

論文の内容の要旨

論文題目 Tob タンパク質複合体因子群の同定と機能解析

指導教官 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

宮坂 隆

高等生物における細胞の増殖・分化は、生命活動の維持や個体内の組織形成などに密接な関係があり、ヒトではその異常によって発癌や疾患、さらに奇形などが引き起こされる。したがって、細胞の増殖・分化が環境に応じて正常に制御されることは、生命活動を維持するために重要な要素となりうる。一方、細胞の増殖・分化を制御する因子はこれまで数多く同定され、解析されている。しかしながら、これらの既知の因子と機能によってすべての生命現象のメカニズムが説明されるわけではなく、現在もなお新たな因子が同定され、その機能についての知見が蓄積してきている。

当研究室で注目しているタンパク質 Tob は、アミノ末端における相同性から Tob2、BTG1、BTG2、ANA、PC3B とファミリーを形成しており、ファミリー間で特に相同性が高い領域として A ボックス、B ボックスの二つの領域を有している(図 1)。すべての Tob/BTG ファミリーメンバーは、NIH3T3 細胞に過剰発現すると増殖抑制能を示す。したがって、ファミリーメンバー間で共通な細胞増殖抑制機構が存在すると推測される。現在まで Tob ファミリーの結合因子がいくつか同定されており、特に Cnot7/Caf1 はすべての Tob ファミリーメンバーと結合し、Tob ファミリーに共通する分子制御機構の解明のための手がかりを提供すると考えられた。Tob と Cnot7/Caf1 の会合体の結晶構造解析から、両者の会合に必要な Tob タンパク質上の配列は、A ボックスと B ボックスに存在することが分かってきた。ところで Cnot7/Caf1 の酵母のホモログ Caf1 は、もともと転写制御に関わる因子として解析されていた。その後、酵母 Caf1 が mRNA 分解に関わることも報告された。しかしながら Tob ファミリーと Cnot7/Caf1 の機能的な相関関係は、まだ明確になっていない。

これら分子生物学的な研究と平行して、生物学的な研究成果も報告されている。当研究室によって *tob* 遺伝子欠損マウスが作製され、Tob の個体レベルの役割が報告された。

このマウスに観察された Osteoblast の異常増殖による骨密度の上昇が、Tob の欠損が引き起こす Smad 依存的な転写の異常亢進によることが明らかになった。また肝臓や乳房での腫瘍発生率の増加が観察され、*tob* が癌抑制遺伝子であることが示唆された。この腫瘍発生率の増加の一因として、*tob* 遺伝子欠損マウスの肝臓での *cyclinD1* mRNA の過剰発現が確認された。同時に、Tob が HDAC1 をプロモーターヘリクルートすることによって *cyclinD1* の転写を抑制することも解明された。他のグループからは、BTG2 が DNA 損傷に伴って p53 依存的に発現が上昇することで細胞周期の停止を引き起こすことや、Tob が Smad の DNA 結合能を増強し IL-2 プロモーター活性を抑制することで、T 細胞の Anergy に関わっていることなども報告されている。

このように Tob ファミリーの機能に関する情報が蓄積されてきたため、Tob の機能を解析するにあたって、視点の変化や解析手法の工夫が要求された。近年の技術進歩により、質量分析計を用いて興味あるタンパク質に会合する分子群を探索する方法は頻繁に用いられており、プロテオーム解析の一手法として有益な結果を導いている。そこで本研究ではこの手法を用いた Tob に結合する複合体分子群の同定によって、Tob ファミリーの細胞増殖抑制能の新しい機構を探索し、新展開を導くことを目指した。精製のために大量のタンパク質を要すると思われたため、浮遊培養によって大量の細胞を得ることが可能な HeLa.S3 細胞株を選択した。

