

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460084

研究課題名(和文) ApollonによるMitosis制御機構

研究課題名(英文) Mitosis regulation by Apollon

研究代表者

内藤 幹彦(Naito, Mikihiko)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・部長

研究者番号：00198011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期を制御するサイクリンA、Bは細胞分裂期(M期)にAPC/Cによってユビキチン化されプロテアソームで分解されるが、スピンドルチェックポイントによってAPC/Cが不活性化されている分裂期前期にサイクリンAが分解される機構は良くわかっていない。本研究では、細胞死阻害タンパク質ApollonがサイクリンAと結合し、分裂期前期でのサイクリンA分解に重要な役割を果たしている事を明らかにした。Apollon欠失細胞ではM期でのサイクリンA分解が正常に起こらず、M期の進行が遅れる事がわかった。

研究成果の概要(英文)：During mitosis, cyclin A and cyclin B are ubiquitylated by the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) and then subjected to proteasomal degradation. However, cyclin A, but not cyclin B, begins to be degraded in the prometaphase when APC/C is inactivated by the spindle assembly checkpoint (SAC). Here we show that Apollon (also known as BRUCE or BIRC6) plays a role in SAC-independent degradation of cyclin A in early mitosis. Apollon interacts with cyclin A and facilitates cyclin A ubiquitylation. In Apollon-deficient cells, mitotic degradation of cyclin A is delayed, and total but not CDK-bound cyclin A level was increased. We propose Apollon to be a novel regulator of mitotic cyclin A degradation independent on SAC.

研究分野：細胞生物学

キーワード：サイクリンA Apollon 細胞周期 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

細胞周期の進行は主に CDK の周期的な活性化と不活性化によって制御されており、CDK の活性化因子であるサイクリンタンパク質の周期的な増減が CDK 活性を調節している事はよく知られている。サイクリン等の細胞周期制御因子の分解にはユビキチン・プロテアソームシステムが中心的な役割を果たしており、M期においては主に APC/C 複合体によるユビキチン化とプロテアソームによる分解によって行われている。しかしM期の進行の過程で各タンパク質は同時期に分解されるわけではなく、それぞれ異なった時期に分解される。例えば、分裂前中期 (Prometaphase)にはサイクリンA、Nek2A が分解され、分裂中期 (Metaphase) になってサイクリンB、securin が分解される。分裂後期 (Anaphase)には CDC20 が分解され、さらに分裂後期以後に Plk1、AuroraA、AuroraB、Geminin 等が分解される (Trends in Cell Biol, 16, 55-63 (2006))。これらのタンパク質が正しい時期に順序正しく分解されることは、細胞分裂が正確に行われるために必須である。

APC/C 複合体が基質を認識するためには、基質認識サブユニットの CDC20 (主に分裂中期) 及び CDH1 (分裂後期から G1 期) が必要と考えられている。しかし分裂前期にはスピンドルチェックポイントによって CDC20 は不活性化されており、この時期にサイクリンAが分解される機構は長い間よくわかっていなかった。最近になって、サイクリンAは CDC20 との親和性が高いためスピンドルチェックポイントを回避できる事が報告されたが (J Cell Biol 190: 501 (2010))、これでサイクリンAの分解機構をすべてうまく説明できるわけではない。サイクリンAと同じく分裂前中期に分解される Nek2A は、C末端の MR 配列によって CDC20 非依存的に APC/C に結合してユビキチン化を受けることが報告されており、サイクリンAにも CDC20 非依存的に APC/C にリクルートする機構が存在すると推測される。

2. 研究の目的

細胞周期制御因子サイクリンAは、G1期から細胞内に蓄積しはじめG2期に最大量となりM期に急速にプロテアソームで分解される。この分解には APC/C によるユビキチン化が必要だが、スピンドルチェックポイントによって APC/C が不活性化な分裂前中期 (Prometaphase) にサイクリンAが分解されるメカニズムはあまり良くわかっていない。申請者は、IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) ファミリーに属する分子量 530K の巨大なタンパク質 Apollon の機能を解析する中で、Apollon がサイクリンAと結合しユビキチン化する事、Apollon 遺伝子破壊 MEF は細胞周期の M 期の進行が遅れる事等を見出してきた。これらの知見は Apollon がサイ

