

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657137

研究課題名(和文)哺乳類エンドサイクルの理解とシグナロソームによる制御

研究課題名(英文)Control of mammalian endocycle by the COP9 signalosome

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類COP9シグナロソーム(CSN)の不活性化がエンドサイクルを誘導するという知見をもとに、第5サブユニット(CSN5)を骨髄特異的に条件性ノックアウトできるマウスの作製を試みたが、残念ながら切れ味が悪く、本研究を進めるに十分な結果を得ることは難しいと判断した。そこで、K562細胞株を巨核球に分化させるin vitro誘導系での解析を行い、CSN5は一定だが、他のサブユニットに特異的変化を認めた。その後、関与する変異体によるK562細胞での解析結果を得て、現在、マウスの骨髄のin vitro分化誘導系で再現性を検討している。これらの結果が得られしだい、論文にまとめて発表する予定である。

研究成果の概要(英文)：Based on the preliminary data that inactivation of the COP9 signalosome complex induced endocycle, we tried to establish the mouse model system, in which the CSN5 gene can be knocked out in a bone marrow-specific and inducible manner, but failed to obtain a clear result, concluding that the system did not work as we expected. In stead, we used an in vitro differentiation system, in which K562 cells can be differentiated into megakaryocytes in response to TPA, and found that the level of CSN5 was steady but some other CSN subunit exhibited a specific and marked change. We tested a relevant mutant of the subunit and working an invitro differentiation system using bone marrow cells isolated from conditionally-knocked-out mice. As soon as we obtain an additional results, we are planning to publish the results in a form of the scientific paper.

研究分野：細胞周期

キーワード：COP9 signalosome endocycle

### 1. 研究開始当初の背景

COP9 シグナロソーム (CSN) は 8 つのサブユニット (CSN1-8) からなるタンパク質複合体で、広範囲の生物種で高度に保存される。COP9 シグナロソームは「Cul タンパク質の脱 Nedd8 化」により Cullin-RING 型ユビキチンリガーゼの活性を制御する機能を有し、これによりさまざまな制御因子の発現量や活性を調節する。脱 Nedd8 化活性には第 5 サブユニット (CSN5 または Jab1) が中心的役割を果たす (Genes to Cells 14, 1209, 2009, 細胞工学 28, 1166, 2009, 実験医学 28, 463, 2010)。CSN の機能を明らかにする目的で培養線維芽細胞で条件性ノックアウトを行ったところ、(CSN) の不活性化がエンドサイクルを誘導した (FEBS Lett. 584, 4545, 2010)。

また、ヒト白血病由来細胞 K562 を TPA で処理し巨核球への分化を誘導するとエンドサイクルが誘導されるが、このとき Cul1 と Cul4 の Nedd8 化が上昇した。エンドサイクルとは、M 期 (細胞分裂) を経ずに S 期 (DNA 複製) を繰り返すことで ploidy (DNA 量) を増大させる特殊な細胞周期のことで、ハエや植物で研究が進んでいるが、哺乳類でも、肝臓などの組織再生、胎盤の栄養膜細胞や巨核球細胞の分化誘導で重要であるがその制御や誘導についての研究はあまり進んでいない。

本研究では CSN による哺乳類エンドサイクルの誘導と制御を明らかにする。アプローチとしては、CSN5 の条件性ノックアウトマウスを作製し、骨髄で特異的に CSN5 遺伝子をノックアウトし、巨核球形成に及ぼす影響を調べる事で、生体内 (マウス個体) におけるエンドサイクル誘導の仕組みを解析する。また、in vitro 誘導系として K562 細胞を用い、TPA が巨核球分化を誘導する事に着目し、C キナーゼがどのように CSN の活性を制御するかを調べる。特に、C キナーゼによる CSN の各サブユニットのリン酸化に焦点を当てる。特異的リン酸化部位が同定できればこの部位に変異を導入した CSN サブユニットを持つマウスを作製し、各組織でのエンドサイクルの誘導状態と、その破綻がもたらす疾患について考える。

