

Biochemical, proteomic and functional analysis of an intraflagellar transport protein MIP-T3 in human cells

ヒト細胞における鞭毛内輸送タンパク質 MIP-T3 の分子機能解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻 郭朝万

目 的

MIP-T3(Microtubule Interacting Protein that associated with TRAF3)は微小管と腫瘍壊死因子受容体結合因子 3 (TRAF3) の結合蛋白質として 2000 年に Goeddel のグループより分離同定された。一方、MIP-T3 は IL-13 受容体 alpha1 の結合タンパク質として 2003 年に小林らのグループによって報告されてきているが、その詳しい生理学的機能は今まで不明であった。2008 年、線虫やゼブラフィッシュ等のモデル生物を用いた幾つかの研究グループにより、MIP-T3 の相同遺伝子である DYF-11/Elipsa が鞭毛内輸送タンパク質複合体 B の構成成分として繊毛の形成と維持に必須であることが報告された。

殆どの真核細胞には一次繊毛というオルガネラが存在し、細胞の感覚、運動、情報伝達などに重要な役割を果たしている。一次繊毛は Sonic hedgehog(Shh), PDGFR, Wnt など多くの重要なシグナル伝達を媒介し、その欠失と機能異常は嚢胞腎、肝臓・胆管異常、多指症、認知障害、糖尿病、癌など多くの疾患を引き起こす。一次繊毛の形成と機能維持には微小管を介する鞭毛内輸送(IFT)が不可欠であり、最近 Berbari らはマウス MIP-T3 欠損は胚致死性であり、MIP-T3 は神経の発育や繊毛形成と機能維持、特に繊毛媒介 Shh シグナル伝達に必須であることが報告した。この事から MIP-T3 は高等動物においても一次繊毛の形成と機能に重要な役割を果たしている事が明らかになって来た。

本研究では、MIP-T3 タンパク質の高等動物での詳細な機能解明を目的として、その安定性制御メカニズムの解析、MIP-T3 による細胞周期停止及びアポトーシス誘導活性とその作用機序の解明やプロテオミクス研究による MIP-T3 と相互作用するタンパク質ネットワークの解析を行った。

第 1 章 プロテオミクス解析による MIP-T3 の結合タンパク質の探索

ヒト細胞内における MIP-T3 の分子機能に対する理解を深めるため、抗 MIP-T3 抗体による免疫共沈と LC-MS によるプロテオミクス解析を行った。HEK293 細胞株に導入発現した MIP-T3 に特異的に結合する新規的タンパク質 34 種類を同定した。MIP-T3 は Tubulin 以外、新たに、Actin

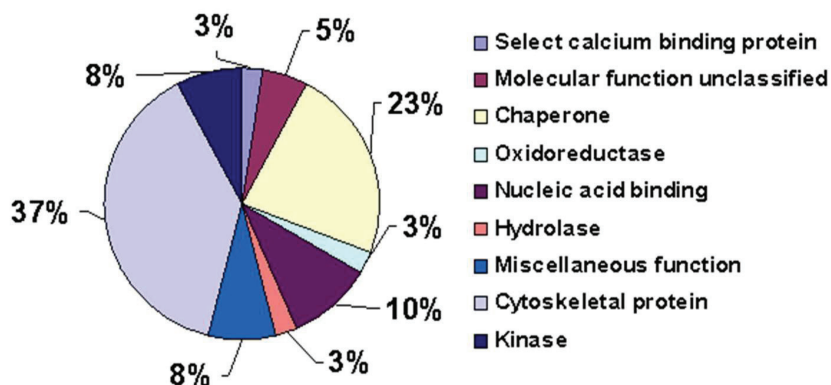


図1 MIP-T3と相互作用するタンパク質の分子機能

や Hsc70 などにも結合することを明らかにした。特に、MIP-T3 は微小管フィラメントとアクチンフィラメントの両方に結合し、細胞骨格ダイナミクス干渉または細胞分裂阻害誘導活性を持つ可能性が示唆された。また、MIP-T3 の相互作用する分子機能

は細胞骨格タンパク質を介する細胞内輸送やシグナル伝達など、多くの細胞内生理過程に関与する可能性が示唆された(図1)。このような網羅的解析は MIP-T3 の作用分子機序と機能制御の全容解明のための基礎となると考えられる。

[基礎となった学術論文]

Guo C-W, Xiong S, Liu G, Wang Y-F, He Q-Y, Zhang X-E, Zhang Z-P, Ge F and Kitazato K. Proteomic analysis reveals novel binding partners of MIP-T3 in human cells. *Proteomics*, 10 (12), 2337–2347, 2010.

第2章 MIP-T3 の細胞内安定性制御機構の解析

ヒト細胞における MIP-T3 分子機能を調べるため、MIP-T3 の発現を確認したところ、mRNA が恒常的に発現しているにもかかわらず、タンパク質の発現は殆ど確認できず、また、細胞に導入発現しても速く分解されることが確認された。各種タンパク分解阻害剤を用いて解析した結果、MIP-T3 の分解はプロテアソーム阻害剤 MG132 によって特異的に抑制された。MIP-T3 の免疫共沈降物にはポリユビキチン化ラダーが検出され、MIP-T3 タンパク質の分解は Ubiquitin-Proteasom System (UPS) により制御されることが判明した(図2A,B)。さらに、MIP-T3 の欠損変異体を用いてその分解速度を比較検討した結果、C末端(aa411-625)の欠損変異体 MIP-T3-NL の分解が著しく遅延が認められ、ポリユビキチン化ラダーも検出されなかったため、C末端が MIP-T3 の UPS による制御に必須であることが示唆された(図2C)。

