

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：細胞周期の再活性化による再生能力の賦活化

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

中山 敬一 (九州大学生体防御医学研究所 教授)

主たる共同研究者

中山 啓子 (東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター 教授)

3. 研究内容及び成果

【細胞周期への再進入(G0期からG1期への移行)のメカニズムの解明】

研究代表者らの以前の研究から、細胞周期のブレーキ分子 p27 が再進入を妨げており、増殖時には p27 がタンパク質分解を受けることによって再進入が始まることを見出していた。p27 ノックアウトマウスでは臓器の大きさが大きくなり、最終的には腫瘍を発生することを示した(Nakayama et al., Cell 1996)。さらにこの p27 の分解に Skp2 というユビキチンリガーゼが重要な役割を果たすことを明らかにし、Skp2 ノックアウトマウスでは体が小さくなり、個々の細胞は巨大化するという結果を得た(Nakayama et al., EMBO J. 2000)。

そこで本研究では、まずこのメカニズムを遺伝学的に検証するために、Skp2・p27 ダブルノックアウトマウスを作製することを試みた。というのは Skp2 の標的タンパク質は p27 だけではなく、p21、p57、free cyclin E、CDK9、Orc1、E2F1、RAG-2、c-Myc、B-Myb 等多くのタンパク質が Skp2 の標的であることを、研究代表者らを含めた多くのグループが報告していたからである(Nakayama and Nakayama, Nature Rev. Cancer 2006)。つまり p27 の蓄積が Skp2 ノックアウトマウスにおけるいろいろな異常の原因である可能性を調べるためには、Skp2・p27 ダブルノックアウトマウスによる検証が最もインパクトのある研究手法であった。実際に、Skp2・p27 ダブルノックアウトマウスでは Skp2 ノックアウトマウスで見られた細胞学的異常(過剰複製による細胞の巨大化、多倍数体化、中心体過剰複製、等)が全て消失した。このことより p27 の蓄積がこれらの細胞学的異常を引き起こしていることが遺伝学的に証明された(Nakayama et al., Dev. Cell 2004)。問題はそのメカニズムであるが、研究代表者らは生化学的解析から、Cdc2 キナーゼの活性が減少していることを明らかにした。Cdc2 の減少は確かに Skp2 ノックアウトマウスにおける異常を再現するので、Skp2 の欠失 p27 の蓄積 Cdc2 キナーゼ活性の阻害 M 期への進行阻害 エンドサイクルへの進入 細胞の巨大化、といった転帰を辿るものと思われる。

この過程における大きな疑問点は、なぜ G1 期では p27 が蓄積せず分解できるのか、ということであった。研究代表者らの当初の予想は、G0 期 G1 期 S 期の進行が阻害されると考えていたが、実際にはその過程にはあまり大きな影響はなく、むしろ上記のように M 期への進行阻害が起こっていたのである。このことは、G1 期に別のユビキチンリガーゼが p27 を分解していると考えれば、説明が可能である。以前から研究代表者らは p27 の分解に別経路の機構があることに気が付いていた(Ishida et al., J. Biol. Chem. 2002; Kotake et al., J. Biol. Chem. 2005; Susaki et al., Mol. Cell. Biol. 2007)。p27 は本来核内に局在するタンパク質であるが、G1 期で分解されるときに核外へ排出されることが知られており、このメカニズムが p27 の G1 期における分解に関与しているのではないかと考え、細胞質より p27 へのユビキチン化活性を示す新規ユビキチンリガーゼ KPC を同定した(Kamura et al., Nature Cell Biol. 2004)。本研究ではこの KPC の生物学的な作用

を細胞レベル・個体レベルで解析し、その調節機構を明らかにした (Kotoshiba et al., J. Biol. Chem. 2005; Hara et al., Mol. Cell. Biol. 2006)。

【細胞周期からの脱出 (G1 期から G0 期への移行) のメカニズムの解明】

研究代表者らは、まず細胞周期を回転させる因子として重要な c-Myc 等の分解機構を詳細に検討することによって、これらのユビキチン化を司る因子 Fbw7 を発見した (Yada et al., EMBO J. 2004)。Fbw7 は c-Myc 以外にも Notch の制御因子としても重要であり、Fbw7 ノックアウトマウスは Notch4 の制御異常によって血管リモデリングや動静脈分化が異常になり、胎生 10.5 日で死亡してしまうことが明らかとなった (Tsunematsu et al., J. Biol. Chem. 2004)。Fbw7 は p53 の下流分子として働いており、ヒト癌においても重要な役割を果たしていることを証明した (Mao et al., Nature 2004)。さらに T 細胞特異的 Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、Fbw7 が細胞周期からの脱出に必須であることを証明した (Onoyama et al., J. Exp. Med. 2007)。このコンディショナルノックアウトマウスでは c-Myc の異常蓄積によって一過性の細胞周期活性化が生じるが、それは p53 を介したチェックポイントによって検出され、細胞周期が強制的に停止してしまう。しかし長期的には p53 の変異が入ることによって、細胞は癌化することが明らかとなった。研究代表者らは現在、骨髄、肝臓、脳、大腸、肺、皮膚、骨格筋、線維芽細胞等で Fbw7 の欠損の効果を調べており、近い将来成果を発表できる予定である。