クリンAの分解に関与し、細胞周期を制御するタンパク質である事を強く示唆している。本研究では、これまでに得られた知見を基に、主に M 期における Apollon とサイクリンAの挙動を解析して、スピンドルチェックポイント非依存的なサイクリンAの分解における Apollon の機能を明らかにし、Apollon の細胞周期制御における役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) M 期でのサイクリンAの蓄積

siRNA により Apollon をノックダウンした Hela 細胞を Nocodazole 処理により分裂中期に停止させ、はがれやすくなった M 期細胞を Mitotic shake off により回収した。Cell lysates を Western blot 解析し、M 期細胞におけるサイクリンAの量を比較した。同様に同調した細胞を蛍光免疫染色法により解析し、個々の細胞でサイクリンAの蓄積量を比較した。

(2) Apollon とサイクリンAの局在

核膜が消失した M 期の細胞内で、サイクリンAと Apollon が共局在するかどうかを検討した。この実験では、M 期に入るとすぐに始まるサイクリンAの分解を阻害するため、CDK 阻害剤 Ro-3306 で G2/M 期に同調した細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 存在下にリリースして M 期の細胞を調製し、サイクリンA及び Apollon の 2 重染色を行った。

(3) M 期細胞内での Apollon とサイクリンAの相互作用

サイクリンAと Apollon の局在が一致しているだけでなく、細胞内で相互作用しているかどうかを調べるために、(2)と同様な方法で M 期に同調した細胞を使って in situ proximity assay を行った。

(4) M 期におけるサイクリンAの分解 (生細胞イメージング)

サイクリンA分解の様子を生細胞で観察するために、GFP 標識サイクリンAを細胞に発現させて蛍光顕微鏡でタイムラプス観察を行い、蛍光の減少を調べる事によりサイクリンAの分解を解析した。(2)と同様に Ro-3306 で同調して、Apollon をノックダウンした細胞で、サイクリンAの分解が遅れが見られるかどうかを調べた。

(5) Apollon と共同して働く因子の同定

Apollon には進化的に良く保存された UBC ドメインが存在するが、サイクリンAのユビキチン化にはこの UBC ドメインは必要で無いことがわかっている。従って Apollon は別の UBC 又はユビキチンリガーゼと協同してサイクリンAをユビキチン化すると推測できる。多くの実験系で、サイクリンAの分解には APC/C が必要である事が示されている

ことから、Apollon は APC/C と協同してサイクリン A をユビキチン化する可能性が考えられる。そこで Apollon と APC/C 複合体サブユニット (APC3、APC11 等) との結合を、免疫共沈法で解析した。

(6) 細胞周期 M 期制御における意義

Apollon KO MEF では M 期の進行が遅れているが、同様な M 期進行の遅れが siRNA で Apollon をノックダウンした細胞でも見られるかどうかをタイムラプス観察で調べた。さらに、サイクリン A 分解の遅れが原因となって M 期進行が遅れることを確かめる為に、Apollon ノックダウン細胞で、サイクリン A をさらにノックダウンする事により、M 期進行の遅れが回復するかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) M 期でのサイクリン A の蓄積

CDK 阻害剤 Ro-3306 で G2/M 期に同調した細胞を Nocodazol 存在下でリリースし、M 期の細胞を Mitotic shake off 法で回収してサイクリン A の量を Western ブロット法で解析した。その結果、siRNA で Apollon の発現量を低下させた細胞では、Control 細胞と比べてサイクリン A の量が増加している事がわかった (図 1)。同様に、M 期細胞は、サイクリン A 抗体を使った免疫染色で強く染まった。これらの結果から、Apollon 欠失細胞では M 期のサイクリン A 量が増加している事が明らかになった。

