

## 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 3月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370052

研究課題名（和文）FLASHの有する多面的生物活性の分子機構と生理機能の解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism and physiological role of FLASH with pleiotropic activities

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（和文）：FLASHはヒストン mRNA の成熟や細胞周期 S 期進行に必須の分子である。本研究では、FLASH が histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1) や corepressor of REST 1 (CoREST1) と直接結合して CoREST 複合体の構成因子となり、エピジェネティックな転写調節に関わることを示した。また、正常二倍体細胞や ES 細胞では FLASH は S 期進行に必須ではなく、FLASH ノックアウト ES 細胞から神経や心筋、内胚葉やトロホブラストへの分化は正常であった。FLASH はがん細胞特異的に細胞周期進行に必須である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：FLASH has been shown to be required for replication-dependent histone transcription and S phase progression. We showed that FLASH is involved in transcriptional regulation through modulating histone methylation by directly interacting to histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and corepressor of REST 1 (CoREST1) in the CoREST1 complex. We also showed that induced knockout of FLASH does not affect proliferation of diploid fibroblasts and ES cells, and FLASH was shown to be dispensable for ES cells to differentiate into mesoderm, endoderm, and trophoblast. FLASH might be required for cell-cycle progression specifically in transformed cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

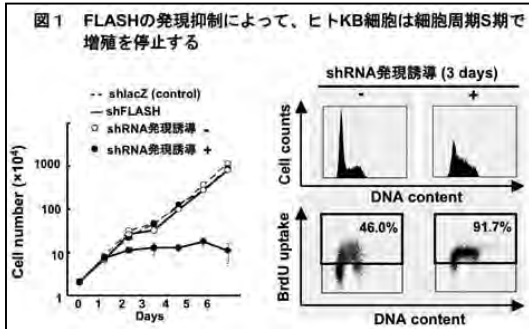
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞周期、転写、細胞分化、ES 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我々が発見・クローニングした巨大分子 FLASH (*Nature* 398: 777-85, 1999) は、細胞周期 S 期進行に必須であること、FLASH はその C 末端部位で NPAT という分子と会合することが報告された (*PNAS*, 103: 14802-7 & 14808-12, 2006)。我々も、FLASH に対する shRNA を薬剤誘導的に発現誘導する系を構築し、FLASH の発現抑制を誘導すると、がん細胞株で細胞周期 S 期の進行が停滞することを見いだした (*Mol Cell Biol*, 29: 4729-41, 2009) (図 1)。



しかし、細胞周期 S 期進行には NPAT との会合を担う C 末端領域は必要ではなく、中央部分の FARB 配列と命名した領域で Ars2 というヒ素耐性を付与する分子と会合することが必要であることを我々は報告した (*Mol Cell Biol*, 29: 4729-41, 2009)。Ars2 も細胞周期進行に必要であると報告されており、興味深いと考えた。また FLASH は、その C 末端部位で NPAT と会合すると報告されたが、細胞周期 S 期進行には N 末端の coiled-coil 領域が重要であり、この領域でヒストン mRNA のプロセッシングを実行する複合体と会合することが新たに報告された (*Mol Cell*, 36: 267-78, 2009)。

さらに、FLASH は転写調節因子である histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1) や corepressor of REST 1 (CoREST1) と会合することを、共免疫沈降法と質量分析で我々は見いだしていた。このように、FLASH は様々なタンパク質と会合することが示されているが、各々の会合と FLASH の機能を明確に説明できていなかった。

FLASH の発現抑制で細胞周期 S 期進行が停止するが、このような現象がどのような種類の細胞で認められるのか、体系的な解析はなされていなかった。また、FLASH のノックアウトマウスが作製され、胎生初期にマウスは死亡することが報告された (*Oncogene*, 31: 573-82, 2012) が、この表現型と細胞周期 S 期進行との関係については明らかにならなかった。