哺乳類のエンドサイクル制御には、サイクリン E、M 期制御因子 APC/C、Cdk インヒビター p57/p27 が関与する知見が報告されているが、エンドサイクル自体を誘導させる機構についての知見は皆無である。本研究では、CSN の活性調節によるエンドサイクル開始の分子機構を明らかにし、生体内でエンドサイクルを開始させたり阻害したりする系を構築する事を目指す。これにより、従来は困難であった、エンドサイクルの生理学的意義の解釈ができるようになり、どのような組織でどれほどエンドサイクルが行われているのかを知り、哺乳類の個体におけるエンドサイクルの重要性を評価する事ができると考える。

### 2. 研究の目的

我々は哺乳類 COP9 シグナロソーム (CSN) の不活性化によりエンドサイクルが誘導されることを見いだした。エンドサイクルとは、M 期を経ずに DNA 複製が繰り返される特殊細胞周期であり、植物や昆虫でもよく見られ、哺乳類では胎盤や羊膜などの胚外組織に分化する栄養膜 (trophoblast) 細胞や、血液の血小板を産出する巨核球 (megakaryocyte) の発生と機能に必須であるが、その機構については不明な点が多い。本研究では CSN により哺乳類エンドサイクルを開始させる分子機構を研究するとともに、エンドサイクルが関わる組織とその生理学的役割を明らかにする。これにより、体細胞周期からエンドサイクルに移行させる機構を明らかにし、従来不明であった哺乳類個体におけるエンドサイクルの生物学的意義の解明と、その破綻がもたらす疾患について考える。

### 3. 研究の方法

哺乳類エンドサイクルの誘導と制御を明らかにする目的で二つの系を使い分ける。(1) COP9 シグナロソームの酵素活性中心のサブユニット (CSN5) を組織特異的に条件性ノックアウトできるマウスシステムを作製する。まず、骨髄で特異的に CSN5 遺伝子をノックアウトし、巨核球形成に及ぼす影響を調べ、生体内におけるエンドサイクル誘導の仕組みを解析する。さらに、この系を元に、生体内で任意の時と場所でエンドサイクルを起こさせる (または、阻害する) 実験システムへと発展させる。具体的には、COP9 シグナロソームの酵素活性中心のサブユニット (CSN5) を Flox-CRE システムで欠失させるマウスシステムを構築する。CSN5 のノックアウトマウス (CSN5<sup>-/-</sup>: J. Biol. Chem. 279, 43013, 2004) と、Flox 遺伝子座 (CSN5<sup>flox</sup>/flox と floxed/-) と CRE による条件性ノックアウトシステム (FEBS Lett. 584, 4545, 2010) はすでに保有、運用しており結果も発表している。まずは、CRE-ER を用いた誘導性 CRE を骨髄で特異的に発現させるトランスジェニック (BM/CRE-ER Tg) マウスを作製し、CSN5<sup>flox</sup>/- マウスと掛け合わせ、BM/CRE-ER, CSN5<sup>flox</sup>/- マウスを作製する。骨髄で特異的に発現させるベクターには骨髄で特異的に発現する遺伝子のエンハンサーが連結されており骨髄、特に未分化な幹細胞やプロジェニター細胞で発現させる工夫が盛り込まれている。すでに、GFP をマーカーとした予備実験を行い、骨髄の幹細胞とプロジェニター細胞における特異的発現を確認してある。また、CRE-ER のタモキシフェンによる誘導性については、CRE-ER を導入した培養細胞を用いて検定し、適正濃度と作用させる時間、副作用の有無などを検証済みである。

(2) TPA 添加で巨核球分化を誘導する K562 細胞を用い、CSN サブユニットのリン酸化に焦点を当て、C キナーゼがどのように CSN の活性を制御し、エンドサイクル(巨核球分化)を誘導するかを検討する。TPA 処理による C キナーゼ特異的リン酸化部位に変異を導入した CSN サブユニットを発現させた K562 細胞を用い、エンドサイクル誘導前後における細胞サンプルを取得し、これまでエンドサイクルに關与すると報告のある因子(サイクリン E、M 期制御因子 APC/C、Cdk インヒビター p57/p27 など)を含めて、細胞周期、シグナル伝達等に係るさまざまな因子の発現量、活性化状態、細胞内局在などの動態を調べ、エンドサイクル開始前後における分子的变化の実態を把握する。最終的に、エンドサイクル開始因子の候補を絞り込み、エンドサイクル誘導の仕組みを解析する。

