

博士論文番号：0781024

哺乳類細胞の増殖とがん化における CSN5/Jab1 の機能解析

吉田 晃洋

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物分子遺伝学講座

(加藤 順也 教授)

2011 年 1 月 25 日

所属 (主指導教員)	動物分子遺伝学講座 (加藤 順也 教授)		
氏名	吉田 晃洋	提出	平成 22年 12月 21日
題目	哺乳類細胞の増殖とがん化における CSN5/Jab1 の機能解析		

要旨

細胞周期、細胞内シグナルの制御には特異性の高いタンパク質分解機構であるユビキチンプロテアソームシステムが必須であり、標的タンパク質のユビキチン化を担う E3 ユビキチンリガーゼの活性制御が重要である。多種多様な E3 ユビキチンリガーゼの中でも Cullin タンパク質を持つ E3 ユビキチンリガーゼ (Cullin-RING-Ligase; CRL) はユビキチンリガーゼ最大のファミリーであり、ユビキチン様タンパク質 NEDD8 が付加されることで活性を持つ。COP9 signalosome (CSN) はこの NEDD8 を Cullin から切り離す活性を持つ (脱 NEDD8 化)。脱 NEDD8 化には CSN の第 5 サブユニットである CSN5 の JAMM モチーフが必須であるが、CSN5 単量体では機能せず CSN 複合体形成が必要とされる。CSN5 は転写因子 c-Jun に結合する因子 Jun activation domain binding protein 1 (Jab1) として同定された経緯から CSN5/Jab1 と表記され、CRL の活性制御以外にも転写制御、局在制御など様々な活性を持つ。さらに様々なヒトのがんで CSN5/Jab1 の過剰発現が認められており、CSN5/Jab1 と細胞増殖、がん化との関係が注目される。しかし、がん細胞で CSN5/Jab1 が過剰発現している生理学的意義、発がんへの分子メカニズムは不明である。そこで本研究では多機能タンパク質 CSN5/Jab1 に焦点を当て、哺乳類細胞における細胞周期制御、細胞増殖、がん化の分子メカニズムを解明することを目的とした。

生理的な CSN5/Jab1 の機能を解明するため、本研究室では CSN5/Jab1 の遺伝子改変マウスの作製、解析が行われた。ノックアウトマウスは胎生致死の表現型を示した。一方、トランスジェニックマウスは骨髄増殖性疾患を発症した。その分子メカニズムとして私は CSN5/Jab1 が CDK インヒビター p16<sup>INK4a</sup> の発現量を減少させることを明らかにした。マウスモデルを用いた解析により CSN5/Jab1 が哺乳類細胞の増殖や生存に必須であり、がん遺伝子として機能することを *in vivo* で証明した。

現在までに CSN5/Jab1 は細胞周期の様々な時期で機能する多くの相互作用因子を有することが報告されているが、細胞周期進行における特異的作用点は明らかでない。さらに CSN5/Jab1 ノックアウトマウスが胎生致死であることより CSN5/Jab1 の解析は困難を極めた。しかし Pardi 博士らにより条件性 CSN5/Jab1 ノックアウト遺伝子座 (CSN5/Jab1<sup>lox/lox</sup>) が作製されたことで、CRE の発現を介した時期特異的 CSN5/Jab1 遺伝子の破壊による細胞周期の研究が可能となった (CRE-flox システム)。そこで私たちは CSN5/Jab1 の細胞周期進行における特異的作用点を見出すために、CSN5/Jab1<sup>-lox</sup> 遺伝子座を持つマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を作製し、詳細に検討した。

CSN5/Jab1<sup>-/flox</sup> MEF にレトロウィルスを用いて CRE を発現させ、ゲノミック PCR、ウェスタンブロット法を行い、CSN5/Jab1 の遺伝子座及び発現が消失していることを確認した。CRE の発現により CSN5/Jab1 の発現を消失させた細胞 (CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF) では顕著に細胞増殖能が消失した。この細胞増殖能の消失は野生型 CSN5/Jab1、NES 変異体 (L237/240/241A) を発現させることで回復した。しかし、JAMM モチーフ変異体 (D151N) においては増殖能の消失を回避できなかった。この結果は哺乳類細胞の増殖には CSN 複合体による脱 NEDD8 化反応を介した CRL の活性制御が必須であることを示す。

CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF では細胞増殖能が消失し、最終的には細胞死に至るが、CSN5/Jab1 の発現消失後約 1 週間以内の細胞は生存した。これらの細胞が細胞周期のどの時期で停止しているか解析した結果、CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF ではコントロールの CSN5/Jab1<sup>-/flox</sup> MEF に対し G1 期と S 期の細胞がわずかに減少し、G2/M 期の細胞がわずかに増加した。そして 4N 以上の細胞の増加が認められた。位相差顕微鏡観察においても CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF では一つの細胞に核が 2 個以上存在する多核の細胞が多く観察された。また BrdU の取り込みも顕著に抑制されていた。これらの実験から CSN5/Jab1 の発現消失による細胞周期停止は細胞周期の特定時期ではなく複数点で起こること、CSN5/Jab1 の発現消失により ploidy が上昇することを明らかにした。さらに CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF の核を Hoechst 33342 で染色し蛍光顕微鏡観察を行った結果、染色体が凝集した Senescence associated heterochromatin foci (SAHF) 様の構造を示した。この構造は細胞老化の指標として報告されており、CSN5/Jab1 の発現消失が細胞老化の引き金になることを示唆している。

細胞周期停止のメカニズムを調べるために CSN5/Jab1 の発現消失前後における細胞周期制御因子の発現量を調べた結果、CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF では、Nedd8 化 Cullin1、Cullin4 が認められた。これは CSN の脱 NEDD8 化反応が機能しないためである。CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF では他にも p53、その下流で働く CDK インヒビター p21 の発現量の増加が認められた。p53 は異常な細胞を細胞周期停止やアポトーシスに導くがん抑制タンパク質であり、老化細胞において発現量が増加することから、CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF の細胞周期停止、細胞老化などの表現型が p53 経路依存的か検討した。CSN5/Jab1<sup>-/flox</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF を作製し、同様に CSN5/Jab1 の発現を消失させた結果、細胞増殖能の消失、細胞周期停止、SAHF 様構造の観察など CSN5/Jab1<sup>-/del</sup> MEF と同様の結果を得た。さらに老化マーカーである  $\beta$  galactosidase が誘導された。

これらの実験から CSN5/Jab1 は細胞周期の複数点で作用し、細胞周期停止、細胞老化などの生命現象に拮抗することで細胞増殖を亢進させること、また細胞質分裂/endoreplication を制御することを明らかにした。細胞老化はがん化に対する防御機構であり、p53 の活性化により誘導されることが明らかにされている。この研究で CSN5/Jab1 が p53 非依存的な細胞増殖抑制、新規の細胞老化に拮抗することで細胞増殖を亢進させるという哺乳類細胞の増殖制御機構の一端を解明した。

# 目次

1. 序論	6
1-1. はじめに	
1-2. COP9 signalosome	
1-3. CSN5/Jab1	
1-3-1. CSN5/Jab1 の同定	
1-3-2. CSN5/Jab1 の構造	
1-3-3. CSN5/Jab1 の機能	
1-3-3-1. 脱 NEDD8 化による Cullin-RING ユビキチンリガーゼの活性制御	
1-3-3-2. 転写制御	
1-3-3-3. タンパク質のリン酸化	
1-3-3-4. タンパク質の局在制御	
1-4. COP9 signalosome とマウスモデル	
1-5. CSN5/Jab1 ノックアウトマウス	
1-6. CSN5/Jab1 コンディショナルノックアウトマウス (T 細胞)	
1-7. CSN5/Jab1 トランスジェニックマウス	
2. 材料と方法	21
2-1. 遺伝子改変マウス胚性線維芽細胞 (MEF) の作製	
2-2. 細胞培養	
2-3. CSN5/Jab1 変異体の作製と発現ベクターの構築	
2-4. フローサイトメトリーを用いた解析	
2-4-1. 細胞のソーティング	
2-4-2. 細胞周期	
2-5. タンパク質解析	
2-5-1. SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング	
2-5-2. NATIVE-PAGE、ウェスタンブロッティング	
2-5-3. 免疫沈降法	
2-5-4. クロマチン免疫沈降法	
2-6. 免疫染色法	
2-7. Senescence associated $\beta$ -gal assay	



3. 結果	26
3-1. CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの解析	
3-2. 条件性 CSN5/Jab1 ノックアウトマウスを用いた研究	
3-3. 条件性 CSN5/Jab1 ノックアウトマウス胚性線維芽細胞 (MEF) の作製	
3-4. CSN5/Jab1 欠損による細胞増殖への影響	
3-5. CSN5/Jab1 欠損による細胞周期への影響	
3-6. CSN5/Jab1 欠損による細胞周期制御因子への影響	
3-7. CSN5/Jab1 欠損による細胞周期停止は p53 非依存的である。	
4. 考察	52
4-1. CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの解析	
4-2. CSN5/Jab1 と細胞周期制御	
4-3. CSN5/Jab1 と脱 NEDD8 化	
4-4. CSN5/Jab1 と細胞老化	
4-5. CSN5/Jab1 と endoreplication/細胞質分裂異常	
4-6. さいごに	
5. 謝辞	57
6. 参考文献	58

# 1. 序論

## 1-1. はじめに

ユビキチンプロテアソームシステムは特異性の高いタンパク質分解機構の一つであり、細胞周期制御、細胞内シグナル制御、がん化など様々な生命現象を制御している。生体内の多くのタンパク質はこの機構による緻密な量的制御を受けており、システムの破綻ががん遺伝子産物の発現量増大、がん抑制タンパク質の分解亢進を引き起こし、細胞のがん化に直結する。千種類以上の E3 ユビキチンリガーゼが存在すると言われていたが、その中でも Cullin サブユニットを持つ E3 ユビキチンリガーゼ (Cullin-RING-Ligase; CRL) はユビキチンリガーゼ最大のファミリーであり、ユビキチン様タンパク質 NEDD8 が付加されることで活性を持つ。

COP9 signalosome (CSN) は 8 つのサブユニットから構成される分子量約 450kDa の巨大タンパク質複合体であり、この NEDD8 を Cullin から切り離す酵素活性を持つ(脱 NEDD8 化反応)。脱 NEDD8 化反応には CSN の第 5 サブユニットである CSN5 の JAMM モチーフが必須であるが、CSN5 単量体では機能せず CSN 複合体形成が必要とされる。CSN5 は転写因子 c-Jun に結合する因子 Jun activation domain binding protein 1 (Jab1) として同定された経緯から CSN5/Jab1 と表記され、CRL の活性制御以外にも転写制御、タンパク質のリン酸化、局在制御など様々な活性を持つ。本研究室において CSN5/Jab1 は細胞周期に関する研究の過程で細胞周期を負に制御する CDK インヒビター p27 と結合し、分解誘導に導く因子として単離された。CSN5/Jab1 は p27 以外にもがんの半分で失活が認められるがん抑制タンパク質 p53 に直接結合して分解誘導に導くなど細胞増殖を亢進させる機能が示されている他、様々なヒトのがんで CSN5/Jab1 の過剰発現、それに伴う p27 の発現量の低下が認められている。これらのことから CSN5/Jab1 と細胞増殖、がん化との直接的な関係性が注目される。しかし、がん細胞で CSN5/Jab1 が過剰発現している生理学的意義、発がんへの分子メカニズムは不明である。そこで本研究では多機能タンパク質 CSN5/Jab1 に焦点を当て、哺乳類細胞における細胞周期制御、細胞増殖、がん化の分子メカニズムを解明することを目的とした。

## 1-2. COP9 signalosome

Constitutive Photomorphogenesis 9 (COP9) signalosome (CSN) はシロイヌナズナの光形態形成を負に制御する 8 サブユニットから構成される分子量約 450kDa の巨大タンパク質複合体として単離された (Chamovitz DA et al., 1996; Wei N et al., 1994)。光形態形成は光に応答して起こる発生プロセスである。この COP9 complex

は光依存的に遺伝子発現を制御することが示された (Wei N and Deng XW., 1992)。その後の研究で、CSN は高等植物だけではなく、分裂酵母、線虫、昆虫から哺乳類に至るまで高度に保存されていること (Wei N et al., 1999)、また胚発生、細胞周期、チェックポイント制御、T 細胞の分化、シグナル伝達、卵母細胞の成熟、オートファジー、サーカディアンリズムなど様々な生命現象に関与することが明らかにされた (Wei N et al., 2003)。CSN、CSN5/Jab1 の立体構造は明らかにされていないが、2009 年にどのサブユニットがどのように結合するかモデル図が提唱されている (Sharon M et al., 2009)。さらに CSN5/Jab1 は CSN 複合体以外にも mini CSN 複合体、CSN5/Jab1 小複合体、単量体として存在することが報告されている (Kato JY and Yoneda-Kato N., 2009; Sharon M et al., 2009; Tomoda K et al., 2002)。各々の複合体の機能は明らかにされていないが、CSN、CSN5/Jab1 の立体構造、複数存在する複合体の意義解明により CSN が多機能性である所以を説明できる可能性がある (Fig.1-1)。

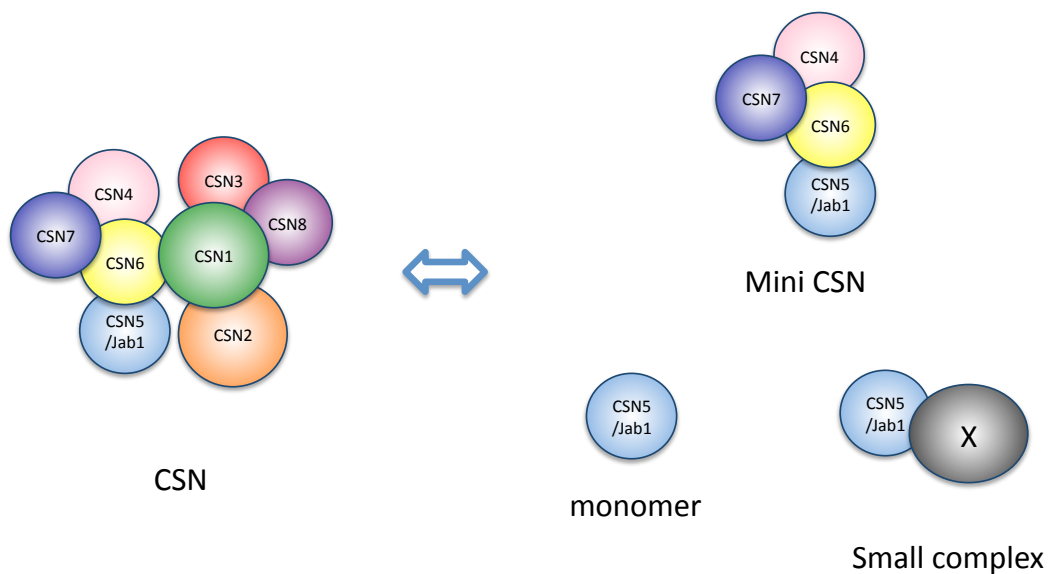


Fig.1-1 複数存在する CSN 複合体のモデル図

Mini CSN は CSN サブユニットの 4~7 (CSN4, 5, 6, 7) で構成され (Tomoda K et al., 2002)、Small complex は結合因子が明らかにされていない。CSN5/Jab1 はがん遺伝子として位置付けられているが、CSN2, 3, 8 はがん抑制に機能すると推測されている。

### 1-3. CSN5/Jab1

#### 1-3-1. CSN5/Jab1 の同定

CSN の第 5 サブユニット (CSN5) は転写因子 **c-Jun** の活性化ドメインに結合する因子 **Jun activation domain binding protein 1 (Jab1)** として Claret らにより最初に同定された (Claret FX et al., 1996)。同定された経緯から **CSN5/Jab1** と表記される。哺乳類細胞において CSN は複合体以外にもサブユニットが独立して様々な因子と相互作用することが報告されている (Kato JY and Yoneda-Kato N., 2009)。特に **CSN5/Jab1** は報告されている相互作用因子が各サブユニットの中で最も多い (表 1 参照)。

#### 1-3-2. CSN5/Jab1 の構造

ヒト **CSN5/Jab1** は 8 番染色体長腕 13.2 にコードされており、334 アミノ酸からなる分子量 37.5kDa のタンパク質である。アミノ酸レベルでマウスとの相同性が 99.7% と非常に高く、酵母から哺乳類まで高度に保存されている。N 末端には **MPN (Mpr1-Pad1-N-terminal)** ドメインとその領域内に **JAMM (Jab1/MPN domain metalloenzyme)** モチーフを有し (MPN+ドメイン)、C 末端には、**NES (Nuclear export signal)** 配列を有している (Hofmann K et al., 1998, Wei N et al., 2003)。MPN ドメインの正確な機能は明らかでないが、タンパク質間相互作用に関与しており (Burger-Kentischer A et al., 2005)、**JAMM** モチーフは脱 **NEDD8** 化に必須である。Fig.1-2 に **CSN5/Jab1** 構造の模式図を示す (Wei N et al., 2003)。

CSN の各サブユニットのうち **CSN5/Jab1** と **CSN6** のみ **MPN** ドメインを持ち、他のサブユニット (**CSN1, 2, 3, 4, 7, 8**) は **PCI (proteasome, COP9, initiation factor 3)** ドメインを持つ (Wei N et al., 2008)。PCI ドメインと **MPN** ドメインは CSN 以外にも、タンパク質分解に関わるタンパク質複合体 **26S** プロテアソームの両端に存在する lid や、タンパク質の合成に関わる翻訳開始因子 **EIF3** (分子量約 750kDa) のサブユニットに認められ、高い相同性を示す (Glickman MH et al., 1998、Unbehaun A et al., 2004)。このことからこの 3 つの複合体が共通の祖先を持つこと、タンパク質の合成や分解に何らかの機能、シグナルクロストークによる共通制御が存在することが示唆される。Fig.1-3, Fig.1-4 にこれら 3 つの複合体の相同性と複合体形成の模式図を示す (Wei N et al., 2003; von Arnim AG and Schwechheimer C., 2006)。また Fig.1-5 に **MPN** ドメイン、**MPN+**ドメイン、**PCI** ドメインのアミノ酸配列の比較を示す (Maytal-Kivity Y et al., 2003; Maytal-Kivity Y et al., 2002)。

表 1 CSN5/Jab1 の相互作用因子と機能

Interactor	Function	Reference
c-Jun, JunD	AP-1 transcription activator	Claret FX et al., 1996
p27 <sup>Kip1</sup>	CDK inhibitor	Tomoda K et al., 1999
Bcl3	I $\kappa$ B family	Dechend R et al., 1999
LFA-1	Integrin receptor (leukocyte functional antigen 1)	Bianchi E et al., 2000; Perez OD et al., 2003
rLHR	Lutropin/choriogonadotropin receptor	Li S et al., 2000
Macrophage migration inhibitor factor (MIF)	Cytokine	Kleemann R et al., 2000
PR	Progesterone receptor	Chauchereau A et al., 2000
SRC-1	Steroid receptor coactivator	Chauchereau A et al., 2000
p53	Tumor suppressive transcription factor	Bech-Otschir D et al., 2001; Oh W et al., 2006a; Zhang XC et al., 2008
ER $\alpha$	Estrogen receptor $\alpha$	Callige M et al., 2005
P8		Malicet C et al., 2006
RUNX3	Runt-related transcription factor 3	Kim JH et al., 2009
WNVCP	West Nile Virus Capsid protein	Oh W et al., 2006b
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible transcription factor	Bae MK et al., 2002; Bemis L et al., 2004
Smad7	TGF- $\beta$ signal transducer	Kim BC et al., 2004
Smad4	TGF- $\beta$ signal transducer	Wan M et al., 2002
PGP9.5	Ubiquitin carboxy terminal hydrolase	Caballero OL et al., 2002
9-1-1 complex	DNA-damage sensor (Rad1-Rad9-Hus1 complex)	Huang J et al., 2007
EB1	Microtubule end-binding protein 1	Peth A et al., 2007
DNA topoisomerase II $\alpha$		Yun J et al., 2004
HPO	Hepatopoietin	Lu C et al., 2002
Hepatitis B virus X protein		Tanaka Y et al., 2006
Thioredoxin		Hwang CY et al., 2004
VDUP1		Jeon JH et al., 2005
HAND2	Transcription factor	Dai YS et al., 2004
Psoriasis		Emberley ED et al., 2003
L-type Ca <sup>2+</sup> channels		Kameda K et al., 2006
Pretease-activated receptor-2		Luo W et al., 2006
IRE1 $\alpha$		Oono K et al., 2004
53BP1	Mitotic checkpoint activation	Kwak HJ et al., 2005
E2F1	Transcription factor	Hallstrom TC and Nevins JR., 2006
Brn-2	POU transcription factor	Huang YT et al., 2005
Id3		Bounpheng MA et al., 1999
SMYD3	Histone methyl transferase	Mori M et al., 2008

(Kato JY and Yoneda-Kato N., 2009)

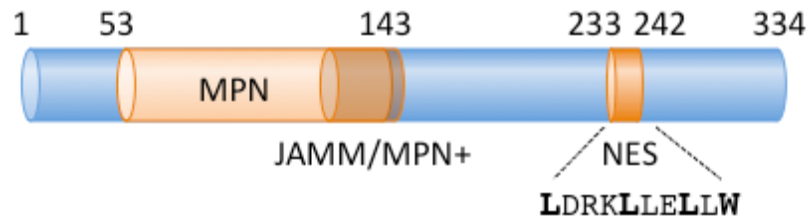


Fig.1-2 CSN5/Jab1 の構造の模式図

CSN5/Jab1 の構造を模式的に示したモデル図を示す。N 末端にタンパク質との相互作用に必要な MPN ドメイン、脱 NEDD8 化に必要な JAMM モチーフ (MPN+ドメイン)、C 末端に NES 配列を有する (Wei N et al., 2003)。

A.

