

Apollon による細胞老化の制御機構

東京大学分子細胞生物学研究所

内藤 幹彦

Apollon is a large protein containing baculoviral-IAP-repeat and ubiquitin-conjugating enzyme domains at the amino- and carboxy termini, respectively. Apollon inhibits apoptosis by facilitating proteasomal degradation of caspase-9 and SMAC. Homozygous disruption of apollon gene in mice results in embryonic lethality, and the mutant embryos showed polymorphic phenotype including growth retardation and defects in vasculogenesis. Here we show that embryonic fibroblasts from apollon-deficient mice showed earlier replicative senescence and over-duplication of centrosome. The time required for completion of mitosis was extended in the apollon-deficient cells compared with wild-type cells. Thus, cell cycle regulation is affected in the apollon-deficient cells, which may be involved in the earlier replicative senescence.

1. 緒言

IAP (inhibitors of apoptosis) ファミリーの1つである Apollon は 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 530 K の巨大なタンパク質である。これまでの研究で、Apollon は BIR、UBC ドメインを介して Caspase 9 や SMAC をユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促進することによりアポトーシスを阻害することが明らかとなっている¹⁾。しかし、BIR、UBC ドメイン以外の広大な領域の機能は未知であり、また、当研究室で作成した Apollon 欠失マウスは胎生致死であることから、Apollon には細胞死制御以外も様々な機能があると推測される。

本研究では、主に Apollon 遺伝子を欠損したマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を解析し、Apollon 欠損 MEF が早期に増殖を停止し老化した表現型を示すこと、M 期の進行が遅延していること、中心体が過剰複製されていることを見出した。

2. 実験

2・1 MEF の初代培養と Genotyping

耐性 14.5 日のマウス胎児を摘出し、ハサミで細かく切り刻んでから、一部を genotyping 用に分ける。トリプシンを加え室温で 40 分間振倒した後、DMEM を加えて遠心 (1000rpm、5 分) し、上清を除く。沈殿を DMEM に

サスペンドして 10 cm ディッシュにまき、炭酸ガス培養器で培養する。

genotyping 用にとった胎仔の 1 部に 60 μ L の Lysis Buffer 加え、55 $^{\circ}$ C、1 時間処理する。95 $^{\circ}$ C で 20 分処理後、15000 rpm、10 分間遠心し、上清 1 μ L に genotyping 用プライマー、PCR Buffer、dNTPmix、polymerase、を加え、PCR にかける。反応産物を 2% agarose gel (エチジウムブロミド入り) で泳動し、バンドを観察する。

2・2 細胞老化の観察

2・2・1 累積の細胞増殖曲線

MEF の初代培養を始めた日を 0 日とし、2 日後から 3 日毎に細胞数を計測し、MEF (+/+) は 5 \times 10⁵ cells/10 cm dish で、MEF (-/-) は 7 \times 10⁵ cells/10 cm dish でまき続けた。

2・2・2 senescence β -galactosidase 染色

MEF の初代培養を始めた日を 0 日とし、初代培養開始後、さまざまな時間に細胞を固定し、senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signalling) の protocol に従い、染色を行った。

2・3 免疫染色

細胞を PBS で洗った後、4% パラホルムアルデヒドで固定する。PBS で 3 回洗浄した後、0.1% TritonX-100 および 3% BSA 入りの PBS で浸透化とブロッキングをする。Blocking Buffer に 1 次抗体を希釈し、室温で 2 時間処理する。PBS で 10 分 \times 3 回洗った後、蛍光標識 2 次抗体と、hoechst も同様に希釈し、遮光して室温で 1 時間処理する。再び PBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、Poly-Mount 液とカバーガラスを用いて封入する。



Regulation of replicative senescence by apollon

Mikihiko Naito

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

2・4 Time-lapse microscopy

MEFは顕微鏡下、37℃、25mM HEPES-KOH (pH7.3) 含有 DMEM で培養し、3分毎に撮影を行った。

3. 結果

3・1 Apollon 欠損 MEF の初代培養

Apollon (+/-) マウスを交配して得られた胎児の細胞を初代培養して、野生型 MEF、及び Apollon 欠損 MEF を樹立した。PCR により Genotype を解析し、Apollon 欠損 MEF は Apollon タンパク質を発現していないことを確認した (Fig. 1)。XIAP 遺伝子破壊マウスでは、cIAP-1、cIAP-2 が発現上昇していることが報告されている²⁾。そこで、Apollon の欠失マウスで他の IAP の発現を検討したが、野生型 MEF との差は見られなかった (Fig. 1)。

