

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－

山野 博之

(英国癌研究所・細胞周期制御部門)

1. 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。

2. 研究成果と考察

(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、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ろう。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ろう。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様構造に、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だ。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と、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）が関わる新奇なメカニズムで、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。

3. 主な論文

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.

4. その他

招待講演 国内1件、海外5件