



Active agingを支援するバイオメディカル工学の研究拠点
—福島県の震災復興に貢献する医工連携研究—

タンパク質分解系による 細胞機能制御機構の解明

研究背景と目的

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、現在でも細胞周期進行の制御メカニズムはあまりよくわかっていない。分子遺伝学研究室では、細胞周期を制御する未知のネットワークの解明を目的として研究を行なっている。Swi5というタンパク質が適切な時期に分解されることが、S期の開始、染色体の分離、M期の終了に重要であること、すなわちSwi5を中核としたフィードフォワード制御が機能していることを明らかにした。

実験方法

細胞周期の進行に、タンパク質の分解を誘導するCdc4というタンパク質が必須であることが知られている。しかしCdc4によって分解されることが重要なタンパク質はよくわかっていない。私たちは、Cdc4の標的タンパク質を明らかにし、その分解の持つ生理機能を解明するという方針で研究を進めてきた。分解の標的タンパク質の同定には、遺伝学研究室で開発した独自の的方法論を用いた。新しくG1期関連因子の転写因子でG1初期に活性化されるSwi5を標的タンパク質として同定した。

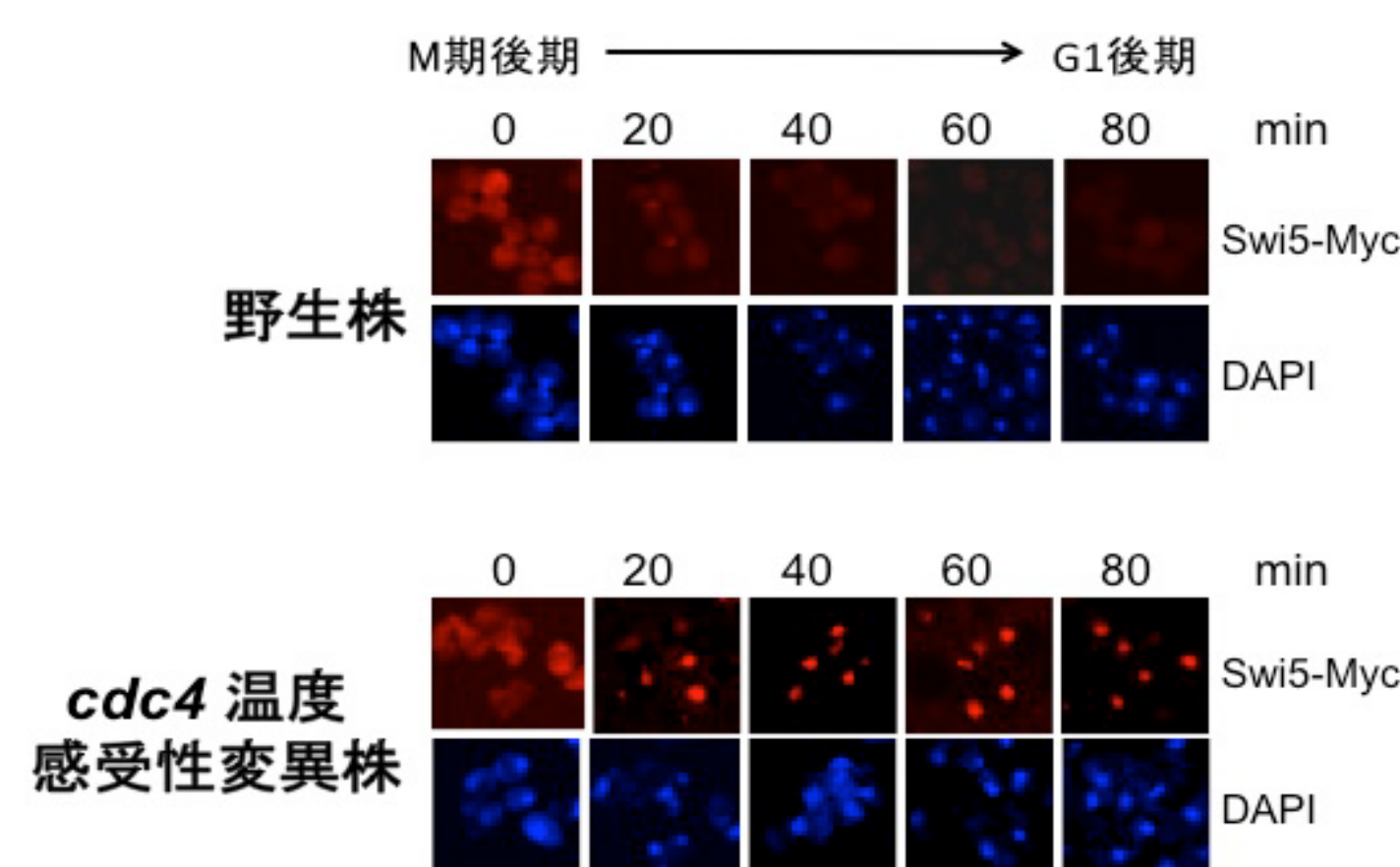