	サブユニット	相同性 ヒト vs	相同性 ヒト vs
		シロイヌナズナ	分裂酵母
PCI/PINT Proteins	CSN1 (500 a.a.)	41%	25%
	CSN2 (443 a.a.)	60%	46%
	CSN3 (423 a.a.)	38%	19%
	CSN4 (405 a.a.)	48%	22%
	CSN7-a (275 a.a.)	28%	17%
	CSN7-b (264 a.a.)	32%	19%
	CSN8 (209 a.a.)	32%	-
	MPN Proteins	CSN5 (334 a.a.)	63%
CSN6 (297 a.a.)		38%	-

B.

	サブユニット(ヒト)	Lid (ヒト)		EIF3(ヒト)
		対応するサブユニット	相同性	対応するサブユニット
PCI/PINT Proteins	CSN1 (500 a.a.)	Rpn7	19%	EIF3a/c/e/m
	CSN2 (443 a.a.)	Rpn6	26%	EIF3a/c/e/m
	CSN3 (423 a.a.)	Rpn3	20%	EIF3I
	CSN4 (405 a.a.)	Rpn5	19%	EIF3a/c/e/m
	CSN7-a (275 a.a.)	Rpn9	18%	EIF3a/c/e/m
	CSN7-b (264 a.a.)	Rpn9	17%	EIF3a/c/e/m
	CSN8 (209 a.a.)	Rpn12	16%	EIF3k
	MPN Proteins	CSN5 (334 a.a.)	Rpn11	29%
CSN6 (297 a.a.)		Rpn8	24%	EIF3h

Fig.1-3 CSN、Lid、EIF3 の相同性

A. CSN のサブユニットの種間での相同性を示す。ヒトとシロイヌナズナの相同性を左側に、ヒトと分裂酵母の相同性を右側に記す。

B. 左側にヒト CSN のサブユニットとヒトプロテアソーム Lid の対応するサブユニットとその相同性を示し、右側にヒト CSN のサブユニットとヒト EIF3 の対応するサブユニットを示す (Wei N et al., 2003 より改変)。

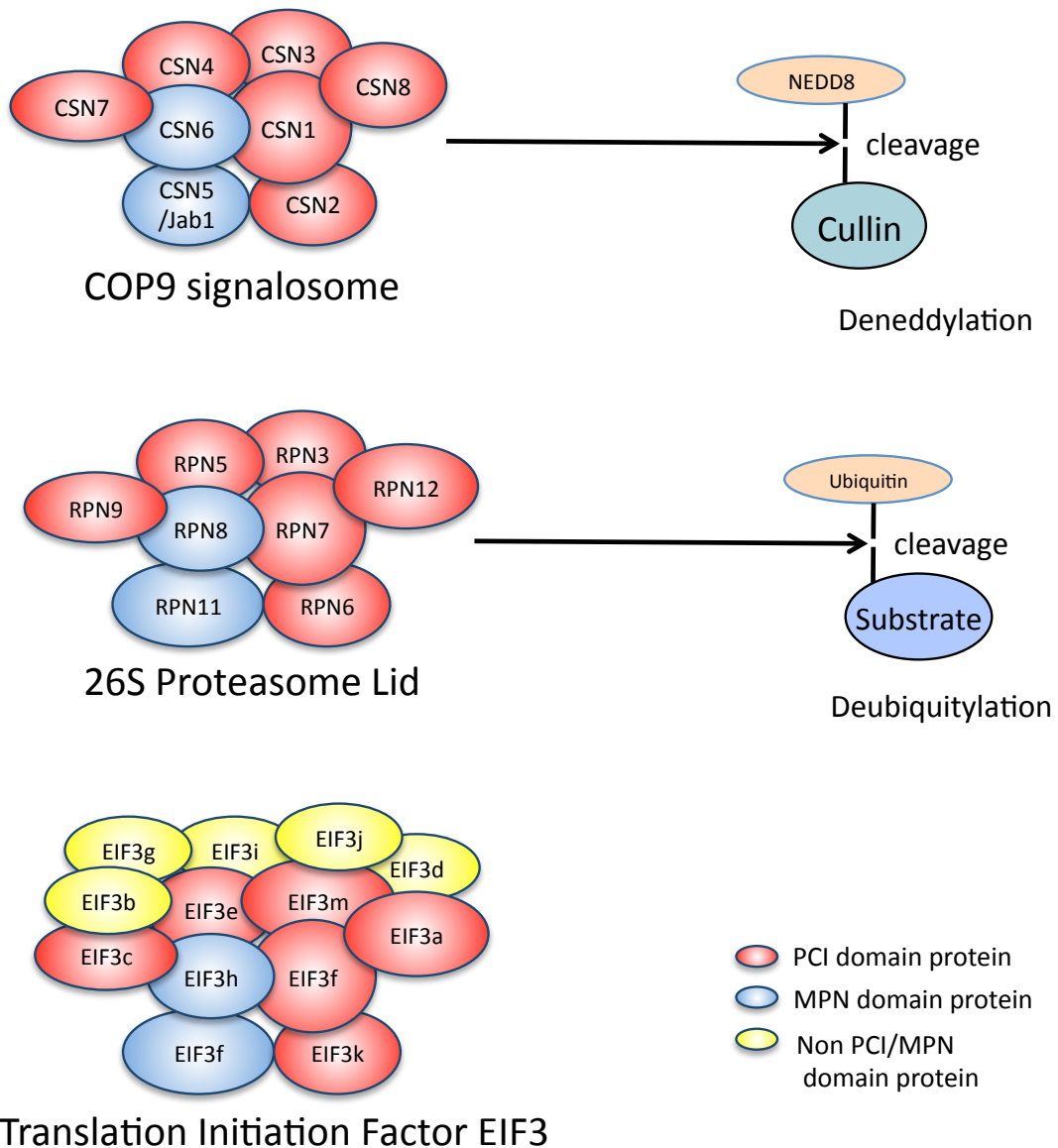


Fig.1-4 CSN、Lid、EIF3 の複合体形成のモデル図

CSN、Lid、EIF3 の複合体形成を模式的に示す。赤色に PCI ドメイン、青色に MPN ドメインを持つサブユニットを示し、黄色に PCI ドメインも MPN ドメインも持たないサブユニットを示す。CSN は Cullin から NEDD8 を切り離す活性を有し、プロテアソームの Lid は基質からユビキチンを切り離す活性を有する (von Arnim AG and Schwechheimer C., 2006)。

A.

		E		H H		S D	
ヒト	Rpn11	MEVMGLMLGEF	...	MVVGWYHSH	PGFGOWL	SGVDINTQ	MPN+
シロイヌナズナ	Rpn11	MEVMGLMLGEF	...	MVVGWYHSH	PGFGOWL	SGVDINTQ	MPN+
分裂酵母	Rpn11	MEVMGLMLGEF	...	MVVGWYHSH	PGFGOWL	SSVDINTQ	MPN+
出芽酵母	Rpn11	MEVMGLMLGEF	...	MVVGWYHSH	PGFGOWL	SSVDVNTQ	MPN+
ヒト	Rpn8	KRVVGVLLGSW	...	RIVGWYHTG	PKLHKNDI	AINELMK	-
シロイヌナズナ	Rpn8	KRVVGVLLGSS	...	HIVGWYSTG	KLRENDLD	VHALFN	-
分裂酵母	Rpn8	RFVVGILLGQN	...	KLVGWYHTG	PQLRPSDL	EINNLLK	-
出芽酵母	Rpn8	KRVGVVILGDA	...	KLIGWYHSG	PKLRSADL	KINELFK	-
ヒト	CSN5	LEVMGLMLGKV	...	NAVIGWYHSH	PGYGOWL	SGIDVSTQ	MPN+
シロイヌナズナ	CSN5a	IEIMGLMQGKT	...	NVVGWYHSH	PGYGOWL	SGIDVSTQ	MPN+
シロイヌナズナ	CSN5b	IEIMGLMQGKT	...	NVVGWYHSH	PGYGOWL	SGIDVSTQ	MPN+
分裂酵母	CSN5	LEVMGYVQGV	...	NVIGWYHSH	PNYGOWL	SGVDVETQ	MPN+
出芽酵母	CSN5	IEIMGILMGFT	...	NVVGWFHSH	PGYDOWL	SNIDIQTQ	MPN+
ヒト	CSN6	VQVIGALIGKQ	...	EELGWYTTGG	PPDPSDI	HVHKQVC	-
シロイヌナズナ	CSN6	PRVYGOVIGLQ	...	YVLGWYSTG	SDATESDM	HIHKALM	-
シロイヌナズナ	CSN6	PRVYGOVIGVQ	...	YILGWYSTG	SDAEESDM	HIHKALM	-
ヒト	EIF3f	ARVIGTLLGTV	...	LILGWYATG	HDITEHS	VLIHEYYS	-
シロイヌナズナ	EIF3f	ERVIGTLLGSI	...	TIVGWYSTG	AGVNGGS	SLIHDFYA	-
分裂酵母	EIF3f	QRVIGTLLGTR	...	VVVGWYATS	PDLDAE	SALIQNLYA	-
ヒト	EIF3h	EVVQGVLLGLV	...	LHVGWYQST	YYGSFV	TRALLDSQF	-
シロイヌナズナ	EIF3f	TVVIGQLLGLD	...	NTVGWYQST	VLGSYQT	VELIETFM	-
分裂酵母	EIF3h	MGTIGQLVGID	...	GHVGWYLG	AYVSSFLS	SPPFVETQ	-



B.

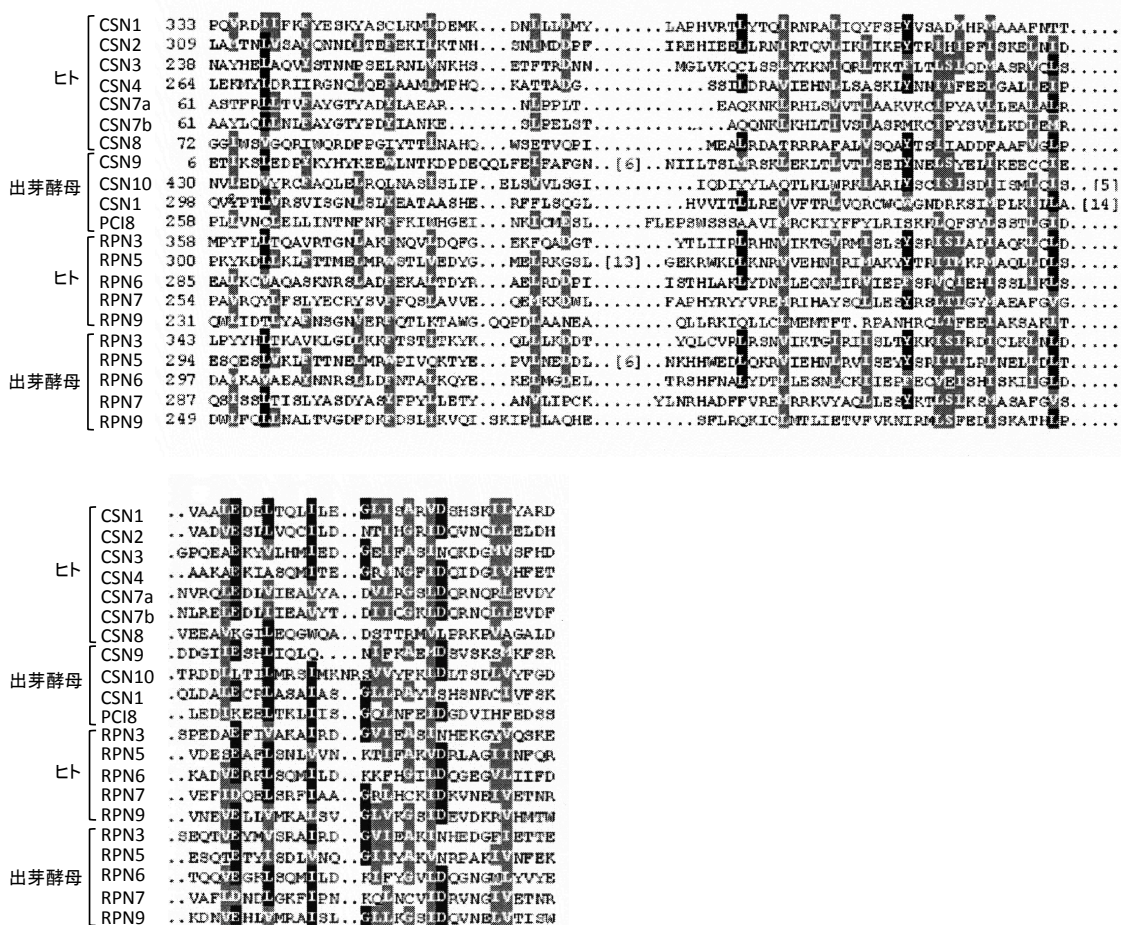


Fig.1-5 CSN、プロテアソーム Lid、EIF3 に保存されている MPN ドメイン (A)、PCI ドメイン (B) のアミノ酸比較

A. ヒト、シロイヌナズナ、酵母の CSN、プロテアソーム Lid、EIF3 に保存されている MPN ドメイン、MPN+ドメインのアミノ酸比較を示す。黒、灰色で示しているアミノ酸は全ての因子で 50%以上保存されている配列を示し、赤色で示している配列は MPN+ドメインを示す。上記のアミノ酸は MPN+ドメインを構成している配列を表す (Maytal-Kivity Y et al., 2003)。

B. ヒト、出芽酵母の CSN、プロテアソーム Lid に保存されている PCI ドメインのアミノ酸比較を示す。保存されているアミノ配列を黒、灰色で表す (Maytal-Kivity Y et al., 2002)。

### 1-3-3. CSN5/Jab1 の機能

CSN5/Jab1 は多機能性タンパク質であり、①脱 NEDD8 化による Cullin-RING ユビキチンリガーゼの活性制御、②転写制御、③タンパク質のリン酸化、④タンパク質の細胞内局在制御など多様な生化学的、生物学的機能に関与することが明らかにされている (Fig.1-6)。

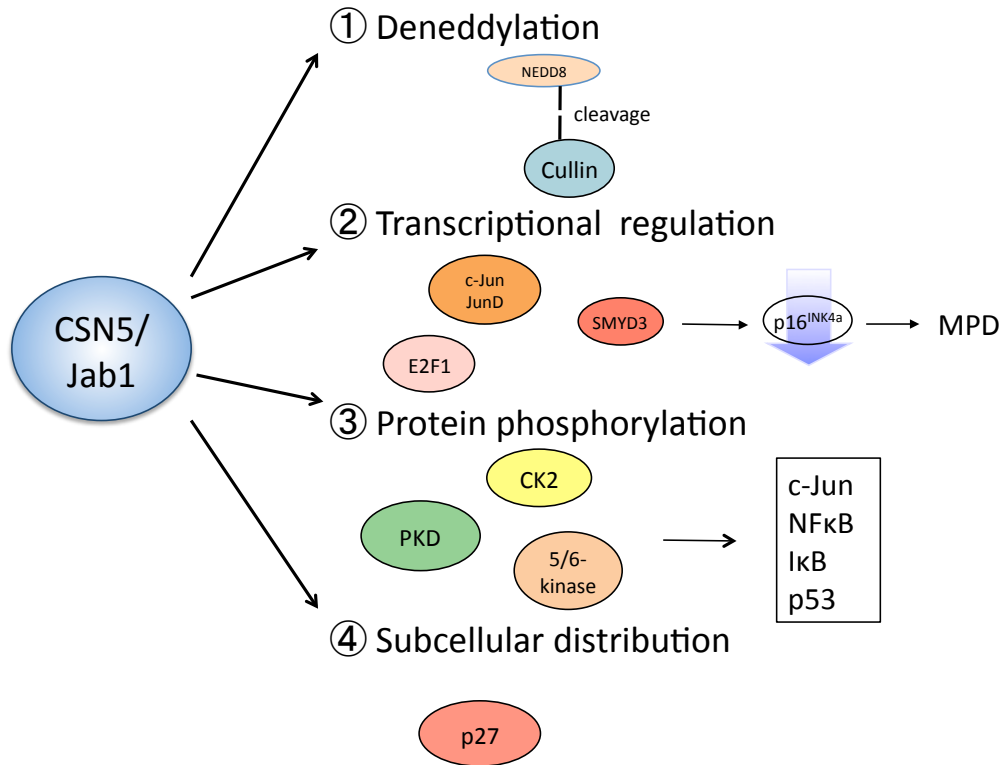


Fig.1-6 CSN5/Jab1 の機能

(Kato JY and Yoneda-Kato N., 2009)

1-3-3-1. 脱 NEDD8 化による Cullin-RING ユビキチンリガーゼ (CRL) の活性制御  
タンパク質の分解制御は CSN の機能の中でも最も研究が進んでいる (Schwechheimer C and Deng XW., 2001; Bech-Otschir D et al., 2002; von Arnim AG and Chamovitz DA., 2003; Cope GA and Deshaies RJ., 2003; Wolf DA et al., 2003)。SKP1/Cullin/F-box (SCF) や von Hippel-Lindau (VHL) などの CRL はユビキチンリガーゼ最大のファミリーであり、Cullin サブユニット (Cullin1, 2, 3, 4A, 4B, 5, 7) により異なった複合体を形成する (Petroski MD and Deshaies RJ., 2005)。CRL はユビキチン様タンパク質 NEDD8 が付加されることで活性化する (Chiba T

and Tanaka K., 2004)。NEDD8 は CRL の立体構造を変化させ、E2 を効率よく補充する効果があると考えられている。CSN はこの NEDD8 を Cullin から切り離す酵素（イソペプチダーゼ）活性を持ち（脱 NEDD8 化）、CSN の第 5 サブユニットである CSN5/Jab1 の JAMM モチーフ（MPN+ドメイン）が必須である。脱 NEDD8 化反応は CSN5/Jab1 単量体では機能せず CSN 複合体形成が必要とされる。CSN は Cullin サブユニットから NEDD8 を切り離すイソペプチダーゼ活性を持つことから、CSN の活性化は CRL の活性を負に制御すると考えられる。しかし実際は CSN の活性化は CRL の活性化に必須である。これは矛盾したように感じられるが、生体内において CRL 複合体は静的に安定した状態ではなく、アダプタータンパク質と基質が絶えず入れ代わっており、そのときに NEDD8 化反応と脱 NEDD8 化反応が繰り返し行われるためだと考えられている（Lyapina S et al., 2001; Schwechheimer C et al., 2001; Cope GA et al., 2002; Groisman R et al., 2003; Pintard L et al., 2003)。一方、NEDD8 化されていない Cullin は CAND1 (Cullin associated Nedd8 dissociated 1) が結合することにより CRL との結合が妨げられている。再び CRL が活性化するためには Cullin から CAND1 が解離すること及びアダプタータンパク質（SCF では SKP1）、基質認識サブユニット（SCF では F-box protein）の結合が必要である。Fig.1-7 に SCF を例に CRL の活性化サイクルの模式図を示した（Schwechheimer C and Isono E., 2010)。

SCF の Cul1 サブユニットの脱 Nedd8 化が F-box サブユニットの自己ユビキチン化を抑制し、その結果 CRL の活性を保持することも報告もされている（Burger-Kentischer A et al., 2005; Cope GA et al., 2002; Cope GA and Deshaies R., 2006)。ヌクレオチド除去修復においては損傷した DNA を認識する過程に参与している CSA、DDB2 は DDB1、Roc1、Cullin4A と複合体を形成しており、この複合体の活性制御も Cullin4A の脱 NEDD8 化によることが示されている（Groisman R et al., 2003)。

