

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21年3月31日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2007-2008
課題番号：19370052
研究課題名 (和文) 細胞死シグナルと増殖・分化シグナル相互作用の解析
研究課題名 (英文) Analysis of interaction between cell death-, cell growth- and differentiation-inducing signals
研究代表者
米原 伸 (YONEHARA SHIN)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：00124503

研究成果の概要：

FLASH/casp8ap2 の解析を行い、FLASH の発現抑制によって、細胞周期の S 期進行が停止し、FLASH は ARS2 (arsenite resisitant protein 2) という分子と会合し、ARS2 の発現抑制によっても、細胞周期の S 期進行が阻害されることを示した。さらに、FLASH の細胞周期進行活性は、ARS2 との会合によって媒介されていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：アポトーシス、細胞周期、シグナル伝達、遺伝子、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

Death receptor である Fas の下流で caspase-8 の活性化を制御する分子として我々が発見・クローニングした巨大分子 FLASH (Imai, Y. et al., Nature 398:777-85, 1999) の解析を進めていくことがこれまで困難であった。そこで、新たに開発した shRNA 発現誘導系を用いた解析を実施したところ、FLASH の発現を抑制すると、細胞増殖は S 期で停止し、細胞が巨大化することが明らかとなった。一方、FLASH がいくつかの転写因子の活性増強に関わること、FLASH の発現レベルが急性白血病の予後を決定する因子であることが報告されてきた。また、FLASH が S 期進行とヒストンの転写に必要であり、核の Cajal body に局在するという報告がなされた。我々が見いだした FLASH という分子が、アポトーシスと細胞増殖の両方に強い生物活性を持つことを示し、これらの分子機構と生理機能を明らかにすることによって、独自性の高い新しい生物学的知見を報告できると期待される。

2. 研究の目的

FLASH が細胞増殖の S 期進行に必須の分子であることを見いだしたので、その S 期進行に関わる分子機構と生理機能を明らかにする。具体的には、FLASH の多様な活性に関わる細胞内局在の変化、FLASH が会合する分子の変化を、FLASH の各種変異分子やノックダウンしたときに表現系が異なる細胞等を用いた解析で明らかにする。また、FLASH の conditional ノックアウトマウスを作製・解析することによって、その生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

テトラサイクリン誘導性 (Tet) リプレッサーを利用した shRNA 発現誘導を、レンチウイルスベクターを用いて行う新しいシステム (図 1) によって、FLASH 特異的 shRNA の発現誘導系を構築する。そして、FLASH の発現抑制を誘導できる細胞株に、EGFP で標識したマウス FLASH をレンチウイルスベクターによって導入し、FLASH ノックダウンによる表現系 (細胞増殖の停止) がレスキューされるか確認する。

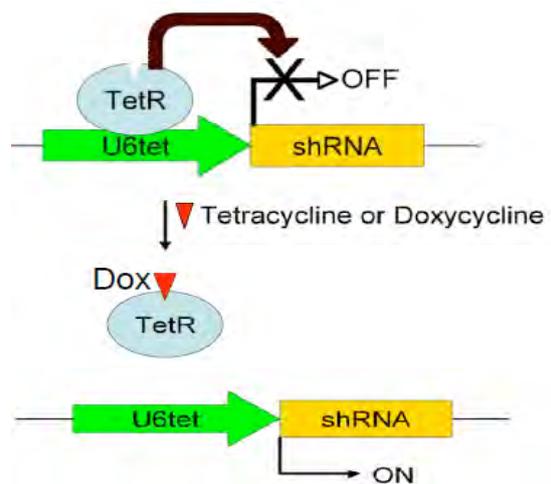


図 1 shRNA の発現誘導システム

また、FLASH と会合する候補分子を、酵母を用いた two-hybrid システム解析および FLASH と共免疫沈降する分子の質量分析 (LC-MS/MS) 解析で同定する。

