

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790117

研究課題名(和文) 巨大ユビキチンライゲース Apollon による小胞体ストレス制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of ER stress regulation by a giant ubiquitin ligase, Apollon

研究代表者

大岡 伸通 (Ohoka, Nobumichi)

国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・主任研究官

研究者番号：80568519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 0 円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス誘導性アポトーシスは神経変性疾患や糖尿病などの原因として重要視されている。本研究では、アポトーシス阻害タンパク質である Apollon が、小胞体ストレス時にアポトーシス促進タンパク質 Bim の発現を抑制し、アポトーシスを阻害していること、また、小胞体ストレスによるアポトーシス誘導時には Apollon タンパク質の発現が減少することを明らかにした。さらに、Apollon が有糸分裂のレギュレーターとして知られる cyclin A の分解を促進することで、細胞周期の制御に関与することも見出した。

研究成果の概要(英文)：There are accumulating important evidences implicating ER stress-inducible apoptosis is in the development and progression of neurodegenerative diseases and diabetes. In this study, we have showed that Apollon, which is an inhibitor of apoptosis protein, represses expression of an apoptosis-facilitating protein, Bim, and inhibits ER stress-dependent apoptosis, whereas during ER stress-inducible apoptosis, expression of Apollon protein is decreased. Moreover, we have demonstrated that Apollon plays a critical role in cell-cycle regulation by promoting mitotic cyclin A degradation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：Apollon 小胞体ストレス ユビキチン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス依存性アポトーシスは神経変性疾患や糖尿病などの原因として重要視されており、近年、その誘導機構や制御機構が分子レベルで明らかにされているが、未だその多くは解明されていない。

Apollon は IAP (Inhibitor of apoptosis protein) ファミリーの 1 つであり、N 末端側に BIR (Baculovirus IAP repeat) ドメインを C 末端側に UBC (Ubiquitin-conjugating enzyme) ドメインを有する分子量 500kDa 以上の巨大なタンパク質である。これまでの研究から Apollon は、主に BIR ドメインを介してアポトーシス促進タンパク質である Smac や caspase-9 と結合し、UBC ドメイン依存的にユビキチン化することで、これらのプロテアソームによる分解を促進していることが明らかになっている。また、Apollon はこのような作用により、様々な抗癌剤やデシリガンドによるアポトーシスを阻害していることが示されている。一方で、Apollon 欠損マウスは胎生致死であるが、胎児組織における異常なアポトーシスの亢進は観察されないことから、Apollon にはアポトーシス阻害以外にも重要な機能があると推測されている。

Apollon 欠損マウスでは胎盤形成不全も高頻度に認められる。一般に、マウス生体レベルで妊娠中の胎盤は小胞体ストレス状態にあり、この小胞体ストレスを軽減するための応答が胎盤の発達や機能に必須であることがわかっている。これらの知見から考えて、Apollon 欠損による胎盤形成不全は小胞体ストレス応答に異常が生じたためではないかと推察している。

2. 研究の目的

上記の様な知見から、Apollon と小胞体ストレスとの関連が予想されるが、これまでにこれらの関連性は全く明らかにされていない。本研究では、主に Apollon による小胞体ストレス応答の制御、小胞体ストレス時の Apollon 発現の制御に関して、Apollon が細胞死制御に関与するか、もしくは細胞死制御以外にどのような細胞機能の制御に関与するかなどを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Apollon による小胞体ストレス応答の制御

Apollon が小胞体ストレス時のアポトーシス誘導に関与するか、ロックダウン実験により検討した。また、小胞体ストレス時に Apollon によって発現が制御される分子を探

索するために、Apollon ロックダウン細胞及びコントロール細胞間で様々なタンパク質の発現量を比較検討した。

(2) 小胞体ストレス時の Apollon 発現の制御

Apollon 活性の制御を介した小胞体ストレス応答の有無を調べるために、小胞体ストレス時の Apollon タンパク質の発現量や細胞内局在の変化を検討した。また、そのメカニズムが Apollon の UBC ドメイン依存的であるか調べるために、UBC ドメイン変異型 Apollon を発現している mouse embryo fibroblast (MEF) を用いた。