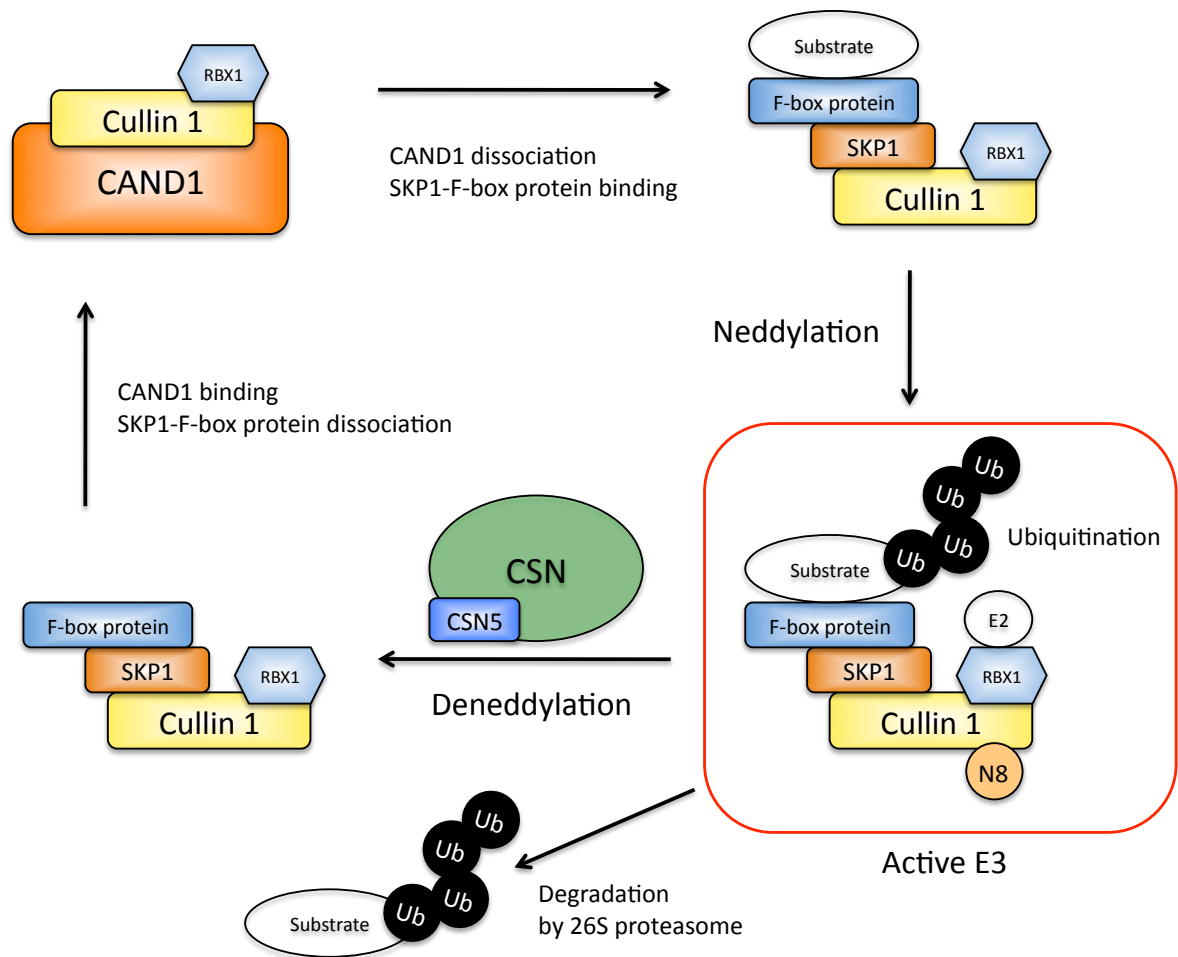


Fig.1-7 SCFの活性化サイクルのモデル図

E3 ユビキチンリガーゼ複合体の形成と活性化サイクルにおける NEDD8 化と CSN 依存的な脱 NEDD8 化の役割を模式的に示す。CAND1, Cullin associated NEDD8 Dissociated 1; RBX1, Ring Box; Ub, Ubiquitin; N8, NEDD8 を表す (Schwechheimer C and Isono E., 2010)。

### 1-3-3-2. 転写制御

CSN、各サブユニットの相互作用因子の中でも転写因子は多く、CSN の機能を解明するためには CSN の転写制御における研究が重要である (Chamovitz DA., 2009)。CSN5/Jab1 は c-Jun の転写活性化補助因子として最初に同定されたが、Jun ファミリー (c-Jun、JunB、JunD、v-Jun) のうち JunB と v-Jun は CSN5/Jab1 との相互作用が認められなかった。このように CSN5/Jab1 は同じファミリー内の因子において転写の特異性を担うことから、特異的因子と位置づけられている (Claret FX et al., 1996)。他にも CSN5/Jab1 は転写因子 E2F ファミリーの中でも E2F-1 と特異的に直接結合し、E2F-1 の誘導するアポトーシスを亢進させることも報告されている (Hallstrom TC and Nevins JR., 2006)。しかし、CSN5/Jab1 がどのように転写活性を制御しているのか明らかでない。近年、CSN5/Jab1 や CSN 複合体がクロマチンに結合し、転写を制御することが報告されている (Menon S et al., 2007)。

### 1-3-3-3. タンパク質のリン酸化

赤血球の細胞抽出液から精製された CSN 複合体にキナーゼ活性があり、c-Jun、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B、p53 などの基質をリン酸化することが示された (Seeger M et al., 1998; Bech-Otschir D et al., 2001)。特にがん抑制タンパク質 p53 は CSN5/Jab1 の N 末端と相互作用することによりリン酸化され、ユビキチン-26S プロテアソームシステムにより分解される (Bech-Otschir D et al., 2001)。さらに CSN5/Jab1 の N 末端領域と p53 が相互作用することによって、p53 の CRM1 依存的な細胞質局在を誘導し、HDM2 と協調することによって p53 の細胞質局在を亢進させ、分解を誘導することも報告されている (Oh W et al., 2006a)。

### 1-3-3-4. タンパク質の局在制御

CSN5/Jab1 は CDK インヒビター p27、がん抑制タンパク質 p53、RUNX3、9-1-1 複合体、WNVCp など多くのタンパク質の局在制御に関与している (Tomoda K et al., 1999; Oh W et al., 2006a; Kim JH et al., 2009; Huang J et al., 2007; Oh W et al., 2006b)。CDK インヒビター p27 の場合、哺乳類細胞内で CSN5/Jab1 を過剰発現させると、p27 が核から細胞質へ移行し、分解誘導されることにより細胞内の p27 タンパク質量が減少することが示されている (Tomoda K et al., 1999)。p27 は NES 配列を持たないため、この核外移行には CSN5/Jab1 の NES 配列が必要であると考えられる (Tomoda K et al., 2002)。これらのことから CSN5/Jab1 のリン酸化活性及び核外移行ががん抑制遺伝子 p53 や p27 のタンパク質量を調節し、細胞周期を制御していることが示された。

#### 1-4. COP9 signalosome (CSN) とマウスモデル

CSN の第 2、3、5、8 サブユニットの単独ノックアウトマウスが作製、解析されている。CSN2 ノックアウトマウスは着床前の胚発達で細胞増殖が休止し、発生初期の E3.5 で胎生致死の表現型を示す。CSN2  $-/-$  の胚盤胞では CSN 複合体が崩壊し、cyclin E、がん抑制タンパク質 p53、CDK インヒビター p21 の発現量が上昇する (Lykke-Andersen K et al., 2003)。CSN3 ノックアウトマウスは E5.5~E7.5 で胎生致死の表現型を示す。CSN3  $-/-$  の胚盤胞を用いて免疫染色法で解析した結果、CSN 複合体を検出できないことから CSN3 は COP9 signalosome 複合体の維持に重要な機能を果たしているということが示唆された (Yan J et al., 2003)。同様に CSN5 (後述)、CSN8 ノックアウトマウスも胎生致死である (Tomoda K et al., 2004; Menon S et al., 2007)。CSN のいずれのサブユニットのノックアウトマウスも早期の胎生致死であることから、CSN が発生段階において重要な役割を果たすことが示された。しかし、その機能は未知な部分が多い。

CRL のサブユニットである Cullin のノックアウトも胎生致死である。Cul1 のノックアウトマウスは胎生 6.5 日で致死となり、サイクリン E の発現量が増加しており (Dealy MJ et al., 1999; Wang Y et al., 1999)、Cul4A のノックアウトマウスも胎生 4.5~7.5 日で致死となる (Li B et al., 2002)。また NEDD8 システムにおいて不可欠な NEDD8 活性化酵素 Uba3 のノックアウトマウスも胎生致死である (Tateishi K et al., 2001)。CRL のサブユニットや NEDD8 システムのノックアウトマウスが胎生致死であることにより CSN の脱 NEDD8 化による CRL の活性制御が重要であることが *in vivo* において示された。

#### 1-5. CSN5/Jab1 ノックアウトマウス

生理的な CSN5/Jab1 の機能を明らかにするため、本研究室で CSN5/Jab1 のノックアウト (CSN5/Jab1  $-/-$ ) マウスが作製、解析された。CSN5/Jab1 ノックアウトマウスは E6.5~E7.5 で胎生致死の表現型を示した。CSN5/Jab1  $-/-$  の胚盤胞では細胞増殖が大幅に抑制され、アポトーシスが亢進し、CDK インヒビター p27、がん抑制遺伝子 p53、Cyclin E の発現量の増加が認められた。CSN5/Jab1 ノックアウトマウスが胎生致死であるため、CSN5/Jab1 の発現量が野生型の約 70%程度である CSN5/Jab1 ヘテロ (CSN5/Jab1  $+/-$ ) マウスを用いて解析が進められた。CSN5/Jab1  $+/-$  マウスは目立った特徴もなく健康に成長し、生殖能力を保持しているが、野生型に比べ小型という表現型を示した。さらに胚性線維芽細胞 (MEF) を用いた解析により、CSN5/Jab1  $+/-$  MEF では野生型 MEF より p27 の発現量が増加すること、細胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期から S 期への進行が遅延すること、それに伴い細胞増殖能が低下することが明らかになった。これらノックアウトマウスを用いた解析結果から CSN5/Jab1 が細

胞の生存や増殖に必須であることが証明された (Tomoda K et al., 2004)。

#### 1-6. CSN5/Jab1 コンディショナルノックアウトマウス (T 細胞)

2008 年 Pardi 博士らにより T 細胞におけるコンディショナルノックアウトマウスが作製された。CSN5/Jab1 を欠損した T 細胞では細胞周期進行が抑制され、G0 期から G1 期への移行が阻害された。CSN5/Jab1 が生理的な T 細胞の恒常性に必須であることが示された (Panattoni M et al., 2008)。

#### 1-7. CSN5/Jab1 トランスジェニックマウス

細胞の生存、増殖には CSN5/Jab1 が必要不可欠であること、また様々ながんで CSN5/Jab1 の過剰発現が認められることから、CSN5/Jab1 ががん遺伝子として機能することが考えられる (Kato JY and Yoneda-Kato ., 2009)。例えば、慢性骨髄性白血病は第 9 染色体と第 22 染色体間の転座によって生じる Bcr-Abl が原因であるが、Bcr-Abl が MAP (mitogen-activated protein) キナーゼ経路や PI3 (phosphatidylinositol3) キナーゼ経路を介して CSN5/Jab1 に作用し、p27 の発現量を減少させる。Bcr-Abl の阻害剤である STI571 で細胞を処理する、あるいは CSN5/Jab1 の siRNA を行うことで p27 の発現量は回復し、G1 期停止が誘導される (Tomoda K et al., 2005)。このように部分的な解明は見られるものの、CSN5/Jab1 とがん化における直接的な関係性は不明である。

CSN5/Jab1 ががん形成にどのように関与するか調べるため、本研究室では CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスを作製し、解析した。CSN5/Jab1 遺伝子座が欠損している CSN5/Jab1<sup>-/-</sup>、CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの掛け合わせのマウスが生存することから、外来的に導入した CSN5/Jab1 遺伝子が CSN5/Jab1 として機能することが示された。CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスは正常に生まれ、外見的には野生型とほとんど変化なかったが、生後半年を過ぎた辺りから骨髄増殖性疾患 (MPD; Myeloproliferative Disorder) を引き起こした。MPD を発症した CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの骨髄細胞を解析した結果、造血幹細胞のプールが増大すること、CDK インヒビター p16<sup>INK4a</sup> の発現量が減少していることを見出した。さらに MPD を発症したマウスでは、脾臓肥大が観察され、脾細胞をフローサイトメトリーにより調べた結果、脾臓中に好中球の蓄積が見られた。一方、CSN5/Jab1<sup>+/-</sup>マウスでは骨髄における造血幹細胞のプールが野生型マウスに比べて減少した。野生型マウスと Jab1<sup>+/-</sup>マウスに DNA 合成阻害剤である 5-FU を投与し成熟した骨髄細胞を破壊後、残存している 5-FU 耐性造血幹細胞の造血能を定期的な血液検査で調べた結果、Jab1<sup>+/-</sup>マウスは野生型マウスに比べて造血の回復に遅延が認められた。これらマウスモデルを用いた研究から CSN5/Jab1 の造血における重要

性を明らかにすると同時に CSN5/Jab1 ががん遺伝子として機能することを *in vivo* で証明した (Mori M et al., 2008)。

本論文の結果 3-1 では CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの骨髄細胞において CDK インヒビター p16<sup>INK4a</sup> の発現量がどのようなメカニズムで減少するか調べた。CSN5/Jab1 が新たに p16<sup>INK4a</sup> の発現量を減少させることを示したが、CSN5/Jab1 は他にも CDK インヒビター p27、がん抑制タンパク質 p53 と相互作用し、分解に導くことが報告されている。これらの因子は全て細胞周期を負に制御する役割を担っているが細胞周期制御における作用機序は様々であり、CSN5/Jab1 の細胞周期進行における特異的作用点は不明であった。このことから本論文結果 3-2 以降では哺乳類細胞における細胞周期制御の分子メカニズムを明らかにするために、CSN5/Jab1 の条件性ノックアウトマウス由来の胚性線維芽細胞を用いて CSN5/Jab1 が細胞周期進行に与える影響を詳細に検討した。



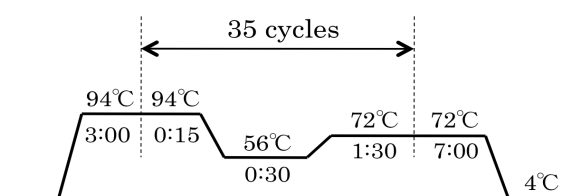
## 2. 材料と方法

### 2-1. 遺伝子改変マウス胚性線維芽細胞 (MEF) の作製

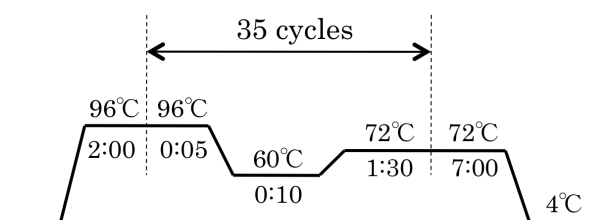
CSN5/Jab1<sup>+/*flox*</sup> (Panattoni M et al., 2008) の雄マウスと CSN5/Jab1<sup>+/*+*</sup> (Tomoda K et al., 2004) の雌マウスをかけ合わせ、CSN5/Jab1<sup>-/*flox*</sup> マウスを作製した。作製した CSN5/Jab1<sup>-/*flox*</sup> マウスの雄と雌をかけ合わせ、plug を確認し 13.5 日後の胎児より MEF を作製した。その後、ゲノム DNA を回収し、PCR により遺伝子型を決定し、実験に用いた。

○使用したプライマーと反応条件

flox allele : Fw 5'-GGT CAG AAA GCT AGG CCT AAG AAG G-3'  
Rv 5'-GGG CTT AGG AAT GCC AAG C-3'



K.O allele : Fw 5'-TCC GGA GAT ACT TAC ACC TCT GTT TCT C-3'  
Rw 5'-CCT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA AT-3'



### 2-2. 細胞培養

本研究ではマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞株 293T 細胞、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を使用した。NIH3T3 細胞、293T 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% Fetal bovine serum (FBS)、100 units/ml Penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin (GIBCO/BRL) を加えた培地を用いた。MEF 培養時にはさらに 2mM glutamine、0.1mM non essential amino acids (NEAA) を加えた培地を用いた。培養は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で行った。細胞を G0/G1 期に

同調させる際には 0.2% FBS、100 units/ml Penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin (GIBCO/BRL) を含む DMEM で 48 時間細胞を培養した。

### 2-3. CSN5/Jab1 変異体の作製と発現ベクターの構築

CSN5/Jab1 の Nuclear Export signal (NES) 変異体 ( $\Delta$ NES; L237/240/241A) は NES 配列の保存された 237、240、241 番目のロイシンを PCR によりアラニンに置換して作製した (Tomoda K et al., 2002)。CSN5/Jab1 の JAMM モチーフ変異体 ( $\Delta$ JAMM; D151N) は保存された 151 番目のアスパラギン酸を PCR によりアスパラギンに置換して作製した (Cope GA et al., 2002)。CSN5/Jab1、CRE (大里博士により供与) は pMSCV-ires-GFP ベクター (Owen Witte 博士により供与) に Subcloning して用いた。

### 2-4. フローサイトメトリーを用いた解析

#### 2-4-1. 細胞のソーティング

細胞を洗浄し、トリプシン処理をして剥がした細胞を DMEM で懸濁し、PBS で洗浄後、再び PBS に懸濁した。GFP 陽性細胞の割合を FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) により測定した。GFP 陽性細胞のソーティングは FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson) を用いた。

#### 2-4-2. 細胞周期の解析

細胞を洗浄し、トリプシン処理をして剥がした細胞を DMEM で懸濁し、PBS で洗浄後、1  $\mu$ g/ml の RNase を含む 1ml の Propidium Iodide (PI) 溶液 (50  $\mu$ g/ml PI、0.1% TritonX-100、0.1% Sodium Citrate) で、室温、30 分間染色した。PI により染色された DNA 量を FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) により測定した。Sub G1 細胞の割合は Modifit cell cycle software を用いて解析した。

### 2-5. タンパク質解析

#### 2-5-1. SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング

細胞を PBS で洗浄し、2000KIU/ $\mu$ l Aprotinin、1mM PMSF、0.1mM Sodium Fluoride (NaF)、0.1mM Sodium Ophthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )、10mM  $\beta$ -Glycerophosphate を含む EBC buffer (50mM Tris-HCl pH8.0、120mM NaCl、1mM EDTA、0.5% NP40) で 4°C、30 分間、細胞を溶解した。遠心分離により可溶性画分を回収し、細胞抽出液とした。調製した細胞抽出液に等量の 2 $\times$  SDS sample buffer (80mM Tris-HCl pH6.8、0.2M DTT、2% SDS、20% glycerol、0.1% Bromophenol Blue) を加え、5 分間煮沸し、SDS-PAGE によりタンパク質を分離

した。SDS-PAGE後のゲルをPVDF膜（Millipore）へ100 mAで一晩転写した。転写後の膜を5% BSAでブロッキングし、5% BSAで希釈した任意の一次抗体と反応させた。PVDF膜を洗浄後、2.5% skim milkでブロッキングし、2.5% skim milkで希釈したHorse radish peroxidase（HRP）標識された二次抗体（GE Healthcare Bioscience）と反応させた。PVDF膜を洗浄後、ECLプロットティングシステム（GE Healthcare Bioscience）を用いてシグナルを検出した。

○使用した一次抗体

一次抗体	二次抗体	提供元
CSN1	rabbit	本研究室で作製
CSN2	rabbit	本研究室で作製
CSN3	rabbit	本研究室で作製
CSN4	rabbit	本研究室で作製
CSN5/Jab1	rabbit	本研究室で作製
CSN6	rabbit	本研究室で作製
CSN7a	rabbit	本研究室で作製
CSN7b	rabbit	本研究室で作製
CSN8	rabbit	本研究室で作製
Cul1	rabbit	本研究室で作製
Cul4	rabbit	本研究室で作製
p53	rabbit	本研究室で作製
p21	rabbit	本研究室で作製
Skp2	rabbit	本研究室で作製
Geminin	rabbit	広島大学瀧原博士より分与
p16 (M-156)	rabbit	Santa Cruz
cyclin D1 (72-13G)	mouse	Santa Cruz
cyclin E (M-20)	rabbit	Santa Cruz
cyclin A (C-19)	rabbit	Santa Cruz
Cdc2 (17)	mouse	Santa Cruz
Cdk2 (M2)	rabbit	Santa Cruz
Cdk4 (C-22)	rabbit	Santa Cruz
$\gamma$ tubulin (GTU-88)	mouse	Sigma

2-5-2. NATIVE-PAGE、ウェスタンブロットティング

細胞をPBSで洗浄し、2000KIU/ $\mu$ l Aprotinin、1mM PMSF、0.1mM Sodium Fluoride (NaF)、0.1mM Sodium Ophovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )、10mM  $\beta$ -Glycerophosphateを含むlysis buffer（50mM Tris-HCl pH8.0、120mM NaCl、1mM EDTA、0.1% digitonin）で4°C、30分間、細胞を溶解した。遠心分離により可溶性画分を回収し、細胞抽出液とした。調製した細胞抽出液に1/5量の6×sample buffer（240mM Tris-HCl pH6.8、60% glycerol）を加え、プレキャストnative gradient gels（5%-15%; Bio-Craft）を用いて泳動し、抗CSN5/Jab1抗体（本研究室で作製）を用いてウェスタンブロットティングを行った。

### 2-5-3. 免疫沈降法

細胞を PBS で洗浄し、2000KIU/ $\mu$ l Aprotinin、1mM PMSF、0.1mM Sodium Fluoride (NaF)、0.1mM Sodium Ophthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )、10mM  $\beta$ -Glycerophosphate を含む EBC buffer (50mM Tris-HCl pH8.0、120mM NaCl、1mM EDTA、0.5% NP40) で 4°C、30 分間、細胞を溶解した。遠心分離により可溶性画分を回収し、細胞抽出液とした。作製した細胞抽出液と抗 CSN1 抗体 (本研究室で作製) を 4°C、over night 反応させた。免疫沈降物と protein A Sepharose beads (Pharmacia Biotech) を 4°C、2 時間反応させた。Beads を洗浄後、1×SDS sample buffer (40mM Tris-HCl pH6.8、0.1M DTT、1% SDS、10% glycerol、0.05% Bromophenol Blue) を加え、5 分煮沸し、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、ウェスタンブロッティングにより解析した。

