

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570186

研究課題名（和文）MLF1-COP1-p53 経路による細胞増殖およびオートファジー制御機構の解明

研究課題名（英文）Analyses of cross talk between cell proliferation and autophagy regulated by the MLF1-CSN-COP1-p53 pathway

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：E3 ユビキチンリガーゼ COP1 の機能解析を中心に、白血病関連 MLF1-CSN-COP1-p53 経路を介した細胞周期抑制およびオートファジーの相互調節機構の存在を検証した。その結果、COP1 は、DNA 損傷シグナル（紫外線照射）によるオートファジー誘導能を著しく阻害し腫瘍形成を促進すること、紫外線照射後にオートファジー促進因子 FIP200 と相互作用することを見いだした。MLF1-CSN-COP1-p53 経路が細胞周期・オートファジー調節機構を制御することで細胞がん化に寄与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed cross talk between cell cycle inhibition and autophagy through a leukemia-associated MLF1-CSN-COP1-p53 pathway, in which the center regulator is the E3 ubiquitin ligase COP1. We found that COP1 markedly inhibits DNA damage-induced (UV irradiation) autophagy leading to tumorigenesis and interacts with FIP200, an autophagy-promoting factor. These data suggest that the MLF1-CSN-COP1-p53 pathway contributes to tumorigenesis by controlling the regulation between cell cycle and autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞増殖、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) がん抑制遺伝子 p53 は固形癌の 50% 以上において、点突然変異や欠失により不活性化されていることが知られているが、一部のがん種、例えば primary 造血器腫瘍では p53 遺伝子変異自体は約 5~15% と頻度が低い。これら野生型 p53 をもつ群においては、高頻度

に p53 の機能的不活性化が観察され、p53 上流の蛋白分解制御機構や転写レベルでの異常が存在することが指摘されてきた。

正常増殖機構では p53 の蛋白質レベルは、ユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解系により厳格に調整され低レベルに維持されている。p53 の E3 ユビキチンリガーゼとしては Mdm2 (Arf-Mdm2-p53 経路) の研究が最も

進んでいるが、その他 COP1・Pirh2・ARF-BP1 が報告されており、なぜこのように多様な p53 標的 E3 リガーゼが必要なのかを含めその制御機構には未解明な点が多い。(2) 我々は、t(3;5)転座型急性骨髄性白血病の原因融合遺伝子産物 NPM-MLF1 の解析から、新たな p53 分解制御経路である MLF1-CSN3-COP1-p53 が存在することを明らかにした(Yoneda-Kato et al, Mol Cell Biol, 2008)。この MLF1-p53 経路各々の因子の相互作用蛋白質群を単離したところ、その多くは DNA 損傷シグナル伝達系および p53 経路を制御することが知られている因子群であった。さらに、COP1 の相互作用蛋白質としてオートファジー制御因子である FIP200 が含まれていた。(3) オートファジーは、栄養飢餓により誘導され、細胞の自己細胞質蛋白質を分解しアミノ酸を産生することにより飢餓に適応するしくみである。近年、オートファジーは細胞死・老化・分化などにも密接に関係し、その制御異常が発がん・変性疾患など多様な病態を惹起することがわかってきている。また、p53 の活性化によりオートファジーが誘導される一方で、p53 の生理的レベルの発現は不用意なオートファジーを抑制するために必要であることが報告されている。しかし、p53 によるオートファジー制御機構、さらにはその異常がどのように細胞がん化を引き起こすのかについては関与する因子群でさえ全く解明されていなかった。我々は、本経路の研究は、DNA 損傷シグナル伝達系とオートファジー制御機構のクロストークの存在、さらにはその異常による発がん機構の解明に資することができると思料するに至った(図1参照)。

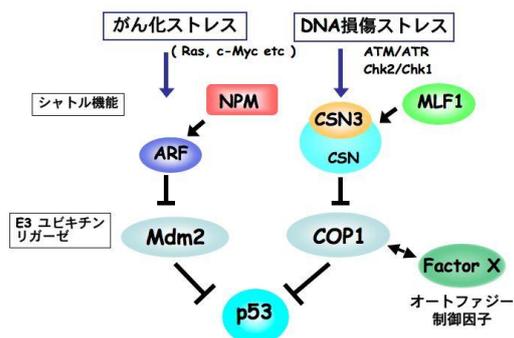


図1. MLF1-COP1-p53経路とArf-Mdm2-p53経路

2. 研究の目的

(1) 白血病関連因子 MLF1 と細胞がん化の関係を研究する過程で、MLF1 が COP9 シグナロソーム(CSN)の第3サブユニット

(CSN3)と結合することにより、CSN 複合体の下流で働く E3 ユビキチンリガーゼ COP1 の活性を抑制し、がん抑制蛋白質 p53 の分解を阻害して細胞増殖を抑制することを見いだした。さらに、この MLF1-CSN3-COP1-p53 経路は DNA 損傷ストレスによる p53 活性化ばかりでなく、栄養飢餓により誘導されるオートファジーにおいても重要な役割を果たす応答経路である知見を得た。

