

タンパク質分解系による細胞周期進行制御機構の解明

岸 努

日大工・生命

緒言

細胞の分裂は、細胞周期と呼ばれる精緻に制御された一連の過程を経て起こる。様々なタンパク質からなるネットワークによって支えられているため、その制御メカニズムは未解明な点が多い。多くのがん細胞は細胞周期制御が破綻した結果引き起こされることを鑑みると、細胞周期の未知の制御機構の解明は、生物学的にも医学的にも重要である。

細胞周期制御においてタンパク質のユビキチン化に依存した選択的分解が着目されている。特に S 期開始においては、ユビキチンリガーゼ SCF^{Cdc4} が必須の役割を果たす。このことは、何らかのタンパク質がユビキチン化・分解されることにより S 期開始が誘導されることを意味している。私たちはこれまでに、SCF^{Cdc4} によるユビキチン化・分解の標的タンパク質の一つとして G1 期に機能する遺伝子群の転写因子 Swi5 を明らかにしている。そこで本研究は S 期開始における Swi5 のユビキチン化・分解の役割を解明することを目的として開始した。その結果、Swi5 が適切にユビキチン化・分解されることが S 期開始だけでなく、G1 期の進行、染色体分離の制御にも重要であることを明らかにした (図 1)。

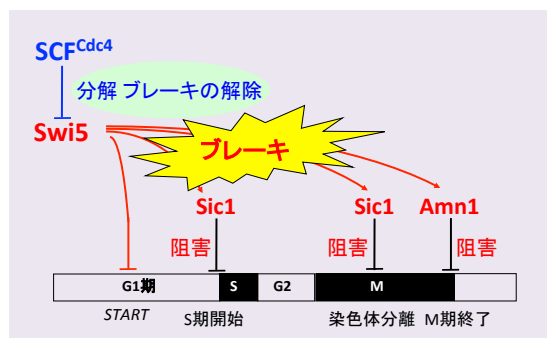


図 1 Swi5の分解による細胞周期制御

(1) S 期開始の制御における SCF^{Cdc4} の標的タンパク質は Swi5 と Sic1 である

S 期の進行は S-CDK (S 期サイクリン-サイクリン依存キナーゼ複合体) が制御する。G1 期には S-CDK の阻害因子である Sic1 が発現している。これまで S 期開始には、Sic1 が SCF^{Cdc4} によってユビキチン化・分解されることが必須であると考えられてきた。しかし近年、酵母およびヒトの系において、Sic1 (ヒトでは p27) の分解は必ずしも必須ではないことが報告されている。すなわち、ユビキチン化に必須のリン酸化部位をアラニン置換することにより安定化した Sic1-9P0 を発現する細胞は、G1 期が長くなるものの S 期を開始することができる。私たちが同定した SCF^{Cdc4} の標的タンパク質である Swi5 は Sic1 の転写因子であるので、S 期開始の制御における SCF^{Cdc4} の標的タンパク質は Swi5 と Sic1 であるという作業仮説を立て検証した。

まず SCF^{Cdc4} によるユビキチン化・分解を受けずに安定化する安定化型 Swi5-ST12A を作製した。具体的には、Swi5 のリン酸化がユビキチン化に必須であるので、12ヶ所のリン酸化部位をアラニンに置換した。実際にこの Swi5-ST12A が安定化することを確認した。染色体上の SWI5 を SWI5-ST12A に置き換えた SWI5-ST12A 株は S 期を開始することはできたが G1 期が著しく長くなった。さらに SWI5-ST12A と SIC1-9P0 を内在性プロモーターから発現する細胞は致死となった。以上の結果は、S 期開始を適切に行うには SCF^{Cdc4} による Swi5 と Sic1 の二つのタンパク質のユビキチン化・分解することが必須であ

ること、一方のみがユビキチン化・分解される場合には S 期を開始することはできるが著しく遅延することを示している。すなわち、S 期開始の制御において SCF^{Cdc4} による Sic1 の量的制御が必須であること、そしてこの制御は、まず第一に Swi5 の分解を介した Sic1 の発現調節と、第二に Sic1 の分解の二つで行なわれていることを明らかにした (図2)。

次に Swi5 のユビキチン化・分解がどのようにプログラムされているか検討した。Sic1 のユビキチン化・分解が G1 後期に行われるのに対して Swi5 の分解は G1 初期に行われるので、Swi5 と Sic1 のユビキチン化・分解を誘導するシグナルは別のはずである。実際 Sic1 ユビキチン化・分解に必要な G1/S サイクリンは、Swi5 のユビキチン化・分解に関与しないことを確認した。そこで Swi5 のユビキチン化・分解に必要なキナーゼのスクリーニングを行なった。Swi5 はリン酸化部位が多いため、リン酸化部位とキナーゼの対応関係を電気泳動における泳動度で見出すことは困難であった。そこで GFP を融合した Swi5 (Swi5-GFP) の安定性を野生株とキナーゼ欠損株を用いて比較した。

蛍光顕微鏡を用いて Swi5-GFP が核に移行してから分解消失するまでをタイムラプス観察した結果、野生株における半減期は約 5 分であった。次に酵母キナーゼの破壊株コレクションを用いて、それぞれの株における Swi5-GFP の半減期を測定した。その結果、3種のキナーゼ破壊株において半減期が野生株と比べて長くなった。そのうちの 하나가 CDK の一つである *PHO85* であった。Pho85 のサイクリンサブユニットである Pcl2 と Pcl9 の破壊株でも Swi5-GFP は安定化した。したがって、核に移行した Swi5 をフィードバックにより分解するプログラムが存在する