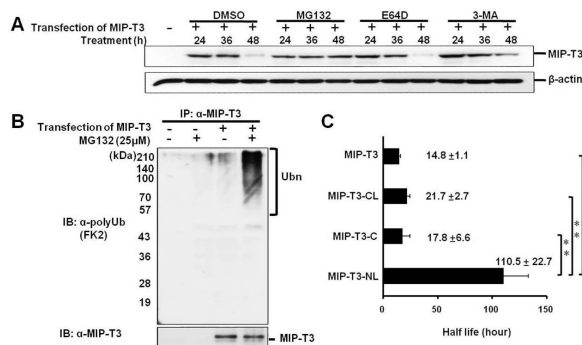


図2 MIP-T3のC末端がユビキチン-プロテアソームを介した分解に必要である

[基礎となった学術論文]

Guo C-W, Liu G, Xiong S, Ge F, Fuse T, Wang Y-F, and Kitazato K. The C-terminus of MIP-T3 protein is required for ubiquitin-proteasome-mediated degradation in human cells. *FEBS Letters*, 585 (9), 1350–1356, 2011.

第3章 MIP-T3 による細胞死誘導活性及びその制御分子機構の解析

MIP-T3 遺伝子を細胞に導入発現により、経時的に細胞にアポトーシス様形態変化が認められた(図3)。そこで、MIP-T3 による細胞死誘導とその分子機構について解析した結果、MIP-T3 の導入発現細胞では、ゲノム DNA の断片化が認められ、Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 及び PARP の切断型が有意に増加した(図4A)。

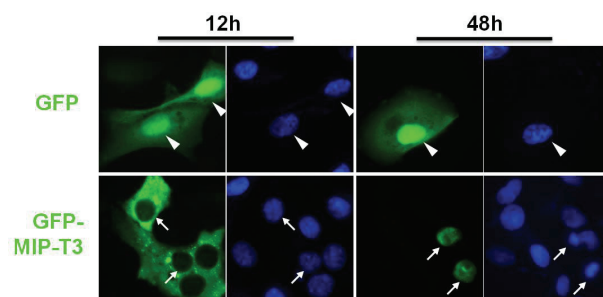


図3 MIP-T3導入発現細胞にアポトーシス様形態変化

FACSにより解析した結果、細胞周期は G2/M 期停止が確認され、アポトーシス細胞の割合が増加した。MIP-T3 の欠損変異体を用いた解析では、

MIP-T3 タンパク質の N 末端が細胞周期停止とアポトーシスの誘導に重要な役割を果していることが判明した。この N 末端には微小管結合ドメインが存在していることから、MIP-T3 と微小管の相互作用は細胞死誘導活性に関連する可能性が示唆された。MIP-T3 はアセチル化チューブリンと重合微小管に結合し、低温処理による微小管の脱重合を抑制することが示唆され、微小管の安定性を促進することが示唆された (図 4B)。

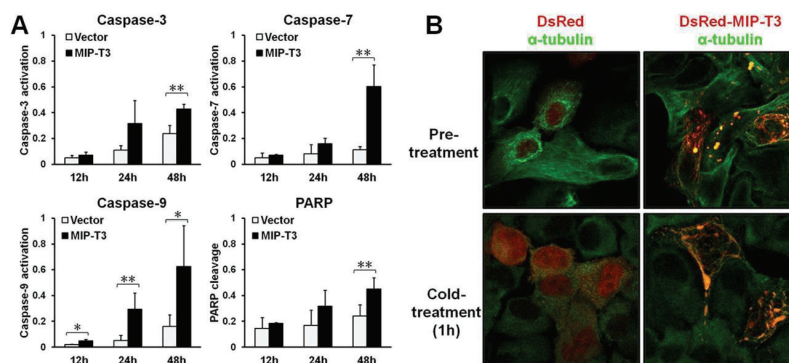


図4 MIP-T3のアポトーシス誘導活性と作用機構

[基礎となった学術論文]

Guo C-W, et al. Ectopically expression of MIP-T3/IFT54 induces G2/M cell cycle arrest and apoptotic cell death in human cells. (In preparation)

まとめ

本研究では IFT タンパク質として MIP-T3 が UPS を介して分解制御を受けることを初めて明らかにした。MIP-T3 の C 末端には coiled-coil (CC) ドメインが存在し、タンパク質間の結合やユビキチンを標識する酵素へのリクルートを媒介することが知られており、さらに興味深いことに、多くの IFT タンパク質では CC ドメインが保存されていることから、これらの IFT タンパク質も MIP-T3 と同様、UPS による分解の調節を受ける可能性が考えられる。一方、MIP-T3 はヒト癌細胞で異所発現させることにより、細胞周期停止やアポトーシスを誘導する活性を示した。これらの活性にはその N 末端に存在する微小管結合部位が関与する可能性が示唆された。MIP-T3 はこの部位を介してアセチル化チューブリンと重合微小管と結合することにより、微小管の脱重合を阻害し、微小管の安定化またはダイナミクスに影響する可能性が示唆された。このような分子活性があるゆえに、細胞ではユビキチン化による素早い分解は細胞の分裂増殖に必要であると考えられる。今後、これらの IFT タンパク質の非 IFT 機能とその関連作用分子機序の解明が抗癌治療の新たな分子標的の確立に繋がると期待される。