

「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 期進行において Cdc2 が Wee1 キナーゼをリン酸化し、Pin1 との結合を促進することでその不活性化を引き起こすこと、(2) 卵減数分裂において Erp1 が合成され、サイクリン B を安定化することで第二減数分裂 M 期を引き起こすことを明らかにした。これらの結果により、M 期進行における主要な制御蛋白質の機能・構造の制御と減数分裂 M 期の進行に重要な蛋白質の機能の一端が明らかになった。今後は、M 期進行における Wee1 の構造・機能制御のより詳細な解析や減数分裂 M 期における Erp1 の構造・機能の制御などの研究を進める予定である。

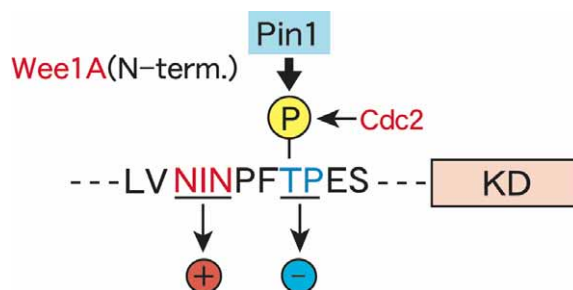
2. 研究実施内容

体細胞周期の M 期進行では Wee1 (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、卵減数分裂においては 2 回の連続した M 期が起こるが、いかにして 2 回目の M 期が誘起されるのかは不明である。今回、ツメガエル卵を実験系として、(1) 体細胞周期 M 期進行における Wee1 の不活性化機構、(2) 減数分裂の 2 回目の M 期誘起機構について、以下の結果を得た。

(1) 体細胞周期 M 期進行における Wee1 の不活性化機構の解析

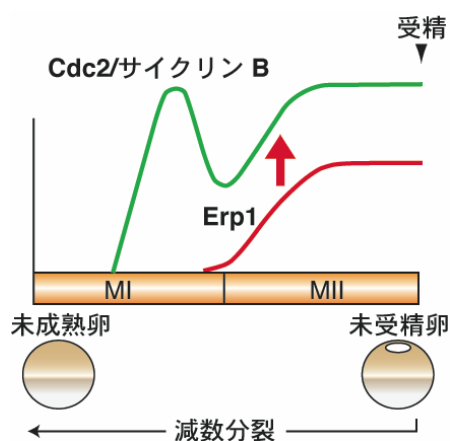
Wee1 キナーゼは Cdc2 の抑制的キナーゼであり、その活性は M 期に阻害される。しかし、その機構については永らく不明であった。本研究では、Wee1 の不活性化に関わるドメインおよびその分子機構を明らかにした。まず、Wee1 の N 末端にその活性を正に制御する小さなドメイン (Wee-box と命名) を同定した。面白いことに、Wee-box は M 期に Cdc2 によりリン酸化され、このリン酸化が Wee1 キナーゼの不活性化に必要であることが判明した。更に、このリン酸化部位にプロリンイソメラーゼ Pin1 が結合し、その異性化活性によって Wee1 が不活性化されることが判明した。また、Wee-box は様々な生物の Wee1 で保存されていることが分った。以上の結果から、Wee1 は M 期に Cdc2 によりフィードバック的に

その正の制御領域 (Wee-box) をリン酸化され、このリン酸化部位の Pin1 による異性化で Wee-box の機能が阻害され、不活性化されることが初めて示された(下図)。



(2) 卵減数分裂の2回目のM期誘起機構の解析

卵の減数分裂周期は、S 期を省略した 2 回の連続した M 期(第一減数分裂,MI:第二減数分裂,MII)からなるが、MI/MII 転移の機構は不明である。Erp1(別名 Emi2)は APC/C ユビキチンリガーゼの inhibitor であり、卵減数分裂を通じて恒常的に発現するとされている。従って、なぜ卵減数分裂が MI で停止しないのかは謎である。今回、我々は複数の Erp1 の抗体を作製し、Erp1 のツメガエル卵成熟過程における発現パターンを再検討した。その結果、従来報告と異なり、Erp1 は MI/MII 転移頃から発現を開始することが分かった。さらに Morpholino oligo を用いて、Erp1 特異的な発現阻害を行ったところ、MI/MII 転移後に Cdc2 活性が低下し、外部形態及び内部染色体・紡錘体微小管構造の異常や DNA 複製も起こり、卵は MI/MII 転移を失敗することが判明した。従って、Erp1 の発現が MI/MII 転移に必須であることが示された。また、MI 期に Erp1 を外来的に発現させると MI で停止することから、MI 期に Erp1 が無いことが MI の進行に必須であることも示された。以上の結果から、卵減数分裂における Erp1 の真の発現パターン及び MI/MII 転移での必須の役割が明らかとなった(下図)。



3. 研究実施体制

(1)「佐方」グループ

①研究者名

佐方 功幸(九州大学理学研究院 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

(2)「小林」グループ

①研究者名

小林 英紀(九州大学医学研究院 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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Tanaka K, Funakoshi M, Inoue K and Kobayashi H. Identification of two isoforms of Dsk2-related protein XDRP1 in *Xenopus* eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 768–773 (2006).
- Tanaka K, Funakoshi M and Kobayashi H. A Cdc2-sensitive interaction of the UbL domain of XDRP1S with cyclin B mediates the degradation of cyclin B in *Xenopus* egg extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 774–782 (2006).
- Ishii T, Funakoshi M, and Kobayashi H. Yeast Pth2 is a UBL domain-binding protein that participates in the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 25, 5492–5503 (2006).
- M. Ohe, D. Inoue, Y. Kanemori, and N. Sagata: Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.*, 303, 157–164 (2007).
- K. Okamoto and N. Sagata: Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase Wee1 at M phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104, 3753–3758 (2007).