### 2-5-4. クロマチン免疫沈降法

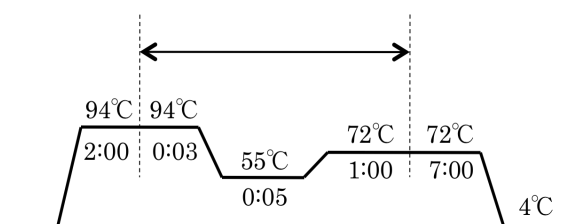
洗浄した細胞を fixation buffer (1% formaldehyde、5mM HEPES pH8.0、10mM NaCl、0.5mM EDTA pH8.0) で 10 分間処理し、細胞をクロスリンクした。1.5M Glycine を用いて反応を停止させ、洗浄後、2000KIU/ $\mu$ l Aprotinin、1mM PMSF を含む SDS lysis buffer (50mM Tris-HCl pH8.0、10mM NaCl、1% SDS) で 4°C、10 分間細胞を溶解した。超音波破碎によってゲノム DNA を断片化した後、遠心分離により可溶性画分を回収し、細胞抽出液とした。作製した細胞抽出液と抗 SMYD3 抗体 (本研究室で作製)、抗 CSN5/Jab1 抗体 (本研究室で作製) を 4°C、over night 反応させた。免疫沈降物と protein A Sepharose beads (Pharmacia Biotech) を 4°C、2 時間反応させた。Beads を洗浄後、DNA を精製し、マウス p16<sup>INK4a</sup> プロモーター特異的プライマーを用いて PCR を行った。

#### ○使用したプライマーと反応条件

マウス p16<sup>INK4a</sup> プロモーター

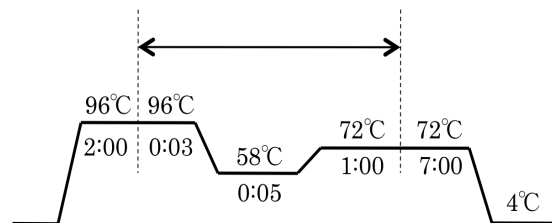
Fw 5'-GGT ATA ATA TAA GGT GAG ACT CTC CTT TC-3'

Rv 5'-TCC CCA TAT TCT TTA TAT GGC CAC AGC TAT T-3'



ヒト p16<sup>INK4a</sup> プロモーター

Fw 5'-ACT CTG CTT CTA GAA CAC TGA GCA CTT TTT CTG-3'  
Rv 5'-TAG TTG TGA GAG CCC CAC CGA GAA TCG AAA TC-3'



## 2-5. 免疫染色法

カバーガラス上に接着させた細胞を 4% paraformaldehyde で 10 分間固定した。0.5% Triton in PBS で細胞を処理し、hoechst 33342 で 2 分間 DNA を染色し、サンプルとした。

BrdU 取り込み実験においては、10  $\mu$  M bromodeoxyuridine (BrdU) を含む培地で 15 分間培養した細胞を 1.5M HCl で処理し、抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (Amersham Biosciences) を用いて免疫染色した。細胞を洗浄後、FITC で標識した抗マウス IgG 抗体を二次抗体として反応させ、サンプルとした。調製したサンプルを位相差顕微鏡または蛍光顕微鏡で観察した。

## 2-6. Senescence associated $\beta$ -gal (SA- $\beta$ -gal) assay

細胞を 0.25% glutaraldehyde で固定し、X-Gal 溶液 (0.2% X-gal、2 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>、5 mM K<sub>4</sub>Fe[CN]<sub>6</sub> in PBS pH6.0) で 16~24 時間インキュベーションし、位相差顕微鏡で観察した。

### 3. 結果

#### 3-1. CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの解析

マウスにおいて CSN5/Jab1 の発現量は成体より活発に増殖している胚の時期に高い (Bounpheng MA et al., 2000)。また CSN5/Jab1 ノックアウトマウスの胚細胞では細胞増殖が消失し、アポトーシスが亢進する。野生型マウスより発現量が約 30% 減少した CSN5/Jab1 ヘテロノックアウトマウスの大きさが野生型のマウスより小さく、このマウスから作製した胚性線維芽細胞 (MEF) は野生型 MEF より細胞増殖に遅延が見られる (Tomoda K et al., 2004)。これらの知見は全て CSN5/Jab1 が細胞増殖に必須の因子であることを示す。さらに様々な人のがんにおいて CSN5/Jab1 の過剰発現が認められることから、CSN5/Jab1 ががん遺伝子として機能することが示唆される。しかし、がん細胞で CSN5/Jab1 が過剰発現している生理学的意義、がん細胞の増殖に CSN5/Jab1 がどのように関与しているかの分子メカニズムは不明であった。そこで私たちは CSN5/Jab1 のトランスジェニックマウスを作製し、解析した (Mori et al., 2008)。CSN5/Jab1 のトランスジェニックマウスは正常に生まれ、体の大きさや行動など野生型と比較して特に顕著な差は見られなかった。しかし 6 ヶ月を過ぎたあたりから末梢血中における白血球数が増加し、貧血を伴う骨髄増殖性疾患 (MPD; Myeloproliferative disease) を発症した。フローサイトメトリーを用いた解析の結果、CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの骨髄内に存在する造血幹細胞のプールが野生型マウスと比べて増大すること、脾臓内に顆粒球が蓄積することが明らかとなった。また移植実験により異常な造血幹細胞の増加や増殖能の獲得は環境的因子に起因するのではなく、細胞自律的であることが示された。

次にどのように CSN5/Jab1 が造血幹細胞の維持や増殖に関与しているのか分子メカニズムを明らかにするために骨髄細胞における様々な細胞周期制御因子、シグナル伝達経路に関与する因子の発現量を RT-PCR により調べた。その結果、CDK インヒビター p16<sup>INK4a</sup> の発現量が特異的に減少することを見出した (Fig.3-1a)。p16<sup>INK4a</sup> は培養細胞で老化とともに発現量が上昇する老化マーカーとして知られている。p16<sup>INK4a</sup> は培養細胞レベルだけでなく、マウスの加齢とともにマウス生体内の造血幹細胞においても発現量が上昇し、それに伴い造血幹細胞の機能としての骨髄再構築能や生着能が減少する (Janzen V et al., 2006)。p16<sup>INK4a</sup> は CDK に結合し、CDK 活性を抑制するがん抑制遺伝子として単離され、ヒトの悪性腫瘍において約半分で失活が認められており、p16<sup>INK4a</sup> が細胞のがん化、老化に直接関与していることが示唆される。また p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子座は JunB、Ets、Myc など様々な転写因子による制御のみならず、Bmi1 などのポリコム遺伝子群においても転写レベルで制御されてい

る (Gil J and Peters G., 2006; Sherr CJ., 2006)。これらの知見から、CSN5/Jab1 は直接 DNA と結合できないため CSN5/Jab1 が他の因子と結合し、p16<sup>INK4a</sup> のプロモーターに作用することで、p16<sup>INK4a</sup> の発現量を転写レベルで減少させることが考えられた。そこで CSN5/Jab1 の新規相互作用因子を単離するために本研究室でイーストツーハイブリッドスクリーニングが行われた。同定された複数の新規相互作用因子の中で SET and MYND domain containing 3 (SMYD3) に着目した。SMYD3 は Set ドメインを持つヒストンメチルトランスフェラーゼであり、特異的 DNA 配列を認識して標的遺伝子の転写を制御する転写因子である他、直腸がんや肝がんなどヒトの癌で過剰発現が認められている (Hamamoto R et al., 2004)。近年、ポリコーム遺伝子群を含めたヒストンの部位特異的メチル化やアセチル化などの修飾は遺伝子発現を正負に制御するということが示されており、CSN5/Jab1 と SMYD3 が協調的に働き p16<sup>INK4a</sup> を制御していると推測された。実際に SMYD3 が p16<sup>INK4a</sup> プロモーター上に存在するか ChIP assay により解析した。HEK293T 細胞に SMYD3 発現ベクターと CSN5/Jab1 発現ベクターを遺伝子導入し、抗 SMYD3 抗体を用いて免疫沈降後、共沈した DNA を精製し、p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、SMYD3 が p16<sup>INK4a</sup> プロモーター上に結合した (Fig.3-1b-A)。次に p16<sup>INK4a</sup> の発現量が減少している CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの骨髄細胞を用いて同様に ChIP assay を行った。その結果、内在性の SMYD3 が p16<sup>INK4a</sup> プロモーター上に結合した (Fig.3-1b-B)。SMYD3 はヒストン H3-lysine4 を特異的にメチル化し、遺伝子発現を活性化させる転写因子であることから、同様の事象により p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子を制御していると考えられた。しかし、CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの骨髄細胞では p16<sup>INK4a</sup> の発現量が減少している。この矛盾を解決するためにヒストンメチル化抗体を用いて ChIP assay を行い、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子座のヒストン修飾の状態を解析した。p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子座が欠損しているマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞に p16<sup>INK4a</sup> のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結させたコンストラクト、CSN5/Jab1 発現ベクター、SMYD3 発現ベクターを遺伝子導入し、抗 Histone H3 抗体、抗 dimethyl H3K4 抗体、抗 trimethyl H3K4 抗体、抗 dimethyl H3K9 抗体を用いて免疫沈降後、共沈した DNA を精製し、p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター特異的なプライマーを用いて PCR を行った。しかし、ヒストンのメチル化において顕著な差は認められなかった (Fig.3-1c)。この結果から SMYD3 が H3-lysine4 のメチル化ではなく、他のヒストンのメチル化または他のタンパク質のメチル化を介して、p16<sup>INK4a</sup> の発現量を負に制御していると結論付けた。これら CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの解析から、過剰発現した CSN5/Jab1 が SMYD3 と協調的に p16<sup>INK4a</sup> プロモーター上に結合し、p16<sup>INK4a</sup> の発現量を減少させることで造血幹細胞のプールが増大し、最終的に MPD を発症する分子メカニズムを見出した。

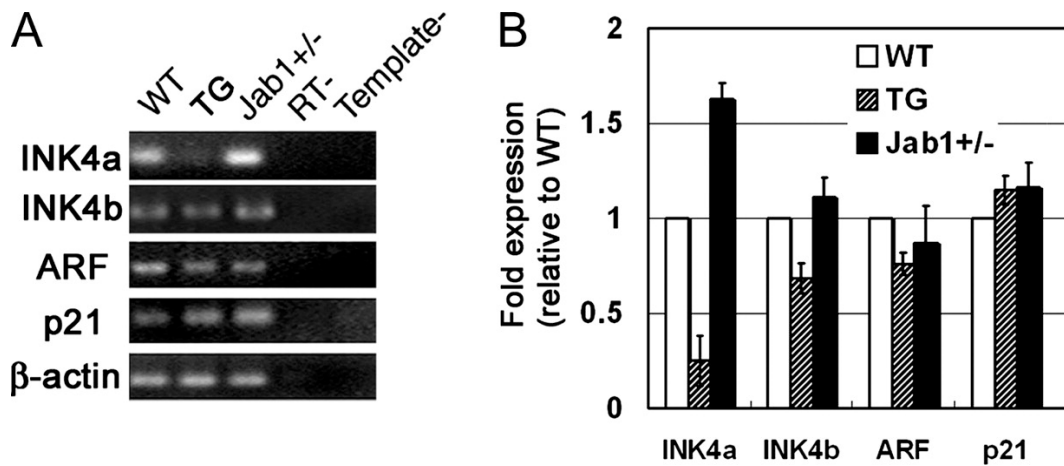


Fig.3-1a 骨髄細胞を用いた RT-PCR

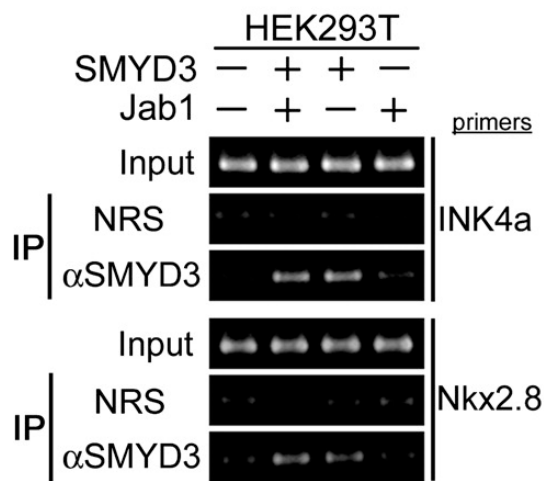
A. 野生型マウスと CSN5/Jab1 トランスジェニックマウス、CSN5/Jab1+/-マウスの骨髄細胞から RNA を抽出し、パネル左に示す因子を特異的に増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行った。RT-は逆転写を行っていないサンプルを鋳型に用いている。

B. A で行った実験において、野生型マウスの細胞の  $\beta$ -actin を 1.0 として各因子の発現量を数値化し、グラフ化した。

(Mori M et al., 2008)



A.



B.

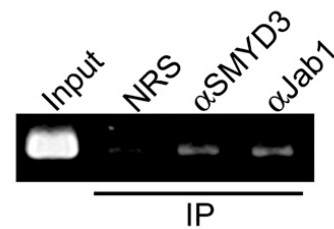


Fig.3-1b. SMYD3 は p16<sup>INK4a</sup> のプロモーターに結合する

A. パネル上に示すように SMYD3、CSN5/Jab1 を遺伝子導入した HEK293T 細胞を固定し、超音波破碎後、細胞抽出液を作製した。細胞抽出液を抗 SMYD3 抗体、NRS (normal rabbit serum) で免疫沈降後、DNA を精製し p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター領域を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行った。Nkx2.8 はポジティブコントロールとして用いた。

B. CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの骨髓細胞を固定し、超音波破碎後、細胞抽出液を作製した。細胞抽出液を抗 SMYD3 抗体、抗 CSN5/Jab1 抗体、NRS で免疫沈降後、DNA を精製し p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター領域を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行った。

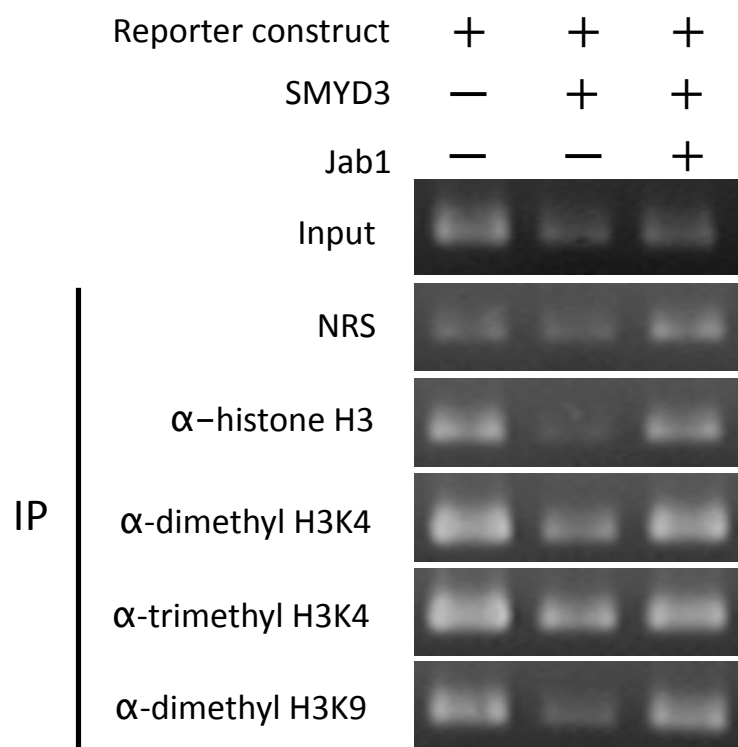


Fig. 3-1c メチル化抗体を用いた ChIP assay

SMYD3 発現ベクター、CSN5/Jab1 発現ベクター、p16 プロモーター領域を含んだレポーターコンストラクトをパネル上に示すように遺伝子導入した NIH3T3 細胞を formaldehyde で固定し、超音波破碎後、細胞抽出液を作製した。作製した細胞抽出液をパネル左に示すように抗 histone H3 抗体、抗 dimethylated histone H3K4 抗体、抗 trimethylated histone H3K4 抗体、抗 dimethylated histone H3K9 抗体、NRS で免疫沈降後、DNA を精製し、p16 プロモーター領域を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行った。

### 3-2. 条件性 CSN5/Jab1 ノックアウトマウスを用いた研究

CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの研究により造血幹細胞における CSN5/Jab1 の重要性を初めて見出した。次に正常なマウスの造血幹細胞の維持に CSN5/Jab1 がどのように関与しているのか分子メカニズムを明らかにする必要がある。しかし CSN5/Jab1 の全身でのノックアウトマウスは早期の胎生致死 (E6.5~E7.5) であること、造血幹細胞特異的に働くプロモーターが報告されていないこと、この 2 点が障壁となり次段階の研究として造血における Jab1/CSN5 の真の役割を追究することが困難であった。しかし、2008 年に Pardi 博士らにより条件性 CSN5/Jab1 ノックアウト遺伝子座 (CSN5/Jab1<sup>flox/flox</sup>) が作製され、T 細胞特異的 CSN5/Jab1 ノックアウトマウスが解析された (Panattoni M et al., 2008)。さらにシンガポール国立大学の 大里博士らにより造血幹細胞特異的に働くエンハンサーが同定され、それを用いたプロモーターが使用可能となった (Ng CE et al., 2010)。この造血幹細胞特異的プロモーター (P<sub>HSC</sub>) の下流に CRE リコンビナーゼ (CRE) を連結させたプラスミドを導入したマウス (P<sub>HSC</sub>-CRE-TG マウス) を作製し、CSN5/Jab1<sup>flox/flox</sup> マウスとかけ合わせることで、造血幹細胞特異的な CRE の発現を介した CSN5/Jab1 遺伝子の破壊を行うことを試みた (CRE-loxP システム)。造血幹細胞特異的に GFP、CRE を発現するトランスジェニック (P<sub>HSC</sub>-GFP-TG, P<sub>HSC</sub>-CRE-TG) マウスを本研究室で作製し (大里博士との共同研究)、各マウスの造血幹細胞特異的 GFP、CRE の発現量を比較した。そして発現量の高いマウスのラインを確立した。次に造血幹細胞特異的 CSN5/Jab1 のノックアウトを行うために共同研究者の Pardi 博士から供与された CSN5/Jab1<sup>flox/flox</sup> マウスと CSN5/Jab1<sup>+/+</sup>; P<sub>HSC</sub>-CRE-TG マウスをかけ合わせ、CSN5/Jab1<sup>flox/+</sup>; P<sub>HSC</sub>-CRE-TG マウスを作製した。しかし、かけあわせを重ねても CSN5/Jab1<sup>flox/flox</sup>; P<sub>HSC</sub>-Cre-TG マウスは産まれなかった。生殖系列でなく、造血幹細胞特異的に CSN5/Jab1 のノックアウトを行っても胎生致死であることから、CSN5/Jab1 は個体の発生に必須だけでなく、胎児の血球産生にも必要不可欠であると考えられる。

### 3-3. 条件性 CSN5/Jab1 ノックアウトマウス胚性線維芽細胞 (MEF) の作製

現在までに CSN5/Jab1 は c-Jun、p53、p27 など細胞周期の様々な時期で機能する多くの相互作用因子を有することが報告されているが (Kato and Yoneda-Kato., 2009)、細胞周期進行の特異的作用点は未だに明らかでない。さらに造血幹細胞特異的 CSN5/Jab1 ノックアウトマウスの解析が困難である。これらのことから私たちは条件性 CSN5/Jab1 ノックアウトマウス由来の胚性線維芽細胞 (MEF) を作製し、解析することで CSN5/Jab1 が細胞周期進行にどのように関与するか詳細に検討した。

当研究室で作製した CSN5/Jab1 ノックアウト遺伝子座 (CSN5/Jab1<sup>+/+</sup>) を持つマウスと CSN5/Jab1 flox (CSN5/Jab1 flox<sup>+/flox</sup>) 遺伝子座を持つマウスをかけ合わせ、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> 遺伝子座を持つマウスを作製した。これらのマウスをかけ合わせ CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> 遺伝子座を持つ MEF を作製した (Fig.3-3a)。より効率的に CSN5/Jab1 の発現を消失させるために CSN5/Jab1<sup>flox/flox</sup> 遺伝子座ではなく、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> 遺伝子座を用いた。CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に MSCV-ires-GFP、MSCV-ires-GFP に CRE をサブクローニングし、GFP 陽性細胞のみで CRE 遺伝子を発現するベクター (MSCV-ires-GFP/CRE) をレトロウイルスにより遺伝子導入した。3 日間培養後、FACS Vantage SE により GFP 陽性の細胞を分取し、実験に用いた。分取した細胞からゲノム DNA、細胞抽出液を調製し、PCR、ウェスタンブロッティングを行い、GFP を発現している細胞 (CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF) においては CSN5/Jab1 遺伝子座及び発現量に変化は認められないが、CSN5/Jab1 の発現を消失させた細胞 (CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF) では CSN5/Jab1 遺伝子座及び発現が消失していることを確認した (Fig.3-3b)。