3・2 MEF の老化

ヒトやマウス線維芽細胞を培養すると、細胞は一定期間増殖後、扁平な形態となり、不可逆的に増殖を停止し長期間生存し続ける。このような状態を細胞の老化と呼び、老化した細胞は対数増殖期の細胞とは異なる特徴を示すことが知られている。野生型 MEF は約 30 日間増殖した後細胞分裂を停止したが、Apollon 欠損 MEF は約 10 日で増殖を停止した (Fig. 2A)。そこで Apollon 欠損 MEF は早

期に老化するのか検討した。正常細胞は分裂回数を重ねるごとに CDK インヒビターの p16、p21 タンパクの発現が増加し、p21 は完全に老化すると減少することが知られている。初代培養を開始後経時的に MEF の lysate を調製し Western blot で解析した結果、野生型 MEF と比較して、Apollon 欠損 MEF では p16、p21 とともに早期に発現が増加していることが明らかになった (Fig. 2B)。また、老化マーカーとして知られる酸性 β -galactosidase 染色³⁾ にお

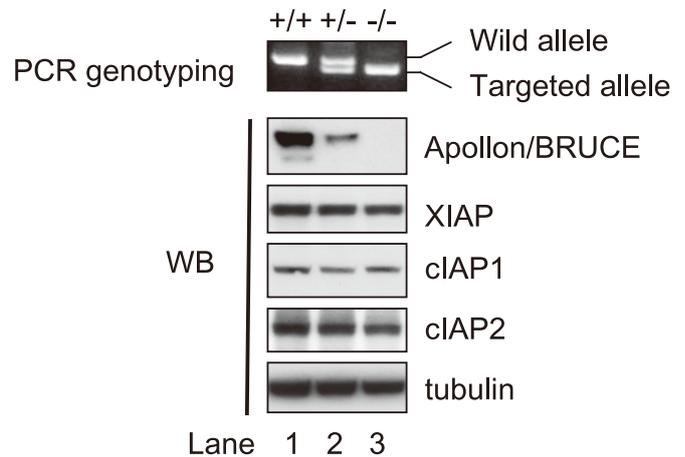


Fig.1 MEF の genotyping と IAP の発現

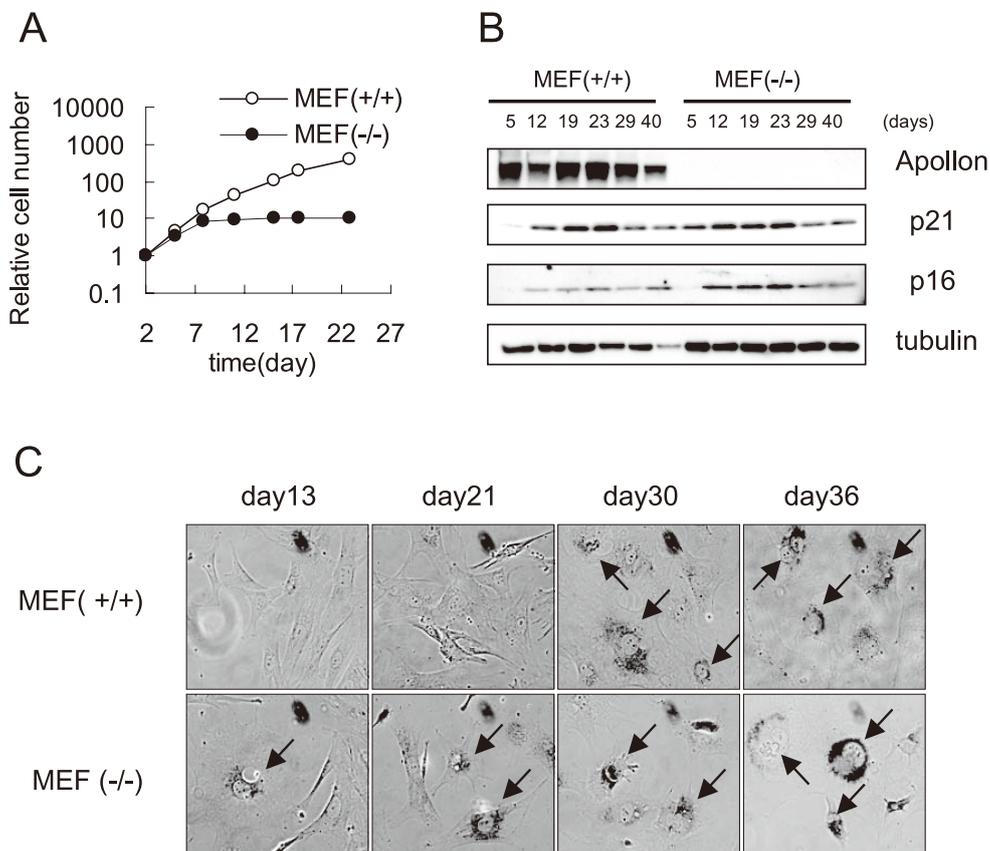


Fig.2 Apollon 欠損 MEF に見られる細胞老化

いても、野生型 MEF と比較して、Apollon 欠損 MEF では早期に強陽性を示す細胞が出現した。(Fig.2C)。これらの結果から、Apollon 欠損 MEF は早期に老化することが明らかになった。

