

審査結果の要旨

氏名 渡辺 誠

本研究は、これまで不明な点が多かった Tob の機能や翻訳後の修飾、分解機構を相互作用分子の解析を通して明らかにするため、Yeast Two-Hybrid 法による Tob の相互作用分子の検索および得られた相互作用分子の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1) Yeast Two-Hybrid 法によるスクリーニングの結果、Tob 相互作用分子として WD40 repeat ドメインを 6 個もつ全長 925 アミノ酸の新規蛋白質を同定し、WAT120 (WD40 repeat protein associated with Tob 120 kDa) と命名した。WAT120 のホモログは *C. elegans*、ガンビアハマダラカにも見いだされ、動物で保存されていることが判明した。WAT120 mRNA の強い発現が胸腺、脾臓、末梢白血球、神経節、精巢において観察され、WAT120 は組織特異的な発現様式をしていることが明らかとなった。

2) WAT120 と Tob とのほ乳類の細胞内における相互作用が免疫沈降法により明らかにされ、さらに WAT120 の欠失変異体と Tob の相互作用を検討した結果、WAT120 は Tob と C 末端 584-925 の領域で結合し、Tob との結合領域はこの範囲に散在していることが示唆された。

3) Tob を WAT120 と共発現させたところ Tob 蛋白質の発現量が減少し、プロテアゾーム阻害剤である MG132 によりそれが抑えられたことから、WAT120 が Tob のユビキチン-プロテアゾーム系依存的分解を促進することが示された。さらに WAT120 欠失変異体の Tob 分解促進能を検討した結果、アミノ酸残基 720-770 が分解促進に重

要であることが明らかとなった。

4) *In vitro* ユビキチン化アッセイにより、WAT120 がユビキチンリガーゼ (E3) として Tob をユビキチン化し得ることが明らかとなり、WAT120 は E3 として蛋白質のユビキチン化に関与していることが示唆された。さらにこの反応にはユビキチン連結酵素 (E2) として Cdc34 が必要であることが示された。

5) WAT120 は E2 をリクルートしてくるために必要な RING フィンガードメインを持っていなかったことから、E3 として機能するために蛋白質複合体を形成していると考え、E3 複合体としてすでに知られている SCF 及び CBC 複合体の構成因子と WAT120 の相互作用を検討した。この結果、WAT120 は SCF 複合体の構成因子である Roc1、Cullin1、Cdc34 (E2) と相互作用するが、同じく SCF 複合体の構成因子である Skp1 とは相互作用しないこと、さらに、CBC 複合体の構成因子である Elongin BC と相互作用することが明らかとなった。これらのことから WAT120 は SCF 複合体に類似した新規 E3 複合体を形成することが明らかとなった。

以上、本研究では Tob 相互作用分子の検索によって同定された新規蛋白質 WAT120 が SCF 様の新規蛋白質複合体を形成し、E3 として機能し得ることが明らかにされた。ユビキチン-プロテアゾーム系による蛋白質分解には未だ不明な点が多く、新規 E3 複合体を提唱した本研究は蛋白質ユビキチン化機構の研究進展の端緒となり得るものであり、学位の授与に値するものと考えられる。