第5サブユニット (CSN5) の条件性ノックアウト細胞を作製し、COP9 シグナロソームの機能が Cullin-Ring ユビキチンリガーゼ活性の制御に重要であり、その機

能喪失は細胞周期の複数点で障害が起こる事、細胞質分裂とエンドサイクルに影響を及ぼす事、p53 非依存的細胞老化を誘導する事などを見いだした。さらに、追加の研究として、哺乳類細胞のオートファジー制御にかかわるとされる因子、smARF に関する解析を行い、以前の Kimchi らの報告に加え、smARF が核内において機能する可能性を示すという意外な結果を得た。

(2) CSN3-p53 経路の解析

これまでに COP9 シグナロソームの第3サブユニットである CSN3 がユビキチンリガーゼ COP1 を介して p53 の上流で働くことを明らかにしていたので、酵母のツーハイブリッド・スクリーニング法を利用し、CSN3, COP1 の新規相互作用因子 (それぞれ CSN3BP と COP1BP) を単離して解析した。特に、COP1BP-1 に着目し特異的抗体を作製して種々の細胞応答における役割を CSN3-COP1 経路との関係に留意しながら解析した。その結果、オートファジーとの関連を見いだした。また、CSN3 と p53 との協調関係をマウスモデルを用いて検証した。

次に、CSN3-COP1 経路の解析を行うために、COP9 シグナロソーム (特に第3サブユニット、CSN3) と COP1 の直接の結合を検証したが認められなかった。そこで、CSN3 と COP1 の新規相互作用因子 (それぞれ CSN3BP と COP1BP) を酵母のツーハイブリッド法を利用して網羅的に単離した。すでに CSN3 と結合することを報告した因子 MLF1 については、さらに詳細に検討を加え、MLF1 には機能的な核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) が存在し核・細胞質シャトリング因子として機能すること、シャトリング能力と増殖抑制能力が関連すること、活性化型 MLF1 融合蛋白質である NPM-MLF1 は細胞老化に拮抗する能力があり、そのためには核・細胞質シャトリング能力が重要であること、などを見出した。また、ショウジョウバエにおける MLF1 ホモログ (dMLF) を同定しその機能について調べた。MLF1 はハエからヒトにいたるまで高度に保存されており、特に特定のドメインにおける保存度が高かった。dMLF は哺乳類 MLF1 と同様に増殖抑制能を保持しており、これはサイクリン E の過剰発現により解除された。dMLF はショウジョウバエの CSN3 とも結合し、この結合には CSN3 の PCI ドメインが必要充分であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Yoshida A, Yoneda-Kato N, Panattoni M, Pardi R, and Kato J.Y., CSN5/Jab1 controls multiple events in the mammalian cell cycle. *FEBS Lett.* 584, 4545-4552, 2010. (査読有)
- (2) 加藤順也, 加藤規子 シグナロソーム研究の最前線-COP9 シグナロソームとヒト疾患 実験医学 2010年 Vol. 28, No. 3 (2月号) p463-467 (査読無)
- (3) Kato J.Y., and Yoneda-Kato N. Mammalian COP9 signalosome. *Genes to Cells* 14: 1209-25, 2009. (査読有)
- (4) Shiraso S, Katayose Y, Yamamoto K, Mizuma M, Yabuuchi S, Oda A, Rikiyama T, Onogawa T, Yoshida H, Hayashi H, Ohtsuka H, Motoi F, Egawa S, Kato J., Unno M. Overexpression of adenovirus-mediated p27kip1 lacking the Jab1-binding region enhances cytotoxicity and inhibits xenografted human cholangiocarcinoma growth. *Anticancer Res.* 29: 2015-24, 2009. (査読有)
- (5) 加藤順也, 加藤規子 シグナロソーム研究今昔物語,そして未来へ 細胞工学 Vol.28 No. 11, p1166-70, 2009 (査読無)
- (6) Mori M, Yoneda-Kato N, Yoshida A, Kato J.Y. Stable form of Jab1 enhances proliferation and maintenance of hematopoietic progenitors. *J. Biol. Chem.*, 283: 29011-29021, 2008. (査読有)
- (7) Yoneda-Kato, N., Kato, J.Y. Shuttling imbalance of MLF1 results in p53 instability and increases susceptibility to oncogenic transformation. *Mol Cell Biol.* 28: 422-434, 2008. (査読有)
- (8) Ueda, Y., Koya, T., Yoneda-Kato, N., Kato, J. Y. Small mitochondrial ARF (smARF) is located in both the nucleus and cytoplasm, induces cell death, and activates p53 in mouse fibroblasts. *FEBS Lett.* 582: 1459-64, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

ワークショップ主催・発表

・第 32 回日本分子生物学会年会、「シグナロソームを介した動・植物共有基盤原理」オーガナイザー：加藤順也・松井南
2009年12月9日、横浜
発表

(1)Jun-ya Kato, and Noriko Yoneda-Kato
Mammalian COP9 signalosome and control of cell proliferation and maintenance

国際学会主催・発表

・Zomes V, Yokohama RIKEN, Yokohama, Japan, 2008年11月11-14日

Organizing Committee: Jun-ya Kato, Kazuhiro Iwai, Minami Matsui, Keiji Tanaka, Michael Glickman, Ning Wei, Daniel Chamovitz.

(2) Kato, J.Y. Role of CSN5 in mammalian cell proliferation and maintenance.

2008年11月11日

(3) Yoneda-Kato, N. Deregulation of the MLF1/CSN/COP1 pathway in leukemogenesis.

2008年11月14日

・Zomes VI, Safed, Israel

2010年10月4-7日

(4) Kato, J.Y. Regulation of mammalian cell cycle by CSN5.

2010年10月6日

(5) Yoneda-Kato, N. UV response mediated by COP1.

2010年10月7日

[その他]

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/kato/kato.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 順也 (KATO JUNYA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：00273839

(2)研究分担者

加藤 規子 (KATO NORIKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：10252785