

ゲノムネットワークプロジェクトの  
課題の報告

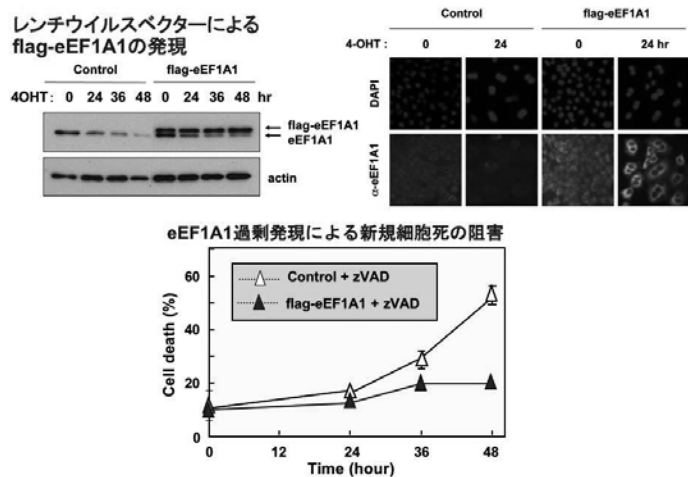
プログラム名	(1) ゲノム機能情報の解析 (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) 次世代ゲノム解析技術の開発 (4) <u>個別生命機能の解析</u> (5) 動的ネットワーク解析技術開発					
課題の分類	(1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) <u>公募課題</u>					
課題名 (和英併記)	細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナル間ネットワーク機構解明 (Investigation of Network Mechanisms between Cell Death Signal Molecules and Growth/Differentiation Signals)					
代表研究者名 (所属機関・職名)	米原 伸 (国立大学法人京都大学・教授)					
年度別研究費 (千円)	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	合計
	26,000	27,000	33,000	30,000	22,000	138,000
	研究者名	所属機関・部局・職			専門分野	
研究 組 織 図	代表機関	☆ 米原 伸	京都大学・生命科学研究科・教授			細胞生物学
		李 慶權	京都大学・生命科学研究科・助教			生化学
		小林 洋平	京都大学・生命科学研究科・研究員			細胞生物学
	分担機関	☆ (代表研究者)				
		(分担研究者)				
<p><b>【研究目的】</b> 本研究では、染色体の凝集異常が新たな転写誘導を介して新規細胞死を誘導する未知の分子機構、TGF-<math>\beta</math>が転写を介して細胞死(アポトーシス)を誘導する分子機構とTGF-<math>\beta</math>がアポトーシスを誘導するか細胞増殖抑制や分化を誘導するかを決定する未知の制御機構と共に、アポトーシス誘導シグナル分子であるcaspaseやFLIP等の分子が生体分子ネットワークに依存する転写の誘導と調節を介して細胞増殖・分化・死を多面的に制御する新規分子機構の解明を目的とする。</p>						
<p><b>【課題の概要】</b> 細胞分裂期における染色体の凝縮異常(不全)によって、娘細胞間をDNAが架橋するanaphase bridgeという構造が認められ、核分裂が成功せずに、二核四倍体の細胞が生じることがある。このような細胞の染色体は不安定であり、変異が蓄積することによって細胞のがん化が誘導されるという。我々は、このような染色体凝縮異常による二核四倍体細胞を誘導する系を作製し(転写因子CREBの転写活性に依存しない作用、あるいはDNAトポイソメラーゼII阻害剤ICRF-193の作用)、生じた二核四倍体細胞がcaspase非依存性の新規細胞死によって除去されることを見だし、その分子機構と生理機能の解明を実行した。 細胞死シグナルと他シグナル系との相互作用は、増殖シグナルによる細胞死抑制作用が主に研究されてきたが、本研究では細胞死シグナル分子が逆に増殖・分化に影響を及ぼすという新しい生体分子ネットワーク機構の解明を行った。具体的には、細胞死シグナル関連分子(caspase-8, caspase-10, viral FLIP E8, FLASH)を特異的に発現誘導した、あるいはノックダウンを誘導した細胞株を解析する研究方法により、細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナルとの転写を介した新しい生体分子ネットワーク機構の解明を目指した。</p>						

