

「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主な目的とし、これまで 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・進行におけるMyt1/Wee1 キナーゼの活性制御などについて解析を行ってきた。本年度は、特に卵減数分裂周期において、(1) Mos/MAPK 経路の p90rsk キナーゼが Erp1 をリン酸化することで M 期停止を引き起こすこと、(2) Cdc2とPlk1 キナーゼが CPEB をリン酸化することでその分解を引き起こすことなどを明らかにした。これらの結果により、減数分裂 M 期の進行と停止に重要な蛋白質の機能と構造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と減数分裂 M 期における Erp1 の構造・機能の制御の研究を進める予定である。

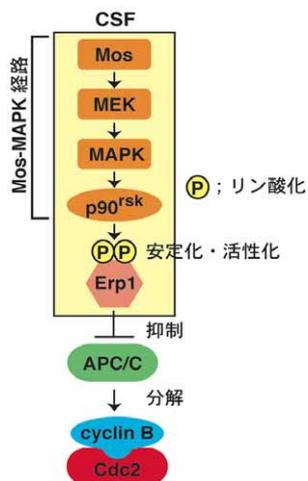
2. 研究実施内容

本年度は、以下の研究を実施し、成果を得た。

(1) 卵減数分裂周期における第二減数分裂中期の停止機構の解析

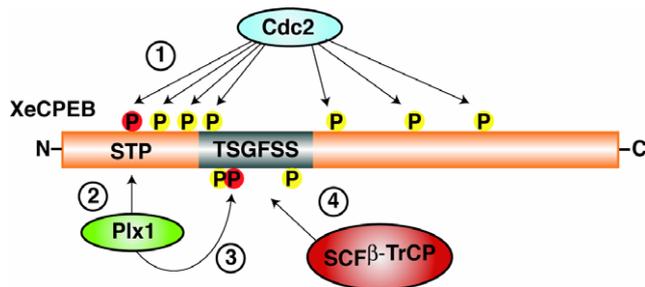
脊椎動物卵の第二減数分裂中期での分裂停止(Meta-II 停止)は、単為発生を防ぐのにきわめて重要である。Meta-II 停止では、細胞分裂抑制因子(CSF)が APC/C ユビキチンリガーゼを抑制することで、最終的にサイクリン B の分解を阻害している。これまで CSF は Mos-MAPK 経路と Erp1(別名 Emi2)という2つの要因から成るとされてきたが、それらの相互関係および最終的な CSF の実体は不明なままであった。今回我々はツメガエル卵を用いて、Mos-MAPK 経路と Erp1 が直接リンクすることで Meta-II 停止に関わることを明らかにした。まず、成熟卵で Mos-MAPK 経路を特異的に不活性化したところ、Erp1 の Meta-II 停止活性が Mos-MAPK 経路依存的であることが判明し

た。次に、in vitro および in vivo の解析から、Mos-MAPK 経路下流の p90rsk キナーゼが Erp1 の 335 番目のセリンと 336 番目のトレオニンリン酸化することを見いだした。さらに重要なことに、これらのリン酸化は Erp1 を安定化だけでなく、Erp1 の APC/C 結合活性を上げることで Meta-II 停止に必須であることが明らかとなった。以上の結果から、CSF が Mos→MEK→MAPK→p90rsk→Erp1 という一つの経路であることが明らかとなった（下図）。



(2) 卵減数分裂における CPEB の分解機構の解析

卵の減数分裂周期の進行は、母性 mRNA の翻訳により厳密に調節される。なかでも、第二減数分裂への移行に必須であるサイクリン B および Erp1 等の翻訳は、CPEB のユビキチンプロテアソーム系に依存した分解により誘導されることが知られている。しかしながら、その分子機構については永らく不明であった。本研究では、ツメガエル CPEB の分解に関わるドメイン及びその分子機構を明らかにした。まず、CPEB の N 末端に分解に関与するドメイン (TSG motif と命名) を同定した。更に、リン酸化された TSG motif に SCF (β TrCP) ユビキチンリガーゼが結合することが明らかになった。面白いことに、TSG motif は脊椎動物の CPEB ホモログ間で完全に保存されていることが判明した。また、TSG motif のキナーゼの一つとして Plx1 を同定し、実際に Plx1 の活性が CPEB の分解に必須であることが分かった。更に、CPEB と Plx1 の結合に必要なリン酸化部位およびそのキナーゼとして Cdc2 を同定した。まとめると、CPEB の分解の詳細な分子機構として、まず 1) Cdc2 が CPEB をリン酸化し、2) CPEB と Plx1 の結合を促進する、さらに 3) 結合した Plx1 が TSG motif をリン酸化し、4) リン酸化された TSG motif に SCF (β TrCP) が結合することで CPEB をユビキチン化し分解へ誘導することが明らかになった（下図）。



(3) M期サイクリンの選択的分解機構の解析

サイクリンなどのタンパク質分解の選択的調節に関わる UBL-UBA 蛋白質 (XDRP1、Rad23, Dsk2) の機能解析を行った。その結果、両生類 UBL-UBA タンパク質 (XDRP1) の解析により、UBL-UBA タンパク質とサイクリン両者の cdc2活性に依存したリン酸化が M 期のサイクリンの選択的分解において共に重要な働きを持つことを明らかにした。また、分解基質をプロテアソームに運ぶ配送の調節経路を明らかにするために、出芽酵母の分子遺伝学的解析を行った結果、UBL-UBA タンパク質 (rad23/Dsk2) と結合して Clb2, Sic1 基質分解を制御する新規因子 Pth2 (Peptidyl tRNA hydrolase 2) を見出し、配送経路における負の制御経路のしくみを明らかにした。また、細胞周期の核機能を調節する RCC1 については乳類培養細胞を用いた解析を行い、cdc2キナーゼに依存した RCC1 の N 末端リン酸化と細胞周期制御の関係について明らかにした。

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)

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・岡山大学教育開発センター)

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)

1. D. Inoue, M. Ohe, Y. Kanemori, T. Nobui, and N. Sagata: A direct link of the Mos- MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs, *Nature*, 446, 1100-1104 (2007).
2. D. Setoyama, M. Yamashita, and N. Sagata: Mechanism of degradation of CPEB during *Xenopus* oocyte maturation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18001-18006 (2007).
3. T. Sekiguchi, N. Hayashi, Y. Wang, and H. Kobayashi: Genetic evidence that Ras-like GTPases, Gtr1 and Gtr2, are involved in epigenetic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 368, 748-754 (2008).
4. Y. Horiike, H. Kobayashi, and T. Sekiguchi: Ran GTPase guanine nucleotide exchange factor RCC1 is phosphorylated on serine 11 by cdc2 kinase in vitro. *Mol. Biol. Rep.*, in press.