

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06013

研究課題名(和文) 低造腫瘍性を示すアフリカツメガエルのゲノム情報による原因遺伝子同定とヒトへの応用

研究課題名(英文) Identification of causative genes for low tumorigenicity of *Xenopus laevis* by its genomic information, and its application to humans.

研究代表者

田中 利明 (Tanaka, Toshiaki)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40263446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：当初、第一候補遺伝子と考えた Cdk7 and/or Cyclin H は、解析の結果、低造腫瘍性に直接関与しているとは考えにくいと結論した。一方、*X. laevis* 遺伝子発現量の *in silico* 比較解析により *X. laevis* で特異的な発現様式を示す因子として Cyclin E1 を見出した。Cyclin E1 は、その変異体導入実験により尾芽胚尾部の形態形成を制御していることがわかった。Cyclin E1 は既知の結合パートナー Cdk とは関係ないが、中期胞胚後に epigenetic 制御に関わる因子と結合して制御することにより形態形成(尾部の細胞増殖)に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に Cyclin E タンパク質は、体細胞周期の G1 期に発現して S 期に分解することにより結合パートナー Cdk の活性を制御し、G1/S 移行の制御および細胞増殖制御を担っていることが広く知られている。本研究結果により、Cyclin E タンパク質が Cdk 以外の新たなタンパク質と結合し得ること、Cyclin E タンパク質が epigenetic な制御に関わっていること、および、初期発生過程の形態形成制御に関与していることを新たに発見した。本研究によって細胞周期の G1/S 制御において中心を担う Cyclin E タンパク質に新たな機能を発見したことは、今後の研究に大きな影響を及ぼすと考えられる。

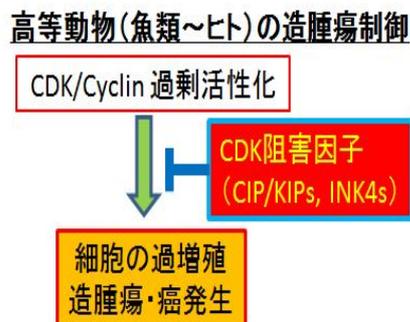
研究成果の概要(英文)：We concluded that Cdk7 and/or Cyclin H, which we initially considered to be the first candidate gene, is unlikely to be directly involved in the low tumorigenicity. However, comparative *in silico* analysis of *X. laevis* gene expression we found Cyclin E1 to control the morphogenesis/cell-proliferation of embryos at tail buds. We found that Cyclin E1 is not related to its known binding partner Cdks, but is involved in morphogenesis/cell proliferation at tail buds by controlling factors involved in epigenetic regulation after midblastula.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス アフリカツメガエル サイクリン 中期胞胚遷移 尾芽胚 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

リン酸化酵素 Cyclin-dependent Kinase (CDK)とその結合因子 Cyclinにより細胞周期が進行することが1980年代後半に解明され(Lohka et al, 1988)、これを機に細胞周期の制御異常が癌につながると認識されると同時に、CDKに直接結合して酵素活性を抑えるCDK阻害因子が癌抑制因子として注目されることになった(右図)。CDK阻害因子として、現在までに全7種類が報告され、構造およびCDK/Cyclinとの結合様式からCIP/KIPとINK4ファミリーの2種類に分類されている(Kato et al, 2001)。CDK阻害因子群は、細胞周期のG1期での停止を普遍的に担うため、動物種を越えて遺伝子保存性は極めて高い。



近年、アフリカツメガエル(*X.laevis*)では、哺乳類に比べて癌の発生率・造腫瘍率の低いことが報告され(Ruben et al, 2007; Hardwick and Philpott, 2015)、その原因が注目された。しかし、*X.laevis*は進化の過程で染色体が倍化し、類似の染色体(同祖染色体)を2本ずつ持つ4倍体動物となったため全ゲノム配列が解読できておらず、*X.laevis*の低い造腫瘍性の遺伝子レベルの解析は困難となっていた。申請者は、*X.laevis*ゲノム国際コンソーシアムへの参加を通して、4倍体動物として初めて*X.laevis*の全ゲノム配列の解読に成功し、進化上、度々生じたゲノム倍化により可能となった遺伝子多様化の原因解明に大きく近づいた。この*X.laevis*全ゲノム配列情報から、遺伝子保存性が極めて高いとされる全7種のCIP/KIPとINK4ファミリー遺伝子の解析に取り組んだ