図1 Swi5はCdc4に依存して急速に分解される

Cdc4は標的タンパク質と結合するが、Cdc4自身が標的タンパク質を分解へと導くために、両者の結合を検出するのは極めて困難であった。そこで標的タンパク質を安定化する遺伝学的手法とタンパク質間相互作用の同定によく用いられるtwo-hybridシステムを組み合わせた新しい方法を開発した。この方法で標的タンパク質としてSwi5を同定した。蛍光顕微鏡を用いてSwi5の挙動を観察したところ、野生株ではSwi5(赤)は急速に分解されるが、Cdc4の温度感受性変異株では制限温度において核(青)に蓄積することがわかった(図1)。

成果1 | Cdc4によるSwi5の分解はS期開始、染色体の分離、M期の終了の制御に重要である

安定化型Swi5を発現する細胞を用いた研究から、G1期を安定に維持するための制御機構を発見した。安定化型Swi5の発現は、S期開始、染色体の分離、M期の終了を阻害した。なぜSwi5を分解できないと細胞周期の進行に異常を生じるのだろうか。Swi5の安定化により、Sic1 (S期開始と染色体分離を阻害) とAmn1 (M期終了を阻害) が過剰に発現することが原因であることを明らかにした。この結果は、Swi5はSic1やAmn1の発現を通してG1期を安定に維持していることを示唆している。