【平成20年8月末までの研究成果】

(1) 染色体凝縮や分裂の異常によって生じる四倍体細胞に誘導される新しい細胞死誘導機構の解析

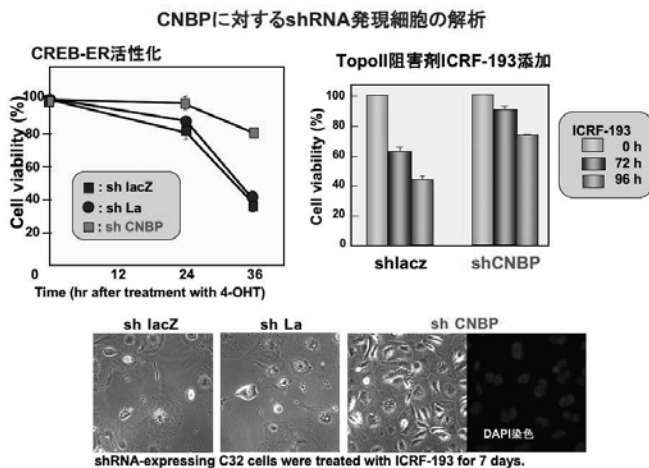
CREB-ER恒常発現細胞株に4-OHTの作用で誘導される『染色体凝縮異常誘導→アナフェーズブリッジ形成→二核四倍体細胞出現→新規細胞死誘導』という系においてcaspaseに依存しない細胞死が誘導されることを見いだしていた。そして、この系において、タンパク質翻訳延長因子であるeEF1A1 (eEF-1 $\alpha$ )のmRNA量とタンパク量が特異的に減少することを明らかとした。ハウスキープング遺伝子の代表的メンバーであるeEF1A1の発現減少が誘導されたことは驚くべき事実であり、興味深い。そして、このようなeEF1A1の減少が新規細胞死の原因であることは、外来生flag-eEF1A1の発現(レンチウイルスベクターを用いて内在性のeEF1A1の発現量に相当する量の発現)によって細胞死が抑制されることによって証明した(図1)。また、eEF1A1の発現を特異的に抑制するshRNA(short hairpin RNA)発現誘導細胞においてもcaspaseに依存しない細胞死が引き起こされた。

図1 新規細胞死はeEF1A1の強制発現によって抑制される



染色体凝縮異常による二核細胞をDNA topoisomerase II (topoII) の阻害剤であるICRF-193を用いて誘導した場合も、同じeEF1A1の発現抑制による細胞死が認められた。そして、CREB-ERとICRF-193の両方の系で、eEF1A1の発現抑制がeEF1A1 mRNAの5' UTRの構造に依

図2 CNBPはeEF1A1の発現抑制による新規細胞死に必要である



存した翻訳阻害によって誘導されることが明らかとなった。eEF1A1 mRNAの5' UTRは、5' TOPと呼ばれる配列を有し、La autoantigen や CNBP (cellular nucleic acid binding protein) というタンパク質が結合すると報告されている。そこで、LaとCNBPに対するshRNAを発現させて解析を行ったところ、CNBPによって eEF1A1の翻訳阻害が誘導され、細胞死も誘導されることを示すことができた(図2)。また、CNBPはeEF1A1 mRNAの5' UTRと会合することも示した。染色体の凝縮異常によって生じた二核細胞

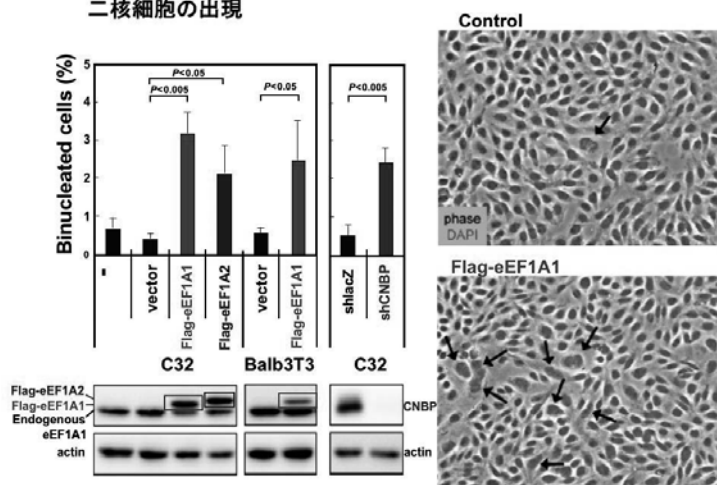
では、CNBPが活性化され、活性化CNBPによるeEF1A1の翻訳抑制によるeEF1A1発現抑制によって、新規細胞死の誘導されることが示された。