表1: CIP/KIP, INK4ファミリー遺伝子の種間保存性

CIP/KIP/INK4 families	ゼブラフィッシュ	アフリカツメガエル		グリーンアノール	ヒト
		同祖染色体1	同祖染色体2		
p21CIP1	○	Mut	○	○	○
p27KIP1	○	○	○	○	○
p57KIP2	○	Del	Del	○	○
p27XIC1	-	Mut	Mut	-	-
p16INK4a	○	Del	Del	○	○
p15INK4b	○	○	○	○	○
p18INK4c	○	Mut		○	○
p19INK4d	○	○	○	○	○

田中利明ら Dev. Biol. 426:291, 2017より改変

結果、*X.laevis*に限定して次の多く変異を発見した： p57KIP2とp16INK4a遺伝子が完全に欠失していた(表1, Del表記)、p21CIP1とp18INK4c遺伝子の一方が変異していた(表1, Mut表記)、新しいCIP/KIPファミリー遺伝子p27XIC1が1種類出現し、その塩基配列にも変異が生じていた(表1, 四角囲み部分)。また、CDK阻害因子の変異とは別に、細胞増殖進行に必要で化学量論的に働くCdk7とCyclin H (Cdk7+CyclinH = CAK複合体)の両遺伝子数の割合が、他の動物種の半分になっていることを*in silico*比較解析から発見した。しかし、*X.laevis*の低造腫瘍性の原因遺伝子は特定できていない。

2. 研究の目的

本研究では、(I)上記 ~ の研究成果をもとに、*X.laevis*とヒトを含む他種動物ゲノム

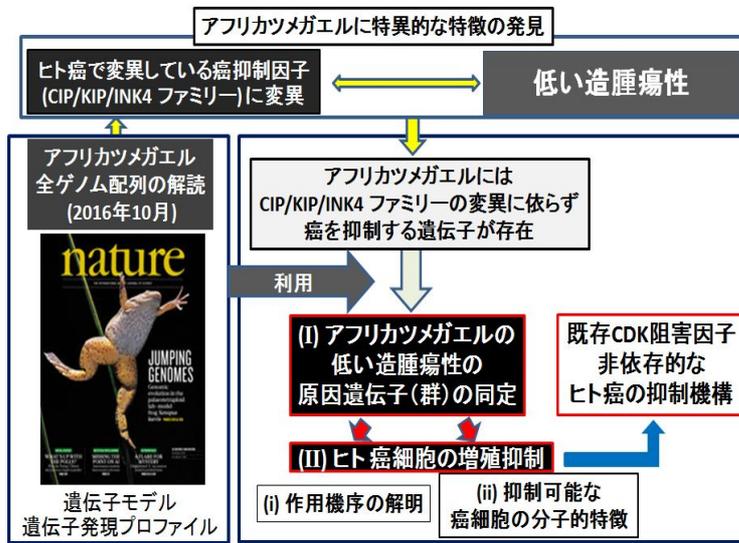


図1 本研究プロジェクト全体図

との遺伝子構造の *in silico* 比較解析、および遺伝子発現量の *in silico* 比較解析を行い、*X.laevis* 特異的な低い造腫瘍性の原因遺伝子を効率的に単離・同定すること、(II) 得られた原因遺伝子を利用して、CDK 阻害因子の変異で発生するヒト癌の増殖を抑制できる新たな癌抑制機構を解明すること、を目的とする(図 1)。申請者は、*X.laevis* の全ゲノム配列の解読に成功し、*X.laevis* の

CDK 阻害因子群に多くの変異を発見した。本実績の発展として、*X.laevis* の低い造腫瘍性を、既存の CDK 阻害因子に依存しない癌抑制機構と結びつけた点が、本課題の独自性である。創造性として、ヒト癌の約半数で変異が見られる CDK 阻害因子とは異なる経路を使って癌を抑圧する新たな分子標的薬の開発に発展することが期待できる。