(3) その他の Apollon による細胞機能の制御

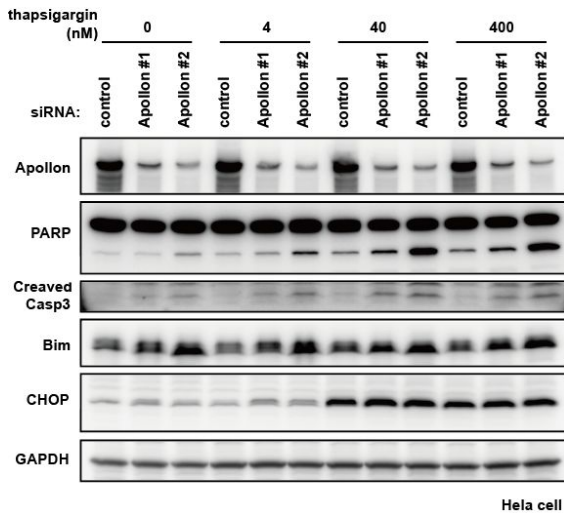
Apollon が直接機能制御するタンパク質を同定するために、抗体アレイにより Apollon 結合タンパク質の同定を試みた。また、同定された結合タンパク質に対する Apollon による機能制御を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) Apollon による小胞体ストレス応答の制御

小胞体ストレスによるアポトーシス誘導に Apollon が関与するか検討した。Apollon ロックダウン細胞及びコントロール細胞を、それぞれ thapsigargin で処理することにより小胞体ストレスを誘導し、caspase-3 や PARP の切断を調べることにより、caspase の活性を両細胞間で比較したところ、Apollon ロックダウン細胞において、より高度な caspase の活性化が見られた(下図)。また、これに相関し、ロックダウン細胞では thapsigargin 処理による細胞死が増強されることが確認された。この結果から、Apollon が小胞体ストレス時のアポトーシス誘導にも関与することが明らかになった。一方で、小胞体ストレス依存性アポトーシスに重要な転写因子 CHOP の発現誘導に関しては両細胞間で違いは見られなかった。

小胞体ストレス時に Apollon によって発現が制御される分子を探索するために、Apollon ロックダウン細胞及びコントロール細胞を、それぞれ thapsigargin で処理し、様々な小胞体ストレス制御因子、細胞死関連因子、細胞増殖制御因子のタンパク発現量を両細胞間で比較検討した。その結果、Apollon をロックダウンすると、アポトーシス促進タンパク質 Bim の発現量が増加することを新たに見出した(下図)。Apollon が Bim のユビキチン化分解に関与しているのかもしれない。

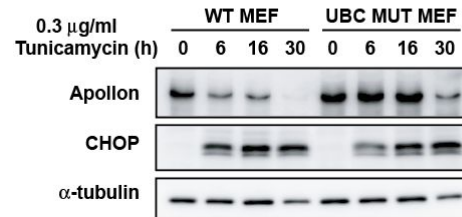
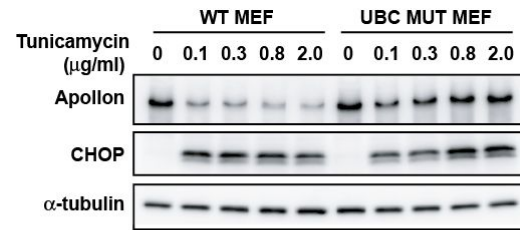


(2) 小胞体ストレス時の Apollon 発現の制御

小胞体ストレスによる Apollon タンパク質の発現変化を検討した。Primary MEF を tunicamycin で処理すると、処理濃度及び時間依存的に内因性 Apollon タンパク質の発現が低下した（下図）。また、別の小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin を用いたときや、NIH3T3, U2OS, MCF7 などの細胞株を用いたときにも同様に内因性 Apollon タンパク質の発現低下が観察された。これらのことから、小胞体ストレス誘導時には Apollon タンパク質の発現低下が起こることが見出された。Apollon はアポトーシス阻害タンパク質であることから、小胞体ストレス時にはこの機構を介したアポトーシス誘導が起こることが想定される。