(2) 本研究では、細胞周期抑制およびオートファジーにおける COP1 の機能解析を中心に、MLF1-CSN3-COP1-p53 経路を介した細胞周期抑制およびオートファジーの相互調節機構が存在するのかを検証することを目的とした(図2参照)。

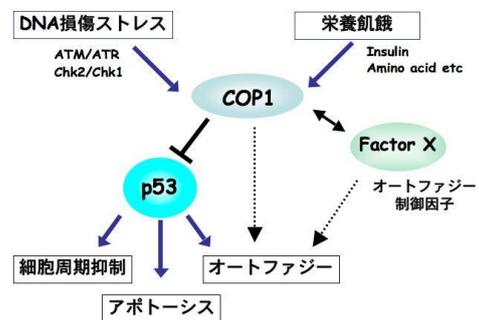


図2. COP1-p53経路は細胞周期・オートファジーを制御する?

3. 研究の方法

(1) DNA 損傷ストレスによるオートファジー誘導の検証: p53 野生型マウス線維芽細胞(NIH3T3 細胞・胎仔線維芽細胞)・ヒト細胞株を用いて、DNA 損傷ストレス(UV 照射)や栄養飢餓ストレス(培地からのアミノ酸除去)を負荷し、細胞周期抑制ならびにオートファジーに与える影響を検定した。

(2) 細胞周期抑制およびオートファジーにおける COP1 の役割の解析: マウス線維芽細胞(NIH3T3 細胞・初代胎仔線維芽細胞)を用いて、COP1 の発現レベルを上昇あるいは減少させた細胞を作製した。この細胞を用いて、各種 DNA 損傷ストレスや栄養飢餓ストレスを負荷することにより、細胞周期抑制やオートファジーに COP1 が果たす役割について解析した。

(3) 細胞周期抑制およびオートファジーにおける COP1 のドメイン解析: COP1 の各ドメインにおける様々な変異体(欠失・点変異)を作製し、マウス線維芽細胞に発現させ上記と同様の実験を行った。細胞周期やオートファジーに対して阻害的あるいは促進的に働く機能ドメインを検索した。

(4) マウスモデルにおける検証：

①MLF1-CSN3-COP1-p53 経路の構成因子のノックアウトマウスを作製および共同研究による供与により確保し、がんを発症するか、また、様々な発がんシグナルに対する感受性の変化を調べた。

②マウス骨髄移植モデルを構築し、造血細胞に与える影響についても検証した。また、上記(3)において、有為に阻害的あるいは促進的作用を持つ COP1 変異体が得られたものについて、マウス骨髄移植モデルにより同様に解析した。

4. 研究成果

(1) DNA 損傷ストレスによるオートファジー誘導の検証：p53 野生型マウス線維芽細胞・ヒト細胞株に DNA 損傷ストレス（紫外線照射）を負荷すると、オートファジー誘導マーカー（LC3-I, p62）のドット状凝集や蛋白質発現減少が観察された。さらに、Atg5 および Beclin1 ノックダウン細胞では紫外線照射によるオートファジー誘導能は著しく阻害され、ヌードマウスへの移植により腫瘍が形成された。これらの知見から、DNA 損傷ストレスは細胞周期抑制ばかりでなくオートファジーを誘導し、その阻害は発がんに関与していることを見いだした。

(2) 細胞周期抑制およびオートファジーにおける COP1 の役割の解析：

① COP1 の解析の過程で、COP1 には細胞内局在の異なるいくつかの COP1 spliced variants が存在し、核内局在を示す spliced variants は野生型に対してオートファジーにおいて抑制的に働くことを見いだした。

②COP1 過剰発現細胞では、紫外線照射によるオートファジー誘導能は著しく阻害され、ヌードマウスへの移植により腫瘍が形成されたことから、COP1 はオートファジーを抑制することにより、細胞増殖を促し発がんに至ると考えた。