## 2. 研究の目的

アポトーシス関連分子として我々が同定した FLASH は細胞周期 S 期進行に必須であり、この活性には Ars2 というヒ素耐性を付与する分子と会合が必要であること、また FLASH が転写抑制 CoREST 複合体の構成因子 LSD1 (ヒストン脱メチル化酵素)、CoREST や HDAC-1 と複合体を形成していることを見いだしている。本研究では、FLASH の多彩かつ複合的な機能、すなわち Ars2 と会合して細胞周期 S 期進行を保障する機能、および CoREST 複合体と会合して転写を調節する機能、そして細胞死を調節する機能に関して、その分子機構と生理機能の解明を目的とする。また、正常細胞とがん細胞、また ES 細胞と ES 細胞から分化を誘導した細胞などで FLASH の発現抑制を実行し、FLASH がどのような細胞において細胞周期の進行に関与するのかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

FLASH と Ars2 との会合が細胞周期 S 期進行支持に果たす分子機構と FLASH と CoREST 複合体による転写制御機構を明らかにするため、FLASH, Ars2 や CoREST 複合体形成分子各々の発現抑制誘導細胞株、それらに外来性の各種変異分子を発現させた細胞株を作製し、それらの細胞周期 S 期進行に関する性質、転写制御機構を詳細に解析する。

また、FLASH のコンディショナルノックアウトマウスと ES 細胞を作製し、その表現系と細胞分化の様式を詳細に解析し、発生や分化における機能を中心に FLASH の生理機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

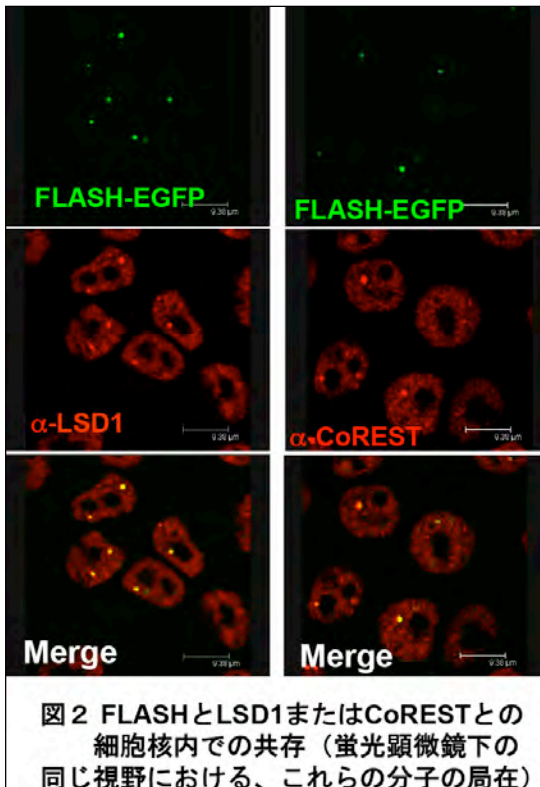
### (1) FLASH と Ars2 との会合

FLASH と Ars2 はともに細胞周期の進行に必要であることが示されていた。また、細胞周期 S 期進行に関する可能性のある多様な生物活性 (ヒストンの転写、Cajal 小体の形成や miRNA の合成) を FLASH と Ars2 が有すると考えられたので、これらの活性が各分子の独立した活性なのか、両分子の会合に依存する活性なのかを shRNA の発現誘導による効果等について詳細に解析した。その結果、FLASH と Ars2 が細胞周期進行に関わる分子機構は異なっていることが判明した。しかし、FLASH の FARB 配列を介する FLASH と Ars2 の会合が細胞周期 S 期進行を支持することも事実であり、その分子機構を解析した結果、FARB を介

して Ars2 が FLASH に会合することによって FLASH タンパク質の安定性に寄与していることが明らかとなった。Ars2 の新しい機能として、FLASH タンパク質の安定性をもたらすことが示された。

