

## 論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of the degradation of CDK inhibitor p57<sup>Kip2</sup> in osteoblastic cells  
骨芽細胞における CDK 阻害因子 p57<sup>Kip2</sup> の分解に関する解析

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 西森 茂樹

### 【背景】

細胞周期において、G1期の細胞に「S期に入る」シグナルが入るか否かが重要な役割を果たす。このシグナルが入ると、細胞は分裂へと進行し、入らないと、通常の増殖サイクルから離れ、静止期、分化、老化、アポトーシス等へと進行する。

このG1/S移行のプロセスにおいて、cyclin-dependent kinase (サイクリン依存性キナーゼ: CDK) は正の、CDK inhibitor (CDK 阻害因子: CKI) は負の制御因子として働く。1993年に初めて発見されたCKIは、現在、INK4 family (inhibitor of CDKs) と Cip/Kip family (CDK interacting protein/ Kinase inhibitory protein) の2つに分類され、INK4 family として、p16<sup>Ink4a</sup>、p15<sup>Ink4b</sup>、p18<sup>Ink4c</sup>、p19<sup>Ink4d</sup>の4つが、Cip/Kip family として、p21<sup>Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>、p57<sup>Kip2</sup>の3つが同定されている。

INK4 family が CDK4 と CDK6 のみを阻害するのに対し、Cip/Kip family は G1/S 期で働く全ての CDK を阻害する。なお、近年、p21<sup>Cip1</sup> 及び p27<sup>Kip1</sup> は、サイクリンと CDK の結合を促進する「正の制御因子」としても働くことが報告されている。

さて、上記の7種のCKIは全てノックアウトマウスが解析されているが、p57<sup>Kip2</sup>のノックアウトマウスのみが重篤な表現系を呈し、口蓋裂、短軀、下部消化管形成不全(鼓腸~小腸の欠損)等の解剖学的異常を伴い、生後半日で死亡した。

このように、p57<sup>Kip2</sup>は発生学的に重要な役割を果たしていることが示唆されるが、p57<sup>Kip2</sup>の細胞内での発現量が低いことが難点となり、他のCKIに比べ、研究が十分に進んでいない状態であった。

我々は p57<sup>Kip2</sup> ノックアウトマウスが骨に異常を生じたことに着目し、ラット胎児の頭頂骨から採取した初代培養骨細胞を 3 日間、血清飢餓下で培養し、静止期に留めると、p57<sup>Kip2</sup> が著明に増加することを見出した。また、この血清飢餓下の細胞に transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 刺激を加えると、p57<sup>Kip2</sup> が半日後に消失し、この過程にユビキチン・プロテアソーム系が関わることを示した (Urano. et.al., J. Biol. Chem. 274, 12197, 1999)。

### 【本論文の目的】

本論文ではこの分解系を詳細に検討することを目的とし、p57<sup>Kip2</sup> の分解に関し、TGF- $\beta$ シグナル伝達系の下流で作用する情報伝達因子 Smad の役割の解析した。

### 【結果及び考察】

(1) 今回、初代培養骨細胞はマウス新生児の頭頂骨から採取した。

胎児または新生児の頭頂骨を酵素で溶かして採取する骨細胞は heterogeneous な細胞集団だが、骨芽細胞としての各種性質を示すため、「osteoblastic cell」と命名されている。前回の JBC の論文では、ラット胎児から採取したが、マウス新生児の方がラット胎児よりも扱いやすいこと、実験で用いた p57<sup>Kip2</sup> 抗体や Smad の cDNA がマウス由来であることから、今回は生後 1 日目の新生児マウスから採取した。

(2) マウスの osteoblastic cell の系での再現性を確認した。

マウス由来の osteoblastic cell でも、血清飢餓により p57<sup>Kip2</sup> が蓄積し、この蓄積した p57<sup>Kip2</sup> 蛋白は TGF- $\beta$ 1 刺激 (1 ng/ml) によって Western Blot 上、約 24 時間後に消失した。この消失は 2 種のプロテアソーム阻害薬 (MG132、ラクタシスチン) で抑制され、プロテアソームによる分解系の関与が示唆された。

以上、マウスの系での再現性も確認され、以後、本論文での新たな解析となる。

(3) TGF- $\beta$ 1 刺激による p57<sup>Kip2</sup> の消失が主に分解によることを示した。

プロテアソームによる分解を阻害すると、p57<sup>Kip2</sup> 蛋白が減少しなくなるということは、「p57<sup>Kip2</sup> の減少は主に分解による」ことが示唆されるが、Western Blot は、蛋白の生成量と分解量の総和であり、厳密には、両者を分けて検討する必要がある。

