

論文審査の結果の要旨

氏名 大畑 広和

Apollon は IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) ファミリーに属する分子量 500K の巨大なタンパク質である。Apollon は N 末の BIR ドメインで SMAC や Caspase9 などのアポトーシス実行因子と結合し、C 末の UBC ドメインの機能によりこれら結合タンパク質をユビキチン化する機能を持つことが明らかになっている。Apollon によりユビキチン化された SMAC、Caspase9 はプロテアソームにより分解されるため、Apollon はアポトーシスを阻害する。しかし Apollon 欠失マウスは、過剰なアポトーシスは観察されないにもかかわらず、胎生致死及び胎仔の発育遅延を示すことから、Apollon には細胞周期や細胞分裂を制御する機能もあることが推測された。

大畑広和の論文は、Apollon が細胞周期制御因子である cyclin A と結合、ユビキチン化し、細胞周期の M 期を制御する重要な機能を持つことを明らかにしたものである。

本論文は全 5 章からなり、第 1 章では、Apollon 欠失細胞（マウス胎仔由来線維芽細胞）に見られる細胞周期の異常をまとめている。Apollon 欠失 MEF を *in vitro* で初代培養すると、野生型の細胞に比べて早期に老化する。初代培養 MEF から不死化した細胞を樹立し、その増殖の様子を詳しく観察することにより、不死化した Apollon 欠失細胞では、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細胞周期の M 期が延長していることを見出した。また中心体を過剰に複製した細胞が多数現れることを見出した。

第 2 章では、Apollon と M 期の細胞周期制御因子 cyclin A との相互作用について詳細な検討を行っている。まず Apollon は cyclin A と細胞内で強く結合し、cyclin B とは結合しないことを免疫共沈降の実験により示した。この Apollon と cyclin A との結合には Apollon の BIR ドメインは必要ではなく、Apollon と SMAC や Caspase9 との結合とは結合様式が異なることを明らかにした。一方、cyclin A の種々の変異体を用いた実験から Apollon は cyclin A の cyclin box1 に結合すること、この結合は cyclin A の結合分子である cdk1 あるいは cdk2 によって強く阻害されることを見出した。

第 3 章では、Apollon が cyclin A のユビキチン化に関与するかを検討している。その結果、Apollon が cdk 非結合型の cyclin A のユビキチン化を促進すること、こ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 cyclin A をユビキチン化している事を明らかにした。

第 4 章では、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分裂期における cyclin A の分解について解析している。その結果、Apollon ノックダウン細胞では、細胞分裂期の prometaphase で cyclin A の分解が遅延し、分裂期が延長することが明らかとなった。

第 5 章では cyclin A と cdk1 の解離メカニズムについて検討しており、prophase で細胞質から核内に移行する cyclin B が核内で cyclin A と cdk1 の解離を誘導している可能性を示唆した。

従来、細胞周期のM期における cyclin A と cyclin B の分解には APC/C 複合体によるユビキチン化が重要であることが示唆されていたが、cyclin A が cyclin B よりも必ず先に分解されるメカニズムは明らかになっていなかった。本論文は、Apollon が cyclin A のユビキチン化を触媒することを見出し、M期において cyclin A が cyclin B よりも先に分解される分子機構を明らかにした研究であり、その内容は博士（科学）の学位を与えるに十分なものであると判断する。