

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657139

研究課題名(和文) Notchシグナルの細胞周期依存的制御の解明

研究課題名(英文) The study of cell-cycle dependent degradation of the Notch intracellular domain

研究代表者

佐方 功幸 (Sagata, Noriyuki)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80142024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の増殖と分化はバランス良く適切に調節されなければならない。本研究においては、細胞増殖と分化を調整しているNotchの分解機構を研究した。Notchシグナルは、Notchの細胞質側領域(NICD)が転写因子として働くことで伝達される。我々は、NICDが細胞分裂の後に分解されることを見出し、その分解機構の解析を行った。その結果、NICDがSCF-Skp2ユビキチンリガーゼによって分解されることを見出した。またNICDの安定性に関与する新たな因子も見出した。本研究結果は発生生物学など基礎生物学の分野だけではなく、再生医療などの応用分野にも重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Notch signaling pathway plays crucial roles in important cell fate decisions. Activation of Notch signaling is triggered by extracellular interactions between Notch receptors and Delta-like ligands, and results in the release of the Notch intracellular domain (NICD) by proteolytic processing. NICD enters the nucleus, and acts as a transcriptional factor by forming a complex with several factors. NICD is an unstable protein and its degradation mediated by the SCF E3 ubiquitin ligase plays an important role in regulating the Notch signaling. In this study, we show that NICD is degraded from anaphase to G1 phase in the cell cycle, and that this cell-cycle dependent degradation is mediated by the SCF-Skp2 E3 ubiquitin ligase. In addition, we found that an F-box only protein interacts with NICD-Skp2 complex to regulate the cell-cycle dependent degradation of NICD. These results raise the possibility that the Notch signaling pathway might be regulated in cell-cycle dependent manner.

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：Notch 細胞周期 タンパク分解 ユビキチン 神経分化

1. 研究開始当初の背景

酵母や培養細胞を用いた近年の精力的な研究によって、基本的な細胞周期制御の分子メカニズムはほぼ解明されたと言ってよい。従って、今後の細胞周期制御の研究においては、多細胞生物の初期発生・細胞分化や、成体の恒常性維持等における細胞増殖制御の機構解明が極めて重要な課題となってきた。多細胞生物の生体内での細胞増殖機構を研究する上では、「細胞周期制御因子」と「細胞分化制御因子」とのクロストークを解明することが重要であると考えられる。しかし、「細胞周期制御の研究」と「細胞分化制御の研究」はこれまでほとんど独立に進められてきており、両分野を横断的に扱った研究は極めて少ない。このため、多細胞生物の発生・分化過程における細胞増殖や、成体における幹細胞等の維持がどのように制御されているかは未だほとんど不明と言える。

Notch シグナルは、多細胞生物の初期発生過程におけるパターン形成や、神経分化・血球分化過程などにおける細胞運命決定に深く関わっている。そのシグナルは、細胞膜タンパク質である Notch の細胞質側領域 (NICD) が細胞膜から遊離し、核内で転写因子として働くことで伝達される。NICD は不安定なタンパク質であることが知られているが、その分解制御についてはほとんど分かっていなかった。しかし、大変面白いことに、我々は、NICD が細胞周期の分裂期 (M 期) から第一間期 (G1 期) にかけて分解すること、またこの分解 Cdk3 依存的に分解されることを見出していた。

本研究では「Notch シグナルの細胞周期依存的制御の解明」を目指し、その研究成果は、細胞分化に深く関わっている Notch シグナルの新たな制御機構の発見につながるのみでなく、「細胞周期進行と細胞分化の相関」の分子機構レベルでの解明にもつながるものと予想された。

2. 研究の目的

上記の NICD の細胞周期依存的な分解機構を、ヒト培養細胞およびアフリカツメガエル胚を用いて解析を行い、その分子機構を明らかにすることを目的とした。下記の2点について中心的に研究を行った。

(1) ヒト培養細胞を用いて、NICD の細胞周期依存的分解の分子機構を明らかにする。

(2) ツメガエル胚を用いて、細胞周期依存的 NICD の分解の生理的意義、特に神経分化への関与を検証する。

3. 研究の方法

上記の背景、およびこれまでの研究結果を踏まえて、下記の研究を行った。

(1) Cdk3 の NICD 分解機構を解析するため

に、HEK293 細胞を用いた実験系と組換えタンパクを用いた実験系により、Cdk3 の NICD への結合領域およびリン酸化部位の同定を行った。

(2) SCF と複合体を形成する各種 F-box タンパクのノックアウト実験を行い、細胞周期依存的な NICD の分解に關与する F-box タンパクの同定を試みた。

(3) 質量分析により、NICD に結合する SCF 複合体について解析を行い NICD の分解に關与するユビキチンリガーゼの同定を行った。

(4) ツメガエル胚を用いて、(2)、(3) で同定した因子の過剰発現実験、および阻害実験を行い、細胞周期依存的な NICD の分解の神経分化への関与について解析を行った。

4. 研究成果

(1) NICD の欠損変異体を用いて、NICD 内の Cdk3 結合部位の同定を試みた。その結果、N 末領域にある複数の領域が Cdk3 と NICD の結合に必要であることがわかった。また NICD の分解に關与する Cdk3 結合サイクリンの同定について解析を行い、サイクリン E が最も効率的に NICD をリン酸化できることがわかった。また分解に關わる Cdk3 による NICD 内のリン酸化部位の同定について解析を行った。in vitro リン酸化アッセイ等によって、NICD 中の 14 カ所の S/T-P 部位が Cdk3 によるリン酸化部位の候補であることがわかった。この結果から、14 カ所ある Cdk3 のリン酸化コンセンサス配列である S/T-P をアラニン置換した変異体を作成し、その安定性を HEK293 細胞において検証した。その結果、14 カ所全てをアラニン置換した変異体は細胞周期依存的な分解を受けず、非常に安定であることがわかった。この結果は、Cdk3 による NICD のリン酸化が NICD の細胞周期依存的な分解に關与していることを強く示唆した。次に NICD の中で、どの Cdk3 リン酸化部位が NICD の安定性に關与しているかについて詳細な解析を行った。その結果、分解に關与する複数のリン酸化部位が同定された。アラニン変異体を用いた解析から、この複数のリン酸化部位が加算的に NICD の安定性に關与することが示唆された。

(2) HEK293 細胞を用いて、NICD の細胞周期依存的な分解が SCF ユビキチンリガーゼによって起きていることがわかった。一般に SCF ユビキチンリガーゼは、そのアダプタータンパクである F-box タンパクにより特異的に基質をユビキチン化することが知られている。NICD の細胞周期依存的な分解に關与する F-box タンパクを同定するために、様々な F-box タンパクの阻害実験を行った。その結果、これまで NICD の分解に關与することが

知られている Fbxw7 ではなく、SKP2 を siRNA により特異的に阻害すると、NICD の細胞周期依存的な分解が強く阻害された。また共免疫沈降法により、NICD と SCF-SKP2 が結合していることがわかった。また、SKP2 を過剰発現すると NICD のユビキチン化が亢進した。これらの結果から、NICD の細胞周期依存的な分解は SCF-SKP2 ユビキチンリガーゼが関与していることが明らかとなった。

(3) HEK293 細胞に Myc タグを付加した NICD と Flag タグを付加した SKP2 を発現させ、抗 Myc 抗体および抗 Flag 抗体を用いて 2 回の免疫沈降を行い、これを質量分析により解析して NICD-SKP2 複合体に結合する新たな因子を同定することを試みた。この実験から NICD と SKP2 に結合する新規の F-box タンパクが同定された。このタンパクは NICD と SKP2 の両者に結合することを免疫沈降法により確認した。次に、このタンパクを過剰発現すると、NICD の安定性が高まった。また、逆にノックダウンを行うと、間期においても NICD の分解が強く起きた。このことは、同定した F-box タンパクが NICD の安定性に深く関与していることを示唆した。さらに解析を進めた結果、このタンパクは細胞周期上の間期で SKP2 に強く結合しており、SCF-SKP2 ユビキチンリガーゼの活性を抑制していることが示唆された。さらに興味深いことに、この F-box タンパクは細胞周期上の分裂期において分解を受けることがわかった。これらの結果を考え合わせると、NICD が分裂期後に分解されるのは、NICD 分解を抑制するこの F-box タンパクがこの時期に分解されるためである可能性が示唆された。

(4) NICD の Cdk によるリン酸化部位を全てアラニンに置換した変異体をつメガエル胚に発現させて、神経分化への影響を観察した。この変異体は野生型と比較すると、ツメガエル初期発生過程で安定に存在し、その神経分化をより強く抑制した。また培養細胞において NICD の細胞周期依存的な分解に關与する SKP2 を阻害すると Notch シグナルの下流因子の転写が上昇して神経分化が抑制された。これらの結果は、本研究で明らかにした細胞周期依存的な NICD の分解機構の結果が、種を越えて共通な機構であり、細胞分化と深く関わっていることを示唆した。

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 1 件)

迫 洸佑、鈴木 和広、磯田 道孝、吉開 聡美、妹尾 千春、中條 信成、大江 宗理、佐方 功幸、Emi2 mediates meiotic MII arrest by competitively inhibiting the binding of Ube2S to the APC/C、Nat.

Commun.、査読有、Vol.5、2014、-、DOI: 10.1038/ncomms4667

[学会発表](計 7 件)

迫 洸佑、鈴木 和広、磯田 道孝、大江 宗理、妹尾 千春、佐方 功幸、ツメガエル未受精卵の Meta- 停止: Emi2 による APC/C-Ube2S 結合の競合的阻害、第 36 回日本分生学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

鈴木 和広、迫 洸佑、村田 壮平、中條 信成、妹尾 千春、佐方 功幸、APC/C における Emi2 と Ube2S の結合サブユニットの解析、第 36 回日本分生学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

出野 結己、中條 信成、妹尾 千春、佐方 功幸、細胞周期依存的な Notch 細胞質内領域の分解、第 36 回日本分生学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

佐方 功幸、脊椎動物未受精卵の分裂停止: その研究小史と精巧な分子機構、第 7 回ツメガエル研究集会(招待講演)、2013 年 9 月 23 日~24 日、秋吉台国際芸術村

佐方 功幸、脊椎動物未受精卵の分裂停止機構、ライフサイエンス筑波研究センター研究連絡会(招待講演)、2013 年 5 月 11 日~12 日、理研・バイオリソースセンター

迫 洸佑、磯田 道孝、村田 壮平、中條 信成、妹尾 千春、佐方 功幸、ツメガエル未受精卵での APC/C 制御における Emi2 と Ube2S の競合の解析、第 35 回日本分生学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

原野 由衣、中條 信成、土田 奈々、長池 碧、妹尾 千春、佐方 功幸、APC/C 阻害因子 Emi1 の分解機構、第 35 回日本分生学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

[図書](計 3 件)

佐方 功幸、医学書院、生体の科学「細胞周期学序説と卵減数分裂停止(下)」、2013、168-175

佐方 功幸、磯田 道孝、迫 洸佑、鈴木 和広、妹尾 千春、中條 信成、羊土 社、実験医学増刊・脊椎動物未受精卵の分裂停止-その研究小史と精巧な分子機構、「ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 2013」(中山 敬一 編)、2013、24-32

佐方 功幸、医学書院、生体の科学「細胞周期学序説と卵減数分裂停止(上)」、2013、72-79

[その他]

ホームページ:

http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~hass/ei/hassei_top_index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐方 功幸 (SAGATA, NORIYUKI)
九州大学・理学研究院・教授
研究者番号: 80142024