

論文内容の要旨

論文題目

腫瘍抑制因子 Tob の分解を促進する新規 WD40 repeat 蛋白質
WAT120 の解析

指導教官 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程 病因・病理学専攻

氏名 渡辺 誠

細胞の増殖、分化はそれらを促進するシグナルと抑制的にはたらくシグナルがバランスを取り合うことにより厳密に制御されている。これまでの研究によりその制御に関わる分子の機能破綻が発生異常、腫瘍などの発症へとつながる例が数多く報告されてきた。

Tob は受容体型チロシンキナーゼ c-ErbB2 と会合する分子として同定され、BTG1、PC3/TIS21/BTG2、ANA、Tob2、PC3B と N 末端側約 110 アミノ酸からなる領域に相同性をもつ。これらの分子は培養細胞に強制発現させると細胞増殖が抑制されることから、構造的にも機能的にも共通性を持つ増殖抑制蛋白質ファミリーを形成していると考えられている。特に Tob、Tob2、ANA、PC3 に関しては、細胞周期の G0/G1 期から S 期への進行を阻害することが示されている。さらに、PC3 は DNA 損傷時に p53 によって発現が誘導され、PC3 を欠損した ES 細胞では DNA 損傷時における G2/M 期停止に異常が起こる。このことから、Tob/BTG ファミリー分子は細胞周期の G0/G1 期停止および G2/M 期停止の両方に関与していると考えられる。

当研究室で *tob* 遺伝子欠損マウスを作成しその表現型の解析を行ったところ、肝臓などの様々な臓器において野生型マウスに比べ腫瘍の発生が高頻度で観察された。また、*tob*

遺伝子欠損マウスより得た線維芽細胞において cyclin D1 の発現量の増加がみられ、腫瘍の頻発には Tob の欠損による cyclin D1 発現の異常が関与していることが示唆された。腫瘍以外の点でも、*tob* 遺伝子欠損マウスに大理石骨病様の表現型が見られ、これは骨形成の異常亢進によることが明らかとなった。細胞レベルの解析において BMP 応答の異常を原因とする骨芽細胞の増殖及び分化の亢進が観察され、Tob は BMP-Smad 伝達系の負の制御因子であることが示された。これらのことから、Tob は細胞、個体レベルともに増殖、分化の制御に関わっていることが示唆された。

Tob は半減期が約 30 分と比較的短く、細胞周期を通してその蛋白量が厳密に制御されていることが示されている。近年の研究により Tob がユビキチン-プロテアゾーム系を介して分解されることが明らかにされ、細胞周期における Tob の蛋白量の制御にもユビキチン-プロテアゾーム系が関与していることが予想される。

我々は Tob の分解や機能発現に関わる分子を探索するため、yeast two-hybrid 法による Tob の相互作用分子の検索を行った。GAL4 DNA 結合ドメインと Tob のアミノ酸残基 2-236 の融合蛋白質を bait として使用し、ヒト肝臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。陽性クローンの塩基配列を解析した結果、約 15 種類の Tob 相互作用分子の候補が得られ、我々はこれらの分子の一つに新規 WD40 repeat 蛋白質を見いだした。WD40 repeat 蛋白質はユビキチン化に関わる蛋白質複合体の構成分子にしばしば含まれている。前述のように Tob はユビキチン-プロテアゾーム系を介し分解されるが、その詳細な機構は明らかにされていない。我々はこの分子が Tob のユビキチン化依存的分解に関わっていると予想し以下の解析を行った。

この新規蛋白質は 6 個の WD40 repeat を含む全長 925 アミノ酸残基の蛋白質であり、見かけの分子量は約 120kDa であった。我々はこの新規蛋白質を WAT120 (WD40 repeat protein associated with Tob, 120 kDa) と名付けた。ノーザンブロット法によりヒト組織における WAT120 mRNA の発現を調べたところ脾臓、末梢白血球及び精巣に強い発現が見られた。ウェスタンブロット法によりリンパ系組織における WAT120 蛋白質の発現を調べたところ脾臓、胸腺に強い発現が見られ、骨髄には弱い発現しか見られなかった。また、マウス胎児の *in situ* hybridization により、胸腺、小腸、神経節に WAT120 mRNA の強い発現が観察された。WAT120 は組織特異的な発現をしており、これらの組織における役割を解析していくことが必要と思われる。

WAT120 を Tob とともに COS7 細胞に強制発現させると Tob の分解が促進され、細胞をプロテアゾーム阻害剤 MG132 で処理することによりその分解が抑制された。さらに、WAT120 の欠失変異体を作製し Tob との相互作用を検討したところ、アミノ酸残基

670-925 に Tob との結合領域があり、実際この部分に強い Tob 分解誘導能があることが分かった。これらのことから WAT120 はユビキチン-プロテアゾーム系を介した Tob の分解に関与しており、詳細な解析の結果その機能には C 末端、とりわけアミノ酸残基 650-750 付近が重要な役割を果たしていることが示唆された。