3. 研究の方法

X.laevis にみられる低造腫瘍性の原因を探るため、以下の項目 および に取り組んだ。*X.laevis* のゲノムの解析から Cdk7とCyclin H (Cdk7+CyclinH =CAK複合体) の両遺伝子数の割合が、*X.laevis* では他の動物種の半分になっていることを見出している。CAK複合体は、他の細胞周期制御因子の上流因子として細胞周期制御に対し化学量論的に働くため、遺伝子数が少ないことは細胞増殖の低下につながり得ることから、Cdk7、Cyclin H、およびCAK複合体が*X.laevis*の低造腫瘍性の原因の最有力候補と考えた。そこで、低造腫瘍性にCdk7、Cyclin H、および CAK複合体の遺伝子割合が少ないことが関与する可能性を検討した。低い造腫瘍性の原因となり得る遺伝子候補を広げるため、*X.laevis*遺伝子発現量の *in silico*比較解析を行った。見出した候補遺伝子について機能解析を進めた。

4. 研究成果

X.laevis 受精卵に対して Cdk7 and/or Cyclin H の mRNA をマイクロインジェクションすることで存在量を増やした際に、*X.laevis* の細胞周期の回転速度が癌細胞のように速くなり得るかどうかが調べ、Cdk7およびCyclin H遺伝子数が半減していることの機能的意義の検討を行った。Mock、Cdk7単独、Cyclin H単独、Cdk7+Cyclin Hコンビネーションの各々のmRNA を調製して受精卵にマイクロインジェクションし、各導入胚の経時的な割球の大きさから分裂速度・タイミングを検討したところ、どの mRNA 導入杯についても割球の大きさに有為な差は認められなかった。このことから、Cdk7とCyclin Hの両遺伝子量の半減は *X.laevis*で特異的に低いものの、*Xenopus* の低造腫瘍性に直接関与しているとは考えにくいと結論した。

*X.laevis*遺伝子発現量の *in silico*比較解析によりCDK 阻害因子以外で造腫瘍に係わり得る遺伝子を探索した結果、*X.laevis*で特異的な発現様式を示す因子としてCyclinE1を見出した。一般的に Cyclin Eは、細胞周期を直接制御し、細胞増殖の調節を行っている因子であるため、Cdk 阻害因子に依存しない*X.laevis*の低造腫瘍性の原因遺伝子として係わる可能性が考えられた。CyclinE1 は *X.laevis* の初期発生過程で多くみられ、また、*X.laevis* 初期発生過程では古くから多くの研究が行われ情報が豊富にあることから、*X.laevis* 初期胚を利用することで CyclinE1 の機能解析に取り組んだ。

Cyclin Eタンパク質は、体細胞周期のG1期に発現してS期に分解することにより結合パートナーCdkの活性を制御し、G1/S期の制御を担っている。一方、CyclinE1タンパク質は、母性因子として*X. laevis* 受精卵に多量に存在し、受精後12回の細胞周期の間は保持されるが、その後、胞胚中期から急激に分解する。その機能は長年に渡り不明であることから、Cyclin E1の変異体を作成し、そのタンパク質を受精卵に導入することで現れる表現型から細胞に対する機能解析を行った。まず、胞胚中期での分解をうけないCyclin E1タンパク質を作成したところ、胞胚中期を含む初期発生過程に異常は認められなかったが、体細胞分裂期である尾芽胚において統計的有為に尾部の異常が生じた。通常の体細胞周期では、Cyclin EはCdkとの結合を通して機能を示すため、次にCdk結合部位を欠損させたCyclin E1を作成したが尾部異常の頻度は減少しなかった。このことから、Cyclin E1は体細胞分裂においても機能しており、その働きには既知の結合パートナーCdkが関与しないことが示された。また、Cyclin E1による初期胚の正常発生には胞胚中期におけるタンパク質分解が重要であることも明らかになった。

