

論文の内容の要旨

論文題目 アポトーシス阻害タンパク質 Apollon による cyclin A 分解と
細胞周期制御機構の解析

氏名 菊池 亮

<序論>

IAP (inhibitor of apoptosis protein)ファミリーの一つである Apollon は Smac、caspase9 といったアポトーシス実行因子を、自身の UBC ドメインによりユビキチン化して、プロテアソーム依存的な分解へと導くことで、アポトーシスを阻害することが明らかになっている。しかし、Apollon ノックアウト胎児マウスではアポトーシスの異常な亢進は観察されておらず、特徴的表現型として体のサイズの減少や胎児繊維芽細胞 (MEF) の増殖速度の低下、早期増殖停止などが観られている。これらの知見から、Apollon が細胞増殖 (細胞周期) の制御に関与している可能性が考えられた。

私は、Apollon による細胞周期制御機構を解明することを目的として解析を進めた結果、Apollon が cyclin A をユビキチン化してその分解を制御すること、cyclin A の分解を通して細胞周期の特に M 期進行の制御に関与する可能性があることを明らかにした。

<方法・結果>

1. Apollon ノックアウト MEF における細胞周期の異常

Apollon ノックアウト MEF と野生型 MEF の細胞周期をフローサイトメーターにより解析した結果、Apollon ノックアウト MEF では野生型 MEF と比べて G2/M 期の細胞の割合が 10%程度多いことが明らかになった。Apollon ノックアウト MEF では G2/M の進行が遅延している可能性が考えられたので、M 期の長さを直接測定するために MEF の増殖の様子をビデオに撮り検討した。M 期の長さは、細胞がラウンドアップしてから二つに分裂し再び接着するまでの時間とした。その

結果、Apollon ノックアウト MEF では全体的に M 期の時間が延長していることが認められ、このことから Apollon は細胞周期の特に M 期の進行に重要な機能を持つことが示唆された。(Fig.1-1) またビデオによる検討の際、

Fig.1-1 Apollon KO MEFのM期延長

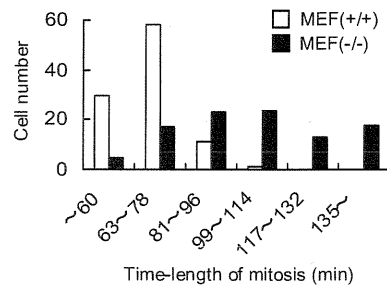
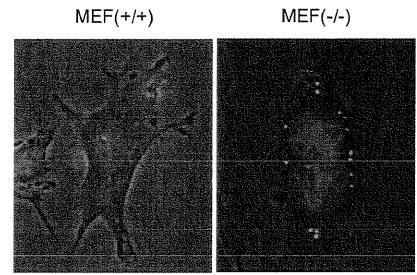


Fig.1-2 Apollon KO MEFにおける中心体過剰

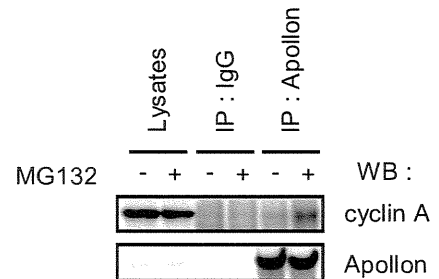


Apollon ノックアウト MEF の一部の細胞では一つの細胞が三つに分裂するなどの異常分裂が観察された。このような分裂異常を起こす細胞は中心体の過剰が原因となっている場合がある。そこで γ -tubulin 抗体を用いた免疫染色を行った結果、Apollon ノックアウト MEF では中心体過剰を起こした細胞が多く存在していることが明らかになった。(Fig.1-2)

2. Apollon と cyclin A の結合

Apollon と結合するタンパク質を探索した結果、cyclin A が同定された。cyclin A は、細胞周期の進行を正に制御する因子である cyclin ファミリーの一つであり、cdk1 (cyclin-dependent kinase1) や cdk2 を活性化し、DNA や中心体の複製、M 期の開始・進行などの過程を制御する因子である。細胞内での両者の結合について、細胞に各々の遺伝子を発現し免疫沈降により検討したところ、細胞内でも Apollon と cyclin A が結合することが確認され、その結合は内在性のタンパク質同士でも確認することができた。(Fig.2)

Fig.2 内在性Apollonと内在性cyclin Aの結合



3. Apollon による cyclin A のユビキチン化

細胞に Apollon、cyclin A、ユビキチンの遺伝子を発現後、cyclin A で免疫沈降しユビキチン抗体でウェスタンブロットしたところ、Apollon 共発現により cyclin A のユビキチン化が促進されることが明らかになった。