蛋白質のユビキチン化にはユビキチン活性化酵素(E1)、結合・転移酵素(E2)、連結酵素(E3)が必要である。E3 には多様性があり、標的分子に対する特異性を決めている。E3 の中には複数の蛋白質の複合体として機能する例が知られており、代表的なものに SCF (Skp1-Cullin-Fbox protein)複合体及び構造的に類似した CBC (Cullin-Elongin BC)複合体がある (図 1)。それぞれ F box 蛋白質、SOCS box 蛋白質が標的蛋白質を認識する分子と考えられている。E2 とこれらの蛋白質とは Roc1 及び Cullin の二つの蛋白質によって架橋されており、SCF 複合体では Cullin1, CBC 複合体では Cullin2 または 5 が主に使われている。Skp1、Elongin BC は F box 蛋白質、SOCS box 蛋白質と Cullin1 をつなぐ分子と考えられている。これまでに E3 蛋白質の過剰発現により標的分子の分解が促進されることが多数報告されている。WAT120 も同様の効果を示すことから、WAT120 が E3 あるいは E3 複合体の構成因子として、Tob のユビキチン化に関与していると考えた。そこで GST タグを付けた WAT120 を遺伝子導入した細胞の抽出液から WAT120 が形成する蛋白質複合体を精製し、それに昆虫細胞、あるいは大腸菌から精製した組み換え体の E1、E2、Tob とユビキチンを混合し、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。反応物を SDS ポリアクリルアミドゲルに流し、ニトロセルロースフィルターに転写後、Tob のユビキチン化による高分子量側へのシフトをウエスタンブロット法により確認した。その結果、E2 として Cdc34 を用いたときに Tob のユビキチン化が見られた。次に我々は WAT120 が SCF 複合体の構成成分になり得るかどうかを調べるため、SCF 複合体の構成成分である Cullin1、Skp1 および Roc1 と WAT120 の相互作用を免疫共沈法により検討した。この結果 Roc1 および Cullin1 との相互作用はみられたが Skp1 との相互作用は見られなかった。さらに SCF 複合体において E2 として機能している Cdc34 との相互作用も見られた。従って、Tob ユビキチン化に関わる WAT120 複合体は従来の SCF 複合体の構成因子を含むが、一部は異なった蛋白質群からなることが考えられた。前述のように Skp1 を介さない SCF 様の E3 複合体として CBC 複合体があり、その複合体は SOCS box 蛋白質、ElonginBC、Roc1 及び Cullin2 または 5 で構成されている。WAT120 のアミノ酸配列を詳細に検討したところ ElonginBC 結合配列である SOCS box 様の配列が見いだされた。そこで WAT120 と ElonginB および C との相互作用を免疫沈降法により調べた結果、プロテアゾーム阻害剤を作用させたときのみ相互作用が観察された。JAK キナーゼの E3 である SOCS-1 においてもプロテアゾーム阻害剤を作用させたときのみ

ElonginB との相互作用が観察されることが報告されており SOCS-1 との機能の類似性が予想された。

以上の結果から WAT120 は SCF E3 複合体、CBC E3 複合体の構成因子のいくつかと相互作用することが分かり、従来知られているものとは異なる組み合わせにより新規の複合体（図 1）を構成し、Tob のユビキチン化に関与していることが示唆された。

一つの標的分子に複数の E3 が存在する例が知られており、それぞれの分子が場所、時間を異にして標的分子の機能を厳密に調節していると予想されている。Tob がユビキタスな発現をしているのに対し WAT120 が組織特異的な発現をしていることは Tob の分解も複数の因子によって制御されていることを示唆するものである。WAT120 のより詳細な機能の解析はこれらの組織における Tob の未知の機能を知る上でも有用であると考えられ、本研究はその端緒として重要な意味を持つものと予想される。さらに WAT120 の発現が高い組織において WAT120 の機能亢進が Tob 発現量の減少を引き起こし腫瘍の発生率を高める可能性がある。WAT120 は特にリンパ球に高発現していることから、WAT120 の白血病、リンパ腫発症への関与を検討していくことも必要であると考えられる。

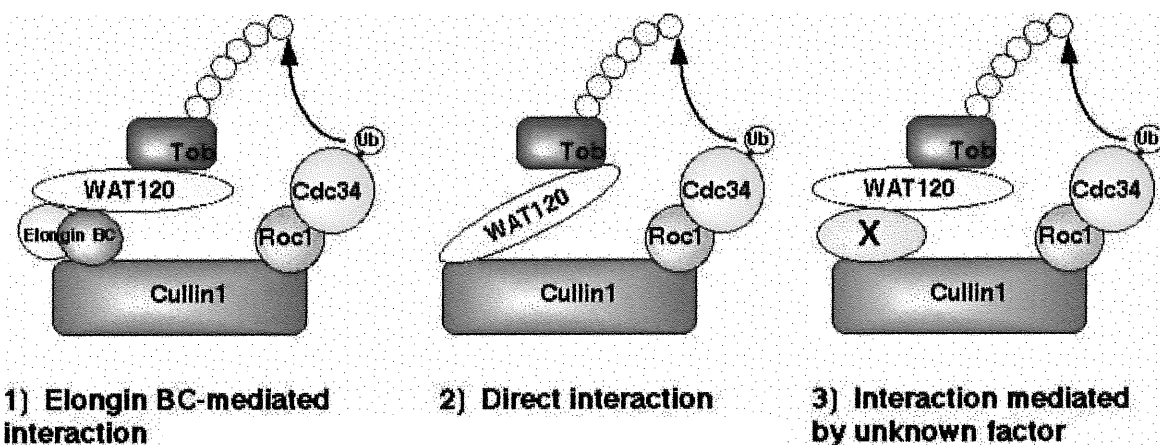


図1 WAT120新規複合体（仮説）

WAT120とCullin1との結合様式にはここに示した3通りの可能性が考えられる。