ことがわかった。しかし *pho85* 欠損株における Swi5 の安定化は Swi5-ST12A に及ばなかった。したがって、Swi5 の分解は複数のシグナルによって調節されていることが示唆される (図2)。この点において、スクリーニングで同定した他の二つのキナーゼの関与とその生理的な意味の解明が重要である。

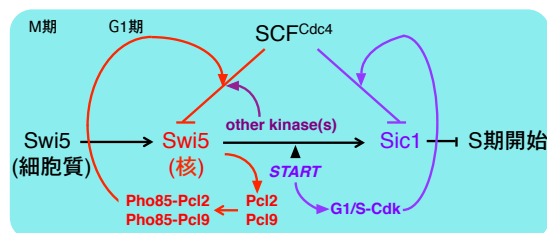


図2 S期開始を制御する2つの調節回路

(2) Swi5 の分解の S 期開始制御以外の役割

(2-1) Swi5 の分解による G1 期の進行制御

細胞分裂を終えた G1 期の細胞が新しい細胞周期に入るためには細胞の大きさが閾値に達しているかチェックする *START* と呼ばれる制御ポイントを通過しなければならない。*START* を通過すると新しい細胞周期に入り出芽を開始する。Swi5-ST12A-GFP を用いて細胞周期マーカー遺伝子の発現を調べたところ、Swi5 の分解が出芽開始の制御に関与することを見出した。

出芽酵母では、娘細胞は母細胞より出芽開始が遅れる。これは出芽酵母が不等分裂を行い、分裂により生じた娘細胞は母細胞より小さいためである。Swi5-ST12A を発現する細胞で出芽開始において以下の異常を観察した。出芽開始は母細胞と娘細胞ともに著しく遅延した。この時、娘細胞は母細胞とほぼ同時に出芽を開始し、いずれも Swi5-ST12A-GFP の消失に依存した。以上の結果は、出芽形成開始に Swi5 が適切に分解されることが重要であることを示している。Swi5 が

STARTの活性化を阻害する可能性と出芽形成を直接阻害する可能性の二つが考えられる。どちらの可能性が正しいかについては、STARTを直接活性化するG1サイクリンおよびG1/Sサイクリンの発現が*SWI5-ST12A*株において阻害されているか調べることによって判定できる。もしSwi5がSTART通過を阻害するのであれば、ヒトにおけるSwi5の分解は新しい抗がん剤の標的となり得る。

(2-2) Swi5の分解による染色体分離の制御

染色体の分離を正確に遂行するためには全ての染色体が染色体分配装置である紡錘体と結合することが必須である。この結合を監視するのが紡錘体チェックポイントである。Swi5の活性を厳密にコントロールすることができない細胞は、紡錘体チェックポイントが活性化状態となり、染色体分離が阻害されることを見出した(図3)。

まずSwi5の細胞質局在に必要な3箇所のセリン・スレオニン残基をアラニンに置換することによって細胞周期に依らず安定化型Swi5を核に局在するSwi5-NLST8Aを作製した。

間接蛍光法を用いて核と紡錘体を構成するチューブリンを観察したところ、M期にSwi5-NLST8Aを強制発現すると染色体分離が阻害された。この阻害は紡錘体チェックポイントに依存した。*sic1*破壊株およびM期サイクリンを過剰発現する細胞では染色体分離の阻害は観察されなかった。これまでM期の進行にM-CDKが必須であることがわかっていたが、M-CDKの一つの機能として染色体分離を制御することを本研究で明らかにした。そして核移行とユビキチン化・分解によるSwi5の活性制御はM-CDKが適切に活性化するために重要であることを明らかにした。

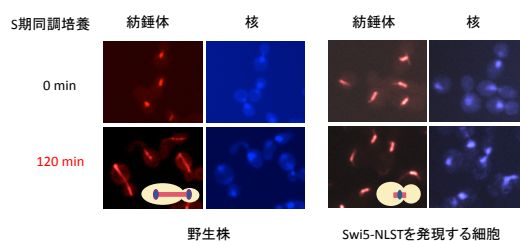


図3 Swi5の分解は染色体分離に重要である

M-CDKが紡錘体チェックポイントを介して染色体分離を制御する仕組みについては今後の課題である。染色体と紡錘体の結合が正常に起きるためにはM-CDK活性が必要であるか、あるいは一度活性化した紡錘体チェックポイントを解除することができないかの二つの可能性が考えられる。

考察

Swi5の分解が、G1期、S期開始、染色体分離を適切に遂行するために重要であることがわかった。また、すでにSwi5の分解が、M期終了を制御するMEN経路(Mitotic Exit Network)の阻害因子でSwi5に依存して転写されるAmn1の発現抑制を介してM期終了を制御することを明らかにしている。したがってSwi5は、G1期に細胞周期の進行にブレーキをかけることによりG1期を安定に維持する役割を果たしていると考えられる(図1)。新しい細胞周期の進行のためにそのブレーキを解除するのがSCF^{Cdc4}に依存したSwi5の分解であると言える。

本研究を行う過程で、酵母で遺伝子破壊やエピトープタグgingの際に用いる新しいリソースを開発した。これについては以下の論文で発表した。

K. Nihei and T. Kishi: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **64**, 99-102 (2018)

M. Nonaka and T. Kishi: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **63**, 199-202 (2017)