SiRNA やノックアウトマウスを用いたこれまでの研究により、CSN の各サブユニットの発現量が減少すると CSN 複合体としての存在量が減少することが報告されている。このことより今回の実験系で CSN5/Jab1 の発現消失後、CSN 複合体の存在量が減少しているか CSN の第一サブユニット (CSN1) の抗体を用いた免疫沈降法により検討した。当研究室で作製された CSN1 の抗体はいくつかある複合体の種類の中でも、CSN 複合体中の CSN1 を認識できる。そのため抗 CSN1 抗体で免疫沈降を行うと CSN 複合体の全サブユニットを効率よく共沈降できる。CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に GFP、GFP/CRE を導入後 2~4 日間という短時間の培養後にそれぞれの細胞から細胞抽出液を作製し、抗 CSN1 抗体を用いて免疫沈降法を行った。その後、免疫沈降物を SDS-PAGE により分画し、CSN の各サブユニット特異的抗体 (CSN1, 3, 5, 6, 7b, 8) を用いてウェスタンブロッティングを行い、CSN5/Jab1 の発現消失前後における複合体の形成量を調べた。その結果、コントロールの CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF では全てのサブユニットが効率よく複合体を形成した (Fig.3-3c)。一方、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF では CSN5/Jab1 の発現消失が見られた。それにもかかわらず、他の CSN のサ

サブユニットはコントロールの CSN5/Jab1<sup>-flox</sup>GFP MEF と同等に共沈し、効率よく複合体を形成した (Fig.3-3c)。これは CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF において CSN5/Jab1 がほとんど含まれていない CSN 複合体が存在することを示唆する。CSN、CSN5/Jab1 の立体構造はこれまで明らかにされていないが、2009 年にどのサブユニットがどのように結合するかモデル図が提唱されている (Sharon M et al., 2009)。さらに CSN5/Jab1 は CSN 複合体以外にも mini CSN 複合体、CSN5/Jab1 小複合体、単量体として存在することが報告されており (Kato JY and Yoneda-Kato N., 2009; Sharon M et al., 2009; Tomoda K et al., 2002)、今後の CSN、CSN5/Jab1 の立体構造、複数存在する複合体の意義を解明することが重要である (Fig.3-3d)。

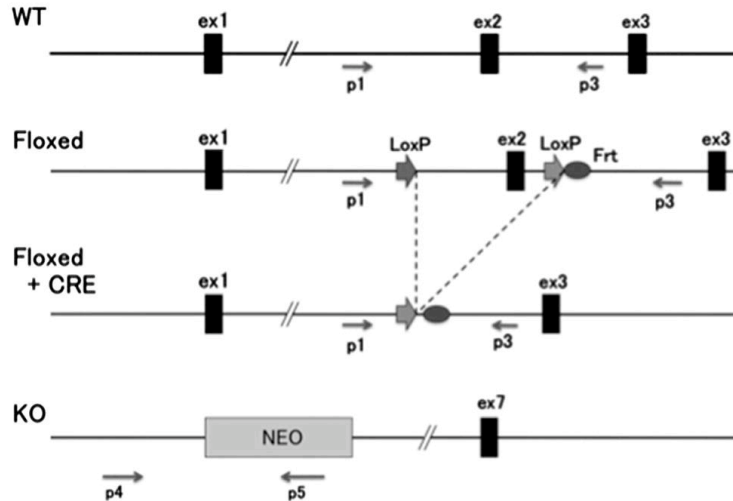
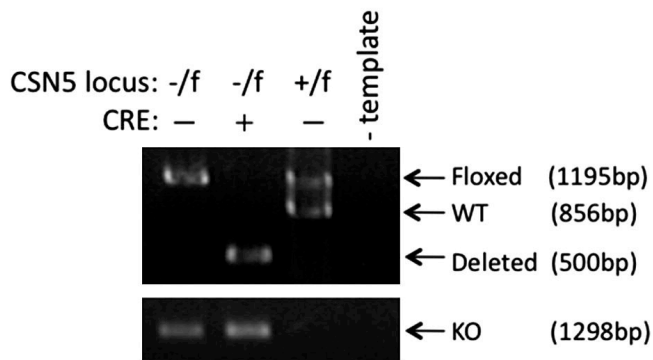


Fig.3-3a 遺伝子改変 MEF の CSN5/Jab1 遺伝子座の模式図

野生型 (WT)、遺伝子改変 (Floxed、Floxed + CRE、KO) を表す。Floxed 遺伝子座に CRE が作用すると LoxP 間の exon2 が欠損しフレームシフトが起こり、CSN5/Jab1 が発現しない。

A.



B.

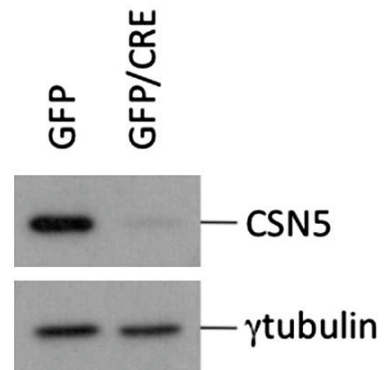


Fig.3-3b CRE 発現後における CSN5/Jab1 遺伝子座、発現の消失

A. 上記に示している CSN5/Jab1 遺伝子座を持つ MEF にレトロウィルスを用いて CRE を発現させた後、ゲノム DNA を調製し PCR を行い、遺伝子型を決定した。

B. コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) を発現させた CSN5/Jab1<sup>-f</sup> MEF から細胞抽出液を作製し、抗 CSN5/Jab1 (上のパネル)、抗  $\gamma$ -tubulin 抗体 (下のパネル) を用いてウェスタンブロッティングを行った。

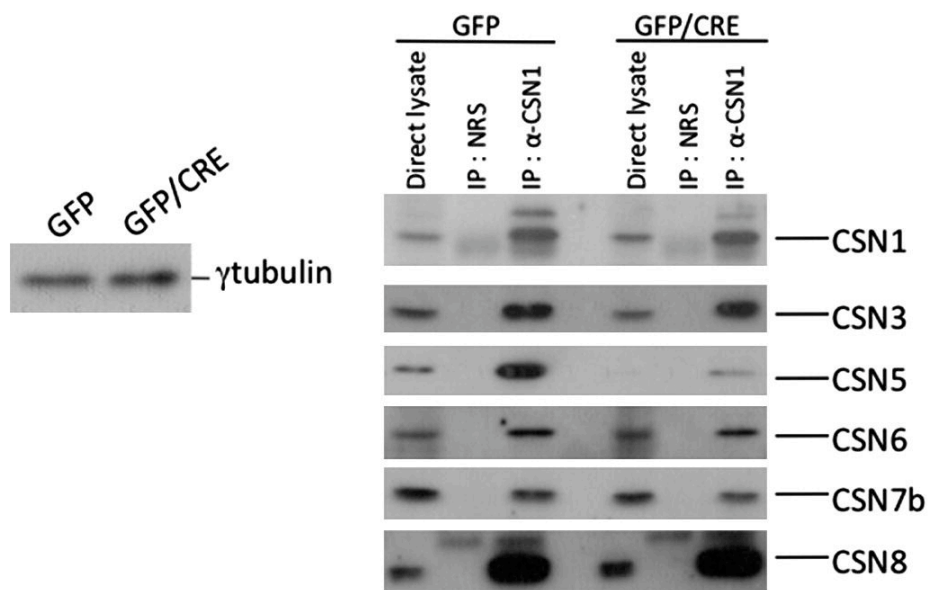


Fig.3-3c CSN5/Jab1 消失後における免疫沈降

右側のパネル；コントロール（GFP）、CRE（GFP/CRE）を発現させて 3 日後の CSN5/Jab1<sup>-/-</sup> MEF から細胞抽出液を作製し、NRS、抗 CSN1 抗体を用いて免疫沈降を行い、各 CSN のサブユニットの抗体（パネルの右側）を用いてウェスタンブロッティングを行った。左側のパネル；等量の細胞抽出液を使用したことを示すために抗  $\gamma$ -tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

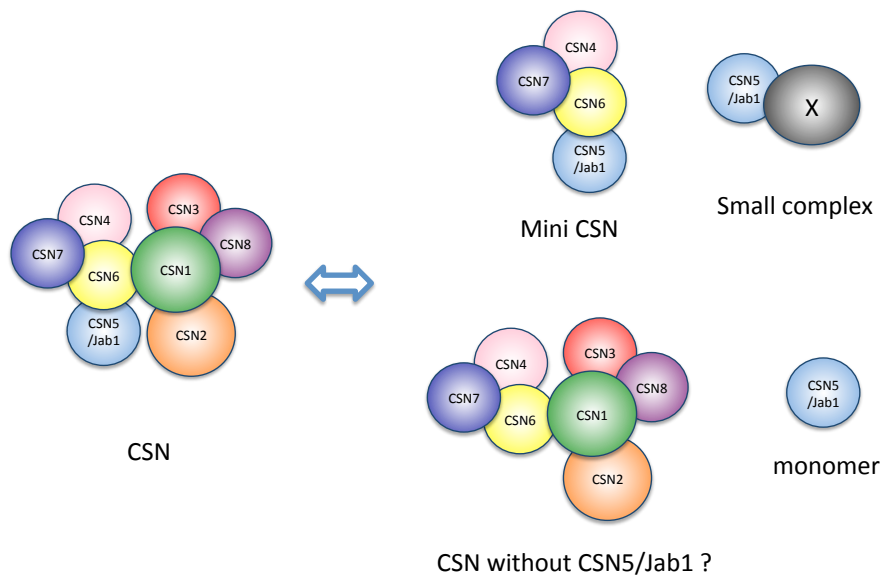


Fig.3-3d CSN 構造のモデル図

### 3-4. CSN5/Jab1 欠損による細胞増殖への影響

CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に GFP/CRE を遺伝子導入することによって、効率よく CSN5/Jab1 の発現を消失させることができた (Fig.3-3b,c)。次に CSN5/Jab1 の発現消失時における細胞増殖への影響を検討した。CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に GFP、GFP/CRE を遺伝子導入した後、GFP 陽性細胞を分取し、35mm plate に  $1 \times 10^4$  個の細胞をまき、毎日細胞数を計測することで増殖曲線を作成した (Fig.3-4a-A,B)。その結果、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF は増殖したが、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF は細胞増殖が停止した。この細胞増殖能の消失が GFP/CRE を遺伝子導入した影響ではなく、CSN5/Jab1 の発現が消失した表現型であることを証明するために、野生型の MEF で同様の実験を行った。その結果、野生型の MEF に GFP、GFP/CRE を遺伝子導入した双方の MEF において同程度の増殖率を示した (Fig.3-4a-A)。増殖が停止した CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF に再び野生型 CSN5/Jab1 を過剰発現させると細胞増殖停止を回避したことから、この GFP/CRE 導入による細胞増殖能の消失は CSN5/Jab1 遺伝子座の特異的欠損が原因であるということを確認した (Fig.3-4a-B)。野生型 CSN5/Jab1 の他にも NES 変異体 ( $\Delta$  NES; L237/240/241A)、脱 NEDD8 化に必須である JAMM モチーフの変異体 ( $\Delta$  JAMM; D151N) を用いて同様の実験を行った。その結果、NES 変異体では野生型 CSN5/Jab1 と同程度増殖停止を回避できたが、JAMM モチーフ変異体においては細胞増殖停止を回避できなかった (Fig.3-4a-B)。この実験において、それぞれの細胞からゲノム DNA、細胞抽出液を調製し、PCR、ウェスタンブロッティングを行い、ゲノム内の CSN5/Jab1 遺伝子座が同程度に欠損していること、外来性 CSN5/Jab1 が同程度の発現レベルであることを確認した (Fig.3-4a-C,D)。また野生型 CSN5/Jab1、NES 変異体を発現させた細胞から調製した細胞抽出液で NATIVE PAGE、ウェスタンブロッティングを行い、外来的に発現させた CSN5/Jab1 が CSN 複合体に含まれていることを確認した (Fig.3-4a-D)。しかし、この実験で GFP/CRE、 $\Delta$  JAMM を遺伝子導入した細胞においては増殖停止の表現型を回避できなかったため、解析に十分な細胞抽出液が得られず実験を行うことができなかった。これらの結果は哺乳類細胞の増殖には CSN 複合体の持つ脱 NEDD8 化活性が必須であることを示している。

CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に GFP/CRE を発現させ CSN5/Jab1 の発現を消失させた後にも増殖する復帰変異体を獲得しようと長期間培養を行った結果、いくつかの GFP 陽性コロニーを獲得した。しかし、これらの細胞は CSN5/Jab1 遺伝子座が欠損しておらず、CSN5/Jab1 タンパク質の発現も残っていた。何度か試みたが、最終的に CSN5/Jab1 の機能欠損を補う復帰変異体は獲得できなかった。このことから様々な因子や経路に影響を与える CSN 複合体欠損の影響は1つや2つの因子だけではなく、細胞内で広範囲に及ぶことが示唆された。



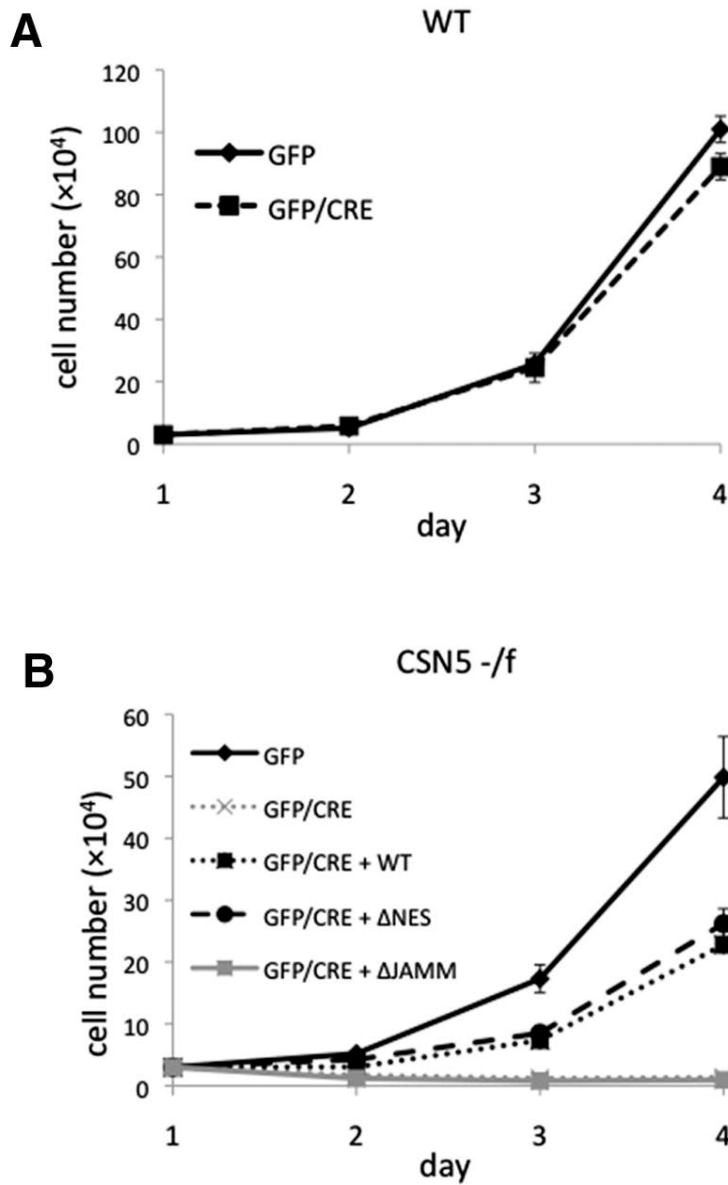


Fig.3-4a CSN5/Jab1 は細胞増殖に必須である (増殖曲線)。

A, B コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE)、野生型 CSN5/Jab1 (WT)、NES 配列、JAMM ドメインに変異を持つ CSN5/Jab1 変異体 ( $\Delta$ NES; L237/240/241A、 $\Delta$ JAMM; D151N) を発現させた野生型 (A, WT)、CSN5/Jab1<sup>-/-</sup> (B, CSN5<sup>-/-</sup>) MEF を  $1 \times 10^4$  個ずつまき、4 日間毎日細胞数を計測しグラフ化した。

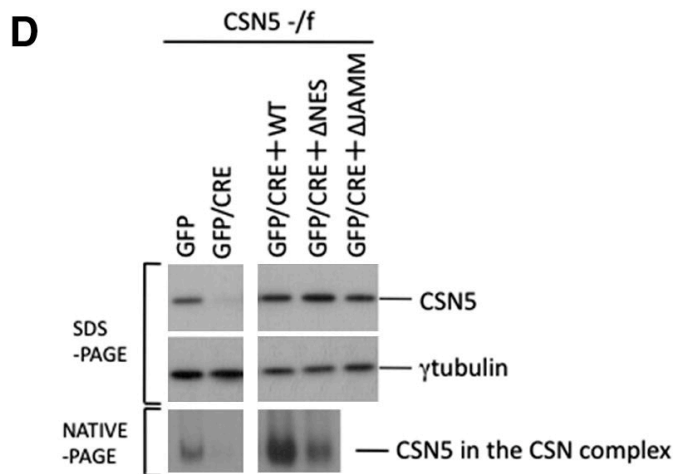
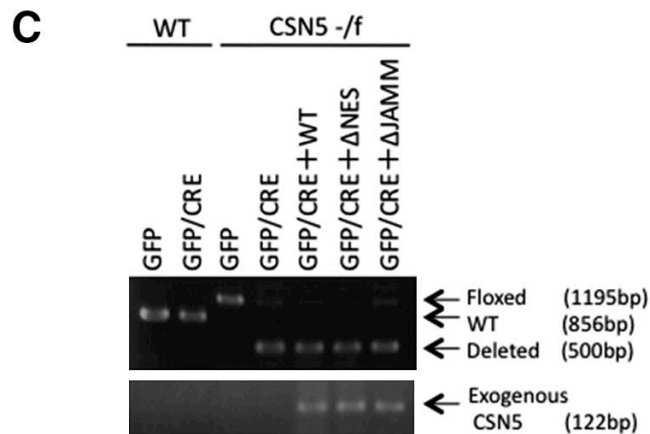


Fig.3-4a CSN5/Jab1 は細胞増殖に必須である。

C, 増殖曲線で用いた細胞からゲノム DNA を調製し PCR を行った。パネル右側に使用したプライマーを示した。

D, パネル上部に示したベクターを発現させた CSN5/Jab1<sup>-f</sup> MEF からそれぞれ細胞抽出液を作製し、SDS-PAGE (上部、真ん中のパネル)、NATIVE-PAGE (下部のパネル) を行った。その後、抗 CSN5/Jab1 抗体 (上部、下部のパネル)、抗  $\gamma$ -tubulin (真ん中のパネル) を用いてウェスタンブロッティングを行った。NATIVE-PAGE では CSN5/Jab1 を含む CSN 複合体の位置を示した。細胞抽出液の量が不十分であったため、CRE と  $\Delta$ JAMM を遺伝子導入した細胞抽出液を用いての NATIVE-PAGE を行うことができなかった。

### 3-5. CSN5/Jab1 欠損による細胞周期への影響

CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF では細胞増殖が停止しており、最終的には（約 2 週間後）細胞死に至る。この細胞死も外来性の野生型 CSN5/Jab1 を発現させることで回避できた（Fig.3-5a）。しかしながら、CSN5/Jab1 の発現消失後、約 1 週間以内の CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF は細胞死に至っていなかった。そこで CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF が細胞周期のどの時期で停止しているか調べるために flow cytometry による解析を行った。野生型 MEF、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に GFP、GFP/CRE をそれぞれ遺伝子導入し、FACS Vantage SE により GFP 陽性細胞を分取後 4~6 日後に細胞を回収し、Propidium Iodide (PI) により DNA を染色し、DNA 含有量を FACScan flowcytometer で測定し、細胞周期を解析した（Fig.3-5b）。その結果、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF ではコントロールの CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF に対し G1 期と S 期の細胞がわずかに減少し、G2/M 期の細胞がわずかに増加した。そして 4N 以上の多核の細胞が多く認められた（Fig.3-5d）。位相差顕微鏡観察においても CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF では一つの細胞中に核が 2 個以上存在する多核の細胞が観察された。これらの細胞の核を Hoechst 33342 により染色し顕微鏡観察を行った結果、染色体が凝集した Senescence associated heterochromatin foci (SAHF) 様の構造を示した（Fig.3-5c）。この構造は細胞老化の指標として報告されており（Narita M et al., 2003）、CSN5/Jab1 の発現消失が細胞老化の引き金になる可能性を暗示している（後述）。また CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF をそれぞれ血清非存在下（0.2% FBS）で培養し、同様に PI 染色を行い、flow cytometer により細胞周期を解析した。その結果、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF では G0/G1 期の細胞集団が 46% から 86% に顕著に増加し、細胞が G0/G1 期に同調した（Fig.3-5a）。しかし CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF では G0/G1 期の細胞集団が 31% から 37% とわずかしこ増加しなかった。このことから CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF では細胞周期が進行し、G0/G1 期に同調することができたが、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF においては細胞周期が停止しているため、G0/G1 期に同調できなかったと考えられる。さらに CSN5/Jab1 の発現消失により細胞周期が停止することを示すため BrdU の取り込み実験を行った。GFP、GFP/CRE を遺伝子導入して 6 日後の細胞を 15 分間 BrdU 含有培地で培養した後、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行い、BrdU を取り込んだ細胞数を計測した。その結果、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF では BrdU が取り込まれていたが、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF では BrdU がほとんど取り込まれていなかった（Fig.3-5e）。これらの実験から CSN5/Jab1 の発現消失による細胞周期停止は細胞周期の特定時期ではなく複数点で起こることを明らかにした。

