

学 位 論 文 題 名

細胞増殖抑制因子 Tob/BTG ファミリーの ユビキチン依存的分解機構に関する研究

学位論文内容の要旨

【はじめに】

ユビキチン-プロテアソームシステムは、細胞周期、シグナル伝達、転写調節などの多様な細胞機能の制御に重要な役割を果たす。このシステムにおいて、ユビキチン化の標的となる基質タンパク質は、ユビキチン化酵素群 E1、E2、E3 により、その Lys 残基を介してユビキチンの付加を受け、付加されたユビキチンがさらにユビキチン化修飾を受けることでポリユビキチン鎖が形成される。26S プロテアソームは、基質タンパク質に付加されたポリユビキチン鎖を分解シグナルとして認識し、基質タンパク質を速やかに分解する。このシステムにおいて、基質タンパク質の認識は多様な E3 によって行われることから、基質タンパク質に対する E3 の同定は分解機構を探る上で最も重要な課題となる。そして、基質と E3 の双方においてユビキチン化に関わる変異は、がんや神経変性疾患などの重篤な疾患の原因となりうると考えられている。

Tob/BTG ファミリーは、N 末端側の約 120 残基に相同性の高い領域 (Tob homology domain) を有する一群の転写制御因子である。これらは、細胞周期の S 期進行を阻害する細胞増殖抑制因子であり、Tob ノックアウトマウスで肝がんの発症率が有意に高いことや、前立腺がん細胞で BTG2 が減少していることなどが報告されており、がん化と Tob/BTG ファミリーの関係が示唆されている分子である。Tob/BTG ファミリータンパク質は、その半減期が 15 分程度の短寿命タンパク質であることが報告されているが、分解機構に関しては不明な点が多く残されている。

本研究では、細胞増殖抑制因子 Tob/BTG ファミリーに焦点をあて、そのユビキチン化修飾と 26S プロテアソームによる分解機構について解析し、新知見を得た。

【結果および考察】

1. プロテアソームによる Tob/BTG ファミリータンパク質の分解

多くの細胞周期制御因子は不安定なタンパク質であり、それらの分解がユビキチン-プロテアソームシステムによってなされることから、短寿命タンパク質である Tob/BTG ファミリーの分解に対するユビキチン-プロテアソームシステムの関与を検討した。

はじめに、Tob/BTG ファミリーの安定性に対するプロテアソーム阻害剤の効果を解析した。培養細胞を用いて、プロテアソーム阻害剤の存在下あるいは非存在下での Tob/BTG ファミリーのタンパク質量を、ウェスタンブロッティングにより解析した結果、プロテアソーム阻害剤による Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 の蓄積が観察された。さらに、Tob/BTG ファミリーの分解速度に対するプロテアソーム阻害剤の効果を、シクロヘキシミドを用いたチェイス実験により解析した。その結果、Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 は、MG132 処理による分解速度の遅延が観察され、これらの分子がプロテアソームにより直接分解されることが明らかとなった。

2. Tob/BTG ファミリータンパク質のユビキチン化

Tob/BTG ファミリーが、プロテアソームによる分解に先立ち、ユビキチン化修飾を受けるか否かを解析した。ユビキチンおよび Tob/BTG の発現ベクターを培養細胞にトランスフェクトし、免疫沈降およ

びウェスタンブロッティングにより解析した結果、Tob/BTG とユビキチンを同時に発現させた場合にのみ、高分子量領域にポリユビキチン化 Tob/BTG が検出された。すなわち、Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 がユビキチン化修飾を受け、26S プロテアソームにより分解されることが明らかになった。

3. Tob/BTG ファミリータンパク質の不安定化ドメインの解析

次に、Tob/BTG ファミリータンパク質の不安定性を規定するドメインの解析を行った。Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 の N 末端欠失変異体と C 末端欠失変異体をそれぞれ作製し、それらの安定性を解析した。その結果、いずれの N 末端欠失変異体も野生型の場合と同様に不安定であったが、C 末端側からの欠失変異体では、約 30 残基の欠失によりいずれの分子も安定化した。また、C 末端欠失変異体のユビキチン化を解析したところ、野生型の場合に比べユビキチン化が減少していることが明らかになった。さらに、各分子の C 末端側 60 残基を、細胞内で安定なタンパク質である GFP の C 末端側に融合させて、その安定性を解析した結果、インタクトな GFP に比べ、GFP 融合タンパク質の不安定化が観察された。すなわち、Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 の C 末端領域が不安定性を規定することが明らかになった。

4. BTG1 および BTG2 と SCF 複合体の結合

細胞周期制御に関わるタンパク質の多くは、ユビキチン依存的分解によってその発現量が調節されており、その E3 として APC/C と SCF 複合体が重要な役割を果たす。APC/C は、主に M 期進行に関わる分子を標的とし、SCF 複合体は G1/S 期に機能する分子を標的とする。Tob/BTG ファミリーは S 期進行を抑制することから、そのユビキチン化に対する SCF 複合体の関与が考えられた。そこで、BTG1 および BTG2 について、SCF 複合体のサブユニット Cullin1 および Skp1 との相互作用を免疫沈降により解析した。その結果、Cullin1 および Skp1 が、BTG1 および BTG2 と免疫共沈することが明らかとなり、BTG1 および BTG2 のユビキチン化に対する SCF 複合体の関与が示唆された。