また、乳がん等のヒト腫瘍細胞ではeEF1A1に相同な分子であるeEF1A2が強発現し、この発現が我々の見いだした新規細胞死を抑制して発がん機能していることも示唆した。具体的には、eEF1A2の発現をshRNA発現によって抑制した細胞でのみICRF-193処理による新規細胞死が誘導可能なことを示した。eEF1A2だけでなくeEF1A1そのものもがん遺伝子産物であるとい

う報告があり、ここで解析している新規細胞死に生物学的意味の存在することが示唆された。

このような新規細胞死が導かれる二核四倍体細胞は、外来性CREBの強発現やDNA topoisomerase IIの阻害剤であるICRF-193の処理によって作製してきたが、このような異常な細胞は通常の培養条件下でも生じているのか、我々が見いだした新規細胞死誘導機構によって、そのような異常な細胞は除去されているのかが問題である。研究室で通常に培養している細胞株においてM期中期染色体伸展標本 (metaphase chromosome spread) を作製して解析したところ、4.6%もの細胞で染色体の凝縮異常が認められた。一方、二核となった細胞は全体の1%以下しか存在しなかった。このような結果は、通常の培養条件下においても染色体の凝縮異常によって二核四倍体となる細胞はかなりの高頻度で出現していることを示唆している。そして、このような自然に生じた二核四倍体細胞には、我々が発見した新規細胞死が誘導されている可能性が考えられた。そこでレンチウイルスベクターを用いて、外来性eEF1A1やeEF1A2の発現やCNBPの発現抑制を実行し、このような新規細胞死を阻害する条件下に細胞を培養した。実際にはベクター感染から二週間、細胞を培養した後に、二核となっている細胞数の割合を測定した。その結果、外来性eEF1A1やeEF1A2の発現やCNBPの発現抑制によって、二核細胞の出現頻度が有意に上昇することが明らかとなった (図3)。これらの結果は、普通に増殖している細胞においても二核四倍体細胞は常に出現しているが、このような異常な細胞の除去に我々の見いだした新規細胞死誘導機構が関わっていることを示していると考えられた。

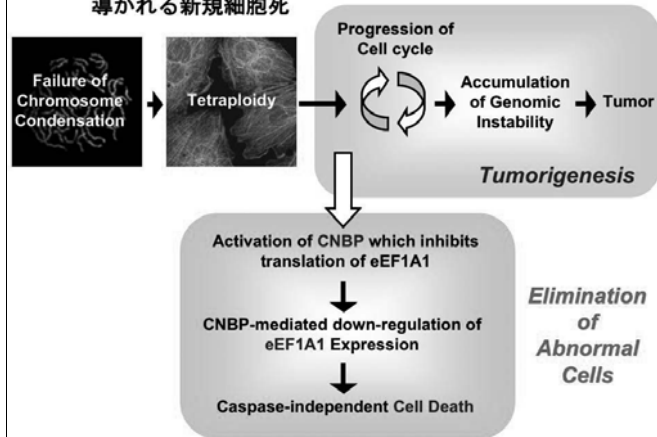
図3 四倍体細胞に誘導される新規細胞死の抑制条件下での二核細胞の出現



次に、eEF1A1の発現抑制が誘導される分子機構の解析を行った。eEF1A1の発現抑制は翻訳抑制によって誘導されることを示してきたが、このときのeEF1A1 mRNAの局在を蛍光in situ hybridization法によって解析した。二核四倍体化を誘導していない細胞ではeEF1A1 mRNAは細胞内に拡散して存在し、特徴的な局在は示さなかった。一方、二核四倍体化を誘導した細胞ではeEF1A1 mRNAが細胞質にフォーカスを形成している様子が観察され、そのフォーカスはmRNA分解や翻訳抑制の場として知られているPボディ (Processing body) のマーカーであるDcp1bと共局在していた。以上の結果から、二核四倍体化した細胞におけるeEF1A1の発現減少は、eEF1A1 mRNAがPボディに局在化することによって分解あるいは翻訳抑制を受けることで誘導されると示唆された。

我々が見いだしたcaspaseに依存しない新規細胞死は、染色体の凝縮異常によって誘導される二核四倍体細胞に引き起こされるが、その分子機構はCNBPが関わるeEF1A1の発現抑制によることを示してきた (図4)。このような新規細胞死誘導機構が普通に増殖している細胞において自然発生する二核四倍体細胞の除去に関与していることを示唆す

