

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

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 underlying 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

研究成果の概要（和文）：APC/サイクロソーム(APC/C)は、細胞周期を制御するタンパク質のプロテアソーム分解系で働く複合体型ユビキチンリガーゼである。本研究では、マウス未受精卵においてAPC/C活性を阻害する細胞分裂停止因子として同定されたEmi2の解析により、ユビキチン鎖伸張反応に干渉する機能ドメインを発見し、その中核構造を明らかにした。本成果は、従来示されてきた基質認識阻害とは異なる新奇のAPC/C制御機構モデルを提示する。

研究成果の概要（英文）：Anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) is a multi-subunit ubiquitin ligase that marks the target cell cycle regulators for proteasomal degradation. Emi2 was identified to be an essential component of the cytostatic factor, which antagonizes APC/C function in unfertilized vertebrate eggs. This study revealed the presence of the ubiquitin chain extension-interfering region within mouse Emi2. We propose a novel model for APC/C regulation, which differs from the previously reported mechanisms to block substrate recognition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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, ユビキチン化反応, APC/サイクロソーム, タンパク質複合体, Emi2

1. 研究開始当初の背景

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には、小さなタンパク質ユビキチンが連結したポリユビキチン鎖の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。APC/サイクロソーム(APC/C, anaphase-promoting complex/cyclosome)は、細胞分裂を制御するユビキチン-プロテアソーム分解系において決定的な役割をもつ E3 であることから、その制御機構は、生物分子研究においても細胞周期研究においても、是非解明されたい項目の一つとなっている。しかしながら、APC/C は 12 個以上のサブユニットから構成される巨大なタンパク質複合体であり、M 期(分裂期)~G1 期ではさらに基質認識のためのアダプター分子 Cdc20 を伴って機能することが知られており、このような複雑な制御機構を解明するにあたっては何か鍵となる因子が必要である。

受精前の哺乳類卵は、分裂期中期(第二減数分裂中期、second meiotic metaphase、mII)で細胞周期が停止していて、通常、精子が到着するまでは分裂が開始されない。この仕組みは細胞分裂停止因子(CSF, cytostatic factor)と呼ばれている。我々は以前の研究において、マウス mII 卵における CSF として Emi2 というタンパク質分子を同定し、Emi2 は Cdc20 と結合することで APC/C 機能を阻害するというモデルを提示した[Shoji et al. EMBO J. 25, 834-845 (2006)]。Emi2 は別名 Erp1 または FBX043 として知られ、脊椎動物

では進化的によく保存されており、現在では、そのホモログである Emi1 を含む Emi/Erp タンパク質ファミリーは APC/C 阻害因子のグループとして認識されている。しかし、Emi2 による APC/C の E3 機能阻害機構については、上述のような基質認識因子と結合する以外にも寄与する仕組みがある可能性が示唆されていたが、依然として不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、APC/C の E3 機能中枢を構成するサブユニットタンパク質分子を用いて、阻害因子 Emi2 の影響を直接受けるとされる APC/C のユビキチン化反応過程に対する解析系を構築し、さらに、これらの機能的・構造的な知見を発展させて、APC/C の E3 活性制御機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) APC/C 系 E2-E3 システムによる *in vitro* ユビキチン化反応構築とそれを用いた解析: 本研究では、APC/C の E3 機能—特にそのポリユビキチン化過程—をクローズアップした解析ができるように使用するタンパク質コンポーネントを限定した *in vitro* ユビキチン化反応実験を設計した。

①実験に用いる高純度タンパク質標品の調製—大量発現系とその精製方法の確立: 先ず、バキュロウイルスベクターを用いた昆虫細胞発現系によりタンパク質標品を調製して実験に供した。この結果をもとに、さらに必要なコンポーネントを絞り込んで、大腸菌無細胞タンパク質合成系(真核細胞内でおこる翻訳後修飾は無視できるセルフリー合成反応系)からの精製方法を確立した。APC/C は

基質認識サブユニットと Cullin-RING 型 E3 モジュール (CRL E3) を基板にしたユビキチン化反応触媒部位を構成しているが、本実験では、最終的には、E1, E2, ユビキチン以外のタンパク質分子は、最小限の APC/C E3 モジュールのみを用いた解析系にアレンジした。この APC/C 系ユビキチン化反応に対する阻害性を調べるにあたって、Emi2 側は、Emi/Erp ファミリーに共通するアミノ酸配列モチーフが集中する C 末端領域をフラグメント化して精製したものをを用いた。

② APC/C コア反応を模した *in vitro* ユビキチン化反応に対する Emi2 フラグメントの阻害性評価：FLAG タグを付けたユビキチンを加えたユビキチン化反応を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットイング (western blotting: WB) により、コントロール条件での反応産物と Emi2 フラグメント存在下での反応産物とを比較した。