5. BTG1 および BTG2 のユビキチン化に対する SCF 複合体の関与と Fbw1 の効果

SCF 複合体は、基質認識サブユニットである F-box タンパク質により、活性や基質特異性が制御される。そこで、代表的な F-box タンパク質について、BTG1 あるいは BTG2 との相互作用を免疫沈降により解析した。その結果、BTG1 および BTG2 のいずれもが、Fbw1 および Skp2 と結合することが示された。

次に、BTG1 および BTG2 のユビキチン化に対する Fbw1 と Skp2 の効果を解析した。BTG1 あるいは BTG2 とともに、F-box タンパク質を培養細胞に発現させ、免疫沈降後、ウェスタンブロッティングにより、BTG1 および BTG2 のユビキチン化を検討した。その結果、それらのユビキチン化は、Fbw1 の存在により顕著に促進された。また、Fbw1 の F-box 欠失変異体存在下では、BTG1 および BTG2 の内在性のユビキチン化がドミナントネガティブ効果により抑制されたことから、BTG1 および BTG2 は、Fbw1 を有する SCF 複合体によって認識され、ユビキチン化されることが示された。

【まとめ】

- (1) 細胞増殖抑制因子 Tob/BTG ファミリーのうち、Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 はユビキチン-プロテアソームシステムにより分解される。
- (2) Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 の約 30 残基からなる C 末端側領域が不安定性を規定する。
- (3) BTG1 および BTG2 は、Fbw1 および Skp2 と結合する。
- (4) BTG1 および BTG2 は、SCF^{Fbw1} によりユビキチン化される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横沢	英良
副査	教授	有賀	寛芳
副査	助教授	平	敬宏
副査	助教授	川原	裕之

学位論文題名

細胞増殖抑制因子 Tob/BTG ファミリーの ユビキチン依存的分解機構に関する研究

ユビキチン-プロテアソームシステムは、細胞周期、シグナル伝達、転写調節などの多様な細胞機能の制御に重要な役割を果たす。このシステムにおいて、ユビキチン化の標的となる基質タンパク質は、ユビキチン化酵素群 E1、E2、E3 により、リシン残基を介してユビキチンの付加を受け、付加されたユビキチンがさらにユビキチン化修飾を受けることで、ポリユビキチン鎖が形成される。次に、26S プロテアソームが、基質タンパク質に付加されたポリユビキチン鎖を分解シグナルとして認識し、基質タンパク質を分解する。このシステムにおいて、基質タンパク質の認識は多様なユビキチンリガーゼ E3 によって行われる。また、基質と E3 酵素の双方におけるユビキチン化に関わる変異は、がんや神経変性疾患などの重篤な疾患の原因になる。

本論文提出者は、転写制御因子であり、細胞周期の S 期進行を阻害する細胞増殖抑制因子でもある Tob/BTG ファミリーを取り上げ、Tob/BTG ファミリーのユビキチン化修飾と 26S プロテアソームによる分解機構に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) Tob/BTG ファミリータンパク質 Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 の代謝回転がプロテアソーム阻害剤によって阻害されることを見出し、Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 がプロテアソームにより分解されることを明らかにした。次に、ユビキチンと Tob/BTG ファミリーの発現系を用いて、Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 がユビキチン化修飾を受けることを見出し、Tob/BTG ファミリーがユビキチン化修飾を受け、26S プロテアソームにより分解されることを明らかにした。

(2) Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 の N 末端欠失変異体と C 末端欠失変異体の安

定性を解析し、不安定な Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 に比較して、C 末端から約 30 アミノ酸を欠失させたいずれの変異体でも安定化されることを見出した。さらに、いずれの欠失させた領域を融合させた GFP 融合たんぱく質が不安定化されることを見出し、Tob、Tob2、BTG1 および BTG2 の不安定化を規定するドメインが C 末端領域に存在することを明らかにした。

(3) 細胞周期制御に関わるタンパク質の多くは、ユビキチン依存的分解によってその発現量が調節されており、その E3 酵素として、SCF 複合体と APC/C が重要な役割を果たす。Tob/BTG ファミリーが S 期進行を抑制することから、G1/S 期で機能する SCF 複合体が Tob/BTG ファミリーのユビキチン化に関与すると考え、免疫沈降法により、BTG1 および BTG2 を用いて、SCF 複合体のサブユニットである Cullin1 および Skp1 との相互作用を解析し、Cullin1 および Skp1 が、BTG1 および BTG2 に結合することを明らかにした。

(4) Cullin1 と Skp1 から構成される SCF 複合体は、基質認識サブユニットとして F-box タンパク質を含む。そこで、免疫沈降法により、代表的な F-box タンパク質を用いて、BTG1 あるいは BTG2 との相互作用を解析し、BTG1 および BTG2 のいずれもが、Fbw1 および Skp2 に結合することを明らかにした。さらに、BTG1 および BTG2 のユビキチン化に対する Fbw1 と Skp2 の効果を解析し、BTG1 および BTG2 のユビキチン化が Fbw1 によって促進されること、Fbw1 の F-box 欠失変異体が、BTG1 および BTG2 のユビキチン化に対してドミナントネガティブ効果を示すことを明らかにした。以上の結果から、BTG1 および BTG2 が、Cullin1、Skp1 および Fbw1 から構成される SCF 複合体 SCF^{Fbw1} によりユビキチン化されると提案した。

以上の新知見およびそれらを得るために用いた新研究方法は、細胞増殖抑制因子 Tob/BTG ファミリーのユビキチン化修飾の機構や 26S プロテアソームによる分解機構の理解にとどまらず、ユビキチン-プロテアソームシステムによる細胞増殖制御機構を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査委員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士（薬学）の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。