得られた結果は、マウスモデルへと発展させる。C キナーゼ特異的リン酸化部位に変異を導入した CSN サブユニットをノックインしたマウスを作製し、各組織でのエンドサイクルの誘導状態と、その破綻を組織特異的に解析する。

上記(1),(2)から、エンドサイクル開始因子の分子実体を提唱し、これをエンドサイクルの分子マーカーとしてマウスの各組織を調べることで、栄養膜細胞や巨核球細胞以外にこれまで知られていなかった組織でのエンドサイクルを探索する。

#### 4. 研究成果

COP9 シグナロソームの第 5 サブユニット(CSN5)を組織特異的に条件性ノックアウトできるマウスシステムの作製を試みた。タモキシフェンにより誘導可能な CRE 組換え酵素遺伝子を、骨髄で特異的に活性化されるエンハンサーとプロモーターに連結した発現ベクターに組み込み、B6 マウスの受精卵に導入し、産児を得た。これを B6 マウスと掛け合わせてトランスジーンが安定にゲノムに取り込まれた系統マウスを 3 種類得た。これらをそれぞれ CSN5 Flox マウスと掛け合わせてその子孫をさらに CSN5 Flox マウスと掛け合わせるにより、CSN5 Flox/Flox CRE-ER マウスを作製した。このマウスにタモキシフェンを腹腔内注射したところ CSN5 の Flox 遺伝子座が減少する結果を得た。さらに、十分数のマウスで同様の実験を行ったが、CSN5 の Flox 遺伝子座の減少は見られるものの、消失することはなかった。また、掛け合せを進めるとタモキシフェンによる反応が鈍くなる傾向にあった。数回の独立した試行の結果、この方法では目的とする現象に矛盾しない結果は得られるが、切れ味が悪く、本研究を進めるに十分な結果を得ることは難しいと判断した。

そこで、モデルシステムとして K562 細胞株を TPA 処理して巨核球に分化させる invitro

誘導系を用いて、COP9 シグナロソームの動態を解析した。その結果、巨核球への分化過程において、CSN5 の発現レベルは一定に保たれているが、他のサブユニットに変化が認められることが判明した。その後、關与する変異体を作製し K562 細胞に導入して解析結果を得た。現在は、より in vivo に近い系でこの結果を確認するために、CSN5 Flox マウスの骨髄に CRE 遺伝子を導入して in vitro 分化誘導系で再現性を検討している。これらの結果が得られしだい、論文にまとめて発表する予定である。

#### 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)

加藤順也, 加藤規子 シグナロソームとシグナル伝達 分子消化器病 11, 183-187 (2014) 査読無

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

Yoshida A, Kato JY, Nakamae I, Yoneda-Kato N. COP1 targets C/EBP for degradation and induces acute myeloid leukemia via Trib1. Blood, 122, 1750-60 (2013). 査読有 doi: 10.1182/blood-2012-12-476101.

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 (2013) 査読有 doi: 10.1038/srep01054

Tsujimoto I, Yoshida A, Yoneda-Kato N, and Kato JY. Depletion of CSN5 inhibits Ras-mediated tumorigenesis by inducing premature senescence in p53-null cells. FEBS Lett. 586, 4326-31 (2012). 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.042.

[学会発表](計 3 件)

Kato, J.Y. CSN5 specifically interacts with CDK2 to control senescence Zomes VIII, November 18-21 (2014), Xiamen, China.

平野 太一、加藤 規子、加藤 順也  
Role of the COP9 signalosome complex in ploidy control and megakaryocytic differentiation.

第 36 回日本分子生物学会年会、12月5日(木) 2013年、神戸市、兵庫県

Kato, J.Y. and Kato, N.  
Roles of CSN5 in mammalian cell  
proliferation.  
ZOMES VII “ Ubiquitin family proteins and  
their cognate PCI complexes ” .  
September 18-21 (2012), Munich, Germany.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (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

### (3) 連携研究者

なし