3・3 Apollon 欠損 MEF に見られる細胞分裂の異常

老化した MEF の培養を長期間維持することにより、自然に形質転換を起こして不死化した野生型 MEF 及び Apollon 欠損 MEF を樹立した。これらの不死化した MEF の細胞分裂の様子をビデオに撮影して観察した (Fig.3A)。

その結果、Apollon 欠損 MEF では野生型 MEF と比べて分裂期の開始から終了までの時間が約 1.5 倍に延長していた (Fig.3B)。1 回の細胞周期に要する時間は、ほとんど同じであったことから、Apollon 欠損 MEF では細胞周期の M 期の進行が特異的に遅れていることが示唆された。これらの結果から、Apollon は細胞周期、特に G2/M 期の制御に関与することが考えられた。

3・4 Apollon 欠損 MEF に見られる中心体過剰複製

ビデオの観察から、M 期が遅延していることに加えて、

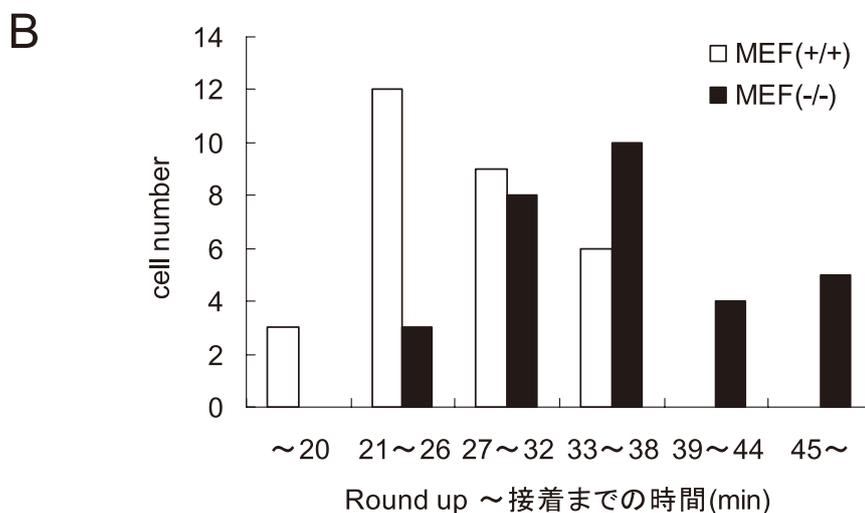
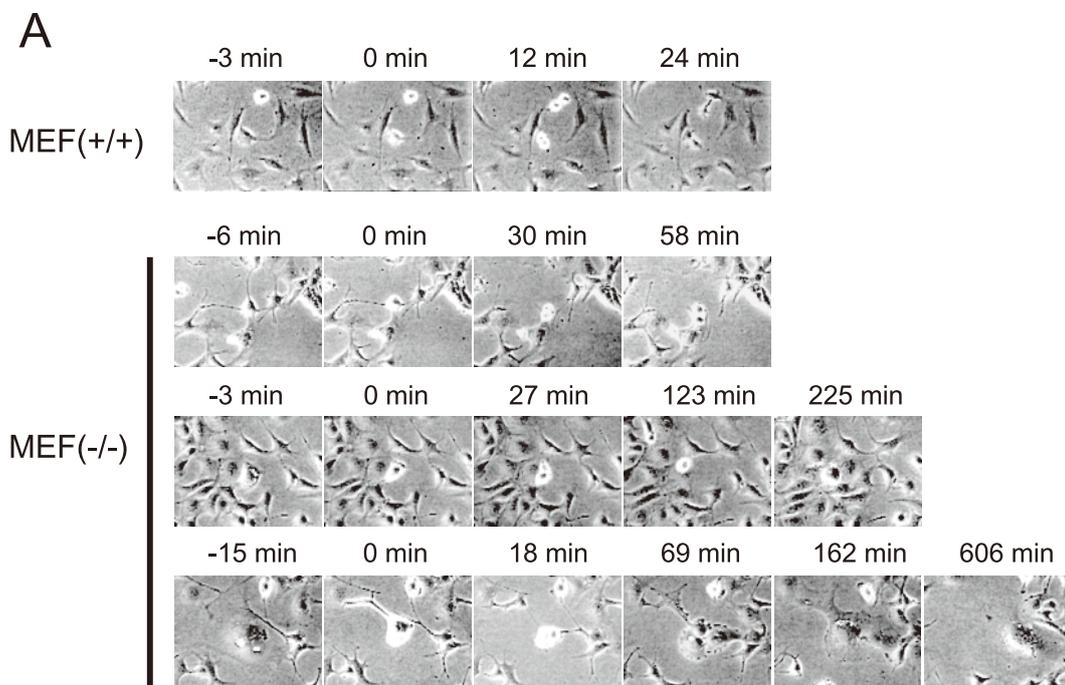


