

翻訳後修飾による細胞機能制御機構の解明

岸 努, 日大工・生命

【緒論】

細胞内で合成されたタンパク質の活性や機能は、修飾を受けることにより調節される。翻訳後修飾は多くの場合可逆的であるため、細胞内の調節経路や情報伝達経路のスイッチのON・OFFの制御に重要な働きをしている。このような修飾系として、リン酸化やアセチル化などの他に、ユビキチンやスモ1というタンパク質が付加されるユビキチン化、スモ1化などが知られている。

遺伝学を用いた研究から、ユビキチン化やスモ1化が、細胞周期、細胞内情報伝達、DNA複製、DNA損傷修復、発生・分化など様々な生命現象の制御に必須であることがわかってきたが、そのメカニズムは多くの場合、未解明である。その理由の一つとして、ユビキチン化あるいはスモ1化されるタンパク質の多くが未解明であることによる。

これまで、ユビキチン化あるいはスモ1化されるタンパク質を系統的スクリーニングする遺伝手法 (conditional two-hybrid システム) を、酵母細胞を用いて開発し、ユビキチン化あるいはスモ1化される新規タンパク質の同定・機能解析を用いて行ってきた(1-4)。昨年度は、同定したタンパク質のユビキチン化あるいはスモ1化の生理的意味を解明することを目的として研究を行った。

【研究経過】

1. DNA 損傷修復に関与する Ssu4 タンパク質のスモ1化機構の解明

conditional two-hybrid システムを用いたスクリーニングにより、DNAの安定性の維持とDNA

損傷修復に機能する酵母 Ssu4 がスモ1化の基質であることを見いだした。

Ssu4のスモ1化は、DNA損傷とDNA複製フォークの停止による一本鎖DNAの露出を引き起こす薬剤であるMMSの濃度に依存して増加した。一方、DNA複製フォークの停止をもたらすHUでは、Ssu4のスモ1化は減少した。したがって、Ssu4のスモ1化はDNA損傷応答に機能していることが推測される。またスモ1部位を特定したので、このリジンをアルギニンに置換した変異型 Ssu4 を発現する細胞を用いて、DNA損傷応答を調べる予定である。

2. 転写因子 Swi5 の分解による細胞周期制御機構の解明

すでに、細胞周期 G1 初期に活性化される転写因子 Swi5 がユビキチンリガーゼ SCF^{Cdc4} により G1 中期ユビキチン化・分解されること、このユビキチン化は Swi5 のリン酸化に依存すること、リン酸化部位をアラニンに置換した Swi5 はユビキチン化を受けずに安定化すること、この安定化型 Swi5 を発現する細胞は、S 期開始、染色体の分離、M 期終了のいずれもが阻害されることを明らかにした。

そこで、Swi5 の分解の時期がどのように決められているのか明らかにするために、Swi5 のユビキチン化に必要なキナーゼの同定を行った。その結果、サイクリン依存キナーゼ CDK5 のホモログである Pho85 が関与することを明らかにした(5)。Pho85 はサイクリンサブユニットと結合して活性化される。そのサイクリンは 10 種類存在し、それぞれが特異的な機能を果たすことが知ら

れている。これら 10 種類のサイクリンのうち、Pc12 と Pc19 は Swi5 に依存して転写される。そこで、Swi5 のユビキチン化が、Pc12/Pho85 あるいは Pc19/Pho85 によるフィードバック制御を受けるという作業仮説を立てて検証している。

また、安定化型 Swi5 の発現が染色体分離の阻害を引き起こす機構について調べた。ノコダゾールで M 期中期より同調培養を行いガラクトースで誘導可能な *GAL1* プロモーターより安定化型 Swi5 を発現すると染色体分離が阻害されるが、この阻害は Swi5 が転写する Sic1 の過剰発現による CDK 活性の低下に依存した。さらに、紡錘体チェックポイントを制御する *MAD2* を欠損すると染色体分離は回復した。以上のことから、CDK は紡錘体チェックポイントを制御すること、さらにこの制御に Swi5 の分解が関与することが示唆される (6)。

3. ユビキチン化を標的とした新しい薬剤スクリーニング系の開発

すでに、ユビキチンリガーゼ SCF の新規基質として、カルシウム情報伝達系の一つであるカルシニューリン・シグナリングのフィードバック阻害因子 Rcn1 を同定した。またそのヒトホモログである DSCR1 もユビキチン化されることを明らかにしている。

創薬上、DSCR1 は興味深い特性を持っている。DSCR1 は、がん細胞における血管新生の抑制や臓器移植による拒絶反応を引き起こすインターロイキン 2 の発現抑制を制御する。またダウン症の患者において DSCR1 は高発現化しており、ダウン症の患者に神経疾患をひき起こす。DSCR1 のユビキチン化は、DSCR1 が SCF ユビキチンリガーゼによって識別されることで引き起こされる。したがって、両者の結合を促進あるいは促進する薬剤は、新しい抗がん剤や免疫抑制剤あるいはダウン症

の治療薬となり得る。

このような薬剤のスクリーニングには、ユビキチンリガーゼとその基質の結合を検出・定量する系が不可欠である。そこで conditional two-hybrid を用いて DSCR1 と SCF ユビキチンリガーゼの結合を安定的に検出する系の作製を行っている。

【参考文献】

1. T. Kishi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 2007: 104, 17419-17423
2. T. Kishi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 2008: 105, 14497-17502
3. S. Mimura et al. *EMBO J.* 2009: 28, 3693-3705
4. Y. Liu et al. *Mol. Biol. Cell* 2011: 222, 1575-1584
5. H. Hayashi et al. *Genes Genet. Syst.* 2014: 89, 332
6. N. Watanabe et al. *Genes Genet. Syst.* 2014: 89, 332