さらに、FLASH コンディショナルノックアウトマウスの作製のためのコンストラクトを作製し、ES 細胞に導入して変異マウスを作製し、解析する。

4. 研究成果

Tet リプレッサーとレンチウイルスベクターのシステムを用いて FLASH 特異的 shRNA の発現誘導系を用いて、FLASH の発現を 5% 以下にまでノックダウンを誘導できるヒト KB 細胞およびヒト U2OS 細胞由来株を作製した。これらの細胞株において FLASH の発現抑制を誘導すると、細胞増殖の停止が認められた (図 2)。そして、この細胞増殖を停止した細胞を解析した結果、細胞周期の S 期進行がされること、S 期進行が阻害されるにもかかわらず弱い DNA 合成は実行され続けていることを明らかにした (図 2)。

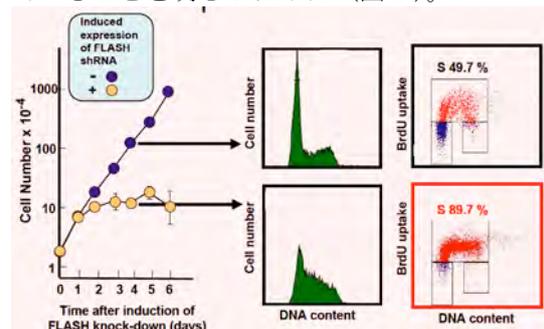


図 2 FLASH の発現抑制によって細胞周期 S 期進行が停止する

上記 KB 細胞株に EGFP で標識したマウス FLASH をレンチウイルスベクターによって導入し、FLASH ノックダウンによる細胞周期進行の S 期での停止という表現系がレスキューされることを確認した (図 3)。さらに、各種欠失変異体 FLASH を発現させることにより、FLASH の S 期進行を保障する活性に必要なドメインを同定する試みを行った (図 3)。その結果、C 末端欠失変異体は S 期進行をレスキューできるが、N 末端欠失変異体は S 期進行をレスキューできないことが明らかとなった。FLASH の細胞周期 S 期進行を保障する活性には、C 末端領域は必要なく、N 末端領域の必要であることを明らかにした。

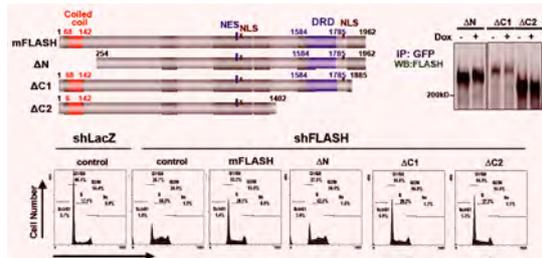


図 3 FLASH の欠失変異体の発現による内在性 FLASH 発現抑制誘導株への影響解析

我々が FLASH の発現誘導抑制で細胞周期の S 期進行が停止することを見いだした時期に、同じ現象を報告する論文が公表され、FLASH はその C 末端領域で NPAT という histone の転写に関わるとされる分子と会合し、核内で histone 等の転写等に関与しているという Cajal body に存在して機能しているという報告された (Barcaroli, D. et al., PNAS 103:14808-12, and 14802-7, 2006)。図 3 に示した我々の結果では、FLASH の C 末端領域 (NPAT 会合領域) は細胞周期の進行には必要ないということなので、FLASH と NPAT との会合は細胞周期の S 期進行には関わらないという結論となった。また、細胞周期進行に必要な N 末端領域には coiled-coil ドメインが存在し、この領域を介して FLASH は自己会合することも明らかにした。FLASH の自己会合は、その細胞周期 S 期進行を担う活性に必要な不可欠であると示唆された。

次に、NPAT 以外の FLASH と会合する候補分子の同定を、上記 C 末端欠失変異体 FLASH と共免疫沈降する分子として LC-MS/MS 解析により試みた。その結果、arsenite resistance protein 2 (ARS2) というタンパク質が同定された。ARS2 とはヒ素の毒性に耐性を示す変異体の原因遺伝子として同定されていた分子である (Rossman, T. G., and Z. Wang. Carcinogenesis 20:311-6. 1999) が、その後ほとんど解析は行われていない分子

である。そこで、ARS2 の発現抑制を誘導する解析を行ったところ、FLASH の発現抑制と同様な細胞周期の S 期進行が阻害されるという結果が得られた (図 4)。

