

1.研究課題名：タンパク質分解ユビキチンシステムと細胞機能の連携制御機構
？ ユビキチンリガーゼ APC の細胞周期での役割？

2.研究者氏名：山野 博之

3.研究のねらい：

増殖の基礎、細胞周期を周期たらしめる分子、サイクリン。分裂期 (M 期) から間期への移行はサイクリン B の分解が鍵である。ここでは、ユビキチンリガーゼ APC (M 期後期促進複合体) を介した分解が起こるものの、基質サイクリン B が認識される分子機構はほとんど分かっていなかった。私は認識に必須なシス配列を同定したので、何がその配列を認識しているのかを研究した。また、APC の基質特異性と細胞内局在の考察を加えるために、APC のライブ観察を行った。さらには、APC の新規機能を発見するため、新しい基質探索を目指した。

4.研究結果：

(1) サイクリン B が認識される仕組み

選択的なタンパク質分解 (ユビキチン依存性タンパク質分解) には、少なくとも、分解基質の (1) 認識、(2) ユビキチン化、(3) 分解という3つの過程が不可欠である。私は細胞周期のマスター酵素 Cdc2 の制御サブユニットであるサイクリン B をモデル基質として、基質の認識からユビキチン化までの過程を研究している。まず、サイクリン B の分解ボックス (ユビキチン化に必須な配列) が何によって認識されているのかを解析した。その結果、カエル卵抽出液では、酵母遺伝学的解析で基質特異性を付与する因子としての報告がある APC 活性化因子 Fizzy ではなく APC 自身が分解ボックスを認識していることを見出した。APC のどのサブユニットが基質認識に関わっているのかを決定するためには、可溶性 APC を精製することが肝要かと考えた。しかしながら、ユビキチンリガーゼ APC は 11 種類以上のサブユニットからなる巨大複合体 (1.5 MD) 故に、活性のある可溶性 APC を短時間で精製する方法はなかった。APC が基質をユビキチン化する分子機構の研究が立ち後れていた一因でもあった。そこで、私は抗 APC3 抗体を用いた免疫精製法と新規な溶出ペプチドを組み合わせて、ヒト、マウス、カエル卵抽出液から短時間 (30 分) で APC を高純度で精製する方法を開発した。そして、この方法で精製した APC を用いて、APC がサイクリン B を認識するキネティクスを BIACORE (表面プラズモン共鳴センサ) で解析した。M 期後期の活性型 APC は特異的に、かつ非常に短い半減期 (約 1 分) で分解ボックスと相互作用していた ($k_d: 0.0123$, 1 秒間に 1.23 % 解離する)。APC が基質を効率よくユビキチン化していくには、これくらい早い認識、解離反応が必要なのである。対照実験として間期から精製した APC はサイクリンと相互作用をしなかったことから、基質認識は細胞周期で確かに制御されていることを明らかにした。また、ここで開発された精製法は APC と相互作用する新規なタンパク質を単離、解析するアプローチとしても今後有用となる。さらに、カエル卵抽出液を用いた試験管内分解アッセイ系から APC を免疫除去および精製 APC 再添加による相補できる系を構築した。この系を用いて、APC が M 期中期と後期で質的に違うことを見出した。この APC の質的相違が中期 後期遷移に起こる APC 依存的分解の引き金の分子機構ではないかと考えている。

(2) ユビキチンリガーゼ APC の細胞内局在変化

APC の細胞周期を通じての細胞内局在を観察するために、染色体上の Apc6/Cut9 を GFP (緑色蛍光色素) でタグした酵母を用いて解析した。その結果、間期には細胞全体に存在するが、M 期前中期頃から核内に蓄積し始め、中期には中期プレート構造に、染色体分配時 (M 期後期) には染色体分離に応じて染色体領域及びスピンドルに局在し、S 期頃にこの核内蓄積が消失することが分かった。この Apc6/Cut9 タンパク質量は細胞周期で変動することなくリン酸化が M 期前中期に起こることが報告されているので、リン酸化が核内 APC 局在の制御に関係しているようである。今後、この局在制御と APC の基質特異性 (分解のタイミング決定) の相関について研究していきたい。