CSN5/Jab1 の遺伝子座を欠損させてから CSN5/Jab1 の発現は徐々に減少し、CRL の活性は CSN5/Jab1 の発現量の減少に依存して減少する。CSN5/Jab1 欠損による表現型は CRL により量的制御を受けている因子により決定されると示唆される。しか

し半減期や生命現象を誘導するための量は因子により様々であるため、表現型が時間差で表面化されると考えられる。今回行った実験では CSN5/Jab1 遺伝子座を欠損させてから 6 日間細胞を培養した後の CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF を用いて解析を行っているため、細胞の多核化と BrdU の取り込み抑制、細胞周期停止とが同時に起こっているような矛盾した解析結果に見える。この解釈として CSN5/Jab1 を欠損させて 6 日後には BrdU の取り込みが抑制され、抑制細胞周期は停止するが、細胞周期が停止するまでの期間に細胞が多核化していると考えられる (Fig.3-5f)。このように CSN5/Jab1 欠損による表現型を詳細に検討するためには CSN5/Jab1 欠損後、時間軸に沿って解析する必要がある。

CSN5/Jab1 の発現消失により引き起こされる細胞周期停止が周囲の環境に起因するのではなく細胞自律的な現象であることを証明するために、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に GFP、GFP/CRE をそれぞれ遺伝子導入し、GFP 陰性細胞と 1:1 の割合で細胞を培養した。その後、3 日おきに細胞を播き直し、GFP 陽性の細胞数を 3 日おきに計測する競合実験を行った。その結果、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF では培養を開始して経代を重ねても同程度の GFP 陽性率を維持していたが、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF では 4 日後で 53%、7 日後で 36%、10 日後で 24%と GFP 陽性率が徐々に減少し、最終的に培養中から消失した (Fig.3-5g)。これらの結果より CSN5/Jab1 の発現消失による細胞周期停止は不十分な細胞間相互作用や CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF から細胞培養液中への何らかの因子の放出によるものではなく、CSN5/Jab1 の発現が消失したことにより細胞周期進行を制御する内在性メカニズムが変化したことにより起因することを示した。

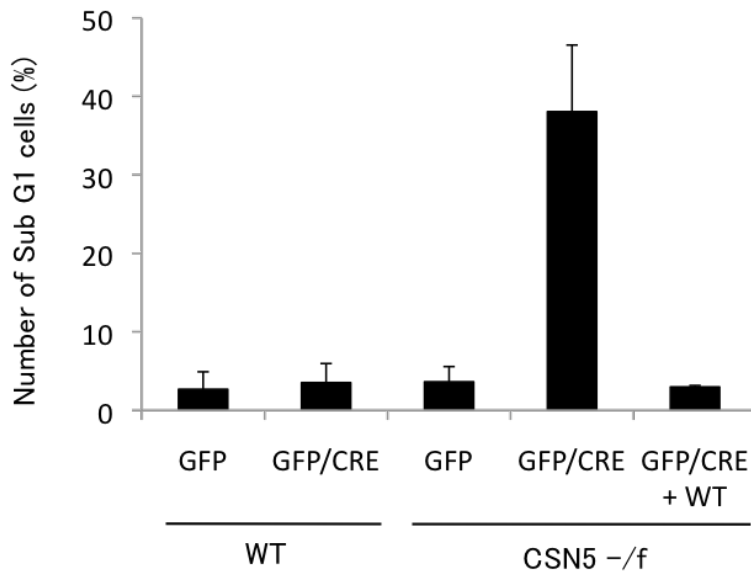


Fig.3-5a Flowcytometer を用いての死細胞の検出

コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE)、野生型 CSN5/Jab1 をレトロウイルスにより野生型 MEF (WT)、CSN5/Jab1<sup>-f</sup> MEF (CSN5<sup>-f</sup>) に発現させた。発現後、2週間細胞を培養し、flowcytometer で解析した。アポトーシス細胞の割合を SubG1 の細胞集団を元に算出してグラフ化した。

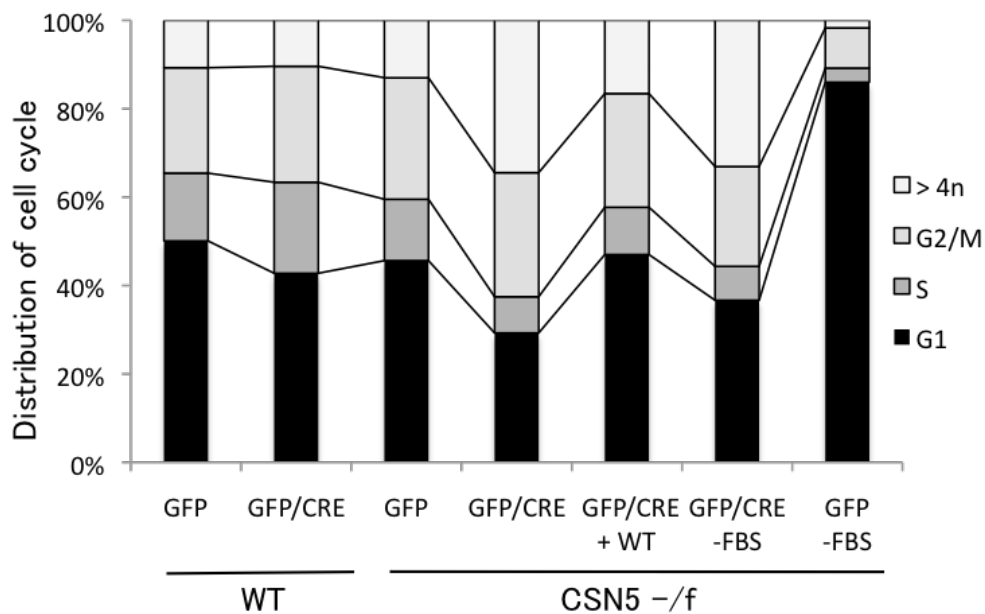


Fig.3-5b Flowcytometer を用いた細胞周期の分布

コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE)、野生型 CSN5/Jab1 をレトロウィルスにより野生型 MEF (WT)、CSN5/Jab1<sup>-f</sup> MEF (CSN5<sup>-f</sup>) に発現させた。発現後、それぞれの MEF を 6 日間培養し、flowcytometer で解析した。解析結果を数値化しグラフ化した。-FBS は解析前に 48 時間血清飢餓培地 (0.2%FBS) で培養したサンプルを示す。

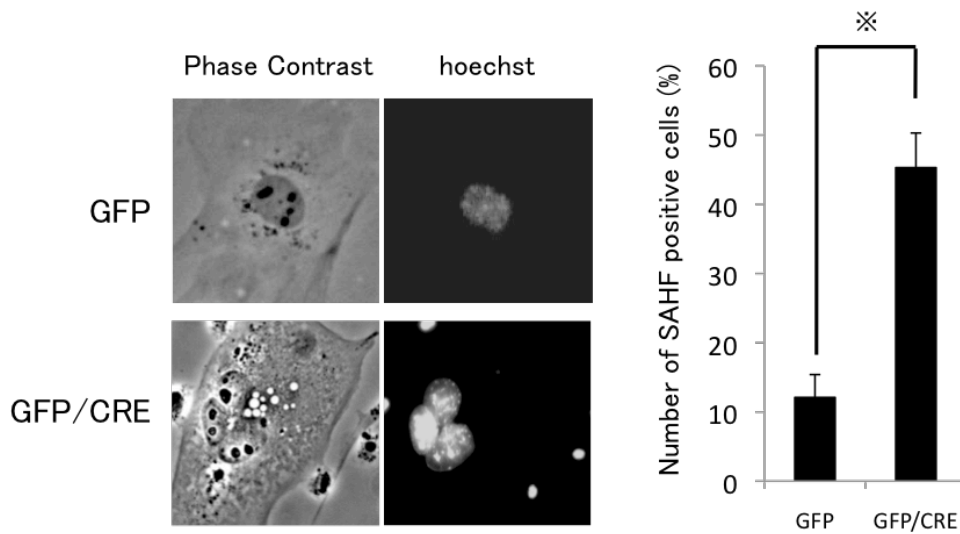


Fig.3-5c CSN5/Jab1 欠損細胞は SAHF 様構造を示す (Hoechst 33342 による免疫染色)。

コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウイルスにより CSN5/Jab1<sup>-/-</sup> MEF に発現させ、培養後、Hoechst33342 で核を染色し蛍光顕微鏡で観察した。左パネルに写真を示した。その後、SAHF 様構造を示す細胞数を計測してグラフ化した (右のパネル)。※ p<0.0005

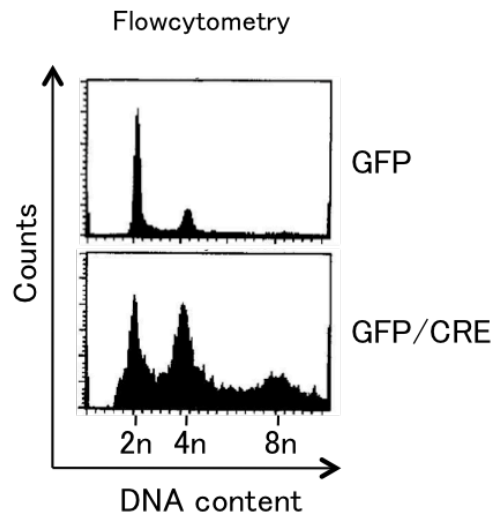


Fig.3-5d Flowcytometer を用いた細胞周期の分布

コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウイルスにより CSN5/Jab1<sup>-/-</sup> MEF に発現させ、培養後、Propidium Iodide (PI) で核を染色し、flowcytometer により細胞周期を解析した。

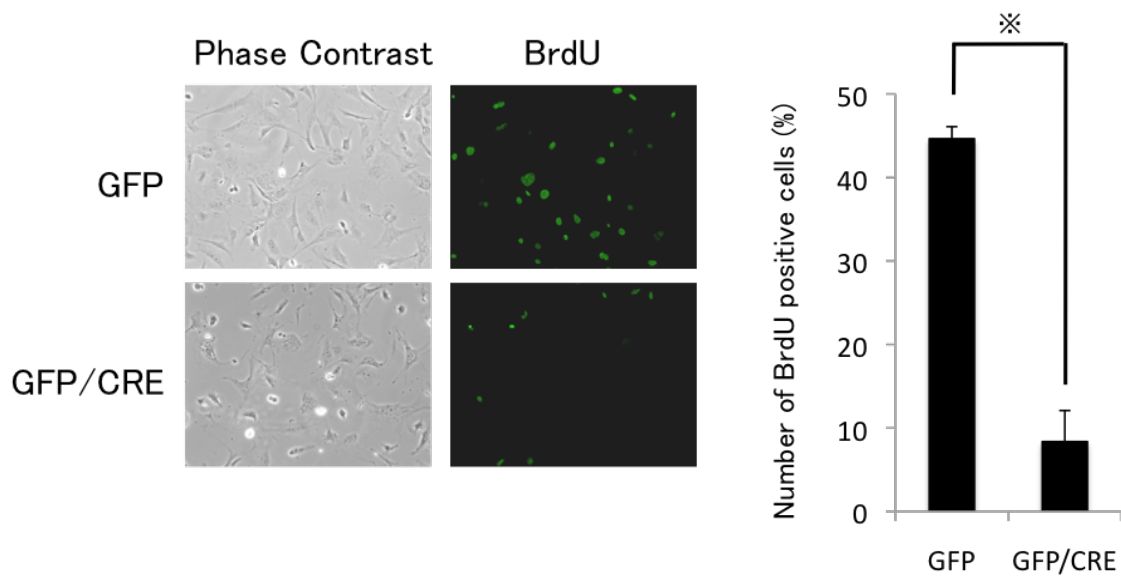


Fig.3-5e BrdU 取り込み実験

コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウイルスにより CSN5/Jab1<sup>-fl</sup> MEF に発現させ、培養後、BrdU を 15 分間取り込ませ、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行った。染色した写真を示す (左のパネル)。その後、BrdU 陽性細胞を計測してグラフ化した (右のパネル)。※ p<0.0001

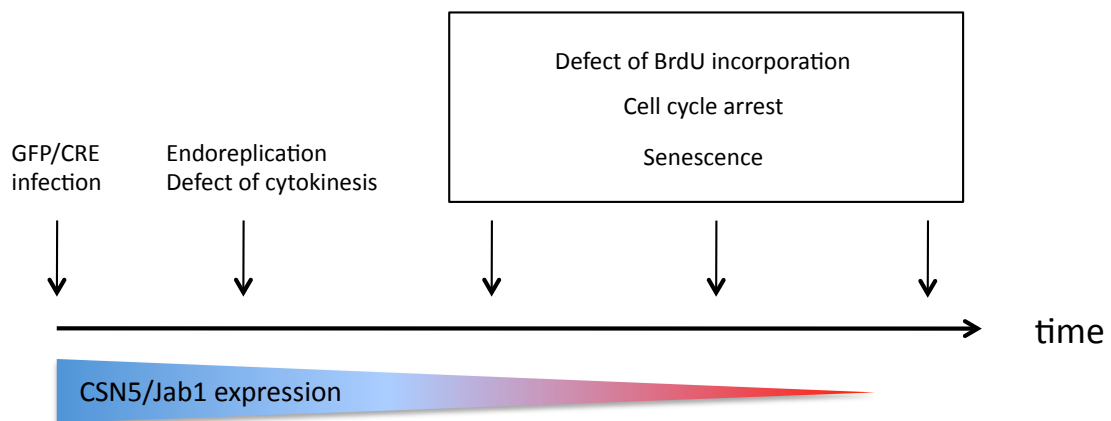
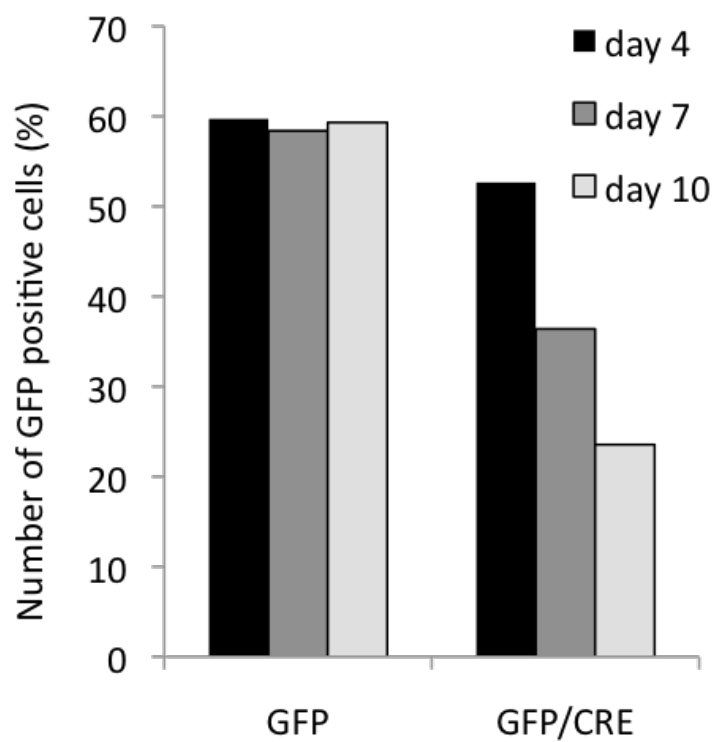


Fig.3-5f CSN5/Jab1 遺伝子座欠損後の細胞の表現型

CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF に GFP/CRE を遺伝子導入し CSN5/Jab1 遺伝子座を欠損後、観察された表現型を時間経過ごとに示したモデル図





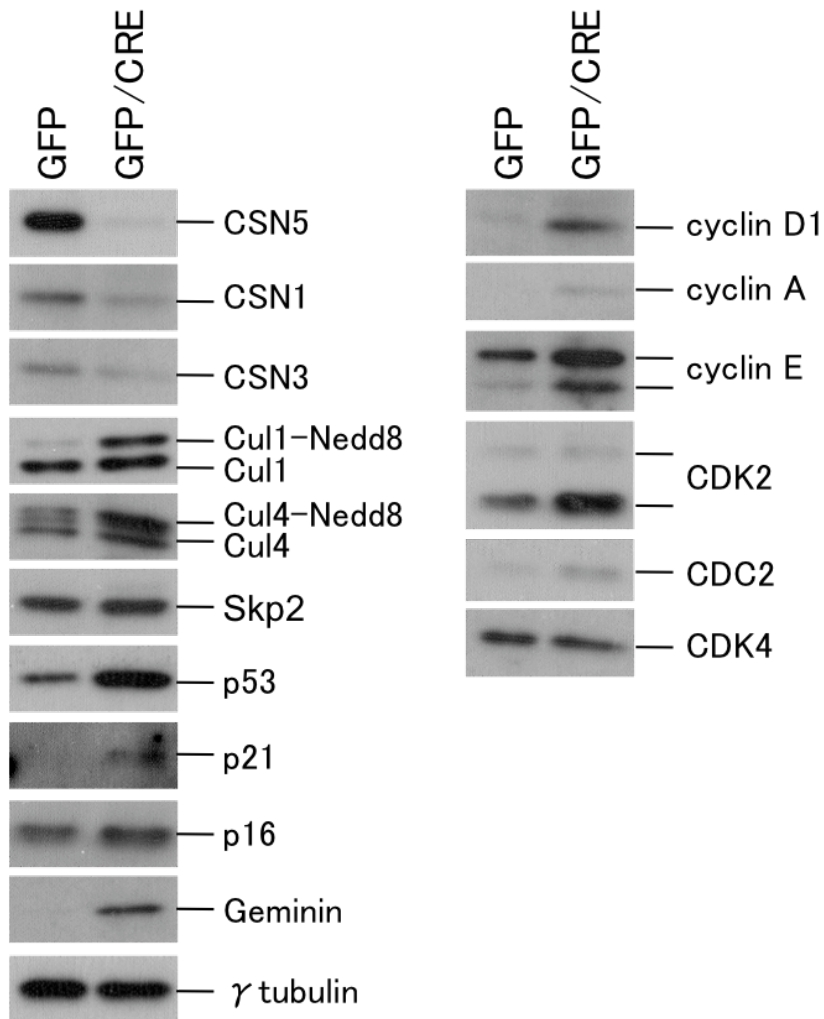
**Fig.3-5g** GFP 陰性細胞との競合実験

コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウィルスにより CSN5/Jab1<sup>-f</sup> MEF に発現させ、GFP 陰性細胞と 1:1 の割合で混合し、培養した。4 日後、7 日後、10 日後に GFP 陽性細胞数を計測し、グラフ化した。

### 3-6. CSN5/Jab1 欠損による細胞周期制御因子への影響

CSN5/Jab1 の発現消失が細胞周期進行を負に制御するメカニズムを調べるために、CSN5/Jab1 の発現消失前後における細胞周期制御因子の発現量をウェスタンブロッティングにより調べた。遺伝子導入後 6 日目の CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> GFP MEF、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF からそれぞれ細胞抽出液を作製し、細胞周期制御因子特異的抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、CSN5/Jab1 の発現消失に伴い、CSN のサブユニット (CSN1, 3) の発現量も減少した。しかし、その減少率は CSN5/Jab1 の発現量と比較して少なかった (Fig.3-6)。CSN の各サブユニットは CSN5/Jab1 非存在下においても効率よく複合体を形成したが (Fig.3-3c)、不安定で最終的に複合体の形成量の減少を促すことが示され、この結果は CSN の一つのサブユニットの欠損は CSN 複合体の形成量を減少させるというこれまでの知見と一致する。CSN5/Jab1 非存在下で CSN のサブユニットの発現が残存している解釈として CSN5/Jab1 を含まない CSN 複合体が存在する可能性、CSN 複合体以外にも CSN5/Jab1 を含まない様々な複合体が存在する可能性、また CSN のサブユニットが単量体として機能する可能性などが挙げられる。CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF ではさらに Cullin1 (Cul1)、Cullin4 (Cul4) などの Cullin ファミリーが定常状態より Nedd8 化されていた (Fig.3-6)。このことは CSN5/Jab1 欠損により CSN の持つ脱 NEDD8 化活性が機能せず、Nedd8 化 Cul1、Nedd8 化 Cul4 が蓄積した結果である。他にも CSN5/Jab1<sup>-del</sup> MEF ではがん抑制タンパク質 p53、CDK インヒビター p21、p16<sup>INK4a</sup>、Geminin、cyclinD1、cyclinA、cyclinE、CDK2、CDC2 など細胞周期を制御する様々な因子の発現量の増加が認められた (Fig.3-6)。実際、CSN5/Jab1 ノックアウトマウスの胚細胞では p53 や cyclinE の発現量の増加が認められている。また CDK インヒビター p21 と p16<sup>INK4a</sup> は細胞老化とともに発現量が増加する指標としても知られており、CSN5/Jab1 欠損細胞において老化細胞特有の SAHF 様構造が認められた知見 (上述) と一致する。