## (2) FLASH と LSD1、CoREST との会合

FLASH と会合すると質量分析法で見いだしている LSD1 と CoREST について、FLASH と直接会合するか否かを共免疫沈降法等で解析した。その結果、FLASH は LSD1 と CoREST の両分子と直接会合し、LSD1 と CoREST も直接会合することが明らかとなった。FLASH, LSD1, CoREST の三分子は互いに直接会合し、他の分子と共に CoREST 複合体を形成することを明らかにした。この点を更に確実にするため、EGFP 標識 FLASH を FLASH ノックダウン細胞に発現させ、LSD1 や CoREST と細胞内で共存するかを解析した (図 2)。LSD1 と CoREST は、既に報告されているように核内で構造体 (CoREST 複合体) を形成しているが、その多くに FLASH も存在することが明らかとなった。



FLASH と CoREST 複合体 (転写を抑制すべくヒストンの脱メチル化を実行する) が会合することを示したので、FLASH が細胞周期 S 期進行に関与するだけでなく、転写を調節するヒストンのメチル化状態に影響を与えるかを解析した。FLASH を 293 細胞に強制発現させ、細胞核全体でヒストンのメチル化状態を蛍光抗体染色で解析したところ、H3K4 のジメチル化には影響がなかつ

たが、H3K9 のジメチル化が劇的に増強した。このことは、FLASH が LSD1 を含む CoREST 複合体と会合することにより、LSD1 によるヒストン H3K9 のジメチルに対する脱メチル化反応を阻害していることを示唆しており、FLASH がエピジェネティックな転写調節にも関わる可能性が示された。

## (3) FLASH の N 末端 coiled-coil 領域の解析

FLASH の N 末端領域に存在する coiled-coil 領域が細胞周期 S 期進行に必要な不可欠なものと、この領域が自己会合領域であることを我々は見いだしていた (*Mol Cell Biol*, 29: 4729-41, 2009)。一方、この領域がヒストン mRNA のプロセッシングを担う複合体との会合領域であることも報告された (*Mol Cell*, 36: 267-78, 2009)。そこで、この coiled-coil 領域を EGFP および核移行シグナルと融合させた分子を作製し、これを細胞に強制発現させたときの効果を解析した。その結果、この分子の強制発現で FLASH 発現のノックダウンと同じ細胞周期 S 期進行の阻害効果が認められた。この分子は、ドミナントネガティブな活性を有すると示唆された。そこで、この分子中の coiled-coil 領域中のアミノ酸残基をプロリン残基に変換する変異体を作製し、その効果を解析した。その結果、coiled-coil の構造が破壊された変異体では、ドミナントネガティブな活性と自己会合活性の両方が消失していた。FLASH の自己会合活性も細胞周期 S 期進行に必要な可能性が考えられた。

## (4) ヒト二倍体線維芽細胞とマウス ES 細胞における FLASH の機能解析

FLASH が正常細胞でも細胞周期 S 期進行に必要なのかを確認するため、ヒト正常二倍体線維芽細胞株 FS-7 において shRNA の発現誘導による発現抑制誘導を実行した。細胞周期の S 期進行は停滞せず、細胞は正常に増殖し続けることが明らかとなった。このような発現抑制の解析系では、十分に発現が抑制できていなかった可能性を排除できない。そこで、上記 FLASH の N 末端領域の強制発現を実行し、そのドミナントネガティブ活性が認められるかを解析した。この系でも、正常二倍体線維芽細胞株では、FLASH が細胞周期 S 期進行に必要なとは示すことができなかった。

この点をより確実にするため、マウス ES 細胞を用いて FLASH のノックアウトを誘導する系を構築した。Cre-lox システムを用い、Cre の活性を 4-OHT 処理で誘導できる MerCreMer 分子を用いて誘導的ノックアウト

を実行した。

その結果、FLASH がマウス ES 細胞では、細胞増殖の維持に必須ではないという新しい知見が得られた (図 3)。興味深いことに、FLASH ノックアウト ES 細胞では、ヒストン mRNA 量の減少はがん細胞株と同じように認められるが、細胞周期 S 期進行阻害は認められないという結果が得られた。FLASH が細胞周期 S 期進行に必要なのは、transform したがん細胞特異的である可能性が示唆された。