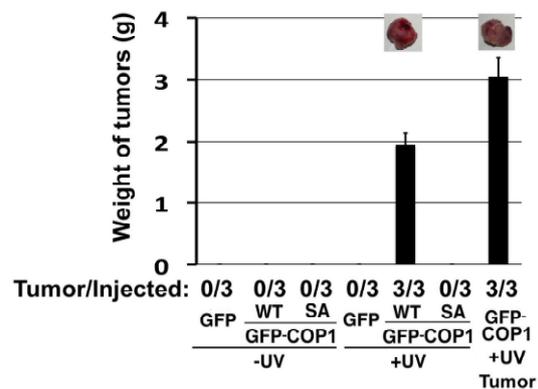
③新規 COP1 特異的相互作用蛋白質の一つとして、オートファジー促進因子 FIP200 (別名 RB1CC1)を同定し、COP1 活性の抑制はオートファジーを促進すること、さらに、COP1 は細胞質内において紫外線照射後に FIP200 と相互作用することを見だし学術誌に報告した(Kobayashi S, et al. BMC Biochem. 2013)。

(3) 細胞周期抑制およびオートファジーにおける COP1 のドメイン解析：E3 ユビキチンリガーゼ活性を欠失した COP1 変異体を過剰発現させた細胞では、上記(2)②の COP1 による腫瘍形成促進能は消失することから、COP1 はオートファジー促進因子を標的として分解促進に導くと予想できた。COP1 は細

胞質内において紫外線照射後に FIP200 と相互作用することを確認した（図参照）。

(4) マウスモデルにおける検証：MLF1 ノックアウトマウスを作製し、COP1 上流の MLF1-CSN3 経路の関与を検討した。MLF1 欠損細胞に COP1 を導入すると、上記の COP1 形質が増強されることから、MLF1-CSN 複合体が COP1 経路に対して抑制的に機能する細胞周期抑制およびオートファジーの相互調節機構の存在が示唆された。

(5) 今後は、本研究期間において得られた成果をもとにマウスモデル（ノックアウトマウス・骨髄移植マウス）を用いて、より生理的条件下で検証していく予定である。



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 5 件)

① Yoshida A, Yoneda-Kato N, Kato JY. CSN5 specifically interacts with CDK2 and controls senescence in a cytoplasmic cyclin E-mediated manner. Sci. Rep. 3: 1054-1064, 2013, 査読有
DOI:10.1038/srep01054.

② Kobayashi S, Yoneda-Kato N, Itahara N, Yoshida A, Kato JY. The COP1 E3-ligase interacts with FIP200, a key regulator of mammalian autophagy. BMC Biochem. 14:1, 2013, 査読有
DOI:10.1186/1471-2091-14-1.

③ Tsujimoto I, Yoshida A, Yoneda-Kato N, Kato JY. Depletion of CSN5 inhibits Ras-mediated tumorigenesis by inducing premature senescence in p53-null cells. FEBS Lett. 586:4326-4331, 2012, 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.10.042.

④ Yoshida A, Yoneda-Kato N, Panattoni M,

Pardi R, Kato JY. CSN5/jab1 controls multiple events in the mammalian cell cycle. FEBS Lett. 584: 4545-4552, 2010, 査読有

DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.039.

⑤ Kato JY, Yoneda-Kato N, New twist in the regulation of cyclin D1. Bio Molecular Concepts. 1:403-409, 2010, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① Kato JY, CSN5 specifically interacts with CDK2 to control senescence, ZOMES-VII, September 20, 2012, Munich, Germany.

② 吉田晃洋, CSN5/jab1 regulates p53-independent cell senescence in association with CDK2, 第 34 回日本分子生物学会, 2011.12.16, 横浜

③ 辻本育子, Searching for a new role of cytoplasmic Chk1 by using an OHT-inducible Chk1-ER translocation system, 第 34 回日本分子生物学会, 2011.12.16, 横浜

④ Kato JY, Regulation of p53-independent cell senescence and suppression of tumorigenesis by CSN5/Jab1, 日本癌学会, 2011.10.3, 名古屋

⑤ 安堵城悟, Identification of interactors regulating molecular functions of cyclin D1, 第 33 回日本分子生物学会, 2010.12.8, 神戸

⑥ 吉田晃洋, Modulation of different modes of the cell cycle by Jab1, 第 33 回日本分子生物学会, 2010.12.8, 神戸

⑦ Yoneda-Kato N, UV response mediated by COPI leads to autophagy, ZOMES-VI, October 7, 2010, Safed, Israel.

⑧ Kato JY, Regulation of mammalian cell cycle by CSN5, ZOMES-VI, October 6, 2010, Safed, Israel.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページアドレス

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

加藤 順也 (KATO JUN-YA)

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