(3) APC の細胞周期における新規基質の探索

ユビキチンリガーゼ APC は、複製されたゲノムの分配が行われる M 期後期からゲノムの複製が行われる S 期までのプログラムされた分解を制御する。APC の細胞周期での役割を詳細に把握するためには、新しい基質の同定とその認識、分解の制御機構を明かす必要がある。本研究で、新たに S 期サイクリン Cig2 および Nek2A キナーゼを APC 基質として同定した。分裂酵母 S 期サイクリン Cig2 が M 期後期に分解されない、核が隔壁で分断された表現型が観察されることから Cig2 の APC 依存的分解は染色体分離を含む M 期後期事象と隔壁形成 (細胞質分裂) の共役に必須であることが分かった。さらに、Cig2 の細胞周期を通じての分解機構を研究した結果、Cig2 の発現は、これまでに報告がない 3 つの独立な分解系 (APC、SCF^{pop1}、pop2、SCF) が関わる新規なメカニズムで、G1/S 期にピークがくるように制御されていることを明らかにした。また、中心体の分離に働いているヒト Nek2A は、サイクリン B とは異なる少し長めの分解配列を用いて、サイクリン A のように M 期中期から分解されることを見出した。最近、ユビキチンリガーゼ APC は細胞周期制御のみでなく、分化した増殖していない細胞でも機能していることが報告されているので、さらなる APC 基質あるいは APC 相互作用タンパク質の網羅的解析が、生命活動を支える必須巨大複合体 APC の役割、制御機構を解明するために必要であろう。

5. 自己評価 :

巨大複合体ゆえに、認識、活性化の分子制御機構の研究が難解であった APC (M 期後期促進複合体) について、ヒト、マウス、カエルから可溶性 APC 精製法を確立し、また、カエルの卵抽出液を用いて、生化学的に APC を研究する系を構築したことは大きな成果である。特に構造解析をも可能にする精製度の高い可溶性 APC を用いた研究は、詳細なサブユニットの役割研究等、今後大きな発展性が期待できる。ただ、選択的な基質認識を行っているサブユニットの正体を決定するまでに至らなかったのは残念である。細胞生物学的な APC の研究としては、世界に先駆けて APC のライブ観察を成功させ、APC の局在が細胞周期で制御されていることを示せし、本研究期間中に新規な APC 基質を 2 つ同定し、その分解のメカニズムを明らかにしたことは、十分評価できる。

6. 研究総括の見解 :

細胞内で不要になった特定のタンパク質が、ユビキチン化による厳密な選定のもとで、プロテアソームにより速やかに分解される機構がある。その基質の一つに細胞周期の適切な進行に必要なサイクリン B がある。本研究者はユビキチンリガーゼ APC (M 期後期進行複合体) のサイクリン B 認識機構を分裂酵母について研究し、新開発の免疫精製法により APC を純化し、ユビキチン化の動力学、細胞周期による APC の質的变化と細胞内所在の可視化、さらに APC のその他の基質として S 期サイクリンを同定した。特に細胞周期の適切な進行に必要なタンパク質除去機構についての知見を深めた。なお APC の活性化剤は抗がん活性をもつものと期待される。

7. 主な論文等 :

1. Hames, R.S., Wattam, S.L., Yamano, H., Bacchieri, R., and Fry, A.M. (2001). APC/C- mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. EMBO J. 20, 7117-7127.
2. Yamano, H., Kitamura, K., Kominami, K., Lehmann, A., Katayama, S., Hunt, T., and Toda, T. (2000). The spike of S phase cyclin Cig2 expression at the G1-S border in fission yeast requires both APC and SCF ubiquitin ligases. Mol. Cell. 6, 1377-1387.

その他

招待講演 国内 1 件、海外 5 件