図4 染色体凝縮異常によって誘導される二核四倍体細胞に導かれる新規細胞死



ることができた。また、eEF1A1の発現抑制は、通常はポリゾームを形成しているeEF1A1 mRNAがPボディ（mRNAの分解や翻訳抑制を実行する場として知られている）へ局在化することによって誘導されることが示唆された。現在、この細胞死誘導機構が発生や発がんに関わるかを生体レベルで明らかにすべく、外来性eEF1A1の強制発現を誘導できるマウスを作製して解析を行っている。そして、新たな発がんモデル系を提出したいと考えている（図4）。また、CNBPがどのような分子機構でeEF1A1の翻訳抑制またはeEF1A1 mRNAのPボディへの集積に関与するのかを明らかにしていく必要がある。これらの研究によって、本ゲノムネットワークプロジェクトで発見し解析を行ってきた「染色体の凝縮異常によって生じる二核四倍体に誘導される新規細胞死」の分子機構と生理機能の全体像を提示することができると期待している。

## （2）TGF- $\beta$ が細胞増殖抑制・分化もしくは細胞死を振り分けて誘導する分子機構の解明

TGF- $\beta$ は胃上皮細胞にBim（アポトーシスを誘導する BH3-only-Bcl-2 family protein）の作用によってアポトーシスを誘導することを示した。一方、TGF- $\beta$ 刺激でアポトーシスは誘導されないが増殖抑制等のシグナルが導入される複数のヒトおよびマウスB細胞株にたいし、TGF- $\beta$ が誘導する多様な初期シグナルのなかでMAPキナーゼであるJNKの活性を阻害するとSmadを介するアポトーシスの誘導が認められた。また、JNK阻害だけでなく、IFN- $\gamma$ 処理という生理的条件下でも同様の現象を認めた。このようなTGF- $\beta$ 誘導細胞死は、正常脾臓B細胞においても誘導された。一方、Bim KOマウスの脾臓B細胞ではJNKを阻害、あるいはIFN- $\gamma$ 処理を行っても、TGF- $\beta$ 誘導細胞死は強く抑制されていた。また、Bimに対するshRNAを発現してもアポトーシスは抑制された。TGF- $\beta$ はB細胞において、IFN- $\gamma$ 処理やJNK阻害条件下にBimを介したアポトーシスを誘導することが示された。

そこで、このような細胞死を抑制する転写産物を同定すること、またTGF- $\beta$ の下流で細胞の生死を決定する転写制御機構を明らかにするために、DNAアレイ法を用いた網羅的転写産物の解析を行った。その結果、TGF- $\beta$ によって発現誘導される遺伝子1, 120と、TGF- $\beta$ によって発現誘導されるがJNKの阻害によって発現が抑制される遺伝子121を同定した。そして、同定した遺伝子の中から、線虫の抗細胞死遺伝子として同定されているces-1のヒトホモログタンパク質であるSlugがTGF- $\beta$ の刺激によって誘導される抗細胞死遺伝子の候補として考えられた（IFN- $\gamma$ 処理によっても発現が抑制された）。さらに、外来性Slugの発現によってJNK阻害条件下(SP)のTGF- $\beta$ 誘導アポトーシスが阻害され、shRNA発現によるSlugの発現抑制によってTGF- $\beta$ 処理のみによってアポトーシスの誘導されることを示した。

B細胞においてTGF- $\beta$ は、アポトーシス誘導とアポトーシスの阻害という相反するシグナルを平行して導入することが明らかとなった。すなわち、TGF- $\beta$ は、Smadを利用したBimの活性化を介するアポトーシス誘導シグナルと、JNKの活性化を介したSlugの発現誘導によるアポトーシス抑制シグナルを同時に導入する。その結果、通常ではアポトーシスは誘導されないが、IFN- $\gamma$ の作用などによってSlugの発現が抑制されるとアポトーシスを誘導するようになることが明らかとなった。

## （3）viral FLIP E8によるWntシグナルの増強と、増強されたWntシグナルによる細胞増殖や細胞死に対する影響の解析

v-FLIP E8はWntシグナルを $\beta$ -catenin安定化の下流で強力に増強することを見いだした。また、E8によって増強されたWntシグナルによりがん化したヒト細胞株では、細胞増殖増強が、またヒト正常細胞株では細胞増殖抑制または細胞死が誘導されることを明らかとした。一方、E8を恒常的に発現する細胞株を作製したが、継代一ヶ月以内にアポトーシス抑制活性は失わないが、Wntシグナル増強活性を失うことが判明した。そこで、本プロジェクトで開発した遺