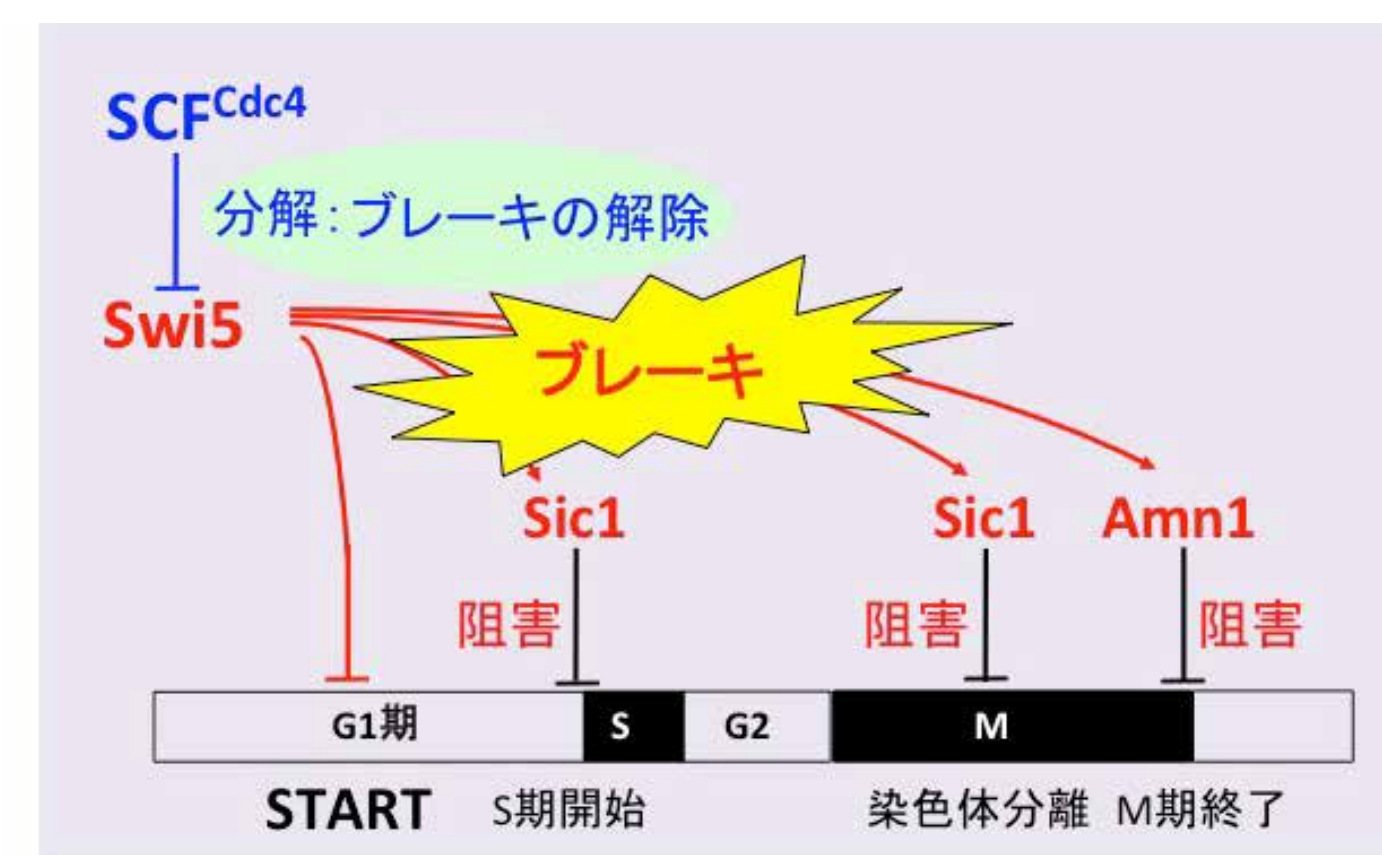


図2 Swi5とCdc4によるG1期の維持機構

私たちの考えをモデルとして示したのが図2である。転写因子であるSwi5はG1初期にSic1とAmn1の発現を誘導する。これらの因子はS期開始や染色体分離、M期終了(細胞分裂)を阻害するタンパク質である。いわば、Swi5はG1期に細胞周期が無秩序に進行しないようにSic1とAmn1を用いてブレーキをかけている。Swi5を適切に分解できない細胞では、ブレーキがかりすぎているため、細胞周期の進行が阻害される。

成果2 | Swi5の分解による染色体分離の制御

Swi5を分解できない細胞で染色体分離が阻害される理由を解明した。Swi5の安定化によりSic1が過剰発現することがわかった。このSic1の過剰発現が、染色体の分離を制御するM-Cdkの活性を低下させていることを突き止めた。さらにこの時、染色体の分離に必要な紡錘体と染色体との結合を監視するチェックポイント機構が活性化した。以上のことからM-Cdkが染色体と紡錘体の結合に必須であることを発見した。