Apollon による cyclin A のユビキチン化における Apollon 自身の UBC ドメインの重要性を調べるため、Apollon の UBC 変異体や UBC を欠失した変異体による cyclin A のユビキチン化を検討した。その結果、これら変異体でも全長の野生型 Apollon 同様、cyclin A のユビキチン化の亢進が起こることが確認された。

4. Apollon と APC/C の結合

上記の結果から、Apollon による cyclin A のユビキチン化には他の UBC 分子を必要とすることが考えられた。cyclin A のユビキチンリガーゼ (E3) として APC/C (anaphase-promoting

complex/cyclosome) が報告されていることから、Apollon と APC/C との相互作用について免疫沈降により検討した。その結果、細胞内在性のタンパク質レベルにおいて、Apollon と APC/C のコンポーネントの一つである APC3 が結合することが明らかとなり (Fig.3)、また一過性発現の系でも APC/C 複合体の中で UBC をリクルートする機能を持つ APC11 が Apollon と結合することを確認した。Apollon と cyclin A と APC11 の 3 者が相互作用するかどうかを検討するために、APC11 で免疫沈降した際に共沈する cyclin A 量に対する Apollon 共発現の影響について調べたところ、Apollon 共発現により両者の結合の増強がみられ、細胞内で Apollon、cyclin A、APC11 の 3 者が同時に相互作用することが明らかになった。これらの知見から、Apollon は APC/C と協調して cyclin A のユビキチン化制御に関与している可能性が考えられた。

5. Apollon による cyclin A の分解制御

Apollon が cyclin A のユビキチン化を促進することから、Apollon が cyclin A のプロテアソームによる分解制御に関与することが考えられた。そこで siRNA により Apollon の発現を抑制し、細胞内在性 cyclin A のタンパク量についてウェスタンブロットにより検討した結果、cyclin A のタンパク量の増加が認められた。cyclin A の蓄積の様子をより詳細に解析するために、Apollon ノックダウン後の細胞を cyclin A 抗体を用いて免疫染色した。その結果、cyclin A が強く染色される細胞が control の細胞に比べて全体的に多くなっていることが観察された。特にラウンドアップした M 期途中の細胞で cyclin A が強染される細胞は、control では全体の 0.3% 以下であったのに対し、Apollon をノックダウンすると約 1.5% 程度の割合で観られるようになった。また、M 期の細胞は Apollon ノックダウンにより 1.7 倍程度増加することが観られた。(Fig.4-1) cyclin A の蓄積がタンパク質の分解異常によるものかどうかを確認するために、タンパク合成阻害剤シクロヘキシミド処理後の cyclin A のターンオーバーについて検討した。その結果、Apollon ノックダウンにより cyclin A の分解抑制がみられ、Apollon が細胞内在性 cyclin A の分解制御に関与することが示唆された。

Apollon が細胞周期のどの時期で cyclin A の分解に関与するかを検討するために、内在性 cyclin A と PI の二重染色を行いフローサイトメーターにより解析した。その結果、Apollon ノックダウンにより細胞周期の

Fig.3 内在性Apollonと内在性APC3の結合

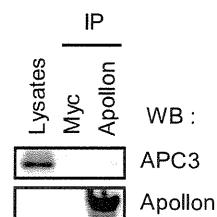
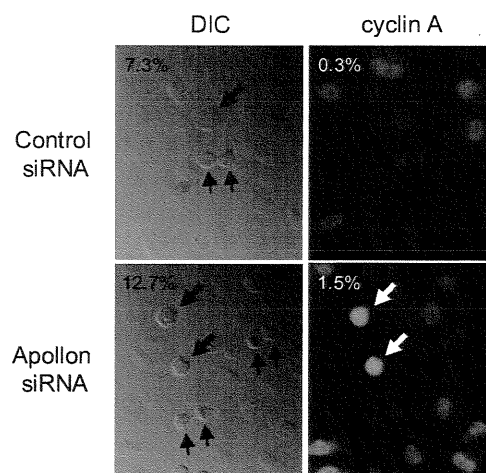


Fig.4-1 Apollonノックダウンによるcyclin Aの蓄積



黒矢印：M期細胞、白矢印：cyclin A⁺M期細胞

Fig.4-2 Apollonノックダウンによる全細胞周期におけるcyclin Aの蓄積