HeLa.S3 細胞への遺伝子導入により FLAG タグ融合 Tob (Tob-FLAG) を安定発現する細胞株を樹立した。得られたすべての細胞株は、親株やベクターのみを導入した細胞株に比べ増殖が遅かった。このことは Tob が HeLa.S3 細胞に対して細胞増殖抑制能を持つことを示しており、つまり HeLa.S3 細胞内に Tob による増殖抑制に必要な分子群の存在が示唆された。次に、Tob が細胞内で複合体を形成していることを確認するために、HeLa.S3 細胞から抽出したタンパク質をゲルろ過法によって分子サイズごとに分画した。それぞれの画分をウエスタンブロットした結果、Tob-FLAG が細胞内で約 700kDa の複合体を形成していることが示された。また抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降によって精製された Tob-FLAG 結合タンパク質を、銀染色法で検出した結果、Tob と複合体を形成する候補タンパク質が複数検出された。質量分析計を用いてこれらの Tob 複合体分子群を同定するために、約 1×10^{12} 個の細胞から核抽出液を調整し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降によって Tob 複合体を精製した。次に過剰量の FLAG ペプチドの添加によって Tob 複合体を抗体から解離させ、さらに抗 Tob モノクローナル抗体による免疫沈降を行った。精製タンパク質を一次元電気泳動にかけ CBB による染色を行った結果、34 本の明瞭なバンドが検出された(図2)。バンドを切り出し、トリプシン処理によるゲル内消化を行い、ペプチドを溶出した。これらを LC-MALDI-TOF/TOF 質量分析計によってペプチドシーケンスした。この測定結果から MASCOT 解析によってタンパク質を 21 種類同定した。

同定タンパク質には、出芽酵母の研究によって転写制御や mRNA 分解に関わること

が知られている CCR4-Not 複合体の構成分子群のヒトホモログが 7 種類含まれていた。具体的に Cnot1、Cnot2、Cnot3、Cnot6-like(酵母 CCR4 ホモログ)、Cnot7/Caf1、Cnot9/Rcd1(酵母 Caf40)、Cnot10(酵母 Caf130)がそれにあたる。既知の Tob 結合因子 Cnot7/Caf1 が同定されたことは、本実験系の信頼性を示している。他にも、11 種類の RNA 結合タンパク質と 2 種類の RNA ヘリケースも含まれていた。このことは、Tob 複合体が mRNA の転写伸長、mRNA スプライシング、mRNA 輸送など、mRNA プロセッシングに関わる機能を有していることを示唆している。例えば CD44 mRNA のスプライシング制御に関わっている Sam68 も同定タンパク質に含まれていた。現在のところ、Tob や CCR4-Not 複合体が mRNA スプライシング制御に関わるという報告は無く、今後新規機能として確認されることが期待される。

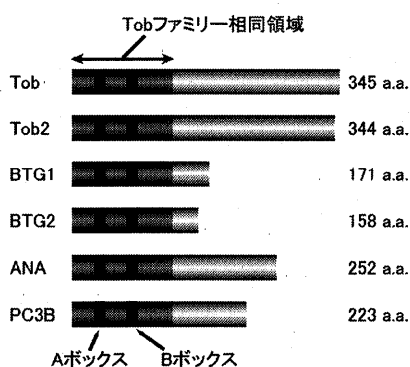


図1 Tobファミリーの模式図
N末端に相同領域が存在し、その中に特に相
同性が高いAボックスとBボックス領域が存在
する。各メンバーのアミノ酸数を右に示した。

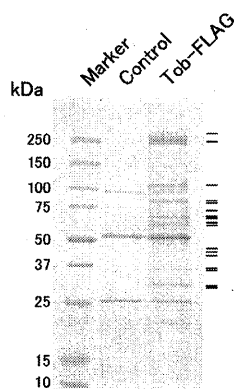


図2 Tob複合体
抗FLAG抗体と抗Tob抗体によって精製され同定されたTob複合体因子群。

CCR4-Not複合体	RNA 結合タンパク質
Cnot1	RAVER1
Cnot2	TLS/ FUS
Cnot3	Sam68
Cnot6-like	TDP-43
Cnot7/Caf1	TIA-1
Cnot9/Rcd1	
Cnot10	(hnRNPs)
	hnRNP A2/ B1
	hnRNP F
	hnRNP H1
	hnRNP H2
	hnRNP H3
	hnRNP K
RNA ヘリケース	
p68 RNA ヘリケース	
DDX3	