(2) *in vitro*/*in vivo* タンパク質結合：共免疫沈降法 (co-immunoprecipitation: co-IP) により検討した。

(3) Emi2 機能ドメインの細胞実験：

In vitro ユビキチン化阻害アッセイの結果もとにして決定した Emi2 機能ドメインを蛍光タンパク質 AcGFP との融合体として哺乳類培養細胞で発現させ、その表現型を解析した。

①発現ベクター作成：AcGFP の C 末端側に Emi2 領域をつなぐ設計で、CMV プロモーターを搭載するプラスミド DNA のコンストラクトを作成した。

②細胞株：細胞周期による形態変化が見やすい接着細胞であり、以前の研究により内在性 Emi2 を持たないことが分かっている HEK293T 細胞を使用した。

③細胞周期解析：蛍光顕微鏡による細胞の形

態変化の観察、フローサイトメトリー (FACS) による細胞周期位相の決定、共焦点顕微鏡による細胞内局在の検討、細胞抽出物の WB による APC/C の基質タンパク質の検出—を行い、細胞分裂イベントへの影響を確認した。

(4) タンパク質立体構造解析：

溶液 NMR (核磁気共鳴分光法) により、

①Emi2 内の APC/C 阻害性領域、特にポリユビキチン鎖形成反応に影響を与える機能ドメイン中核の立体構造を決定した。

②APC/C 活性部位サブユニットを含む *in vitro* ユビキチン化反応系に用いた各タンパク質コンポーネントに対する Emi2 機能ドメイン内の相互作用部位を解析した。

(5) Emi2 機能ドメインの変異体解析：

公開データベースの情報等をもとに「類似モチーフを有するが性質の異なるタンパク質の機能ドメイン」について配列アライメントを行い、Emi2 オルソログで保存された部位の変異体を AcGFP 融合体として作成し、それらの細胞表現型を観察した。この結果と(4)の構造解析の結果とを照合させて、重要と思われるアミノ酸残基を絞り込み、これらの変異体フラグメントを作成して(1)–②と同様にして *in vitro* ユビキチン化阻害アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 主な実験結果

①APC/C の部分的再構築系を用いた予備実験により、Emi2 の C 末端領域にユビキチン鎖伸長反応自体を阻害する性質があることが示唆された。また co-IP では Emi2 は APC/C の E3 モジュール構成サブユニットと結合した。

②そこでモチーフ配列をもとに分割した

Emi2 フラグメントを用いて、APC/C のコア反応を模した *in vitro* ユビキチン化反応解析を進めた結果、本阻害性能に必要な領域には、IBR (in-between-RING) と C-Tail モチーフが含まれることが分かった。また、E1 によるユビキチン活性化と E2 のユビキチンチャージの過程は、この阻害機構の対象ではないことも分かった。

③Emi2 の IBR-CT 領域を AcGFP との融合タンパク質として HEK293T 細胞に発現させると、培養 2 日目で本細胞の分裂期特有のボール状形態となって停滞期を経た後、細胞分裂異常(核分裂不全)が観察された(図 1-A)。この 2 日目の Emi2 IBR-CT 発現細胞では、同時期の Blank コントロール細胞に比べて、APC/C の基質であり M 期を脱した細胞では速やかに分解されるサイクリン B (CycB1) の存在量が多く検出された(図 1-B)。また、同時期の FACS 解析の結果から、G2/M 期細胞が増加していることが示され、Emi2 IBR-CT の発現によって M 期遅延が惹起されたことが分かった。さらに細胞内局在解析および co-IP の結果から、細胞内で IBR-CT は APC/C と結合しうることも確認された。以上のことから、Emi2 IBR-CT は APC/C 阻害性ドメインとして細胞内で機能するものと判断された。

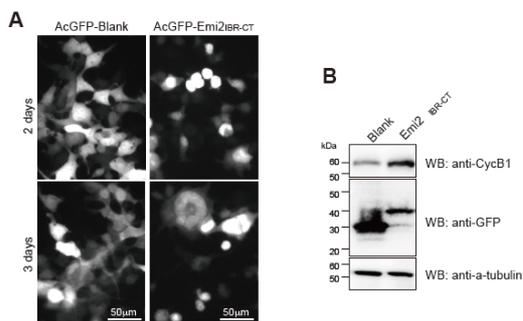


図 1. AcGFP 融合タンパク質発現ベクターと HEK293T 細胞を用いた表現型解析。

④Emi2 IBR-CT の APC/C E3 モジュールとの相互作用を NMR で解析した結果、結合部位は

CT 配列内に認められた。細胞内においても IBR のみでは APC/C には結合しない。そこで、CT を削って IBR のみにして解析を進めた結果、(E3 サブユニットに結合できる IBR-CT に比べるとその阻害効力は約 50% 程度低下したが)、IBR 自身にもユビキチン鎖伸張反応阻害性があることが分かった(図 2)。