次に、Cyclin E1の Cdk 非依存的な働きの原因を知るため新規結合因子を探った。GST-CyclinE1 およびその変異体を受精卵にマイクロインジェクションし、胞胚中期の前後において glutathione ピーズにより回収した。Cyclin E1 結合因子を質量分析で同定した結果、ゲノムの epigenetic 制御に関わる因子 X (論文投稿前につき非公開) を見出した。因子 X の生化学的解析を進めた結果、中期胞胚遷移 (MBT) と共に、CyclinE1 のNLS に結合した Importin a の働きによって Cyclin E1 は核内に移行して 因子 X と結合すること、CyclinE1 との結合によって因子 X の活性が変化すること、中期胞胚遷移後に Cyclin E1 が分解することが正常な尾芽胚の尾部形態形成に必須であることなどを明らかにした。現在、本成果を論文にまとめており、まもなく投稿予定となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Toshiaki Tanaka, Koji Moriya, Makoto Tsunenaga, Takayo Yanagawa, Hiromi Morita, Takashi Minowa, Yoh-ichi Tagawa, Nobutaka Hanagata, Yutaka Inagakid, Toshiyuki Ikoma	4. 巻 5
2. 論文標題 Visualized procollagen Ia1 demonstrates the intracellular processing of propeptides.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koji Moriya, Miho Tamai, Takumi Koga, Toshiaki Tanaka and Yoh-ichi Tagawa.	4. 巻 25
2. 論文標題 Acetaminophen-induced hepatotoxicity of cultured hepatocytes depends on timing of isolation from light-cycle controlled mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 257-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yumeko Satou, Kohei Minami, Erina Hosono, Hajime Okada, Yuuri Yasuoka, Takashi Shibano, Toshiaki Tanaka, Taira Masanori.	4. 巻 145
2. 論文標題 Phosphorylation states change Otx2 activity for cell proliferation and patterning in the <i>Xenopus</i> embryo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 159640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.159640	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kohei Kawaguchi, Akinori Endo, Toshiaki Fukushima, Yuka Madoka, Toshiaki Tanaka, Masayuki Komada.	4. 巻 499
2. 論文標題 Ubiquitin-specific protease 8 deubiquitinates Sec31A and decreases large COPII carriers and collagen IV secretion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 635 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計29件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 守矢恒司、森田浩美、箕輪貴司、花方信孝、田中利明
2. 発表標題 可視化I型プロコラーゲン発現システムによる分泌コラーゲンの定量解析手法の開発
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芝池由樹、守矢恒司、佐野桂、田中利明
2. 発表標題 可視化I型プロコラーゲンを利用した、細胞老化に伴うI型コラーゲン生合成過程の変化の解析
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中利明、守矢恒司
2. 発表標題 可視化I型プロコラーゲンによるコラーゲン生合成過程の可視化と肝星細胞活性化に伴う変化
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Moriya, Toshiaki Tanaka
2. 発表標題 Visualized procollagen Ia1 demonstrates the intracellular processing of propeptides
3. 学会等名 Matrix Biology Europe 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化 I 型プロコラーゲンによる細胞内タンパク質輸送の解析
3. 学会等名 第1回 LiHub バイオマトリックスシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化コラーゲン技術の社会実装
3. 学会等名 GTIE Pre-DEMO Day シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化コラーゲンによる製品機能評価と成分/薬剤スクリーニング
3. 学会等名 第13回化粧品開発アカデミックフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 守矢恒司、田中利明
2. 発表標題 可視化 I 型プロコラーゲンによる分泌コラーゲン定量評価系の開発
3. 学会等名 第2回 LiHub バイオマトリックスシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口亮太、中川泰宏、守矢恒司、田中利明、生駒俊之
2. 発表標題 水酸アパタイトを用いた可視化 型コラーゲン発現MC3T3細胞の骨形成能評価
3. 学会等名 第2回 LiHub バイオマトリックスシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤奈帆子、上麻祐子、蔀泰幸、近藤慎也、守矢恒司、田中利明、桜井哲人
2. 発表標題 Ectoin のコラーゲン分泌促進作用メカニズムの探索
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川泰宏、錦織桜子、守矢恒司、田中利明、生駒俊之
2. 発表標題 Synthesis and characterization of Hydroxyapatite Hollow Nanoparticles for DNA Delivery Vehicles
3. 学会等名 The Twelfth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics STAK12 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中利明、守矢恒司、稲垣豊、生駒俊之