また、FLASH と ARS2 との会合も、共免疫沈降実験で確認をした (図 5)。

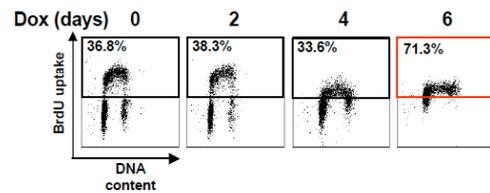
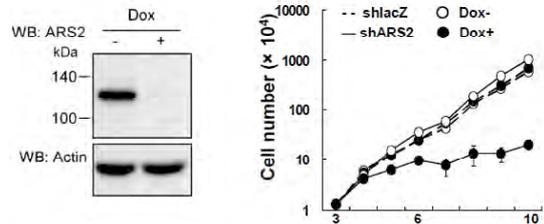


図 4 ARS2 の発現抑制誘導によってヒト KB 細胞は細胞周期の S 期進行が停止する

Expression of Flag-ARS2 in ARS2 knock-down cells

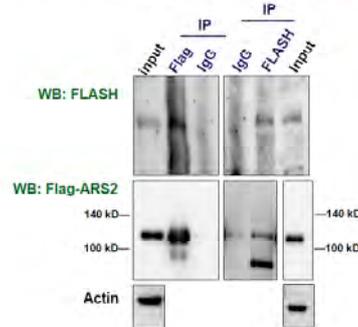


図 5 ARS2 発現抑制細胞に発現させた外来性 ARS2 は内在性 FLASH と会合している

さらに、FLASH と ARS2 の会合領域に関して欠失変異体を用いて解析したところ、ARS2 は C 末端側の ARS 領域 (広い生物種にわたって保存されている構造) で、FLASH は中央部分の領域で会合することが明らかとなった。さらに FLASH における解剖領域を狭めていったところ、生物種を超えて FLASH に保存されている 13 アミノ酸残基が同定された。この短いペプチドの配列を、FARB (FLASH-ARS2-binding) 配列と命名した (図 6)。

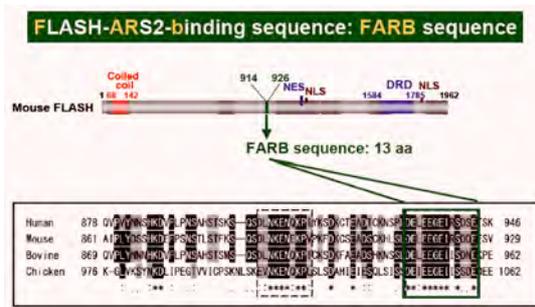


図6 FLASHとARS2の会合をになう13アミノ酸配列からなるFLASHのFARB配列

またΔFARB-FLASHはARS2と会合できないばかりか、FLASHノックダウン細胞の細胞周期S期停滞という表現系を相補できなかった。さらにFARBにGFPと核移行シグナルを連結した合成遺伝子を細胞に強制発現させたところ、細胞周期の進行が停止するという現象が観察された。これらの結果は、FLASHとARS2との会合が細胞周期のS期進行に必要不可欠であることを示している。

FLASHが細胞周期のS期進行に果たしている役割と、S期進行に関わる可能性のある様々な活性について、FLASH分子上でこれらの活性や役割を担っている領域を図7にまとめた。