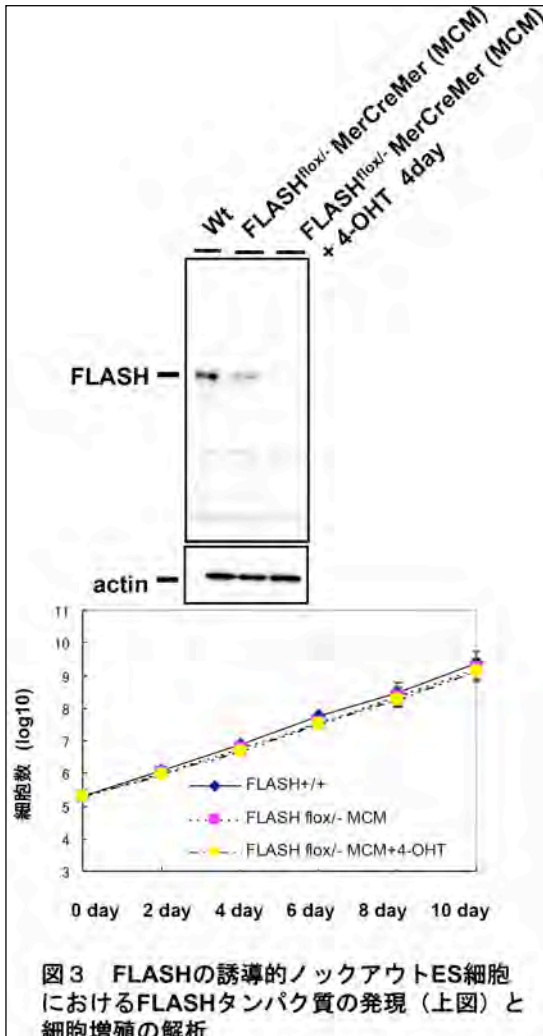


図3 FLASHの誘導的ノックアウトES細胞におけるFLASHタンパク質の発現(上図)と細胞増殖の解析

(5) 発生と分化における FLASH の機能解析

FLASH のノックアウトマウスが作製され、胎生初期にマウスは死亡することが報告された (*Oncogene*. 31: 573-82, 2012)。しかし、FLASH のノックアウト ES 細胞は正常に増殖できた。そこで、FLASH ノックアウト ES 細胞における細胞分化能を解析した。FLASH ノックアウト ES 細胞株は、正常 ES 細胞株と同じように、神経や心筋、内胚葉やトロホプラストへの分化を誘導できた。また、FLASH ノックアウト ES 細胞由来の神経細胞や心筋細胞は、正常 ES 細胞から分化した細胞と顕微

鏡下の観察では全く区別ができなかった。FLASH は ES 細胞からの分化にも必要ではないことが示唆された。

このような結果は、FLASH ノックアウトマウスが胎生初期に死亡する現象を説明できないばかりか、矛盾さえ存在すると考えられる。そこで、FLASH ノックアウト胚を *in vitro* で培養して初期発生を誘導し、FLASH の初期発生における機能を解析した (図 4)。

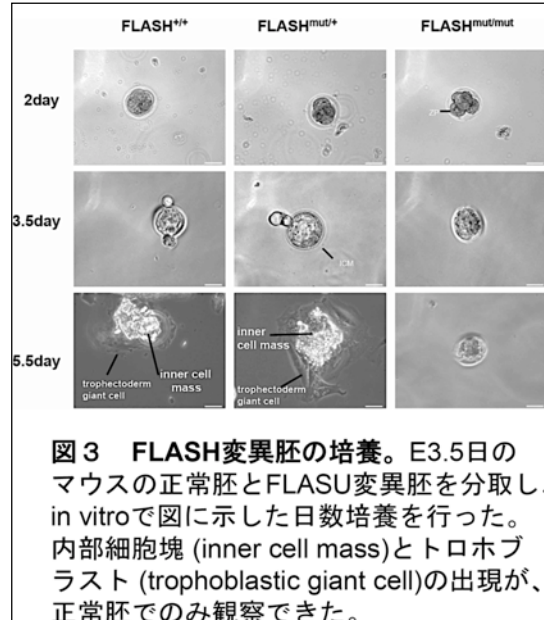


図3 FLASH変異胚の培養。E3.5日のマウスの正常胚とFLASH変異胚を分取し、*in vitro*で図に示した日数培養を行った。内部細胞塊 (inner cell mass) とトロホプラスト (trophoblastic giant cell) の出現が、正常胚でのみ観察できた。