2. 発表標題 可視化I型プロコラーゲンによる細胞内可視化および活性化肝星細胞における変化の検討
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化I型コラーゲンによる分泌評価と成分/薬剤スクリーニング
3. 学会等名 第12回化粧品開発展 アカデミックフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化I型プロコラーゲンのライブイメージングによる細胞内領域の可視化および活性化肝星細胞における変化
3. 学会等名 第72回細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化I型コラーゲンによる生合成と分泌のライブイメージング
3. 学会等名 化粧品開発展 大阪 アカデミックフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守矢恒司、稲垣豊、田中利明
2. 発表標題 I型プロコラーゲンのプロセッシング、輸送および部筆過程の肝星細胞におけるライブイメージング解析
3. 学会等名 第52回 日本結合組織学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川泰宏、守矢恒司、田中利明、生駒俊之
2. 発表標題 核酸医薬の効率的送達を目指した中空水酸アパタイトナノ粒子の作製と評価
3. 学会等名 MRM forum2020 シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守矢恒司、森田浩美、箕輪貴司、花方信孝、田中利明
2. 発表標題 可視化I型プロコラーゲンによるコラーゲンのプロセッシングおよび分泌輸送経路の解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中利明、守矢恒司、柳川享世、稲垣豊、生駒俊之
2. 発表標題 肝星細胞におけるI型コラーゲンの分泌およびプロセッシング過程のライブイメージング解析
3. 学会等名 第26回 肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中利明、常長誠、守矢恒司、柳川隆代、内山太郎、上田修、稲垣豊、生駒俊之
2. 発表標題 可視化I型コラーゲンによるコラーゲン分泌およびプロセッシング過程のライブイメージング解析
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会・第19回日本蛋白質科学会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 Live Imaging によるコラーゲン生合成過程の解析 - 可視化I型コラーゲンによって見えてきたこと -
3. 学会等名 富士フィルム講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化技術による I 型コラーゲン生合成のライブイメージング
3. 学会等名 BioJapan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化I型プロコラーゲンのライブイメージングによる細胞内領域の可視化
3. 学会等名 第3回オルガネラゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守矢恒司、森田浩美、箕輪貴司、花方信孝、田中利明
2. 発表標題 可視化I型コラーゲンをを用いたコラーゲン分泌のハイスループット定量解析法
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 I型コラーゲンのライブイメージング解析-コラーゲンの可視化によって見えてきたこと-
3. 学会等名 ファンケル講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中利明、常長誠、柳川享世、茂呂忠、内山太郎、上田修、田川陽一、稲垣豊、生駒俊之
2. 発表標題 I型コラーゲンの分泌およびプロセッシング過程の線維芽細胞におけるライブイメージング解析
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会 ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守矢恒司、生駒俊之、田中利明
2. 発表標題 ヒト I型コラーゲン 1遺伝子プロモーター制御を受けるライブイメージングシステムを用いた I型コラーゲンの分泌およびプロセッシング過程の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 コラーゲンの可視化によるライブイメージング
3. 学会等名 第5回 LiHub フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中利明
2. 発表標題 可視化I型コラーゲンによる生合成過程のライブイメージング
3. 学会等名 第9回化粧品開発アカデミックフォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 コラーゲンの生合成及び/又は生合成後の過程に関する物質のスクリーニング方法	発明者 田中利明、守矢恒司	権利者 国立大学法人東京工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-163885	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 コラーゲン分泌促進剤	発明者 大石奈帆子、蔀泰幸、田中利明、守矢恒司	権利者 (株)ファンケル、国立大学法人東京工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-187867	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 コラーゲン融合タンパク質、及びそれを用いた薬剤のスクリーニング方法	発明者 田中 利明、生駒 俊之、田中 順三	権利者 国立大学法人東京工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6868232	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

<p>I型コラーゲン生合成過程の可視化に成功 教科書に修正を迫る成果 https://www.titech.ac.jp/news/2022/063742 I型コラーゲン生合成過程の可視化に成功 https://educ.titech.ac.jp/bio/news/2022_04/062298.html 資生堂、東京工業大学との共同研究で コラーゲン産生の高解像度ライブ撮影に成功 https://corp.shiseido.com/jp/news/detail.html?n=00000000003378 東京工業大学 生命理工学院 田中(利)グループ http://www.ttanaka.bio.titech.ac.jp/ 可視化コラーゲン https://www.ori.titech.ac.jp/asset/img/sangaku/ip/patent/14T162PJ.pdf 細胞のコラーゲン分泌機構の一部を解明-小胞体からの輸送に関わる脱コピキチン化酵素がカギ- https://www.titech.ac.jp/news/2018/041646.html Enzyme for control formation of collagen carriers. https://www.titech.ac.jp/english/news/2018/041705.html</p>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------