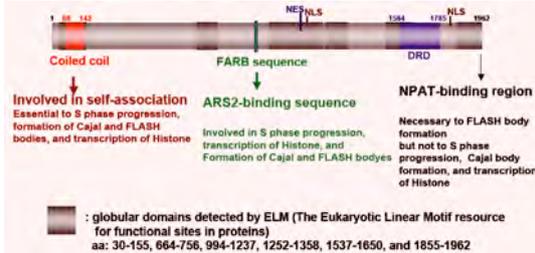


図7 FLASHのドメイン構造とその生理機能

我々が解析に用いた細胞は、ヒト鼻咽頭癌由来KB細胞（カルシノーマ）とヒト骨肉腫由来U2OS細胞（ザルコーマ）であり、がん化した細胞はFLASHとARS2の会合によって細胞周期のS期進行が保障されていると考えられる。一方、ヒト正常細胞である二倍体繊維芽細胞ではFLASHをノックダウンしても細胞周期の停止は認められない。また、マウスES細胞においてFLASH遺伝子をノックアウトしたが、これによってES細胞の増殖は変化しなかった。これらの結果は、FLASHとARS2の会合はがん細胞では細胞周期S期進行に必要不可欠であるが、正常細胞では細胞周期の進行に関わらないことを示唆しており、この会合を制御することによりがん細胞の細胞増殖を特異的に阻害できる可能性がある。

このように、FLASHとARS2の発現および

会合が異常な増殖能を持つ細胞のS期進行に必須であるという全く新しい細胞周期S期進行の制御機構の存在を見いだした。これまで知られてきた細胞周期進行機構（例えばcyclinやCDKに依存した機構）に対する阻害剤の多くは、異常細胞への特異性が低だけでなく、薬剤除去後に細胞増殖が復活するという致命的問題が存在している。一方、FLASHの発現抑制で細胞増殖を停止させた後に、FLASHの発現を回復させると細胞増殖回復後に細胞死が誘導されることを見いだしている。これらの結果は、異常増殖細胞の除去を目的とする癌分子標的治療薬の開発には最適であると考えられる。

これらの結果を基に、我々は「細胞増殖抑制剤及びそのスクリーニング方法細胞増殖抑制剤及びそのスクリーニング方法」という発明の名称の特許を申請した。

今後は、ARS2とFLASHの会合が細胞周期のS期進行を支持する分子機構を解明するとともに、その会合様式を構造含めて解析し、その会合を制御することによってがん治療薬の開発に結びつけていくことが期待される。

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. Kobayashi Y, and Yonehara S. Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids. *Cell Death Differ*, 16; 139-150, 2009.
2. Shimaoka T, Seino K, Kume N, Minami M, Nishime C, Suematsu M, Kita T, Taniguchi M, Matsushima K, and Yonehara S. Critical Role for CXC Chemokine Ligand 16 (SR-PSOX) in Th1 response mediated by NKT cells. *J Immunol*, 179: 8191-8199, 2007.
3. Sakata S, Yan Y, Satou Y, Momoi A, Ngo-Hazelett P, Nozaki M, Furutani-Seiki M, Postlethwait JH, Yonehara S, Sakamaki K. Conserved function of caspase-8 in apoptosis during bony fish evolution. *Gene*. 396: 134-148, 2007.
4. Moriyama H, and Yonehara S. Rapid up-regulation of c-FLIP expression by BCR signaling through the PI3K/Akt pathway inhibits simultaneously induced Fas-mediated apoptosis in murine B lymphocytes. *Immunol Lett*, 109: 36-46, 2007.
5. Kuninaka S, Iida SI, Hara T, Nomura M, Naoe H, Morisaki T, Nitta M, Arima Y, Mimori

T, Yonehara S, Saya H. Serine protease Omi/HtrA2 targets WARTS kinase to control cell proliferation. *Oncogene*, 26: 2395-2406, 2007.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Shin Yonehara. “A novel type of caspase-independent cell death in tetraploids with chromosome aberrations” International Symposium 7: Cell death and autophagy, The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kyoto, December 1-3, 2008.
2. Shin Yonehara. “Novel types of cell death identified in 1989 and 2008” Argenes Sponsored Symposium: Apoptotic Therapy in RA, MEDICAL-EXPO 2008 in APLAR's World: The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 23-26, 2008.
3. Shin Yonehara. “Novel caspase-independent cell death by downregulation of eEF1A1/EF-1 α expression in tetraploids with chromosomal aberrations” The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Seoul, Korea, July 20-23, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞増殖抑制剤及びそのスクリーニング法

発明者：京都大学大学院生命科学研究科
教授 米原 伸 他 3 名

権利者：同上

種類：特許出願（国内）

番号：特願 2009-052628

出願年月日：2009 年 3 月 5 日

国内外の別：国内出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米原 伸 (YONEHARA SHIN)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00124503