伝子発現誘導システムを用いて、E8発現誘導系をヒト骨肉腫由来細胞株U2OSを用いて作製した。樹立した細胞株は、E8の発現誘導と発現誘導されたE8によるWntシグナル増強作用を安定に示した。また、E8発現細胞を用いて、Flag標識E8と共免疫沈降するタンパク質を、LC-MS/MS法による質量分析解析で同定した。その結果、三種類のタンパク質が再現性良く同定された。さらに、横軸機関との連携によって酵母ツーハイブリッド法 (Y2H法) を用いてE8結合タンパク質を同定した。その結果、両方で共通の分子としてPIEキナーゼの制御サブユニットp85が同定された。また、共免疫沈降実験によって、実際にE8とp85が会合すること、p85の強発現でE8のWntシグナル増強活性がより増強される結果を得ており、WntシグナルによるTCF依存性転写活性 (Wntシグナルの標的転写) の新しい制御機構 ( $\beta$ -catenin安定化の下流での) を明らかにできると期待される。

#### (4) 細胞死シグナル分子が細胞増殖・分化を制御する未知の分子機構の解析

Death receptor Fasを介するアポトーシスでは、開始caspaseであるcaspase-8が必要不可欠の因子として機能する。一方、ノックアウトマウスの解析から、caspase-8は胎生期の心臓の発生や免疫担当細胞の増殖や分化に関与することが示されていた。しかし、アポトーシスの誘導経路でcaspase-8の上流と下流に存在するFasとcaspase-3およびcaspase-7のノックアウトマウスは胎生致死とならず、免疫担当細胞の増殖や分化の異常も示さない。したがって、caspase-8はdeath receptorを介する細胞死誘導において機能するだけではなく、それとは異なった機能を免疫担当細胞や胎児心臓で担っていると考えられてきた。そこで、caspase-8や、そのホモログでヒトには存在するがマウスには存在しないcaspase-10の免疫系のT細胞での機能を明らかにすることを目的に解析を行った。

本ゲノムネットワークプロジェクトにおける研究において樹立したshRNA発現誘導システムを用いて、caspase-8の発現抑制を薬剤処理によって誘導できる細胞株をマウスTリンパ腫由来L5178Y細胞から樹立した結果、caspase-8の発現抑制を誘導することによって、L5178Y細胞に細胞増殖の停止と細胞死の誘導が引き起こされることが示された。caspase-8がT細胞株L5178Yの増殖と生存維持に必要であることが示唆された。

次に、ここで見いだした現象がcaspase-8タンパク質の活性によって担われているかについて、外来性caspase-8を強制発現するレスキュー実験により解析した。外来性のcaspase-8としては、アミノ酸配列は変わらないがcaspase-8特異的なshRNA (sh casp8) に対応するヌクレオチド配列に変異を導入した\*caspase-8を用いた。\*caspase-8を発現させることによって、細胞増殖の停止や細胞死の誘導が解除されるかを解析した結果、sh casp8の発現によって誘導された細胞増殖の停止と細胞死の誘導が\*caspase-8の発現により部分的に解除されることが示された。sh casp8発現誘導後2日目までの早い時期に観察される細胞増殖の抑制と細胞死の誘導は、\*caspase-8の発現によってほぼ完全に抑制されたが、3日目以後に認められる細胞増殖の抑制は阻害されなかった (この遅い時期に認められる細胞増殖の抑制についてはヒトcaspase-10の解析を説明する後の項で考察する)。\*caspase-8の発現で阻害された早い時期の細胞増殖の抑制と細胞死の誘導について、\*caspase-8とその各種変異体を発現させることによって早い時期の細胞増殖の停止や細胞死の誘導が阻害されるかを解析した。その結果、前駆体から活性化型に変換するときに切断されるサイトに変異 (7つのアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に変換した) を導入した活性化型に変換できないcaspase-8変異体を発現させることによっても細胞増殖と生存の回復することが明らかとなった。一方、プロテアーゼの活性中心であるシステイン残基をセリン残基に変異させたプロテアーゼ活性を持たない\*caspase-8の発現では回復させることができなかった。caspase-8前駆体のプロテアーゼ活性がT細胞の増殖と生存維持に必要であることが明らかとなった。現在、caspase-8前駆体の持