論文審査の要旨及び担当者

報告番号	㊙ 乙 第　　号	氏　名	増　田　健　太

論文審査担当者　　主　査　産婦人科学　青　木　大　輔
産婦人科学　田　中　　守　　解剖学　松　尾　光　一
薬理学　安　井　正　人
学力確認担当者：　　審査委員長：田中　　守
試問日：平成２７年　２月１０日

（論文審査の要旨）

論文題名：LATS1 and LATS2 Phosphorylate CDC26 to Modulate Assembly of the Tetratricopeptide Repeat Subcomplex of APC/C
（LATS1, LATS2はCDC26をリン酸化し, APC/Cを構成するTPRモチーフを有する蛋白質の会合を調整する）

本研究では、癌抑制遺伝子として知られているセリン・スレオニンキナーゼであるLATS1（large tumor suppressor 1）とそのhomologであるLATS2によりリン酸化される基質としてAPC/C（anaphase promoting complex/cyclosome）の構成タンパク質の一つであるCDC26を新たに同定した。CDC26はAPC/C内においてAPC6と直接結合しており、LATS1/2によりCDC26の 7番目のスレオニン（T7）がリン酸化されることで、APC6との結合が減弱し、APC/Cの構造が変化した。CDC26のT7リン酸化によるAPC/Cの構造変化は、APC/CによるPlk1（Polo-like kinase 1）のユビキチン化を促進することで細胞周期に影響する可能性が示唆された。

審査ではまず、CDC26とAPC6との結合について、CDC26のT7をアスパラギン酸に置換したCDC26 T7Dタンパク質で結合が減弱するだけでなく、アラニンに置換したT7Aタンパク質においても若干減弱している点を指摘され、この現象はどのように考えるかと質問された。これに対し、CDC26のT7はAPC6の5つのアミノ酸の中心に位置しているという立体構造から、APC6との結合に重要なアミノ酸であると考えられ、脱リン酸化型を模倣するアラニン変異であってもAPC6との結合に影響する可能性があると回答された。この回答に対し、ゲル濾過クロマトグラフィーではCDC26 T7Aを発現する細胞においてもAPC/Cの構造が変化しているため、molecular dynamics simulationによる解析を加えてはどうかと提案された。次にCDC26のリン酸化部位について、*in vitro* kinase assayの結果CDC26の野生型と比較してT7Aではリン酸化の低下が見られるが、完全に消失していないことを指摘された。これに対し、T7はAPC6との結合において重要なリン酸化部位であるため、本研究ではT7のみの解析を行ったが、カルボシキル末端側にもリン酸化部位があることを確認しており、今後の検討すべき課題であると回答された。次に抗CDC26抗体でT7がリン酸化されたCDC26が検出されない理由についての質問がなされた。それに対し、抗CDC26抗体のエピトープがT7を含んでいるため、T7がリン酸化されると感度が低下するのではないかと回答された。さらにリン酸化抗体の特異性についての質問がなされ、それに対してはリコンビナントタンパク質、CDC26のノックダウン、フォスファターゼ処理による検討などを行って証明したと回答したが、非特異的な反応の可能性についても慎重に検討するべきであるとの指摘を受けた。次にCDC26 T7の変異体を発現する細胞を用いて解析すると、Plk1のユビキチン化の変化はあるようだが、細胞周期についての差がみられない理由について質問がなされた。それに対し、APC/Cはタンパク質の複合体であり、CDC26のT7の変異体を発現させるだけでは、複合体の形成が不完全であったためではないかと回答された。この回答に対して、今回用いているHeLa細胞以外の細胞を用いた実験を検討することなどが提案された。

以上より、本研究は今後さらに検討すべき課題が残されているが、LATS1/2がAPC/Cの構成タンパク質の一つであるCDC26をリン酸化することを見出し、そのリン酸化によってAPC/Cの構造変化をもたらすことを示した点で有意義な研究であると評価された。