

論文の内容の要旨

論文題目 細胞周期制御遺伝子 MgcRacGAP の発現制御機構の解明

氏名 西村耕太郎

細胞は、増殖する際に G1 期（細胞間期）、S 期（DNA 複製期）、G2 期（複製と分裂の間期）、M 期（分裂期）からなる細胞周期を回っている。さらに、分裂しない時期 G0 期（休止期）が存在し、幹細胞、分化した細胞などは G0 期にあると考えられている。そしてこれら細胞周期に関わる様々な分子が、量的、質的に厳密に制御され、正常な細胞周期が維持されている。

Male germ cell Rac GTPase activating protein (MgcRacGAP)は、Rho GTPaseの一つであり、細胞周期の各時期に機能を有する分子である。間期では核内に局在し、Rac1、Cdc42へのGAPとして機能し、セントロメアタンパク質CENP-Aの染色体への取り込みの安定化や、STAT3と結合し、サイトカインシグナルを増強する。細胞の分裂期（M期）になるとAuroraBによりセリン387番目がリン酸化されRhoAへの活性を獲得し、MKLP1と結合しセントラルスピンドリンを形成する。さらに分裂終期でミッドボティに局限し、RhoAに対するGAP活性によりアクチン収縮環が収縮、細胞分裂を完了させる。MgcRacGAPを*in vitro*でノックダウンすると細胞は分裂を完了できない。また、ノックアウトマウスは、8細胞期以降に発生が進まず胚生致死となることからMgcRacGAPは細胞分裂に必須の分子であることがわかっている。これまでの研究でMgcRacGAPは、多くの機能を有し、細胞周期に深く関与することが示され、さらにタンパク質のリン酸化等の質的な制御機構は研究が進められてきた。一方、他の細胞周期遺伝子同様、MgcRacGAPの機能発現にも厳密な量的制御が存在すると考えられるが、未解明のままである。

MgcRacGAP の発現量制御機構の解明のため、まず NIH-3T3 細胞を G0 期、M 期中期にそれぞれ血清除去およびノコダゾール処理により同期し、MgcRacGAP mRNA の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。MgcRacGAP mRNA の発現量は、G0 や G1 初期には発現が高いが、G1 中期にかけて一旦減少し、S/G2/M 期にかけて発現が上昇していくことが明らかとなった。また、MgcRacGAP に作用する可能性のある microRNA を探索した結果、miR-17-92 クラスターが 3'UTR 領域に結合し、MgcRacGAP mRNA は miR-17-92 クラスターの過剰発現により有意に低下した。

次に MgcRacGAP タンパク質の発現量も細胞周期依存的に変化するのかを明らかにするため、レトロウイルスを用いて pMXs-IG-MgcRacGAP-Flag を NIH-3T3 細胞に導入し、mRNA と同様に同期実験を行いタンパク質の発現量を解析した。その結果、MgcRacGAP は、M 期中期に発現が上昇し、G1/G0 期に減少、さらに細胞周期が進むと再び上昇することが確認された。また、血清除去実験により G0 期に MgcRacGAP の発現は減少し、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理すると G0 期での発現減少が抑制された。さらに、細胞内ポリユビキチン化の解析で MgcRacGAP のポリユビキチン化バンドが検出された。以上のことから MgcRacGAP はユビキチン・プロテアソーム分解系によって分解されることがわかった。MgcRacGAP がポリユビキチン化され、プロテアソームにより分解されることがわかったため、ユビキチン化酵素 E3 リガーゼの同定を試みた。細胞周期の G1/G0 期で主に働くことが知られている CDH1 と CDC20 を MgcRacGAP とともに 293T 細胞に形質導入し、ウエスタンブロットにより発現を解析したところ、CDH1 により MgcRacGAP の発現が有意に減少していた。このとき、MgcRacGAP mRNA の発現は確認されていることから、タンパク質分解が原因であることがわかった。さらに、プロテアソーム阻害剤 MG132 を作用させると、CDH1 との共発現による MgcRacGAP 発現量の減少が抑制された。CDH1 による分解促進に MgcRacGAP のどの領域が重要であるかを解析するため、MgcRacGAP に存在する既知のドメイン、ミオシン様ドメイン、インターナルドメイン、システインリッチドメイン、GAP ドメインをそれぞれ欠失させた変異体を作製した。各種変異体を CDH1 と 293T 細胞に共発現させ、その分解を解析した。結果、GAP ドメインを欠失した Δ GAP 変異体は CDH1 による分解促進が有意に抑制された。GAP ドメインに分解調節ドメインがあると考え、さらにユビキチンとの共発現によりポリユビキチン化を解析したところ、GAP ドメインが欠失した変異体では、ポリユビキチン化バンドが有意に減弱した。MgcRacGAP の GAP ドメインの中に存在する、分解調節領域（デグロン）を同定するため、C 末領域を欠失した MgcRacGAP 変異体を作成した。各種変異体と CDH1 を 293T 細胞に共発現させ、分解の有無によりデグロン領域の同定を試みた。その結果、537-632 の領域を欠失した G3 変異体で有意に分解促進が抑制された。また、分解されない Δ GAP 変異体に 537-632 領域を結合させた変異体を作成し、CDH1 との共発現させたところ、CDH1 による分解促進が確認された。以上の結果から、537-632 領域がデグロンであると同定した。

