

論文内容の要旨

申請者氏名 吉田 晃洋

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（ユビキチン-プロテアソーム系）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が重要な役割を果たす。Cullin を持つ E3 ユビキチンリガーゼ (Cullin-RING-Ligase; CRL) は E3 リガーゼ最大のファミリーで、ユビキチン様タンパク質 NEDD8 の付加により活性が調節される。COP9 signalosome (CSN) は NEDD8 を Cullin から切り離す（脱 NEDD8 化）ことで CRL 活性を制御し、第 5 サブユニット (CSN5/Jab1) の JAMM モチーフがこの活性に必須である。CSN5/Jab1 が様々なヒトのがんで過剰発現していること、CSN5/Jab1 のトランスジェニックマウスが骨髄増殖性疾患を発症すること、CSN5/Jab1 のノックアウト、ノックダウンが培養細胞や生体内の細胞増殖を抑制することから、CSN5/Jab1 はがん遺伝子で細胞増殖に必須であることが明らかであるが、細胞がん化におけるタンパク質分解制御/細胞周期制御の具体的な作用機序については未解明であった。

本論文では、CRE-flox システムを利用した条件性 CSN5/Jab1 ノックアウト (CSN5/Jab1^{flox}) 細胞を用いて細胞周期進行における特異的作用点の有無を検証することで、CSN5/Jab1 が細胞周期制御、細胞増殖、がん化にどうかかわるかの分子メカニズムを解明することを目的とした。CSN5/Jab1^{flox} 遺伝子座を持つマウス胚性線維芽細胞 (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。この CSN5/Jab1 非発現細胞では顕著に細胞増殖能が消失した。野生型および NES 変異体 (L237/240/241A) の CSN5/Jab1 は増殖能を回復させたが JAMM 変異体 (D151N) ではできなかった。細胞周期解析の結果、CSN5/Jab1 非発現細胞は細胞周期の複数点で進行を停止すること、ploidy が上昇すること、細胞老化を誘導することを見いだした。ウェスタンブロット法による解析により、CSN5/Jab1 非発現細胞では、Nedd8 化 Cullin1/Cullin4、p53、CDK インヒビター-p21、p16、サイクリン D1、E、A、Cdk2、Cdc2 の増加が認められた。また、CSN5/Jab1^{flox} p53^{-/-} MEF を用いることにより、上記の表現型が p53 に依存しないことを見いだした。

これらの実験結果から、CSN5/Jab1 は細胞周期の複数点で作用すること、細胞質分裂/endoreplication を制御すること、p53 非依存的な細胞老化に拮抗すること、これらの活性を通じて哺乳類細胞の増殖を制御し細胞がん化の一端を担うことを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 吉田 晃洋

ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解機構において、Cullin を持つ E3 ユビキチンリガーゼ (Cullin-RING-Ligase; CRL) の上流で COP9 signalosome (CSN) 複合体が働くことが知られている。これはユビキチン様タンパク質 NEDD8 を Cullin から切り離す (脱 NEDD8 化) 活性 (イソペプチダーゼ) によるものである。このイソペプチダーゼ活性には CSN の第 5 サブユニット (CSN5/Jab1) が重要であり、特に CSN5/Jab1 に含まれる JAMM モチーフが必須である。しかし、CSN5/Jab1 単体には活性が認められないので CSN 複合体がイソペプチダーゼの本体であると考えられる。CSN イソペプチダーゼは多くの生命種で重要な働きをするが、必ずしもすべての生物種で必須というわけではない。また、その作用機序も様々である。哺乳動物の場合、CSN2,3,5,8 のノックアウトマウスや、CSN1-8 のノックダウン細胞を用いた解析から、CSN が個体の維持と細胞の生存、増殖に必須であることが示されているが具体的な作用機序については未解明であった。

本論文は、条件性 CSN5/Jab1 ノックアウト (CSN5/Jab1^{flox}) 細胞を用い、哺乳類細胞の増殖と生存に CSN がどのようにかわるかを詳細に調べたものである。細胞周期進行における特異的作用点の有無を検証した結果、CSN5/Jab1 の不活性化が細胞周期を複数点で停止させるという結論を得た。この結果は予想されたものであったが、JAMM モチーフに変異を持つ CSN5/Jab1 変異体がノックアウトを救済することができないことを丁寧な実験で示すことにより、哺乳類細胞の増殖に CSN イソペプチダーゼ活性が必須であることを疑問の余地なく証明した意義は大きい。また、この結果はこれまでに CSN5/Jab1 の相互作用因子として G1、S、G2/M 各時期の制御因子が単離されている事実とよく合致する。さらに、注意深い観察をもとに、CSN の不活性化が細胞の ploidy を上昇させ、細胞老化を誘導することを見いだした。ウェスタンブロッティングの結果から、このような細胞では細胞老化誘導に重要な働きをすることがよく知られている癌抑制遺伝子 p53 が活性化されていることを見つけ、条件性 CSN5/Jab1 ノックアウトマウスと p53 ノックアウトマウスと掛け合わせることで、p53 ヌルの遺伝的背景で CSN5/Jab1 をノックアウトしても同様の現象が起こることを発見し、CSN5/Jab1 の不活性化が p53 非依存的細胞老化を引き起こすことを新たに見いだした点はこの分野の成果として意義が大きい。

以上のように、本論文は CSN を介したタンパク質分解制御が、細胞周期、細胞老化、エンドサイクル/細胞質分裂を制御することを証明したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。