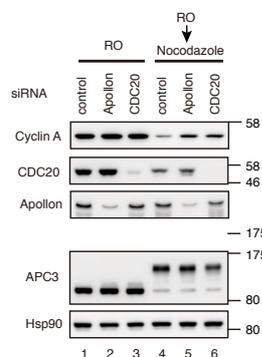


図 1 Apollon 発現低下によるサイクリン A の増加

(2) Apollon とサイクリン A の局在

Ro-3306 で G2/M 期に同調し、MG132 存在下でリリースした M 期の細胞をサイクリン A 抗体及び Apollon 抗体で 2 重染色した結果、両抗体とも細胞全体が強く染まり、核膜が消失した M 期の細胞では、Apollon とサイクリン A が共局在している事が明らかになった。(図 2 の白矢印)

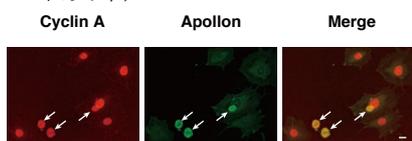


図 2 Apollon とサイクリン A の共局在

(3) M 期細胞内での Apollon とサイクリン A の相互作用

Ro-3306 で G2/M 期に同調し、MG132 存在下でリリースした M 期の細胞を、サイクリン A 抗体及び Apollon 抗体を用いて in situ proximity assay 法で解析した結果、Apollon とサイクリン A が細胞内で非常に近接して存在している事を示すシグナルが見られた (図 3 の白矢印)。間期の細胞ではこの様なシグナルは全く見られないことから、Apollon とサイクリン A は M 期においてのみ結合している事が明らかになった。

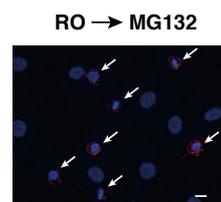


図 3 in situ proximity assay

(4) M 期におけるサイクリン A の分解 (生細胞イメージング)

GFP 標識サイクリン A 及び DsRed2 標識サイクリン B を細胞に発現させ、細胞周期を同調後、M 期の細胞を蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。Control 実験において間期の細胞ではサイクリン A は核、サイクリン B は細胞質に分かれて存在した。M 期に入ると核膜が消失しサイクリン A、B は共局在し、その後速やかに (約 20 分) サイクリン A の分解が認められた。一方 siRNA で Apollon の発現量を低下させた細胞では、M 期に入ってもサイクリン A の分解がなかなか進まず、約 3 時間後ようやく分解された (図 4)。これらの結果から、Apollon が M 期におけるサイクリン A 分解に重要である事が生きた細胞内でも確認された。

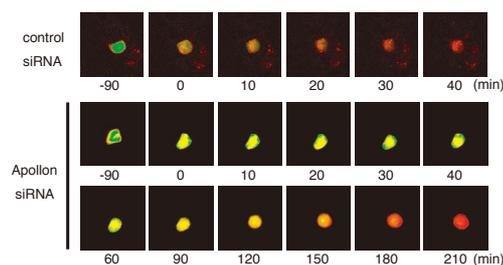


図 4 Apollon 発現低下によるサイクリン A 分解の遅延 (生細胞イメージング)

(5) Apollon と共同して働く因子の同定

Hela 細胞の Lysate を Apollon 抗体で免疫沈降すると、APC/C 複合体の構成因子である APC3 が共沈する事がわかった。同様な実験で APC11 も Apollon と一緒に共沈する事が示された。また Apollon を発現すると APC/C と結合するサイクリン A が増加した。これらの結果から、Apollon は APC/C と結合するサイクリン A を増加させることにより、APC/C

