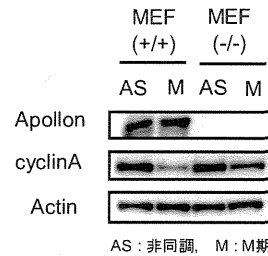


どの時期においても cyclin A が蓄積することが明らかになった。(Fig.4-2)

cyclin A は、M 期進行後に急激に分解され、cyclin A の分解遅延は M 期からの離脱を遅らせることが知られている。上述のように Apollon ノックダウンにより細胞周期によらず cyclin A の蓄積がみられたが、Apollon ノックアウト MEF では特に M 期に遅延がみられたことから、M 期での cyclin A の分解における Apollon の重要性について検討した。細胞に GFP-cyclin A を発現させ、個々の細胞で M 期進行後の cyclin A の挙動を観察したところ、Apollon ノックダウンにより GFP-cyclin A の分解が遅延している細胞が確認された。次に Apollon ノックアウト MEF で M 期における cyclin A の分解異常が認められるかどうかをウェスタンブロットにより検討した。その結果、細胞をノコダゾールにより M 期に停止させると、野生型 MEF では cyclin A は分解されてしまうが、Apollon ノックアウト MEF ではこの分解がかなり抑制されていることが明らかになった。(Fig.4-3) これらの結果から、Apollon は M 期においても cyclin A の分解に関与していることが明らかになり、それを通じて、M 期進行の制御に関与する可能性が示唆された。

Fig.4-3 Apollon KO MEFにおけるcyclin Aの蓄積



<総括>

本研究で私は、アポトーシス阻害タンパク質 Apollon が cyclin A をユビキチン化すること、この cyclin A のユビキチン化において Apollon は UBC (E2) としてではなく、APC/C とともに E3 として機能することを明らかにした。そして、Apollon が生理的に cyclin A の分解を制御し、この分解を通して M 期進行を制御する可能性を示した。M 期での cyclin A の分解は M 期から G1 期の進行に必須であり、また cyclin A を過剰発現した細胞では多核・巨核や中心体過剰複製を引き起こすことが報告されていることから、正常な細胞周期の進行における cyclin A 分解制御の重要性はよく知られている。cyclin A 以外にも Apollon が制御するタンパク質は存在すると予想されるが、Apollon による cyclin A の制御機能が失われることが、Apollon ノックアウト MEF 等で観察された M 期進行の遅延の原因の一つになっていると考えられた

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 菊池 亮

本研究の表題は、『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』である。IAP (inhibitor of apoptosis protein)ファミリーの一つである Apollon は Smac、caspase9 等の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 遺伝子破壊マウス胎児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ていた。

菊池亮は、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研究を行い、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制御に関与することを明らかにした。

第1章では、Apollon ノックアウト MEF に見られる様々な異常について記載した。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%程度多いことを明らかにした。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、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を見出した。また、免疫染色等により、Apollon ノックアウト MEF では多核細胞や中心体過剰を起こした細胞が多く存在していることを明らかにした。

第2章では、Apollon と結合するタンパク質として cyclin A を同定した。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て免疫沈降により検討し、細胞内でも Apollon と cyclin A が結合すること、その結合は内在性のタンパク質同士でも確

認できることを明らかにした。

第3章では、Apollonによる cyclin A のユビキチン化について検討し、Apollon 共発現により cyclin A のユビキチン化が促進されることを明らかにした。このユビキチン化には Apollon の UBC ドメインは必ずしも必要ではなく、Apollon の UBC 変異体や UBC を欠失した変異体でも野生型 Apollon と同様に、cyclin A のユビキチン化を亢進することを明らかにした。

第4章では、Apollon とともに cyclin A のユビキチン化に関与する UBC を探索し、APC/C を同定した。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、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 が結合することを明らかにした。さらに *in vitro* のユビキチン化実験において、APC/C による cyclin A のユビキチン化は Apollon を添加することにより促進される事を明らかにした。

第5章では、Apollon による cyclin A の分解制御について検討した。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 のタンパク量が増加することを見出した。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、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、M期の細胞が増加していることを見出した。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を明らかにした。

以上、菊池亮の研究はアポトーシス阻害タンパク質 Apollon が cyclin A をユビキチン化すること、この cyclin A のユビキチン化において Apollon は UBC (E2) としてではなく、APC/C とともに E3 として機能すること、また Apollon が生理的に cyclin A の分解を制御し、この分解を通して M 期進行を制御する可能性を示した。これらの研究成果は、細胞周期を制御する新規薬剤の開発に資する新しい知見であり、博士(薬学)の学位を受けるにふさわしいと判断した。