デグロン領域がどのように分解を制御しているのか、その分子機構の可能性として、(1) 分解促進ドメインとして知られる PEST ドメインの存在、(2) ユビキチン化リジンの存在、(3) リン酸化修飾による分解スイッチの存在、(4) CDH1 結合領域 D-box の存在の 4 つの可能性をデグロン領域のアミノ酸配列についてそれぞれ探索した。デグロン領域のアミノ酸配列を解析ソフト pestfind により PEST ドメインを探索したところ、3 つの PEST ドメインが発見されたが、いずれもスコアは低かった。デグロン領域内にユビキチン化を受けるリジン残基が存在するか、デグロン領域内のリジン残基をアルギニンに置換した KR 変異体を作製し解析した。293T 細胞に CDH1 と共発現させたところ、デグロン領域のリジン残基をすべてアルギニンに置換しても CDH1 により分解されることが明らかとなった。細胞周期依存的な分解は、リン酸化が分解の促進や抑制に機能していることが知られており、MgcRacGAP デグロン領域には、10 カ所 M 期にリン酸化される部位がわかっている。その中で、Cdk1 によりリン酸化され PP2A で脱リン酸化される T588、PKC リン酸化モチーフである S595、またその間にある S590、S591、S592、S593 について、アラニン置換変異体作成したが、いずれの変異体でも CDH1 による分解促進が見られた。次に、デグロン領域に CDH1 の認識配列 D-box が存在するかどうかを検討した。D-box は RXXL というコンセンサスマチーフをもつ。MgcRacGAP デグロン領域には 599 番目の位置から始まる RSTL という配列があり、この 4 つのアミノ酸をすべてアラニンに置換した変異体 599RSTL>AAAA を作成した。293T 細胞に CDH1 と共発現させウエスタンブロットにより解析した結果、599RSTL>AAAA 変異体は CDH1 の過剰発現により分解が促進された。デグロン領域の分子機構については今後更なる解析が必要である。

MgcRacGAP が CDH1 により G1/G0 期でポリユビキチン化されプロテアソームにより分解されることが確かとなったので、この分解が生体内でどういった意義を持つのか G3 変異体を用い解析した。G3 変異体の局在は、野生型と同様で間期には核内に、分裂期には進行に伴って Midbody に集約していくことがわかった。そして、G1/G0 期では G3 変異体は野生型に比べ有意に発現が亢進しており、分解が抑制されていることが確認された。次に MEF 細胞に野生型 MgcRacGAP と G3 変異体を導入した。コントロールに比べ、野生型、G3 変異体において有意に増殖の抑制と早期細胞老化の誘導がみられ、MgcRacGAP の過剰発現により早期細胞老化が誘導されることが明らかとなった。また、骨髄移植実験を行ったところ、野生型と G3 変異体が導入された骨髄細胞は、コントロールに比べ移植した骨髄細胞の生着率が有意に低かった。これまで MgcRacGAP ノックダウンにより細胞分裂に異常が生じるという報告はあったが、MgcRacGAP の過剰発現により MEF での早期細胞老化、骨髄細胞の生着などへの影響が本研究により明らかとなった。しかし、野生型と G3 変異体には有意な差はみられておらず、G1/G0 期分解が早期細胞老化や骨髄細胞の生着に関与しているかは、今後更なる解析の必要が有ると考えられる。

本研究により、MgcRacGAP は、miR-17-92 クラスターによる mRNA の抑制、さらに

APC/C-CDH1 による G1/G0 期でのタンパク質分解により厳密な量的制御を受けていることが新たに明らかとなった。そして、MgcRacGAP の発現異常は、生体内で細胞老化や血球細胞の生着に異常をきたすことが示され、厳密な量的制御による適正な発現量が重要であることが明らかとなった。