によるサイクリン A ユビキチン化を促進することが考えられた。

(6) 細胞周期 M 期制御における意義

Apollon の発現量を低下させた細胞では、細胞分裂に要する時間（付着進展している細胞が丸くなってから、2 つに分裂して再付着するまでの時間）が、Control 細胞と比べて長くなる細胞が多かった。また、この細胞において siRNA でサイクリン A の発現量を低下させると、M 期の時間は短くなった (図 5)。この結果は、Apollon 発現量が低下すると M 期でのサイクリン A 分解が遅れ、その結果 M 期の進行も遅延する事を示している。これらの結果から、Apollon はサイクリン A の分解を制御する事により、細胞周期 M 期を制御する事が明らかになった。

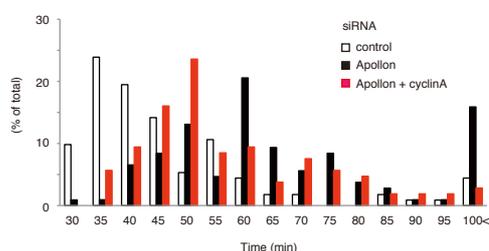


図5 M期進行の遅延

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Kikuchi, R., Ohata, H., Ohoka, N., Kawabata, A. & Naito, M.: APOLLON Protein Promotes Early Mitotic CYCLIN A Degradation Independent of the Spindle Assembly Checkpoint. *J Biol Chem* 289, 3457-3467 (2014).

Hashimoto, Y., Takeshita, Y., Naito, M., Uchino, H. & Matsuoka, M.: Apollon/Bruce is upregulated by Humanin. *Molecular and cellular biochemistry* 397, 147-155 (2014).

Shibata, N., Ohoka, N., Sugaki, Y., Onodera, C., Inoue, M., Sakuraba, Y., Takakura, D., Hashii, N., Kawasaki, N., Gondo, Y. & Naito, M.: Degradation of stop codon read-through mutant proteins via the ubiquitin-proteasome system causes hereditary disorders. *J Biol Chem* 290, 28428-37 (2015).

[学会発表] (計 7 件)

大岡伸通, 大畑広和, 内藤幹彦: Apollon

binds cyclin A and promotes degradation in early mitosis independent of spindle assembly checkpoint. 第 72 回日本癌学会学術総会(2013.10)

柴田識人, 大岡伸通, 権藤洋一, 内藤幹彦: 終止コドンのリードスルー変異によるユビキチン-プロテオソーム系を介した FLIPL の蛋白質不安定化. 第 72 回日本癌学会学術総会(2013.10)

大岡伸通, 大畑広和, 内藤幹彦: Apollon は細胞分裂初期においてスピンドルチェックポイント非依存的な cyclin A の分解を促進する. 日本薬学会第 134 年会(2014.3)

大岡伸通, 内藤幹彦: Apollon 細胞分裂初期においてスピンドルチェックポイント非依存的な cyclin A の分解を促進する. 日本がん分子標的治療学会第 18 回学術集会(2014.6) (仙台市)

柴田識人, 大岡伸通, 権藤洋一, 内藤幹彦: 終止コドンのリードスルー変異によるユビキチン-プロテアソーム系を介した蛋白質の不安定化. 第 73 回日本癌学会学術集会(2014.9) (横浜市)

柴田識人, 大岡伸通, 櫻庭喜行, 権藤洋一, 内藤幹彦: Destabilization of carboxy-terminally extended proteins encoded by stop codon read-through mutation via ubiquitin-proteasome system. Symposium for young ubiquitin researchers in Japan "New Era in the Ubiquitin Research" (2014/11), Kyoto, Japan

Norihito Shibata, Nobumichi Ohoka, Yoichi Gondo, Mikihiko Naito: Degradation of C-terminally extended proteins by stop codon read-through mutations cause hereditary disorders. 第 74 回日本癌学会学術総会 (2015.10) (名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/mtgt/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 幹彦 (NAITO, Mikihiko)

国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子医薬部・部長

研究者番号: 00198011