Apollon による抗アポトーシス作用にはその C 末端に存在する UBC ドメイン依存的な標的タンパク質のユビキチン化が重要である。小胞体ストレスによる Apollon 発現抑制において、自身の UBC ドメインの機能が重要であるか検討した。UBC 変異型 Apollon タンパク質に対する小胞体ストレスの影響を調べたところ、野生型とは異なり UBC 変異型タンパク質の発現低下は見られなかった（下図）。この結果から、小胞体ストレスによる Apollon タンパク質の発現低下には自身の UBC ドメインを介した機能が重要であることが示唆された。他の IAP ファミリータンパク質と同様に、Apollon タンパク質もアポトーシス誘導時には、複数の caspase により切断され不活性化されることがわかっている。しかし、小胞体ストレス時の Apollon タンパク質の減少には自身の UBC ドメインの機能が必要であることから、単に caspase により切断されたことにより減少したのではないと推察される。自己ユビキチン化の促進、もしくは別のタンパク質のユビキチン化

を介した間接的な Apollon の発現抑制機構などが想定される。



小胞体ストレス時における Apollon の細胞内局在の変化の有無を調べた。内因性 Apollon を特異的に染色することができる抗 Apollon 抗体を用いて、MEF や U2OS 細胞に対して免疫蛍光染色法を行った。Apollon タンパク質は通常の培養条件においては主に細胞質に局在し、tunicamycin 処理により小胞体ストレスを誘導しても、その局在に変化はなかった。

(3) その他の Apollon による細胞機能の制御

抗体アレイにより、Apollon 結合タンパク質として、細胞周期の有糸分裂期を制御するタンパク質 cyclin A を同定した。Apollon は cyclin A をユビキチン化し、その分解を促進したが、予想に反して、このユビキチン化には Apollon の UBC ドメインは必要ないことがわかった。Cyclin A は別のユビキチンリガーゼ複合体である APC/C によりユビキチン化されることが明らかになっているが、Apollon の発現に伴い cyclin A と APC/C の結合が増強された。

Apollon と cyclin A は分裂期においてのみ共局在し結合すること、Apollon を欠失した分裂期の細胞において cyclin A が蓄積することを明らかにした。また、Apollon をノックダウンすると分裂期の進行が遅延するが、cyclin A の蓄積を RNA 干渉法により通常レベルにまで抑制すると、分裂期進行遅延が一部回復することを明らかにした。

この結果から、Apollon が cyclin A のユビキチン化を介した分解を誘導することで、細胞分裂期の進行に重要な役割を果たしていることを新たに見出した。

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 査読有. (*equally contribution) DOI: 10.1074/jbc.M113.514430

Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami T, Okuda H, Kurihara M, Naito M. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrotic cell death in breast cancer cells. *Cancer Sci*, 104: 1492-1498, 2013 査読有. DOI: 10.1111/cas.12272

Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T. HNF4a increases liver-specific human ATP-binding transporter A1 expression and cholesterol efflux to apolipoprotein A-I in response to cholesterol depletion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: 1005-1014, 2012 査読有. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.238360

[学会発表](計7件)

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 年 3 月 8 日(熊本)

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. キーストンシンポジウム「ユビキチンシステム」, 2014 年 1 月 9 日(米国ビッグスカイ)

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 回日本癌学会学術集会, 2013 年 10 月 3 日(横浜)

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. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research, 2013 年 2 月 22 日(米国マウイ)

大岡伸通, 林秀敏, 内藤幹彦, 佐藤隆一郎: ヒト肝癌細胞株における TRB3 による SREBP-2 制御機構の解明. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日(札幌)

大岡伸通, 林秀敏, 内藤幹彦, 佐藤隆一郎: ヒト肝癌細胞株における TRB3 による SREBP-2 制御機構の解明. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日(横浜)

大岡伸通, 林秀敏, 内藤幹彦, 佐藤隆一郎: ヒト肝癌細胞株における TRB3 による SREBP-2 制御機構の解明. 第 70 回日本癌学会学術集会, 2011 年 10 月 4 日(名古屋)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大岡伸通 (Nobumichi Ohoka)
国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部
主任研究官
研究者番号: 80568519

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし