

論文内容の要旨

博士論文題目 The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes β -catenin
(脱ユビキチン化酵素Famによる β -cateninの分解制御機構)

申請者氏名 田谷 真一郎

ユビキチン/プロテアソームの蛋白分解系は、様々な生理機能に重要な役割を果たしている。ユビキチンによる蛋白質の翻訳後修飾は、蛋白分解のための標的シグナルとして機能する。この修飾は可逆的であり、細胞内には蛋白質に結合したユビキチンを解離させる脱ユビキチン化酵素が多数存在するが、その基質については不明な点が多い。

私の研究室では、低分子量GTP結合蛋白質Rasの標的蛋白質としてAF-6を同定した。AF-6は、細胞間接着部位に濃縮し、細胞間接着分子ZO-1と結合している。さらに、私は細胞間接着部位におけるAF-6の機能を明らかにするためにAF-6結合蛋白質探索し、脱ユビキチン化酵素のFamを同定した。私は、AF-6はユビキチン化を受け、FamがAF-6のユビキチン化を阻害することを見い出している。したがって、AF-6はFamの基質である可能性が高いと考えられた。本研究で、私は、Famがカルシウム依存性接着分子Cadherinの裏打ち蛋白質 β -cateninと結合することを見出した。Famと β -cateninは、in vivo、in vitroの両方で結合することを確認した。すでに β -cateninもユビキチン化を受けることが報告されており、 β -cateninもAF-6と同様にFamの基質である可能性が考えられた。そこで私は、繊維芽細胞のLcellを用いてFamの安定発現株を樹立した。Lcellは、内在性のCadherinを発現しておらず、 β -cateninのターンオーバーが非常に速い細胞と思われる。樹立した細胞株では、 β -cateninの発現レベルの上昇が確認できた。また、Famを安定に発現している細胞と、通常の細胞の β -catenin半減期の違いを検討したところ、半減期が約2倍に伸長していた。さらに、Famの β -cateninに対する結合領域を決定した。その結果、Famは、 β -cateninのユビキチン化を促進すると考えられている分子と β -cateninとの結合を阻害する可能性がある。これらの結果は、Famがユビキチン化 β -cateninを脱ユビキチン化しているか、或は β -cateninのユビキチン化を阻害していることを示唆している。その結果、Famが β -cateninの分解機構を制御していると考えられる。

細胞間接着は接着分子の分解、移動等の現象で制御されている可能性が高い。私は、Famが2つの細胞間接着分子AF-6と β -cateninの蛋白分解を阻害することを明らかにした。したがって、Famは、蛋白分解による細胞間接着のメカニズムを理解するための重要な分子であると考えられる。また、Rasも細胞骨格、細胞接着を制御することで、癌化の際に見られる形態異常を引き起こすことが報告されている。さらに今後、Famを介した細胞間接着のメカニズムにRasがどのように関与しているのかを検討することで、Rasによる細胞間接着装置の制御機構を解明することができると考えられる。

論文審査結果の要旨

博士論文題目 The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes β -catenin
(脱ユビキチン化酵素Famによる β -cateninの分解制御機構)

申請者氏名 田谷 真一郎

近年、ユビキチン-プロテアソームの蛋白分解システムが細胞周期制御、細胞の癌化、数種の疾患等に関与している点で非常に注目を集めている。しかし、ユビキチン-プロテアソームの蛋白分解システムでの脱ユビキチン化酵素の機能はほとんど報告されてない。よって、脱ユビキチン化酵素の基質を同定することは、その機能解析をする上で非常に重要なことと考えられる。また、本論文で脱ユビキチン化酵素Famの基質の候補として同定した β -cateninは、細胞内での発現レベルが直接疾患につながると考えられている分子である。本論文は、このような背景を踏まえ脱ユビキチン化酵素Famの解析を行い、以下に示すような成果を得ている。

(1) 上皮細胞においてFamは、tight junctionのみならず、adherens junction付近にも局在している。この結果から、Famと結合するadherens junction付近に局在する分子を探索し、 β -cateninを同定した。

(2) Famと β -cateninの相互作用を、in vitroではアフィニティークラムを用いて、またin vivoでは免疫沈降法を用いて証明した。このような生化学的手法を取り入れ、分子間の相互作用を検討している点が本研究の特徴のひとつである。

(3) β -cateninの蛋白分解メカニズムは、徐々に明らかにされつつあるが、安定化のメカニズムは不明な点が多い。本論文では、細胞にFamを恒常的に安定に発現する細胞株の樹立し解析をおこなっている。その結果、Famの発現によって β -cateninの発現レベルが上昇し、 β -cateninの半減期が伸長することを明らかにした。その作用機構は、ユビキチン化 β -cateninを脱ユビキチン化しているか、或はFamが β -cateninと複合体を形成し分解へのメカニズムを阻害しているものと考えられる。よって、 β -cateninの蛋白分解メカニズムを脱ユビキチン化酵素というツールを用いて解析した点が本研究の特徴のひとつである。

以上の結果から、本論文の結果は、細胞間接着分子 β -cateninの分解機構をFamが制御していることを示唆している。またFamは、細胞間接着分子AF-6の分解制御をしていると考えられる。これらの結果は、Famが複数の分子の状態を制御することで接着の制御に関与していることを示唆している。細胞間接着装置の分子メカニズムは不明な点が多いが、本論文は、細胞間接着装置の制御機構の一端を明らかにしたものと考えられる。したがって、本論文は博士（バイオサイエンス）の学位論文として十分に価値あるものと認める。