【神経分化促進メカニズムの解明】

研究代表者らは出芽酵母 Ufd2 の哺乳類ホモログとして世界で初めて E4B のクローニングを報告したが、この分子は神経変性疾患に対する防御機構があることが判明し (Matsumoto et al., EMBO J. 2004)、何か神経において生理的な作用があることが示唆されていた。その後の研究で E4B が、神経突起形成に関わる FEZ1 に対してタンパク質分解を伴わないユビキチン化を起こし、それが神経突起形成に重要であることを示した (Okumura et al., J. Biol. Chem. 2005)。さらに E4B ノックアウトマウスを作製し、心臓発生や神経保護に重要な役割を果たしていることを証明した (Kaneko-Oshikawa et al., Mol. Cell. Biol. 2005)。一方で、E4B と同じ複合体に含まれると予想される膜シャペロン分子 FKBP38 は Bcl-2 をミトコンドリアに局在させるのに重要な役割を果たし、アポトーシス制御に関わっていることが明らかとなってきた (Shirane and Nakayama, Nature Cell Biol. 2003)。さらに FKBP38 に結合するタンパク質としてプロトルーディンを発見し、それが神経突起形成時に膜輸送システムを制御し突起を形成していることを明らかにした (Shirane and Nakayama, Science 2006)。

【上記以外の研究】

上記の研究以外にも、この分野に関わる研究として、p27 ノックアウトマウスにおける耐糖能の改善 (Uchida et al., Nature Med. 2005)、細胞増殖抑制効果を持つ PKC- δ のノックアウトマウス作製 (Miyamoto et al., Nature 2002) と、それが細胞老化に関わるという発見 (Takahashi et al., Nature Cell Biol. 2006) や、Cul2/Cul5 ユビキチンリガーゼの構造や機能に関する発見 (Kamura et al., Genes Dev. 2004)、Cul1/Cul7 ユビキチンリガーゼダイマーに関わる研究 (Tsunematsu et al., Mol. Cell. Biol. 2006)、Fbw1a ノックアウトマウスに関する研究 (Nakayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003) や p57 のユビキチンリガーゼの研究 (Kamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003)、等がある。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

発表論文はすべて高レベルの一般誌および専門誌に数多く発表されており、期待以上に十分な成果があげられたと評価できる。特にその中でも研究代表者が主たる役割を果たしたと判断される30余編の論文が、Nature Cell Biology, Dev. Cell, Science, PNAS などの評価の高い雑誌に発表されている。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

研究代表者は、ガンなど成因を理解しその新しい治療のターゲットを見出すためには、細胞分裂の制御が細胞周期の各ステップでどのような分子機構で行われているかを明らかにすることが最も重要であるという考えのもとに一貫して研究を行っている。とくに本研究プロジェクトにおいては、細胞が増殖周期とG0期との間で出入りする過程でそれぞれ特異的なユビキチンリガーゼによって制御されていることを見出した。当初の計画ではG0期から細胞分裂周期への再進入の分子機序の解明にあった。その目標は再進入抑制分子 p27 を分解するためのユビキチンリガーゼ Skp2, KPC の発見とKOマウスを用いたそれらの作用機序の解明で達成されたといえる。特に未知のユビキチンリガーゼKPCの発見は大きな貢献である。研究はさらに細胞周期からG0への脱出機構にも発展し、その抑制因子 c-Myc の分解にユビキチンリガーゼ Fbw7 が働くことを発見したことも大きな成果といえる。これらの成果はガンの成因を理解しその治療法を開発したり、もっと広く再生医療の技術開発にも貢献する基礎的な知見としての意味が重要である。その意味で、本研究は当初の目標を十分に達成した上に、その先の発展の道筋も与えたものと高く評価できる。今後は、上述のようにガンその他の疾患の診断治療へのユビキチンリガーゼ関連のターゲットを重視した研究に発展が期待できるとともに、細胞分化と細胞増殖という細胞生物学の基本テーマへの発展も期待できる。

4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

受賞

1. 中山 敬一.

「哺乳類における細胞増殖と細胞死の制御機構の研究」日本学術振興会賞. 2005/3/22.

2. 中山 敬一.

「Ubiquitin ligases involved in cell-cycle control and cancer」 JCA-Mauvernay Award (Basic Research). 2007/10/4.