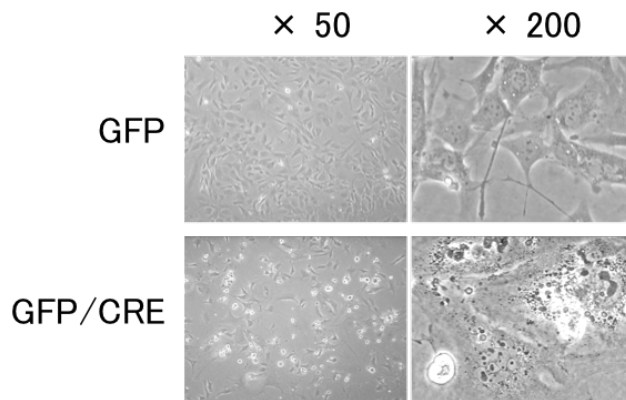
統率された細胞周期制御は cyclin の分解と合成が秩序正しく行われることで成立する。増殖停止している細胞において cyclin や CDK の発現量が増加していることは一見矛盾している結果に見えるが、cyclin の分解が効率的に行われないうえに細胞周期は次の段階に進めない状態にあると考えると説明がつく。また不可逆的な細胞老化が誘導され、増殖が停止した後に cyclin や CDK が蓄積しても細胞周期は進行することができないと推察される。そもそも細胞周期が進行するためには cyclin と CDK が結合しリン酸化活性を持つことが重要であるため、蓄積した cyclin や CDK が複合体を形成し、リン酸化活性を持つか調べる必要がある。



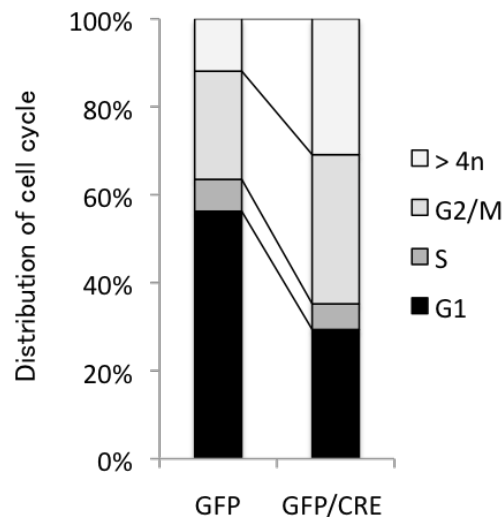
**Fig.3-6** CSN5/Jab1 の欠損による様々な細胞周期制御因子の発現量の変化  
 コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウイルスにより CSN5/Jab1<sup>-/-</sup>MEF  
 に発現させ、6日間培養後、それぞれの細胞から細胞抽出液を作製しウェスタンブ  
 ロットティングを行った。パネルの右側にウェスタンブロットティングに用いた抗体を示す。

3-7. CSN5/Jab1 欠損による細胞周期停止は p53 非依存的である。

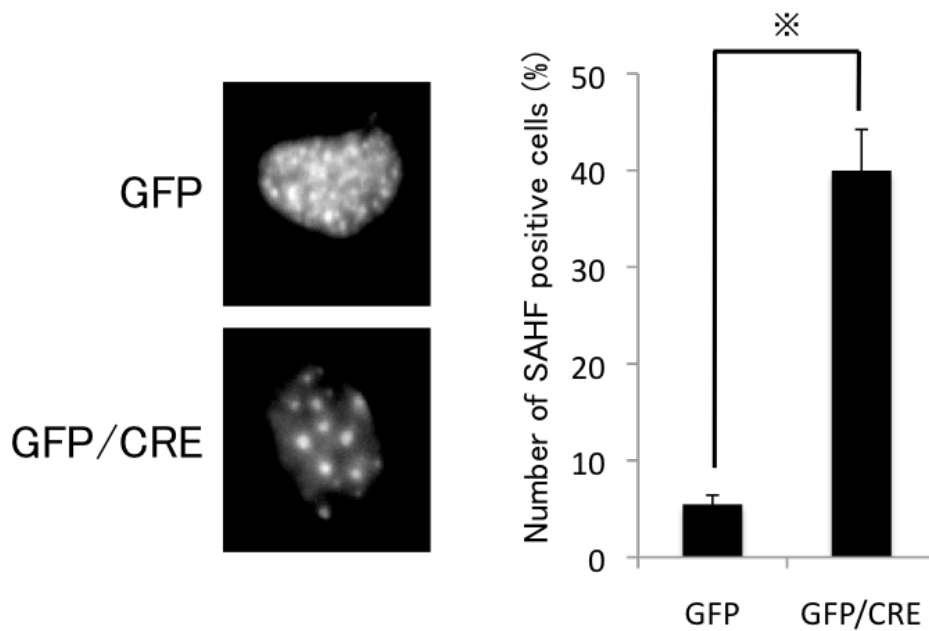
p53 は UV や薬剤など様々な刺激により DNA 損傷チェックポイントを活性化し、細胞を細胞周期停止やアポトーシスに導くがん抑制遺伝子である。さらに老化細胞において発現量が増加していることも知られている。上記のように CSN5/Jab1 の発現が消失した細胞では p53、その下流で働く CDK インヒビター p21 の発現量の増加が認められ、さらに CSN5/Jab1 ノックアウトマウスの胚細胞においても p53 の発現量が増加していることから次に CSN5/Jab1 欠損細胞における細胞周期停止が p53 経路依存的か非依存的か検討した。これを検討するために CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> マウスと p53<sup>-/-</sup> マウスを複数回かけ合わせ、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF を作製した。CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF に GFP、GFP/CRE を遺伝子導入し (CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> GFP MEF、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF)、GFP 陽性細胞を FACS VantageSE により分取し、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF の時と同様に増殖曲線を作成した。その結果、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> GFP MEF は増殖したが、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF は顕著に細胞増殖が停止した。また遺伝子導入後 4~6 日後に細胞を回収し、Propidium Iodide (PI) により DNA を染色し DNA の含有量を FACScan flowcytometer で測定した。その結果、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF ではコントロールとして用いた CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> GFP MEF に対し G1 期と S 期の細胞がわずかに減少し、G2/M 期の細胞がわずかに増加した。そして 4N 以上の多核の細胞を多く認めた (Fig.3-7b)。また位相差顕微鏡観察において CSN5/Jab1<sup>-del</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF においても一つの細胞中に核が 2 個以上存在する多核の細胞が見られた (Fig.3-7a)。CSN5/Jab1<sup>-del</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF の核を Hoechst 33342 により染色し顕微鏡観察を行った結果、細胞老化の指標である染色体が凝集した SAHF 様の構造が観察された (Fig.3-7c)。これらの実験結果はすべて CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> MEF の時と同様の結果である。最後に細胞老化の指標として用いられている Senescence associated  $\beta$ -gal assay (SA- $\beta$ -gal assay) を行った。これは老化細胞では酸性下 pH6.0 における細胞内の  $\beta$  galactosidase 活性が特異的に増加していることを利用した検定法である (Dimri et al., 1995)。CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> GFP MEF、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF を用いて SA- $\beta$ -gal assay を行い、顕微鏡で  $\beta$  gal 陽性細胞を観察した。またポジティブコントロールとして細胞老化を引き起こし増殖せず扁平な形態を示す分裂限界に達した野生型 MEF を用いた。その結果、CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> GFP MEF はほとんど  $\beta$  galactosidase 陽性細胞が認められなかったが、CSN5/Jab1<sup>-del</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF および野生型 MEF においては  $\beta$  gal 陽性細胞が認められた (Fig.3-7d)。この結果は CSN5/Jab1 の欠損が p53 非依存的に細胞老化を誘発することを支持している。これらの結果より、CSN5/Jab1 発現消失による細胞増殖能の消失、細胞周期停止、細胞死、核内倍加、細胞老化などの様々な表現型は p53 経路非依存的であると結論付けた。



**Fig.3-7a** CSN5/Jab1<sup>-flox</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF における位相差顕微鏡観察  
 コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウイルスにより CSN5/Jab1<sup>-f</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF に発現させ、位相差顕微鏡で細胞を観察した。  
 GFP、GFP/CRE を発現させた CSN5/Jab1<sup>-f</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF を 6 日間培養し、flowcytometer で解析した。解析結果を数値化しグラフ化した。



**Fig.3-7b** Flowcytometer を用いた細胞周期の分布  
 コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウイルスにより CSN5/Jab1<sup>-f</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF に発現させ、位相差顕微鏡で細胞を観察した。  
 GFP、GFP/CRE を発現させた CSN5/Jab1<sup>-f</sup> p53<sup>-/-</sup> MEF を 6 日間培養し、flowcytometer で解析した。解析結果を数値化しグラフ化した。



**Fig.3-7c** CSN5/Jab1<sup>flox</sup>p53<sup>-/-</sup> MEF は SAHF 様構造を示す (Hoechst 33342 による免疫染色)。

コントロール (GFP)、CRE (GFP/CRE) をレトロウイルスにより CSN5/Jab1<sup>f</sup>p53<sup>-/-</sup> MEF に発現させ、6 日間培養後、Hoechst33342 で核を染色し蛍光顕微鏡で観察した。観察した写真を左パネルに示した。SAHF 様構造を示す細胞数を計測してグラフ化した (右のパネル)。※ p<0.0005

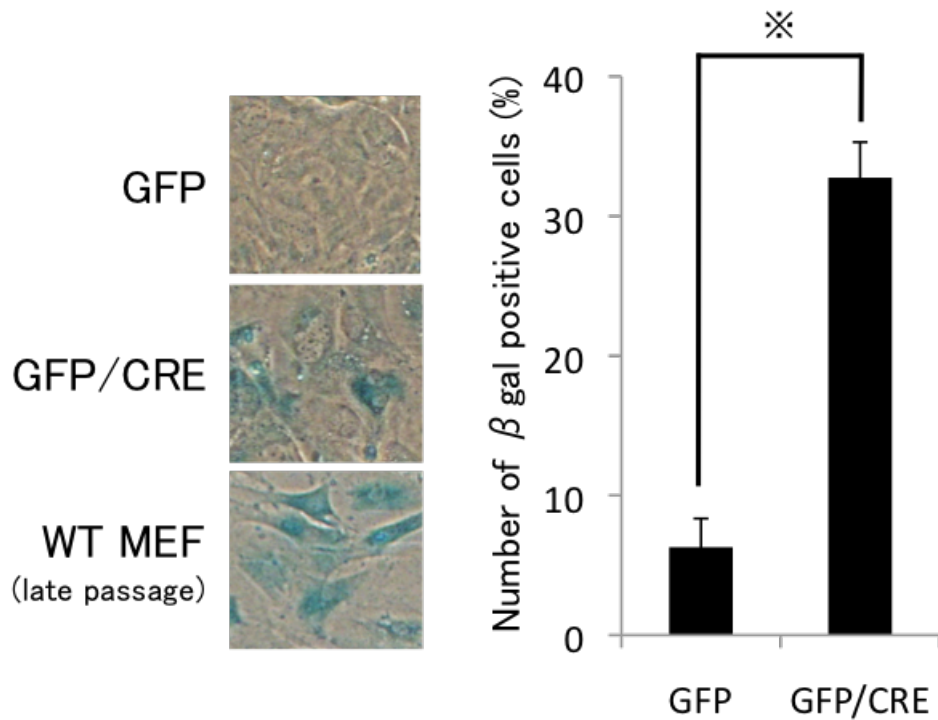


Fig.3-7d CSN5/Jab1<sup>fllox</sup>p53<sup>-/-</sup> MEFはSA-βgalactosidase陽性である。コントロール(GFP)、CRE(GFP/CRE)をレトロウィルスによりCSN5/Jab1<sup>fl</sup>p53<sup>-/-</sup>MEFに発現させ、6日間培養した。細胞をX-gal溶液(pH6.0)で培養し、位相差顕微鏡で観察しSA-β-galactosidase活性(青色)を観察した。観察した写真を左パネルに示した。ポジティブコントロールとして分裂限界に達したMEF(late passage MEF)を使用した。SA-β-galactosidase陽性細胞数を計測してグラフ化した(右のパネル)。※ p<0.0001

## 4. 考察

### 4-1. CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの解析

CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスは造血幹細胞の異常な増加を認め MPD を発症すること、骨髄では CDK インヒビター p16<sup>INK4a</sup> の発現量が減少することを見出した。そのメカニズムとして CSN5/Jab1 の新規相互作用因子である SMYD3 が CSN5/Jab1 と協調的に p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター領域に結合し、転写を抑制することを明らかにした (Fig. 4-1)。この研究において CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスは MPD を発症し、その分子メカニズムとして p16<sup>INK4a</sup> の発現量が減少することを示したが、p16<sup>INK4a</sup> のノックアウトマウスには CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスで見られる MPD の発症が認められない。このことから、CSN5/Jab1 が p16<sup>INK4a</sup> 以外の他の細胞周期制御因子に作用していることが示唆される。他の CSN5/Jab1 の相互作用因子で細胞周期制御に関与するものとしては p27、p53 が知られているが、CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスで認められる表現型を説明するにはこれらの因子のみでは不十分である。なぜならノックアウトマウスを用いた解析から p27、p53 の造血における役割がすでに明らかにされており、それらのノックアウトは造血幹細胞の増殖には影響を与えないからである。具体的な造血の役割として p27 は造血幹細胞の自己複製や細胞数など造血幹細胞の維持や増殖には関与しないが、造血前駆細胞において増殖能が亢進し、造血前駆細胞のプールが大きくなることが報告されている (Cheng T et al., 2000)。また p53 は造血幹細胞の静止期の維持に重要であることが示されているものの、ノックアウトマウスは MPD のような骨髄性白血病を発症しない (Liu Y et al., 2009)。CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスが MPD を発症するより詳細なメカニズムを解明するためには細胞周期を制御する新規 CSN5/Jab1 相互作用因子の同定が必須であると考察される。

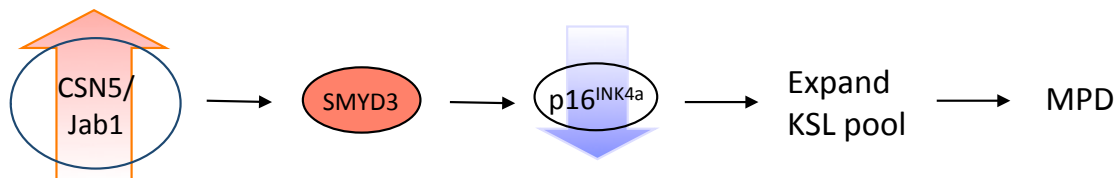


Fig.4-1 CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスの表現型のモデル図



#### 4-2. CSN5/Jab1 と細胞周期制御

CSN5/Jab1 の全身でのノックアウトマウスは早期の胎生致死 (E6.5~E7.5) の表現型を示し、その胚細胞では cyclin E、CDK インヒビター p27、がん抑制遺伝子 p53 の発現量の増加が認められた。このことから CSN5/Jab1 欠損により G1 期、G2 期チェックポイント機構が働き細胞周期の停止を誘導したことが推測される (Tomoda K et al., 2004)。マウスだけでなく線虫においても CSN5/Jab1 の欠損は DNA 損傷チェックポイント、M 期チェックポイントを活性化し、卵形成過程において cyclin E が蓄積することが示されている (Doronkin S et al., 2002; Doronkin S et al., 2003)。また Pardi 博士らの研究により T 細胞における CSN5/Jab1 のコンディショナルノックアウトは G1 期に顕著な影響は与えないが、S 期を通じて細胞周期の進行が阻害されることが示された (Panattoni M et al., 2008)。実際、がん細胞株において CSN5/Jab1 をノックダウンすると細胞増殖が抑制されるが (Adler AS et al., 2006; Fukumoto A et al., 2006)、CSN5/Jab1 や COP9 signalosome 複合体が細胞周期の進行にどのように関与するか具体的なメカニズムはいまだ明らかでない。そこで私たちは条件的に CSN5/Jab1 の発現を消失させることができる CRE-loxP システムを用いた MEF の解析により細胞周期進行における CSN5/Jab1 の機能を詳細に解析した。この研究で、哺乳類細胞の増殖には CSN5/Jab1 が必須であり、CSN5/Jab1 が細胞周期の複数点に作用することを示した。これまで CSN5/Jab1 は p27、cyclin E、p53、DNA topoisomerase II、APC/C など G1 期から M 期全てに関与する因子に作用することが報告されているが (Kato JY and Yoneda-Kato N., 2009)、今回示した結果はこれらの報告、また CSN5/Jab1 ノックアウトマウスの研究で得られた知見 (上記) と矛盾のない結果である。この研究は様々な時期の細胞が混在する非同調細胞を用いているため、多くのタンパク質が発現している状態である。今後より詳細に細胞周期における CSN5/Jab1 の機能を解明するためには、G1 期から M 期それぞれで細胞周期を同調させた状態で CSN5/Jab1 の発現を消失させ、細胞周期の進行を解析する必要がある。各期において CSN5/Jab1 の欠損が及ぼす影響に相違があるのか、そのときの cyclin や CDK などの発現量、キナーゼ活性の変化などが着目点であると考察される。

#### 4-3. CSN5/Jab1 と脱 NEDD8 化

この研究で CSN5/Jab1 の発現が消失した細胞では顕著に細胞増殖能が消失するが、野生型 CSN5/Jab1、NES 変異体 (L237/240/241A) を発現させることで増殖能は回復した。しかし、JAMM モチーフ変異体 (D151N) においては増殖能の消失を回避できなかったことから哺乳類細胞の増殖には CSN 複合体による脱 NEDD8 化反応を介した CRL の活性制御が必須であることを示した。多くの機能を持つ CSN の中で

最も研究が進められている脱 NEDD8 化による CRL の活性制御には CSN5/Jab1 の JAMM モチーフが必須であるが (上述)、この結果はこれまでの報告を支持するものである。NEDD8 は酵母から哺乳類まで高度に保存されており、マウスにおいて胎生期から成体のほとんどの組織まで発現が認められる (Carrabino S et al., 2004)。さらに分裂酵母、線虫、ショウジョウバエ、シロイヌナズナ、マウスなど多くのモデル生物で NEDD8 システムが生物の生存に必須であることが証明されている (Osaka F et al., 2000; Jones D and Candido EP., 2000; Ou CY et al., 2002; Dharmasiri S et al., 2003; Tateishi K et al., 2001; Kurz T et al., 2002)。このように多くの生物、組織において NEDD8 システムのノックアウトマウスが胎生致死であることは、細胞増殖において CSN の脱 NEDD8 化による CRL の活性制御が重要であることを示唆する。またがんや神経変性疾患などヒトの病気と NEDD8 との関連性も報告されている (Rabut G and Peter M., 2008)。今後、どのようなタンパク質が NEDD8 化されるのか、そしてこの修飾がどのようにタンパク質に機能を与えるのか、CRL により制御される全てのタンパク質の発現量がどのように変化しているのか、CSN の脱 NEDD8 化による CRL の活性制御が Cullin ファミリー全てに同じように影響しているのか、CRL 複合体のサブユニットや CRL 本体の形成量は変化するのか、CRL の制御に関与する因子 CAND1 や UBXd7 との関係性など CRL 制御の具体的なメカニズムの解明が必要であると考察される。

#### 4-4. CSN5/Jab1 と細胞老化

CSN5/Jab1、p53 を欠損した MEF の核を Hoechst 33342 で染色し蛍光顕微鏡観察を行った結果、染色体が凝集した Senescence associated heterochromatin foci (SAHF) 様の構造を示した。さらに老化マーカーである Senescence associated  $\beta$  galactosidase (SA- $\beta$  gal) が誘導された。SAHF は MEF の初代培養時に恒常的活性化型の Ras の発現により誘導されるマーカーとして同定され細胞老化の指標として報告されており (Serrano M et al., 1997)、SA- $\beta$  gal と並んで細胞老化のマーカーとして多く用いられている。本来の細胞老化ではこれらのマーカーが陽性であるのみならず、p53、CDK インヒビターの p27、p16 の発現量が増加することも細胞老化の指標の一つとして認識されている。しかしこの研究では CSN5/Jab1、p53 の両方を欠損した MEF において、細胞老化が引き起こされた。このことは現在までに報告されている細胞老化とは別経路の細胞老化であると考えられる。最近、p53 非依存的な細胞老化として Skp2 の不活化により誘導される細胞老化が報告されたが (Lin HK et al., 2010)、CSN5/Jab1 の発現消失前後における Skp2 発現量に変化は認められなかった。これらのことから CSN5/Jab1 の発現消失後に誘導される細胞老化は p53 非依存的かつ Skp2 非依存的な新規の細胞老化であると結論づけた。今後、CSN5/Jab1

