

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者： 佐方 功幸(九州大学大学院理学研究院 教授)

主たる共同研究者： 林 英紀(岡山大学教育開発センター 教授)(平成15年10月～)

3. 研究内容及び成果：

G2/M 転移とそのチェックポイント制御はゲノムの安定性を保証する重要な機構の 1 つであり、それらを正・負に制御する蛋白質群とそのリン酸化経路の太要が判明している。しかし、非常に意外なことに、この経路における個々の制御蛋白質の相互作用やリン酸化等による構造と機能の制御についてはよく分っていない。本研究では、主にツメガエル卵を用いて、これらの G2/M 細胞周期・チェックポイント制御蛋白質の諸素過程における構造と機能の制御機構を解明した。本研究は、G2/M 転移・チェックポイント制御の本質的理解のみならず、G2 チェックポイントを標的とした抗癌剤の開発等のためにも重要な基礎研究である。

(1) M 期開始における Myt1 キナーゼの抑制的キナーゼの同定(佐方グループ)

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。本研究では、受精後には Polo 様キナーゼ Plx1 (Plk1) が Myt1 と結合し、その活性を阻害することを見い出している。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・不活性化することを見いだした。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を明らかにした。

(2) M 期進行における Wee1 キナーゼの不活性化機構の解明(佐方グループ)

Wee1 キナーゼは Cdc2 の抑制的キナーゼであり、その活性は M 期進行に伴い阻害される。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。その 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を示した。更に、このリン酸化部位にプロリルイソメラーゼ 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を示した。また、Wee-box は様々な生物の Wee1 で保存されていることを見い出した。

(3) チェックポイントキナーゼ Chk1 の活性化機構の解明(佐方グループ)

チェックポイントキナーゼ Chk1 は、未複製 DNA に応答して ATR キナーゼを介したリン酸化・活性化を受ける。しかし、Chk1 の活性化機構の詳細は分っていない。本研究では、ツメガエル Chk1 のドメイン構造と ATR による活性化機構を解析した。まず、Chk1 の C 末端に自己抑制的領域(AIR)が存在し、これが非常に長い二極性の核移行シグナルと重複していることを見い出した。そして、ツメガエル卵に AIR と Chk1 のキナーゼドメインを共発現させると、AIR はキナーゼドメインと結合しその活性を阻害できるが、全長の Chk1 とは結合(阻害)できないことから、Chk1 分子内での相互作用により AIR がキナーゼドメインを阻害することを示した。

(4) Chk1 による Cdc25A の新規阻害機構の発見(佐方グループ)

Cdc25 ホスファターゼは、サイクリン依存性キナーゼ(Cdks)を活性化することで、細胞周期の進行を促進させる役割を持っている。脊椎動物では、DNA 傷害等に応答し、Chk1 と Chk2 が Cdc25A の N 末端領域をリ

ン酸化し、その分解を誘導する。本研究で、Chk1, Chk2 の内 Chk1 のみがツメガエル Cdc25A の C 末端 (Thr504) をリン酸化し、同ホスファターゼと様々な Cdk-サイクリンとの相互作用を阻害することを明らかにし、この阻害が Cdc25A の分解よりも早く起こり、複製チェックポイントでより必須の役割を果たすことを示した。更に、ヒトから酵母までの他の様々な Cdc25 にも Thr504 に相当する部位が存在し、これらの Chk1 によるリン酸化でも様々な Cdk-サイクリンとの相互作用が阻害されることを示した。

(5) 卵減数分裂周期における第二減数分裂中期停止の機構解明(佐方グループ)

脊椎動物卵の第二減数分裂中期での分裂停止(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、それらの相互関係は不明なままであった。本研究でツメガエル卵を用いて、Mos-MAPK 経路が直接的に Erp1 にリンクしていることを明らかにした。まず、成熟卵で Erp1 の Meta-II 停止活性が Mos-MAPK 経路依存的事であることを示した。次に、Mos-MAPK 経路下流の p90^{rsk} キナーゼが Erp1 の 335 番目のセリンと 336 番目のトレオニンをリン酸化することを見いだした。さらに、これらのリン酸化は Erp1 を安定化・活性化することで Meta-II 停止に必須であることを示した。

(6) サイクリン B-Cdc2 複合体の基質認識部位の同定(小林グループ)

サイクリン依存性キナーゼ(Cdk)は細胞周期に関わるタンパク質を選択的にリン酸化する。基質となるタンパク質はサイクリンに捕捉されたあとCdkと結合し、サイクリン-Cdk複合体のキナーゼ活性によってリン酸化を受ける。本研究では、Cdc2(Cdk1)の基質であるCdc25ホスファターゼ及びWee1/Myt1キナーゼとサイクリンB間との相互作用を担う(サイクリンBの)基質認識部位を同定した。具体的には、様々なサイクリンB変異体を用い、サイクリンBに存在するRRASK配列が共通にCdc25, Wee1, Myt1を認識するモチーフであることを明らかにした。また、RRASKモチーフがG2/M転移におけるCdc2のキナーゼ活性に必須であることを示した。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表:国際誌23件、国内誌総説等16件。口頭発表:国内28件、国際3件。ポスター発表:国内37件、国際7件。特許:なし。(平成20年12月20日現在)

citation の非常に高い Journal を中心に、質、量共に十分な発表が行なわれ、申し分ない。

特記すべき論文:

Uto, K., Inoue, D., Shimuta, K., Nakajo, N., and Sagata, N.: Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism, EMBO J. 23, 3386-3396 (2004).

G2チェックポイントにおいて、Chk1がCdc25AのC末端をリン酸化し、その基質(様々なサイクリン-Cdk複合体)との相互作用を阻害することを示した。

Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., and Sagata, N.: A direct link of the Mos- MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs, Nature, 446, 1100-1104 (2007).

脊椎動物の未受精卵において、Mos/MAPK経路下流のp90^{rsk}キナーゼがAPC/C阻害因子Erp1をリン酸化・活性化し、分裂停止を引き起こすことを示した。

特許はないが、基礎研究であり、優れた成果はいずれ応用にもつながるので、成果が上がっている限り工業所有権は短期的には期待しなくてもよい。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究では、M期におけるサイクリンB-Cdc2 複合体の制御に関わる諸タンパク質 (Myt1-Plx1、Wee1-Pin1、Chk1-ATR、Cdc25-Chk1、Erp1-Rsk) について、リン酸化部位、機能ドメイン、相互作用、活性制御等を的確に解き明かした。極めてインパクトのある成果である。細胞周期の研究は国内外で盛んに行われているが、G2/M 転移の全素過程、及び G2 チェックポイントに的を絞り、各関連たんぱく質の相互作用やリン酸化等による構造と機能の制御機構を追求した点で、ユニークであり当該分野における歴史的成果と評価されるほどであり、国内外においてトップレベルの研究を展開している。本研究グループは当該分野の中で圧倒的な存在であり、今後も世界的な牽引車の役割を果たし続けるであろう。今後特に、構造生物学を導入して原子レベルでの相互作用解析に発展することで研究に深みを増すことを期待したい。また、将来的には細胞周期を制御することで、制癌剤の開発、微生物による物質生産にも繋がり、技術的な価値が出るような発展を期待したい。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本プロジェクトに参加した研究者・学生のうち、1名が大学講師、3名が大学助教、10名が企業研究員、8名が日本学術振興会特別研究員に採用された。また、Mos/MAPK/Erp1経路の発見は、新聞各紙やNHKニュース等で報道された。

以上