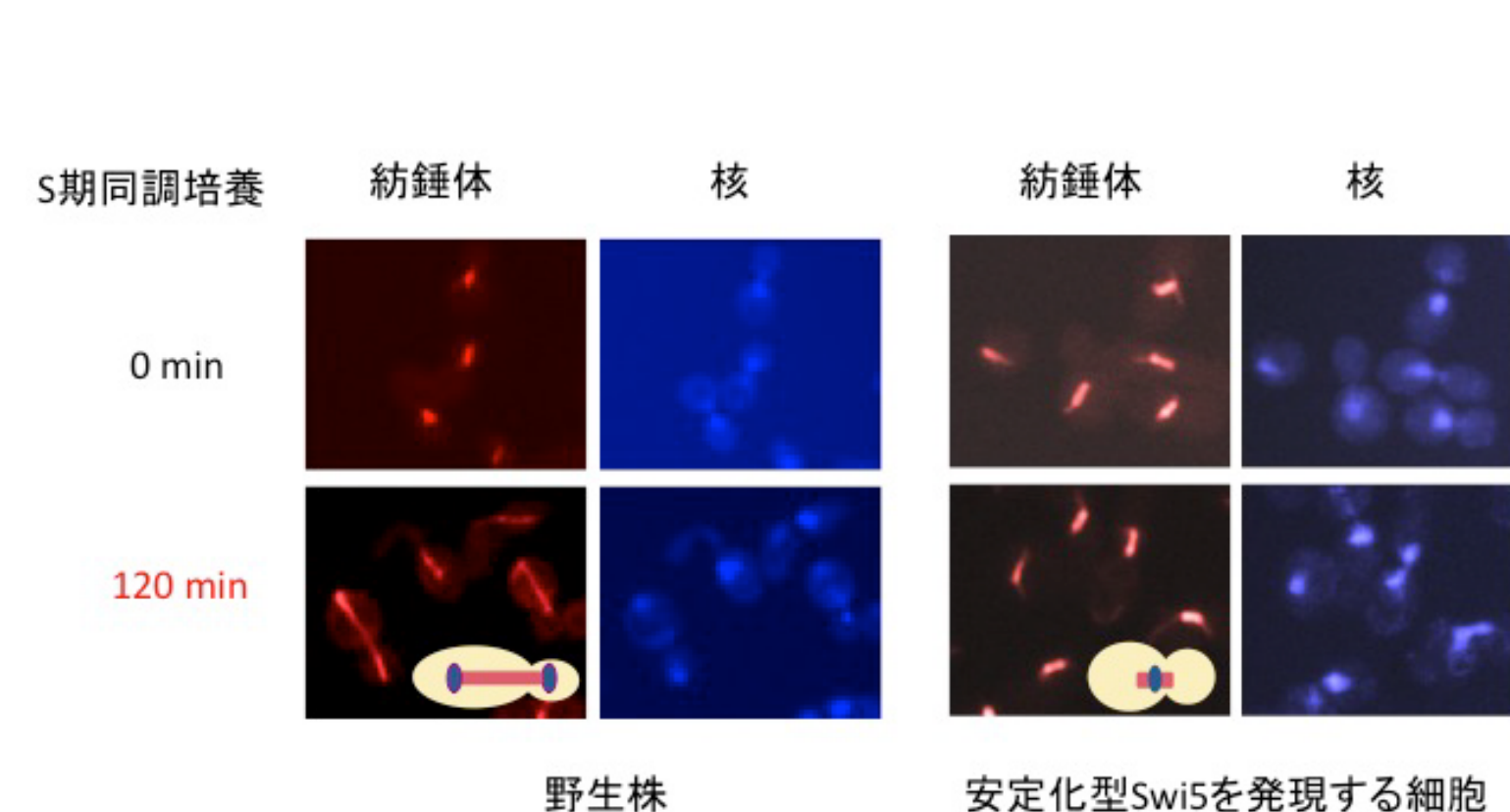


図3 Swi5の分解は染色体分離に重要である

S期より同調培養を行い、安定化型Swi5を発現する細胞で染色体分離が阻害されることを見出した。図3で紡錘体を赤く、核を青く染色した。S期同調培養開始時では紡錘体は短いままで、染色体の分離が起きていないことを示している。S期同調培養120分後、野生株では紡錘体は伸長した。これは染色体が分離したことを意味する。これに対して安定化型Swi5を発現する細胞では紡錘体は短いままで染色体の分離が阻害されている。