そこで、Pulse Chase Study と Northern Blot を行った。血清飢餓下の osteoblastic cell を <sup>35</sup>S-アミノ酸でラベルした後、TGF- $\beta$ 1 刺激の有無で Chase すると、TGF- $\beta$ 1 刺激で p57<sup>Kip2</sup> の分解が促進され、TGF- $\beta$ 1 非刺激では p57<sup>Kip2</sup> は比較的安定であった。また、Northern Blot では、TGF- $\beta$ 1 刺激後 24 時間で、p57<sup>Kip2</sup> の mRNA 量は幾分、減少するものの、p57<sup>Kip2</sup> の細胞内蛋白量の消失は説明出来なかった。

以上の 2 点より、TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の消失は主に分解によると考えられた。

(4) アデノウイルスベクターを用いて Smad pathway を解析した。

TGF- $\beta$ 1 の細胞内情報伝達系として、Smad pathway が最もよく研究されている。TGF- $\beta$ 1 はまず Type II レセプターに結合し、Type II レセプターは次に Type I レセプターを活性化する。活性化 Type I レセプターは次に Smad2 または Smad3 (リガンド特異型 Smad) をリン酸化し、活性化する。このリン酸化を Smad7 (抑制型 Smad) は競合的に阻害する。活性化 Smad2 及び Smad3 は細胞質内で Smad4 (共有型 Smad) と結合し、核内に移行し、核内で他の転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子の発現を誘導または抑制する。

なお、TGF- $\beta$ 1 レセプター下流の Smad independent Pathway として、ERK/MAPK、JNK/SAPK、p38 MAP Kinase 等も報告されている。

アデノウイルスベクターはほとんどの細胞で、高い細胞導入効率と蛋白発現量を有し、生体組織から採取した初代培養系の細胞では有力な実験手段となる。

#### (4-1) 活性型 TGF- $\beta$ 1 Type I レセプターの過剰発現

TGF- $\beta$ 1 Type I レセプターに 1 アミノ酸置換を加えると、「constitutively active」の活性化レセプターとなることが報告されている。この活性型レセプターを組み込んだアデノウイルスベクターを、血清飢餓下の osteoblastic cell で過剰発現させると、感染 72 時間後に TGF- $\beta$ 1 刺激と同様に p57<sup>Kip2</sup> が分解され、p57<sup>Kip2</sup> が TGF- $\beta$ 1 Type I レセプターの下流で確かに分解されることが示された。

#### (4-2) 抑制型 Smad (Smad7) の過剰発現

抑制型 Smad (Smad7) の過剰発現は TGF- $\beta$ 1 刺激あるいは活性型 TGF- $\beta$ 1 Type I レセプター過剰発現による p57<sup>Kip2</sup> の分解亢進を阻害した。

「TGF- $\beta$ 1 Type I レセプターの下流」というだけでは、Smad-independent pathway も含まれるが、Smad2 または Smad3 の活性化を阻害する Smad7 により p57<sup>Kip2</sup> の分解が阻害されたことは Smad pathway の関与が強く示唆される。

#### (4-3) Smad-independent pathway に対する阻害薬の添加

TGF- $\beta$ 1 レセプター下流の Smad 以外の情報伝達因子として報告されている因子のうち、p38 MAP kinase の阻害薬 (SB203580) または MAP kinase kinase (MAPKK) の阻害薬 (PD98059) を加え、TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の分解が阻害されるかを調べたが、p57<sup>Kip2</sup> の分解は阻害されず、この点でも主として Smad pathway が関与することが支持された。

#### (4-4) Smad2、Smad3、Smad4 の過剰発現

Smad2、Smad3、Smad4、Smad2+Smad4、Smad3+Smad4 を血清飢餓下の osteoblastic cell で過剰発現させた。Smad2+Smad4、Smad3+Smad4 を発現させた場合、感染 96 時間後に p57<sup>Kip2</sup> の分解が見られ、Smad pathway 関与の可能性がさらに確実となった。

さらに、Smad2+Smad4+Smad7、または Smad3+Smad4+Smad7 と抑制型 Smad も発現させると p57<sup>Kip2</sup> の分解が抑制された。この 3 種の共発現は細胞を強く傷害し、96 時間の培養が不可能だったため、p57<sup>Kip2</sup> を分解できない程、低濃度の TGF- $\beta$ 1 (0.03 ng/ml) を加えることにより、Smad2、Smad3 をリン酸化させ、実験のタイムコースを早めた。

#### (4-5) 転写抑制剤の添加

p57<sup>Kip2</sup> の分解が Smad Pathway によるならば、最下流では、転写に関わるはずであるが、TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の分解誘導は、転写抑制剤 Actinomycin D 処理によって抑制された。念のため、他の転写抑制剤  $\alpha$ -Amanitin も用いても、同様の結果が得られた。

#### 【結論】

以上の結果から、osteoblastic cell における TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の分解には、仲介因子として Smad による細胞内情報経路が関与し、その作用は遺伝子の転写を介することが明確になった。Smad Pathway によって誘導されてくる新規の蛋白が p57<sup>Kip2</sup> を修飾し（例：リン酸化）、不安定化させる、あるいはユビキチン/プロテアソーム系による分解反応を直接、賦活化する等のメカニズムが推測された。