

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成 15 年度採択研究代表者

佐方 功幸

(九州大学大学院理学研究院 教授)

「細胞周期/チェックポイント制御たんぱく質の構造と機能の解析」

1. 研究実施の概要

細胞周期の M 期開始および G2 チェックポイントを制御する重要な蛋白質因子の構造と機能の制御解明を目的とし、DNA 複製チェックポイントにおける Chk1 キナーゼの構造と機能制御、その標的因子 (Cdc25A) の制御、および M 期開始における Myt1 キナーゼの活性制御などについて解析を行ってきた。特に本年度は、(1) M 期開始において Polo 様キナーゼ Plx1 が Myt1 キナーゼをリン酸化・不活性化することで M 期開始因子 (Cdc2) を活性化すること、(2) G2 チェックポイントにおいて Chk1 が Cdc25A を SCF^{B-TrCP} 依存的に新規な機構で分解誘導することを明らかにした。これらの結果により、M 期開始および G2 チェックポイントにおける主要な制御蛋白質の構造と機能の制御機構の一端が明らかになった。今後は、M 期開始/G2 チェックポイントに関わる他の蛋白質、および M 期進行を制御する蛋白質の構造と機能制御の研究を進める予定である。

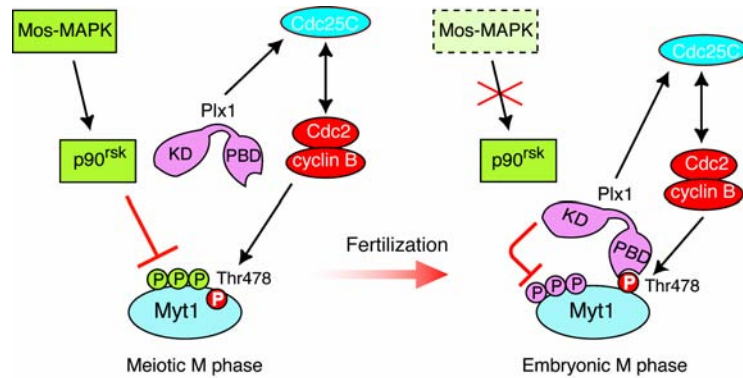
2. 研究実施内容

細胞周期の M 期開始では Myt1 (Cdc2 の抑制キナーゼ) が不活性化されることが重要であるが、その分子機構は不明である。一方、DNA 複製チェックポイントでは、Chk1 が Cdc25A の分解を介して Cdk/サイクリン複合体を阻害するとされるが、Cdc25A の分解機構には不明な点が多い。今回、ツメガエル卵を実験系として、(1) M 期開始における Myt1 の不活性化機構、(2) Chk1 による Cdc25 の分解誘導機構について、以下の結果を得た。

(1) M 期における Myt1 の不活性化機構

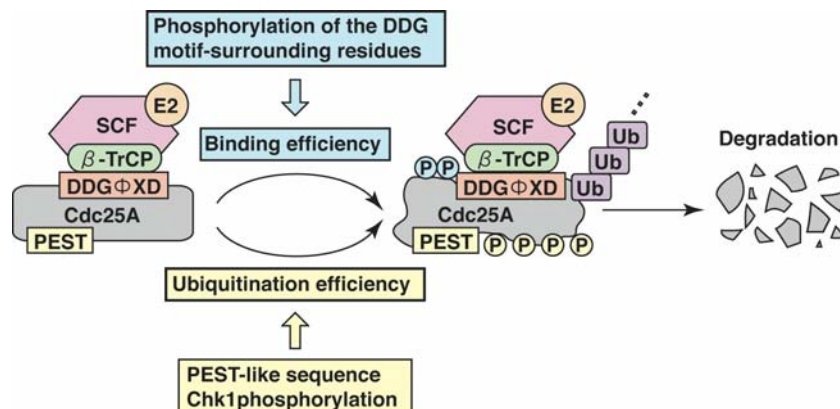
Myt1 キナーゼは Cdc2 の抑制的キナーゼであり、細胞周期の G2/M 転移で負に働く。ツメガエル卵の減数分裂においては、Mos/MAPK 下流の p90^{rsk} キナーゼが Myt1 と結合し、その活性を阻害している。しかし、p90^{rsk} は受精に伴う Mos の分解で不活性化される。本研究で、受精後には Polo 様キナーゼ Plx1 が Myt1 と結合し、その活性を阻害することを見出した。具体的には、受精後の M 期に、Cdc2 が Myt1 の Thr478 をリン酸化し Plx1 との結合を可能にすること、そして、この結合により Plx1 が Myt1 をリン酸化・不活性化することが判明した。また、卵減数分裂においても Myt1 の Thr478 はリン酸化されているが、

