

審査の結果の要旨

氏名 西村 耕太郎

本研究は、細胞周期の制御因子である MgcRacGAP の量的制御機構を解明するため、mRNA およびタンパク質レベルでの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 細胞同期実験の結果、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示され。また、MgcRacGAP に作用する可能性のある microRNA を探索したところ、miR-17-92 クラスタが 3'UTR 領域に結合し発現を抑制することが明らかとなった。
2. 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 と同様に細胞同期実験により、MgcRacGAP タンパク質は、M 期中期に発現が上昇し、G1/G0 期に減少した。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示された。
3. MgcRacGAP に対するユビキチン化酵素 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 を過剰発現させることにより MgcRacGAP の発現が有意に減少することから、CDH1 が MgcRacGAP に対する E3 リガーゼであると同定した。
4. MgcRacGAP 欠損変異体と CDH1 共発現による分解促進の有無により分解調節領域（デグロン）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、蛍光タンパク質 mVenus と 537-632 領域の融合遺伝子を作製し CDH1 と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。
5. MEF 細胞に MgcRacGAP を遺伝子導入すると増殖の抑制と早期細胞老化の誘導がみられた。また、骨髄移植実験を行ったところ、骨髄細胞の生着率が有意に低かった。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。

以上、本論文は、MgcRacGAP が、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。本研究は、未解明であった MgcRacGAP の量的制御機構を明らかにすることで、細胞周期制御の更なる解明に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。