Fig.3 Apollon 欠損 MEF に見られる M 期の延長

Apollon 欠損 MEF では2つに分裂できない細胞や、1度3つに分裂した後1つに融合してしまう細胞等、細胞分裂に異常を示す細胞も多数観察された (Fig.3A)。細胞分裂の過程で、凝縮した染色体は分裂中期において赤道面上に並び、対極に位置する2つの中心体から紡錘糸が伸びてきて染色体を均等に分配する。しかし、中心体が過剰に存在すると染色体が不均一に分配され、3つ以上に分裂することがある。そこで、Apollon 欠損 MEF で中心体が過剰に存在するかどうか、 γ -tubulin の免疫染色により検討した (Fig.4A)。野生型 MEF の中心体はほぼすべての細胞が2個以下であったのに対し、Apollon 欠損 MEF では約20%の細胞で中心体が過剰複製していた (Fig.4B)。

4. 考 察

Apollon 欠損 MEF の解析から、Apollon が細胞周期 (特にM期) の制御や中心体複製の制御に重要な機能を持つことが示唆された。Apollon 欠損によるこれらの制御異常が、初代培養 Apollon 欠損 MEF に見られた早期老化の原因となっている可能性が考えられる。Apollon は UBC ドメインを持ち、Caspase 9 や SMAC のユビキチンリガーゼと

して機能することが知られている。今後、Apollon によってユビキチン化などの制御を受ける細胞周期制御因子を明らかにすることにより、Apollon による細胞老化の制御機構を解析していく予定である。

(文 献)

- 1) Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T., and Naito, M.: Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol*, 6 (9), 849-860, 2004.
- 2) Harlin, H., Reffey, S. B., Duckett, C. S., Lindsten, T., and Thompson, C. B.: Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 21 (10), 3604-3608, 2001.
- 3) Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (20), 9363-9367, 1995.

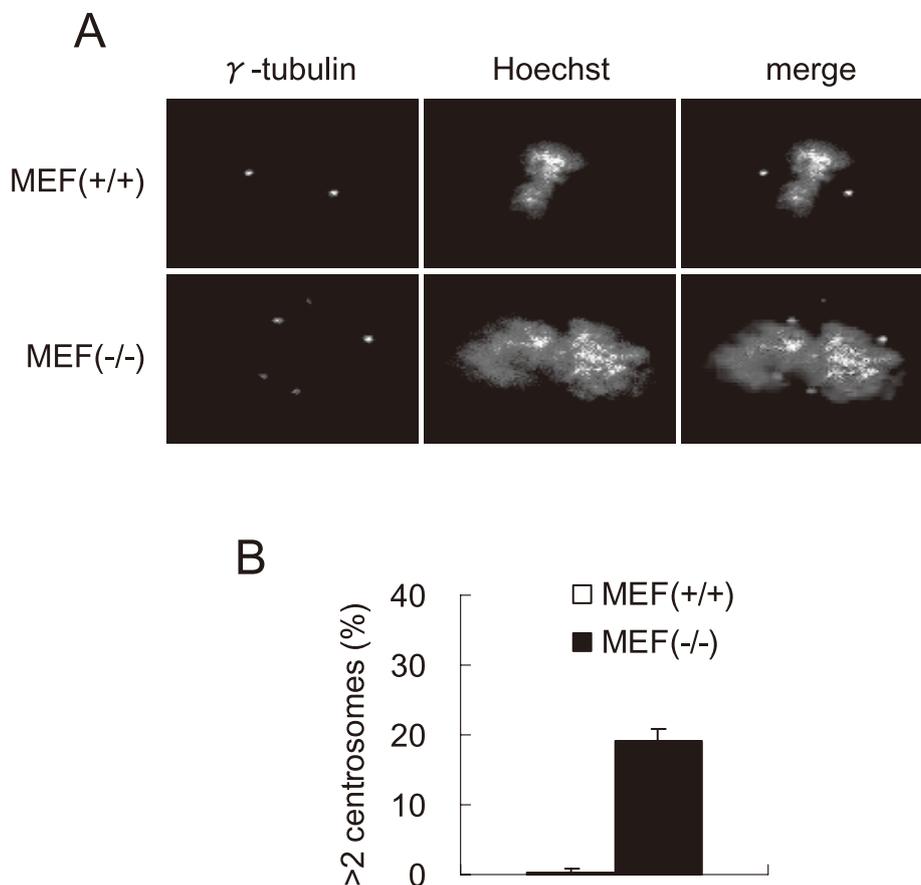


Fig.4 Apollon 欠損 MEF に見られる中心体過剰