Myt1 と Plx1 の結合は $p90^{rsk}$ による Myt1 のリン酸化で阻害されていることが分った。以上の結果から、ツメガエル卵の受精において Myt1 の抑制キナーゼが $p90^{rsk}$ から Plx1 に切り換えられること、体細胞周期においては Plx1 が Myt1 の直接的な抑制キナーゼであることが示された（下図）。



(2) Chk1 による Cdc25A の分解誘導機構

SCF ^{β -TrCP} ユビキチンリガーゼの F-box タンパク質である β -TrCP は様々な基質中の 2 重にリン酸化された DSG モチーフ (DpSG Φ XpS) を認識する。 β -TrCP はヒト Cdc25A の DSG モチーフにも Chk1 依存的なリン酸化で結合する。しかし、ツメガエル Cdc25A は対応する位置に DSG モチーフを持っていない。本研究で、ツメガエルおよびヒト両方の Cdc25A が、 β -TrCP によって認識される、新規な非リン酸化型 DDG モチーフ (DDG Φ XD) を持つことが明らかになった。DDG モチーフはツメガエル Cdc25A の唯一の機能的 β -TrCP 結合部位であり、ヒト Cdc25A でも重要な結合部位であることが判明した。また、DDG モチーフはヒト Cdc25B を含む他種の様々なタンパク質にも存在し、それらの機能的 β -TrCP 結合部位であることが分った。更に、これらのタンパク質のユビキチン化に β -TrCP の結合のみでなく、他の領域や Chk1 などによるリン酸化が必要なが判明した。この研究で、Cdc25A の分解機構のみならず、 β -TrCP が非リン酸化型 DDG モチーフも認識することが初めて示された（下図）。



3. 研究実施体制

「佐方」グループ

- ①研究分担グループ長：佐方 功幸（九州大学、教授）
- ②研究項目：M 期開始の一部、および G2 チェックポイントの大半における細胞周期/チェックポイント蛋白質の解析

「小林」グループ

- ①研究分担グループ長：小林 英樹（九州大学、助教授）
- ②研究項目：G2/M 転移における細胞周期制御蛋白質の解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Ohno, A., Jee, J-G., Fujiwara, K., Tenno, T., Goda, N., Tochio, H., Kobayashi, H., Hiroaki, H. and Shirakawa, M.: Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with ubiquitin: Molecular determinants for ubiquitin recognition. Structure 13, 521-532 (2005).
- Inoue, D. and Sagata, N.: The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs. EMBO J. 24, 1057-1067 (2005).
- Sasaki, T., Funakoshi, M., Endicott, A. and Kobayashi, H: Budding yeast Dsk2 protein forms a homodimer via its C-terminal UBA domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 530-535 (2005).
- Kanemori, Y., Uto, K. and Sagata, N.: β -TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 6279-6284 (2005).
- Ryo, A., Togo, T., Nakai, T., Hirai, A., Nishi, M., Yamaguchi, A., Suzuki, K., Hirayasu, Y., Kobayashi, H., Perrem, K., Liou, Y-C. and Aoki, I.: The prolyl-isomerase Pin1 accumulates in the Lewy bodies of Parkinson's disease and facilitates the formation of α -synuclein inclusions. J. Biol. Chem. 281, 4117-4125 (2006).