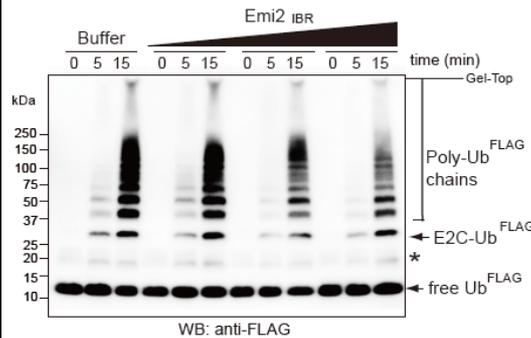


図 2. APC/C 系 E2-E3 システムによる *in vitro* ユビキチン鎖伸張反応に対する阻害効果の検討。Emi2 IBR 存在下でのポリユビキチン生成量 (Poly-Ub^{FLAG} chains) は、反応開始後の同時間に検出されるコントロール反応 (Buffer) と比較すると少ない。

⑤IBR モチーフは、アミノ酸配列上、システイン/ヒスチジンリッチの C6HC 型ジンクフィンガーモチーフに分類され、一般には、2 個の RING フィンガーモチーフに挟まれた配置で RBR (RING-between-RING) ドメインの構成要素として存在する。RBR ドメインはユビキチンリガーゼ E3 活性を有するタンパク質の機能ドメインの特徴であるが、Emi2 の場合、これらとは逆に、E3 である APC/C の活性を阻害する性質をもっている。本研究では、この Emi2 IBR の立体構造を決定した。Emi/Erp ファミリータンパク質について立体構造を明らかにしたのは本研究が初めてとなる。

これまでに報告されてきた Emi2 の APC/C 阻害性を失う変異体は、配列アライメントに基づいて IBR 保存アミノ酸残基に変異を入れ

た結果が示されてきたが、今回の構造解析の結果から、これらは Emi2 の機能ドメインの中核構造の安定化に寄与する亜鉛配位の部位に相当する変異であることが分かった。

⑥本研究では、IBR のジンクフィンガー構造を保ったままの状態での Emi2 機能ドメインの解析を行うため、今回解明した立体構造情報に基づき、亜鉛配位部位以外のアミノ酸残基の変異体を作成して、細胞表現型を観察した。その結果、この中に野生型の発現で誘導される細胞分裂異常が抑制される残基が幾つか見出されたので、さらに解析を進めた。

⑦NMR による各ユビキチン化反応コンポーネントとのタイトレーション実験を行った結果、Emi2 IBR にはユビキチンと相互作用する部位があることが示された。上述した細胞表現型に影響を与える変異体の中にこの部位と一致するものがあったので、対応する変異体フラグメントを作成して *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った結果、ユビキチン鎖アセンブリ阻害性がほぼ消失したことから、本機能に関与する部位であると確認された。

(2) 総括

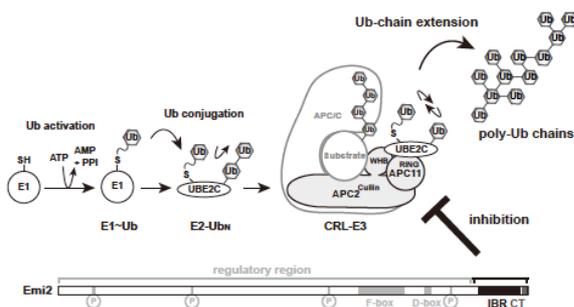


図 3. Emi2 によるユビキチン鎖伸張反応阻害機構のモデル:本機構の対象は E2-E3 によるユビキチン鎖伸張反応過程である。Emi2 の IBR はユビキチンと親和性がありながら、自身はポリユビキチン化されにくい性質である。IBR が CT を介して APC/C の E3 モジュールに結合すると、この場で行われる活性化ユ

ビキチン転移反応を介するユビキチン連結過程が阻害されて、ポリユビキチン鎖形成が遅くなる。

(3) 本成果の意義

ユビキチンリガーゼ E3 は、(a) ユビキチン化の標的となるタンパク質を認識し、(b) ユビキチン連結反応を行うという二つの機能がある。これまでに示されてきた APC/C の E3 活性阻害機構は (a) に対してであったが、本研究からは (b) に対する制御機構が提示できる。ユビキチン化システムにおける E3 制御系に関しては、基質認識機構への理解が進んでいる一方で、ユビキチン鎖伸長反応機構の研究は活発化し始めているものの、依然として不明な部分が多い。本成果は、当該分野への大きな一助となると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

①発表者(代表)名: 庄司 志咲子

発表標題: マウス卵細胞分裂停止因子 Emi2 の APC/C 阻害機構 [英語演題名: APC/C-mediated ubiquitylation inhibitory mechanism of mouse cytostatic factor Emi2]

学会名: 第 34 回 日本分子生物学会年会

発表年月日: 2011 年 12 月 16 日

発表場所: パシフィコ横浜 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 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: 6 0 3 2 1 8 0 8