

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20710178

研究課題名(和文)細胞分裂を制御するタンパク質複合体 APC/サイクロソームの活性発現の分子機構

研究課題名(英文) Molecular systems for the regulation of Anaphase-promoting complex/cyclosome ubiquitin ligase activity,

研究代表者

庄司 志咲子 (SHOJI SHISAKO)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・研究員

研究者番号：60321808

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子化学・生物分子化学

キーワード：細胞周期、ユビキチン化、APC/サイクロソーム、タンパク質複合体、タンパク質立体構造、細胞分裂停止因子、Emi2

### 1. 研究計画の概要

細胞分裂の正しい進行のために特定の細胞周期で不要なタンパク質を処理するシステムが細胞内には存在する。その代表的な分解コンパートメントであるプロテアソームの標的となるタンパク質はユビキチン鎖というマークが付けられる。このユビキチン付加反応は、ユビキチン活性化酵素(E1)→ユビキチン結合酵素(E2)→ユビキチンリガーゼ(E3)の三段階の酵素反応で行われる。

本課題では、この E3 に相当する巨大なタンパク質複合体である APC/サイクロソーム (APC/C) の機能制御に関するタンパク質分子の構造とはたらきに着目し、

- (1) APC/C の阻害因子を用いた解析
- (2) APC/C の活性部位構成分子の解析
- (3) APC/C の全体構造についての解析を計画した。

### 2. 研究の進捗状況

- (1) APC/C の阻害因子を用いた解析：

本研究では APC/C の機能制御タンパク質分子として、以前に申請者が見出した、受精前のマウス卵を分裂期中期で停止させておく因子であり APC/C 活性の阻害機能をもつ Emi2 を利用した解析を行った。まず APC/C によるユビキチン化反応に対して Emi2 分子がどのように作用するのか調べるため、高純度の精製タンパク質を調製して *in vitro* アッセイ系を構築し、また蛍光タンパク質を利用した哺乳類培養細胞による解析系を確立した。これらを用いた一連の実験により Emi2 及びその相同因子(ファミリー分子)である Emi1 について APC/C 阻害に重要な機能ドメインが

明らかになった。さらに、これらについて溶液 NMR (核磁気共鳴分光法) による解析を行いこれらの中核領域の構造を決定した。現在、ここまで得られた構造情報と機能情報を総合的に分析して APC/C によるユビキチン化反応を抑制する制御系についてモデルを考察中である。

- (2) APC/C の活性部位構成分子の解析：

APC/C は活性化アダプター分子も含めると 13 個以上のタンパク質から構成される複合体型酵素である。本研究では、この中の活性中枢を構成するサブユニットタンパク質の構造解析を行い APC/C によるユビキチン化反応過程を理解することを目指している。先ず過去の情報分析から候補となる分子を抽出し、次いで *in vitro* アッセイにより解析ターゲットとするサブユニットを選定した。その後これらのタンパク質の精製方法の検討により E3 活性を有する標品の大量調製系を構築した。現在これを用いた結晶化スクリーニング中であり、X 線回折によるタンパク質結晶構造解析に向けて条件最適化を図っている。

- (3) APC/C の全体構造の電子顕微鏡解析：

研究期間中に他の研究グループからこれに関する論文が発表されたためこのアプローチは中止した。

### 3. 現在までの達成度

- (1) APC/C の阻害因子 Emi2 を用いた解析：

評価①当初の計画以上に進展している。(理由) 想定していた以上の結果が得られており、本課題の成果をもとにして今後新たな研究の展開が見込まれているので。

(2)APC/Cの活性部位構成分子の解析:

評価③やや遅れている。

(理由)構造解析のためのタンパク質の大量精製系を確立するまでに予定より長期間を要したことにより結晶化スクリーニングの開始が遅れたため。

#### 4. 今後の研究の推進方策

(1) APC/C阻害因子を用いた解析:

当初見込んでいたよりも豊富なデータが得られており、高精度分析が可能となったので、これに基づく新理論を構築し国際的学術雑誌へ論文を投稿する。

(2)APC/Cの活性部位構成分子の解析:

良質の結晶の作成の成否が鍵であり、この点での難易度は高いが、所属研究チームの過去の研究で蓄積された結晶化条件の情報や分析ツールを活用して結晶の調製方法を確立し、X線回折による構造解析を目指す。

本課題は構造生物学的な観点と細胞生物学的な観点の双方から研究を進めてきた。最終年度はこれらのデータについて総合的な解釈を加えて分子機構モデルを提示する。

#### 5. 代表的な研究成果

(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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)