CCR4-Not 複合体の構成分子群は下等生物や植物でも保存されている。中でも Not1 を欠損した酵母細胞は唯一致死性を示す。このことは Not1 が複合体中で唯一生存に不可欠な因子であることを示唆している。また酵母ツーハイブリッドアッセイや GST プルダウンアッセイ、そして免疫沈降実験によって、Not1 が CCR4-Not 複合体分子群の足場として機能していることが推測されている。一方 Tob のホモログは多細胞動物だけでクローニングされており、酵母には存在しない。したがって多細胞動物で特有な、CCR4-Not 複合体の機能に対する Tob の作用機構が存在すると考えられた。そこで Tob の CCR4-Not 複合体に対する作用を知るために、複合体で中心的な因子 Cnot1 の機能解析に焦点を絞った。Cnot1 は電気泳動で約 250kDa 付近を示すタンパク質であり、NCBI データベースより全長が 2376 アミノ酸残基からなることがわかっている。特に既知の機能ドメイン構造は見あたらないが、酵母、線虫、ショウジョウバエホモログのアミノ酸配列と比較すると、高度に保存されている領域が 3 ヶ所存在した。しかし、これらの領域がどのような機能を有しているかは不明である。

Cnot1 の過剰発現実験のために、全長のヒト *cnot1* cDNA のクローニングを行った。Cnot1 が Tob や Cnot7/Caf1 との複合体形成を確かめるために、Cnot1、Tob、Cnot7/Caf1 を過剰発現した COS7 細胞に対し、グリセロールグラジエント法を行った。その結果、これら三つのタンパク質が同じフラクションに存在し、つまり同じ複合体を形成していることが示された。さらに Cnot1 の Tob や Cnot7/Caf1 との結合領域を決定するために、Cnot1 欠失変異体を作製し、COS7 細胞に Tob または Cnot7/Caf1 と共発現させた。酵母 Not1 と Caf1 の結合や、Tob と Cnot7/Caf1 の結合が確認されていることから、Tob が Cnot7/Caf1 を介して Cnot1 に結合する可能性を想定していた。しかしながら、細胞抽出液を免疫沈降法とウエスタン法によって確認した結果、Tob と Cnot7/Caf1 は Cnot1 上の異なる領域に結合することがわかった。この結果に加え、Tob が Cnot7/Caf1 と直接結合することからも、これら三分子が複雑に結合しあい立体構造を形成していると考えられた。

次に Cnot1 の細胞レベルでの機能を知るためにオリゴ siRNA のトランスフェクションによる RNAi 法を行った。HeLa 細胞において Cnot1 の発現が抑制されると、細胞増殖が抑えられた。Cnot1 は細胞増殖を正に制御するか、もしくは増殖に必須な因子であることが示された。上述の *tob* 遺伝子欠損マウスの報告で、Tob による *cyclinD1* プロモーター活性の抑制がルシフェラーゼアッセイを用いて示されていた。そこでこの実験系を Cnot1 の過剰発現系に適用した結果、*cyclinD1* プロモーター活性の上昇が検出された。逆に Cnot1 を RNAi 法によって発現抑制したときには、*cyclinD1* プロモーター活性が低下した。以上より Cnot1 が *cyclinD1* プロモーターを正に制御する因子であることが示された。しかし、RNAi によって Cnot1 の発現を抑制させたとき、Tob は *cyclinD1* プロモーター活性を抑制した。この結果から Tob と Cnot1 における *cyclinD1* プロモーターの制御は互いに独立している可能性が示唆された。

本研究をまとめると、(1) Tob 複合体の構成分子として CCR4-Not 複合体構成分子群や RNA 結合タンパク質群を同定した。(2) 特に Tob の機能を理解するために、酵母の CCR4-Not 複合体中でも生存に不可欠な Not1 のヒトホモログ Cnot1 に注目した。(3) Cnot1 は Tob や Cnot7/Caf1 と同じ複合体を形成しているが、Tob と Cnot7/Caf1 が結合する Cnot1 の領域は異なっていた。(4) RNAi 法の結果から、Cnot1 は細胞増殖の進行に関係する因子であった。(5) ルシフェラーゼアッセイによって、Cnot1 が *cyclinD1* プロモーター活性を上昇させることが分かった。これらの結果をふまえ、今後 Cnot1 の発現を抑制しマイクロアレイをするなど、転写標的となりうる因子を探索し、Tob のマイクロアレイデータとの比較によって、機能的な関係が解明されることが期待される。また、Tob 複合体中に複数の RNA 結合タンパク質が存在したことから、Tob 複合体が mRNA の転写からタンパク質の翻訳までの mRNA プロセッシングに関わっていることが推測された。Tob や Cnot1 の過剰発現や発現抑制系によって、Tob 複合体と mRNA の伸長、スプライシング、輸送、分解などとの関係を一つずつ検証していくことが重要と考えられた。