これらの結果から、FLASH は ES 細胞からの細胞分化には必要ではないが、正常胚の初期分化には必要であると考えられた。

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. Takahashi S, Futatsugi-Yumikura S, Fukuoka A, Yoshimoto T, Nakanishi K, and Yonehara S. 2013. Fas deficiency in mice with the Balb/c background induces blepharitis with allergic inflammation and hyper-IgE production in conjunction with severe autoimmune disease. *Int Immunol*, 25, 287-293. 【査読有】
2. Uchiyama R, Yonehara S, and Tsutsui H. 2013. Fas-mediated inflammatory response in *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 190, 4245-4254. 【査読有】
3. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, and

Chiba T. 2013. Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet, 45, 98-103. 【査読有】

4. Kikuchi M, Kuroki S, Kayama M, Sakaguchi S, Lee KK and Yonehara S. 2012. Protease activity of procaspase-8 is essential for cell survival by inhibiting both apoptotic and nonapoptotic cell death dependent on receptor interacting protein kinase 1 (RIP1) and RIP3. J Biol Chem, 287, 41165-41173. 【査読有】
5. Lee KK and Yonehara S. 2012. Identification of a mechanism that couples multisite phosphorylation of Yes-Associated Protein (YAP) with transcriptional coactivation and regulation of apoptosis. J Biol Chem, 287, 9568-9578. 【査読有】
6. Gao Y, Kazama H and Yonehara S. 2012. Bim regulates B-cell receptor-mediated apoptosis in the presence of CD40 signaling in CD40-pre-activated splenic B cells differentiating into plasma cells. Int Immunol, 24, 283-292.2007. 【査読有】
7. Uza N, Nakase H, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Shimaoka T, Kume N, Minami M, Yonehara S, Ikeuchi H, and Chiba T. 2011. SR-PSOX/CXCL16 plays a critical role in the progression of colonic inflammation. Gut, 60: 1494-1505. 【査読有】
8. Nakatsumi H, and Yonehara S. 2010. Identification of functional regions defining different activity between caspase-3 and caspase-7 within cells. J Biol Chem, 285, 25418-25425. 【査読有】

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Yonehara S. Allergic blepharitis is developed in Balb/c Fas knockout mice with associated Hyper-production of IgE. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Carcinogenic Spiral “Infection, Immunity and Cancer” January 16, 2012. Kyoto.
2. Yonehara S. Double-faced functions of caspase-8 in induction and protection of programmed cell death. The 10th NTU-Japan International Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. January 8, 2012. Taipei, Taiwan.
3. Yonehara S. Apoptosis and Disorders: Allergic Blepharitis Associated with Hyper-Production of IgE in Balb/c Fas Knockout Mouse. Bio-Rheumatology International Congress (BRIC2011) Plenary Session –Immunology–. January 14-15, 2011.Urayasu, Chiba.
4. 米原 伸. 新しいタイプのプログラム細胞死. 第 84 回 日本生化学会 シンポジウム：多様な生物における細胞死と細胞死関

連分子の多彩な機能. 2011 年 9 月 21 日. 京都

5. 米原 伸. 新しいタイプのプログラムされた細胞死. 第 20 回 Cell Death 学会学術集会 シンポジウム. 2011 年 7 月 21 日. 東京.
6. Yonehara S. がん研究入門コース. 多様な細胞死とがんとの関わり/Cell Death and Cancer. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 23 日. 大阪.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

## 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