

論文内容の要旨

論文題目 アポトーシス阻害タンパク質 Apollon による cyclin A のユビキチン化と
分裂期制御に関する研究

氏名 大畑 広和

[Introduction]

Apollon はアポトーシス阻害タンパク質の 1 つであり、BIR (baculoviral IAP repeat)ドメインで Smac や Caspase-9 などのアポトーシス実行因子と結合し、これら結合タンパク質をユビキチン化して、プロテアソームによる分解を促進することによってアポトーシスを阻害することが明らかとなっている。しかし、当研究室で作成した Apollon 欠失マウスは胎生致死であり、胎仔の発育に遅延が認められることから、Apollon にはアポトーシス阻害だけでなく細胞増殖を制御する機能もあることが推測される。

細胞周期の進行はサイクリン (cyclin)とそのパートナーであるサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase: cdk)によって調節されている。G1 期から S 期への進行は主に cyclin D-cdk4/6 と cyclin E-cdk2 によって制御され、G2 期から M 期の進行は主に cyclin A-cdk1 と cyclin B-cdk1 によって制御されている。

M 期の制御分子である cyclin A は G1/S 移行期から合成され始め、G2/M 期においてピークとなり、M 期の前中期から中期にかけて急激に分解される。一方、cyclin B は G2 期から合成され始め、G2/M 期においてピークとなり、M 期後期に分解される。cyclin A と cyclin B の活性は M 期の進行に必須であるが、逆に M 期からの離脱には両者の分解が必要である。cyclin A と cyclin B の分解に関しては明確な分子機構はわかっていないが、細胞周期特異的な E3 ligase である APC/C (anaphase promoting complex/ cyclosome)によりユビキチン化を受けプロテアソームで分解されるという報告がある。し

かしながら、cyclin A は cyclin B より必ず先に分解されることが知られている。また、ノダゾールなど微小管形成を阻害することによってスピンドルチェックポイントを活性化し APC/C の活性を抑制する薬剤を処理すると、cyclin B の分解は阻害されるが、cyclin A の分解は阻害されないことがわかっている。これらのことから、cyclin A の分解には cyclin B とは異なる制御機構が存在することが予想されるが、その実体は分かっていない。

本研究では、アポトーシス阻害タンパク質である Apollon が cyclin A の分解を制御することによって M 期の進行に関与していることを明らかにした。

[Results]

(1) Apollon^{-/-}MEFに見られる細胞周期異常

Apollon^{-/-}MEF (mouse embryonic fibroblast)を *In vitro*で初代培養すると、野生型のMEFに比べて早期に増殖が停止することから、Apollon欠失細胞は野生型の細胞よりも早く老化することがわかった。また、不死化したMEFを樹立し、その増殖の様子を観察したところ、不死化したApollon^{-/-}MEFでは2つに分裂できない細胞や、1度3つに分裂した後、また1つに戻ってしまう細胞など、分裂に異常のある細胞が多数観察され、野生型の細胞に比べて分裂期の開始から終了までの時間が延長していた。

これらの結果から、Apollon欠失細胞は初代培養において早期に老化すること、分裂に異常がみられ、細胞周期のM期が延長していることがわかった。

(2) Apollon と cyclin A の結合

上記の結果から Apollon が M 期制御に重要であることが示唆された。M 期を制御しているタンパク質として cyclin A と cyclin B がよく知られているため、Apollon と相互作用するかを検討した。細胞に Apollon と cyclin A あるいは cyclin B を一過性に発現させて結合を検討したところ、cyclin B に比べて cyclin A が Apollon と強く結合した。この cyclin A と Apollon の結合は内在性のタンパク質同士でも確認できたため、Apollon と cyclin A は生理的な条件下においても結合すると考えられる。

次に、Apollon と cyclin A の結合領域を特定するため、それぞれの種々の変異体を用いて、結合を検討した。Apollon の UBC のみ、あるいは BIR と UBC の両方に変異を導入した point mutant を用いた場合、cyclin A はこれらの変異体 Apollon と同野生型の Apollon と同程度に強く結合した。このことから Apollon と cyclin A との結合には Apollon の UBC ドメインや、BIR ドメインは必要ではないことが確認された。一方、cyclin A の各種 deletion mutant を用いた結合実験から Apollon は cyclin A の cyclin box に結合することがわかった。cyclin A の結合分子である cdk1/2 も cyclin A の cyclin box に結合するため、Apollon と cdk1/2 が cyclin A と競合的に結合する可能性が考えられた。そこで cdk による競合実験を行ったところ、Apollon と cyclin A の結合は cyclin A と結合する cdk1/2 によって強く阻害された。

(3) Apollon による cyclin A のユビキチン化

Apollon にはタンパク質のユビキチン化において E2 として機能する UBC (ubiquitin-conjugating enzyme)ドメインが存在するため、Apollon が cyclin A をユビキチン化するかどうかを検討した。その結果、細胞に Apollon を過剰発現させると cyclin A のユビキチン化が亢進することがわかった。次に、Apollon による cyclin A のユビキチン化に Apollon の UBC ドメインが重要であるかどうかを調べるために、Apollon の UBC 活性欠失変異体を用いて同様に検討した。その結果、予想に反し、Apollon の UBC 活性欠失変異体を過剰発現させた場合でも、野生型の Apollon と同様に、cyclin A のユビキチン化促進活性が認められた。これらの結果から、Apollon による cyclin A のユビキチン化には、Apollon 自身の UBC 活性は必ずしも必要ではなく、他の E2 分子と協調して機能している可能性が示唆された。さらに、cyclin A のユビキチン化に対する cdk1/2 の影響を検討したところ、cdk1/2 を共発現することによって、Apollon による cyclin A のユビキチン化が阻害された。

以上より Apollon は cdk1/2 とは結合していない cyclin A と結合して、そのユビキチン化を促進していること、しかし、このユビキチン化には Apollon の UBC は必ずしも必要ではないことが示唆された。

(4) Apollon ノックダウンによる cyclin A 分解遅延と M 期延長

Apollon による cyclin A のユビキチン化が cyclin A の分解制御に関与するかを調べるために、siRNA で Apollon をノックダウンした細胞を用いて M 期での cyclin A の分解を検討した。その結果、Apollon siRNA を処理した後、S 期に同調培養し、薬剤除去後の細胞周期の進行を解析したところ、M 期からの離脱が遅くなることが認められ、これに伴って、cyclin A の分解が遅延することが観察された。cyclin A が分解されないと M 期からの離脱が遅れる、あるいは止まることが報告されていることから、Apollon が cyclin A の分解を制御することにより M 期を制御することが強く示唆された。

本研究において私は、今まで詳しいメカニズムがわかっていなかった M 期における cyclin A の分解機構の一部を解明し、アポトーシス阻害タンパク質である Apollon が cyclin A の分解を介して分裂期を制御するという新規機能を有することを見出した。