欠損後、どのようなメカニズムでこの細胞老化が誘導されるのかまた本来の p53 依存的な細胞老化との違いがどこにあるのか生理的機能があるのかなどを解明する必要があると考察される。またこの研究で示した CSN5/Jab1 の欠損に伴う p53 非依存的な細胞老化の誘導はヒトの腫瘍の約半数において認められる p53 が不活性化した悪性腫瘍を標的にした治療に有効であることが推測される。CSN5/Jab1 を標的にした新薬、新規化学物質などを同定することにより、p53 が不活性化状態の悪性腫瘍に対して効果的、かつ決定的な新しい抗がん剤としての応用が期待できる。

#### 4-5. CSN5/Jab1 と endoreplication/細胞質分裂異常

CSN5/ Jab1 を欠損した細胞における DNA 含量を調べた結果、4n から 8n の細胞集団の増加が認められ、位相差顕微鏡観察においても多核化した細胞を多く観察した。このことから CSN5/Jab1 が細胞質分裂や endoreplication を制御すると考えられる。実際、植物においては CSN が endoreplication に関与していることが報告されている (Schwechheimer C and Isono E., 2010)。また本研究室で作製された CSN5/Jab1 ノックアウトの胚において endoreplication を行う栄養芽細胞は正常であったが、通常の細胞周期が行われる内部細胞塊は増殖が抑制されていた。これらの知見も今回の実験結果を支持する。動物細胞において細胞質分裂や endoreplication が行われるメカニズムについてはいまだ明らかにされていない。しかし、endoreplication に関しては cyclin E や APC/C が関与していることが報告されている (Eliades A et al., 2010; Zielke N et al., 2008)。cyclin E の過剰発現が ploidy の上昇につながるということであるが、CSN5/Jab1 を欠損した細胞においても cyclin E の発現量の増加が認められるため、ploidy 上昇という表現型のメカニズムを部分的に説明できるかもしれない。しかし cyclin E の過剰発現のみでは endoreplication を起こさないことから、endoreplication が誘導されるメカニズムは完全には明らかにされていない。CSN5/Jab1 の欠損による ploidy の上昇が endoreplication を研究するための 1 つのシステムになると考察される。

#### 4-6. さいごに

本論文では CSN5/Jab1 トランスジェニックマウスが MPD を発症する新規分子メカニズムを明らかにし、CSN5/Jab1 ががん遺伝子として機能することを in vivo で証明した。がん遺伝子による発がん細胞周期制御は密接に関係することから次に、CSN5/Jab1 コンディショナルノックアウトの MEF を用いて CSN5/Jab1 の細胞周期制御における役割について検討した。その結果、CSN5/Jab1 は細胞周期の複数点で作用すること、細胞周期停止に対して拮抗して働くことを明らかにした。今回の実験系では細胞周期制御以外にも新たな生命現象が見られた。endoreplication、p53 経路

非依存的な新規の細胞老化である。endoreplication と発がんとの関係は定かではないが、CSN5/Jab1 をモデルにした endoreplication によるがん抑制機能のメカニズムを解明することが将来的ながん研究の進展につながると推測される。また細胞老化はがん抑制に働く生命現象として位置づけられている。この研究より CSN5/Jab1 が p53 経路非依存的な細胞老化に対して拮抗して機能すること、すなわち CSN5/Jab1 が発がんに対して直接働きかけることを初めて見出した。この知見は CSN5/Jab1 を標的にした新たながん治療への応用という点で期待できる。

## 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導を承りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分子生物学専攻動物分子遺伝学講座の加藤順也先生、加藤規子先生に謹んで深謝の意を表します。

CSN5/Jab1 のコンディショナルノックアウトマウスを供与してくださった Vita-Salute San Raffaele University School of Medicine の Ruggero Pardi 博士、MSCV-ires-GFP ベクターを供与してくださった Owen Witte 博士、CRE の cDNA を供与してくださったシンガポール国立大学の大里元美博士、Geminin の抗体を分与してくださった広島大学の瀧原義宏博士に感謝の意を表します。マウスの世話などお世話になりました高橋一彰氏、俵佳江氏、小澤珠代氏、動物舎のスタッフの方々に謝意を表します。また適切なお助言、ご助力を頂きました動物分子遺伝学講座の皆様にも感謝いたします。

## 6. 参考文献

- Adler AS, Lin M, Horlings H, Nuyten DS, van de Vijver MJ, Chang HY. (2006) Genetic regulators of large-scale transcriptional signatures in cancer. *Nat Genet.* 38(4): 421-430.
- Bae MK, Ahn MY, Jeong JW, Bae MH, Lee YM, Bae SK, Park JW, Kim KR, Kim KW. (2002) Jab1 interacts directly with HIF-1 $\alpha$  and regulates its stability. *J Biol Chem.* 277: 9-12
- Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W. (2001) COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J.* 20(7): 1630-1639.
- Bech-Otschir D, Seeger M, Dubiel W. (2002) The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci.* 115: 467-473.
- Bemis L, Chan DA, Finkielstein CV, Qi L, Sutphin PD, Chen X, Stenmark K, Giaccia AJ, Zundel W. (2004) Distinct aerobic and hypoxic mechanisms of HIF- $\alpha$  regulation by CSN5. *Genes Dev.* 18(7): 739-744.
- Bianchi E, Denti S, Granata A, Bossi G, Geginat J, Villa A, Rogge L, Pardi R. (2000) Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature.* 404(6778): 617-621.
- Bounpheng MA, Dimas JJ, Dodds SG, Christy BA. (1999) Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 13(15): 2257-2264.
- Bounpheng MA, Melnikova IN, Dodds SG, Chen H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Christy BA. (2000) Characterization of the mouse JAB1 cDNA and protein. *Gene.* 242(1-2): 41-50.

Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Thiele M, Schmucker J, Geiger G, Tovar GE, Bernhagen J. (2005) Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Lett.* 579: 1693-1701

Caballero OL, Resto V, Patturajan M, Meerzaman D, Guo MZ, Engles J, Yochem R, Ratovitski E, Sidransky D, Jen J. (2002) Interaction and colocalization of PGP9.5 with JAB1 and p27(Kip1). *Oncogene.* 21(19): 3003-3010.

Calligé M, Kieffer I, Richard-Foy H. (2005) CSN5/Jab1 is involved in ligand-dependent degradation of estrogen receptor {alpha} by the proteasome. *Mol Cell Biol.* 25(11): 4349-4358.

Carrabino S, Carminati E, Talarico D, Pardi R, Bianchi E. (2004) Expression pattern of the JAB1/CSN5 gene during murine embryogenesis: colocalization with NEDD8. *Gene Expr Patterns.* 4(4): 423-431.

Chauchereau A, Georgiakaki M, Perrin-Wolff M, Milgrom E, Loosfelt H. (2000) JAB1 interacts with both the progesterone receptor and SRC-1. *J Biol Chem.* 275(12): 8540-8548.

Chamovitz DA. (2009) Revisiting the COP9 signalosome as a transcriptional regulator. *EMBO Rep.* 10(4): 352-358.

Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW. (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell.* 86(1): 115-121.

Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT (2000) Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27<sup>kip1</sup>. *Nature Medicine* 6: 1235-1240

Chiba T, Tanaka K. (2004) Cullin-based ubiquitin ligase and its control by NEDD8-conjugating system. *Curr Protein Pept Sci.* 5(3): 177-184.

Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M. (1996) A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 383: 453-457.

Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ. (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science* 298(5593): 608-611.

Cope GA, Deshaies RJ. (2003) COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*. 114(6): 663-671.

Cope GA, Deshaies RJ. (2006) Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels. *BMC Biochem.* 9;7:1.

Dai YS, Hao J, Bonin C, Morikawa Y, Cserjesi P. (2004) JAB1 enhances HAND2 transcriptional activity by regulating HAND2 DNA binding. *Neurosci Res.* 76(5): 613-622.

Dealy MJ, Nguyen KV, Lo J, Gstaiger M, Krek W, Elson D, Arbeit J, Kipreos ET, Johnson RS. (1999) Loss of Cull1 results in early embryonic lethality and dysregulation of cyclin E. *Nat Genet.* 23(2): 245-248.

Dechend R, Hirano F, Lehmann K, Heissmeyer V, Ansieau S, Wulczyn FG, Scheidereit C, Leutz A. (1999) The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene.* 18(22): 3316-3323.

Dharmasiri S, Dharmasiri N, Hellmann H, Estelle M. (2003) The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis. *EMBO J.* 22(8): 1762-1770.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. (1995) A biomarker that



identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26;92(20): 9363-9367.

Doronkin S, Djagaeva I, Beckendorf SK. (2002) CSN5/Jab1 mutations affect axis formation in the *Drosophila* oocyte by activating a meiotic checkpoint. *Development.* 129(21): 5053-5064.

Doronkin S, Djagaeva I, Beckendorf SK. (2003) The COP9 signalosome promotes degradation of Cyclin E during early *Drosophila* oogenesis. *Dev Cell.* 4(5): 699-710.

Emberley ED, Niu Y, Leygue E, Tomes L, Gietz RD, Murphy LC, Watson PH. (2003) Psoriasis interacts with Jab1 and influences breast cancer progression. *Cancer Res.* 63(8): 1954-1961.

Eliades A, Papadantonakis N, Ravid K. (2010) New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. *J Biol Chem.* 285(24): 18909-18917.

Fukumoto A, Tomoda K, Yoneda-Kato N, Nakajima Y, Kato JY. (2006) Depletion of Jab1 inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett.* 580(25): 5836-5844.

Gil J, Peters G. (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9): 667-677.

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.* 94(5): 615-623.

Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K, Nakatani Y. (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell.* 113(3): 357-367.

Hallstrom TC, Nevins JR. (2006) Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis. *Genes & Development*. 20(5): 613-623.

Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. (2004) SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol*. 6(8): 731-740.

Hofmann K, Bucher P. (1998) The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci*. 6: 204-205

Huang YT, Iwamoto K, Kurosaki T, Nasu M, Ueda S. (2005) The neuronal POU transcription factor Brn-2 interacts with Jab1, a gene involved in the onset of neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 382(1-2): 175-178.

Huang J, Yuan H, Lu C, Liu X, Cao X, Wan M. (2007) Jab1 mediates protein degradation of the Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex. *J Mol Biol*. 371(2): 514-527.

Hwang CY, Ryu YS, Chung MS, Kim KD, Park SS, Chae SK, Chae HZ, Kwon KS. (2004) Thioredoxin modulates activator protein 1 (AP-1) activity and p27Kip1 degradation through direct interaction with Jab1. *Oncogene*. 23(55): 8868-8875.

Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT. (2006) Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 443(7110): 421-426.

Jeon JH, Lee KN, Hwang CY, Kwon KS, You KH, Choi I. (2005) Tumor suppressor VDUP1 increases p27(kip1) stability by inhibiting JAB1. *Cancer Res*. 65(11): 4485-4489.

Jones D, Candido EP. (2000) The NED-8 conjugating system in *Caenorhabditis elegans* is required for embryogenesis and terminal differentiation of the hypodermis. *Dev Biol.* 226(1): 152-165.

Kameda K, Fukao M, Kobayashi T, Tsutsuura M, Nagashima M, Yamada Y, Yamashita T, Tohse N. (2006) CSN5/Jab1 inhibits cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity through protein-protein interactions. *J Mol Cell Cardiol.* 40(4): 562-569.

Kato JY, Yoneda-Kato N. (2009) Mammalian COP9 signalosome. *Genes Cells.* 14(11): 1209-1225.

Kim BC, Lee HJ, Park SH, Lee SR, Karpova TS, McNally JG, Felici A, Lee DK, Kim SJ. (2004) Jab1/CSN5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation. *Mol Cell Biol.* 24: 2251-2262

Kim JH, Choi JK, Cinghu S, Jang JW, Lee YS, Li YH, Goh YM, Chi XZ, Lee KS, Wee H, Bae SC. (2009) Jab1/CSN5 induces the cytoplasmic localization and degradation of RUNX3. *J Cell Biochem.* 107(3): 557-565.

Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. (2000) Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature.* 408(6809): 211-216.

Kwak HJ, Kim SH, Yoo HG, Park SH, Lee CH. (2005) Jun activation domain-binding protein 1 is required for mitotic checkpoint activation via its involvement in hyperphosphorylation of 53BP1. *J Cancer Res Clin Oncol.* 131(12): 789-796.

Kurz T, Pintard L, Willis JH, Hamill DR, Gönczy P, Peter M, Bowerman B. (2002) Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science*. 295(5558): 1294-1298.

Li B, Ruiz JC, Chun KT. (2002) CUL-4A is critical for early embryonic development. *Mol Cell Biol*. 22(14): 4997-5005.

Li S, Liu X, Ascoli M. (2000) p38JAB1 binds to the intracellular precursor of the lutropin/choriogonadotropin receptor and promotes its degradation. *J Biol Chem*. 275(18): 13386-13393.

Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, Yang WL, Wang J, Egia A, Nakayama KI, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. (2010) Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature*. 464(7287): 374-379.

Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, Antipin J, Reva B, Koff A, Nimer SD. (2009) p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell*. 4(1): 37-48.

Lu C, Li Y, Zhao Y, Xing G, Tang F, Wang Q, Sun Y, Wei H, Yang X, Wu C, Chen J, Guan KL, Zhang C, Chen H, He F. (2002) Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway. *FASEB J*. 16(1): 90-92.

Luo W, Wang Y, Hanck T, Stricker R, Reiser G. (2006) Jab1, a novel protease-activated receptor-2 (PAR-2)-interacting protein, is involved in PAR-2-induced activation of activator protein-1. *J Biol Chem*. 281(12): 7927-7936.

Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, Wolf DA, Wei N, Shevchenko A, Deshaies RJ. (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*. 292(5520): 1382-1385.

Lykke-Andersen K, Schaefer L, Menon S, Deng XW, Miller JB, Wei N. (2003) Disruption of the COP9 signalosome Csn2 subunit in mice causes deficient cell proliferation, accumulation of p53 and cyclin E, and early embryonic death. *Mol Cell Biol.* 23(19): 6790-6797.

Malicet C, Hoffmeister A, Moreno S, Closa D, Dagorn JC, Vasseur S, Iovanna JL. (2006) Interaction of the stress protein p8 with Jab1 is required for Jab1-dependent p27 nuclear-to-cytoplasm translocation. *Biochem Biophys Res Commun.* 339(1): 284-289.

Maytal-Kivity V, Pick E, Piran R, Hofmann K, Glickman MH. (2003) The COP9 signalosome-like complex in *S. cerevisiae* and links to other PCI complexes. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(5): 706-715.

Maytal-Kivity V, Reis N, Hofmann K, Glickman MH. (2002) MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem.* 3:28.

Menon S, Chi H, Zhang H, Deng XW, Flavell RA, Wei N. (2007) COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nat Immunol.* 8(11): 1236-1245.

Mori M, Yoneda-Kato N, Yoshida A, Kato JY. (2008) Stable form of JAB1 enhances proliferation and maintenance of hematopoietic progenitors. *J Biol Chem.* 283(43): 29011-29021.

Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113(6): 703-716.

Ng CE, Yokomizo T, Yamashita N, Cirovic B, Jin H, Wen Z, Ito Y, Osato M. (2010) A Runx1 intronic enhancer marks hemogenic endothelial cells and hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 28(10): 1869-1881.

Oh W, Lee EW, Sung YH, Yang MR, Ghim J, Lee HW, Song J. (2006a) Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2. *J Biol Chem*. 281(25): 17457-17465.

Oh W, Yang MR, Lee EW, Park KM, Pyo S, Yang JS, Lee HW, Song J. (2006b) Jab1 mediates cytoplasmic localization and degradation of West Nile virus capsid protein. *J Biol Chem*. 281(40): 30166-30174.

Oono K, Yoneda T, Manabe T, Yamagishi S, Matsuda S, Hitomi J, Miyata S, Mizuno T, Imaizumi K, Katayama T, Tohyama M. (2004) JAB1 participates in unfolded protein responses by association and dissociation with IRE1. *Neurochem Int*. 45(5): 765-772.

Osaka F, Saeki M, Katayama S, Aida N, Toh-E A, Kominami K, Toda T, Suzuki T, Chiba T, Tanaka K, Kato S. (2000) Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J*. 19(13): 3475-3484.

Ou CY, Lin YF, Chen YJ, Chien CT. (2002) Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cull1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev*. 16(18): 2403-2414.

Panattoni M, Sanvito F, Basso V, Doglioni C, Casorati G, Montini E, Bender JR, Mondino A, Pardi R. (2008) Targeted inactivation of the COP9 signalosome impairs multiple stages of T cell development. *J Exp Med*. 196(2): 465-477.

Perez OD, Mitchell D, Jager GC, South S, Murriel C, McBride J, Herzenberg LA, Kinoshita S, Nolan GP. (2003) Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol*. 4(11): 1083-1092.

Peth A, Boettcher JP, Dubiel W. (2007) Ubiquitin-dependent proteolysis of the microtubule end-binding protein 1, EB1, is controlled by the COP9 signalosome: possible consequences for microtubule filament stability. *J Mol Biol.* 368(2): 550-563.

Petroski MD, Deshaies RJ. (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(1): 9-20.

Pintard L, Kurz T, Glaser S, Willis JH, Peter M, Bowerman B. (2003) Neddylation and deneddylation of CUL-3 is required to target MEI-1/Katanin for degradation at the meiosis-to-mitosis transition in *C. elegans*. *Curr Biol.* 13(11): 911-921.

Rabut G, Peter M. (2008) Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* 9(10): 969-976.

Schwechheimer C, Deng XW. (2001) COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol.* 11(10): 420-426.

Schwechheimer C, Isono E. (2010) The COP9 signalosome and its role in plant development. *Eur J Cell Biol.* 89(2-3): 157-162.

Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng XW. (2001) Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science.* 292(5520): 1379-1382.

Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W. (1998) A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.* 12(6): 469-478.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88(5): 593-602.

Sharon M, Mao H, Boeri Erba E, Stephens E, Zheng N, Robinson CV. (2009) Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Structure*. 17(1): 31-40.

Sherr CJ. (2006) Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer*. 6(9): 663-673.

Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Imamura J, Ikenoue T, Ijichi H, Kawabe T, Isobe T, Omata M. (2006) The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. *Oncogene*. 25(4): 633-642.

Tateishi K, Omata M, Tanaka K, Chiba T. (2001) The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J Cell Biol*. 155(4): 571-579.

Tomoda K, Kato JY, Tatsumi E, Takahashi T, Matsuo Y, Yoneda-Kato N. (2005) The Jab1/COP9 signalosome subcomplex is a downstream mediator of Bcr-Abl kinase activity and facilitates cell-cycle progression. *Blood*. 105(2): 775-783.

Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato JY. (2002) The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem*. 277(3): 2302-2310.

Tomoda K, Kubota Y, Kato J. (1999) Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*. 398:160-165

Tomoda K, Yoneda-Kato N, Fukumoto A, Yamanaka S, Kato JY. (2004) Multiple



functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice. *J Biol Chem.* 279(41): 43013-43018.

Unbehaun A, Borukhov SI, Hellen CU, Pestova TV. (2004) Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev.* 18(24): 3078-3093.

von Arnim AG, Chamovitz DA. (2003) Protein homeostasis: a degrading role for Int6/eIF3e. *Curr Biol.* 13(8): R323-325.

von Arnim AG, Schwechheimer C. (2006) Life is degrading--thanks to some zomes. *Mol Cell.* 23(5): 621-629.

Wan M, Cao X, Wu Y, Bai S, Wu L, Shi X, Wang N, Cao X. (2002) Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep.* 3: 171-176

Wang Y, Penfold S, Tang X, Hattori N, Riley P, Harper JW, Cross JC, Tyers M. (1999) Deletion of the Cull1 gene in mice causes arrest in early embryogenesis and accumulation of cyclin E. *Curr Biol.* 9(20): 1191-1194.

Wei N, Chamovitz DA, Deng XW. (1994) Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell.* 78(1): 117-124.

Wei N, Deng XW. (1992) COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis. *Plant Cell.* 4(12): 1507-1518.

Wei N, Deng XW. (1999) Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet.* 15(3): 98-103.

Wei N, Deng XW. (2003) The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19: 261-281

Wei N, Serino G, Deng XW. (2008) The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci.* 33(12): 592-600.

Wolf DA, Zhou C, Wee S. (2003) The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol.* 5(12): 1029-1033.

Yan J, Walz K, Nakamura H, Carattini-Rivera S, Zhao Q, Vogel H, Wei N, Justice MJ, Bradley A, Lupski JR. (2003) COP9 signalosome subunit 3 is essential for maintenance of cell proliferation in the mouse embryonic epiblast. *Mol Cell Biol.* 23(19): 6798-6808.

Yun J, Tomida A, Andoh T, Tsuruo T. (2004) Interaction between glucose-regulated destruction domain of DNA topoisomerase IIalpha and MPN domain of Jab1/CSN5. *J Biol Chem.* 279(30): 31296-31303.

Zhang XC, Chen J, Su CH, Yang HY, Lee MH. (2008) Roles for CSN5 in control of p53/MDM2 activities. *J Cell Biochem.* 103(4): 1219-1230.

Zielke N, Querings S, Rottig C, Lehner C, Sprenger F. (2008) The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Dev.* 22(12): 1690-1703.