成果3 | Swi5を分解できない細胞では染色体と紡錘体の誤った結合を修正できない

安定化型Swi5を発現する細胞で、人為的にチェックポイントを解除して染色体分配を強制的に行かせたところ、二つの姉妹染色分体が両方とも一方の極に移動することを発見した。対になっている姉妹染色分体の両方に同じ極から形成された紡錘体が結合し、修正されなかったためと考えられる。すなわち、染色体と紡錘体の誤った結合を修正するのにSwi5の分解(すなわちM-Cdkの活性化)が必須であることがわかった。

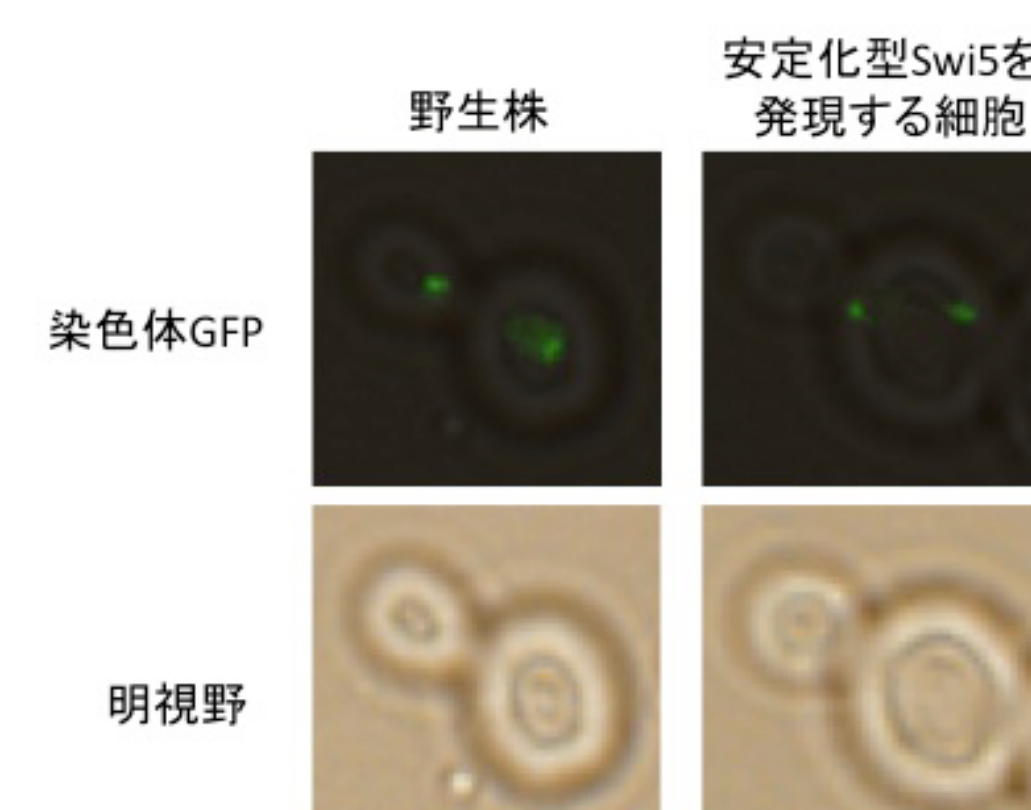


図4 Swi5を分解できない細胞では染色体と紡錘体の誤った結合を修正できない

染色体が正常に分配されるためには、姉妹染色分体のそれぞれが別の極から形成された紡錘体と結合する必要がある。誤って結合した場合にはすぐに修正される。GFPを用いて染色体を可視化する実験系を用いて、安定化型Swi5を発現する細胞で染色体分配を強制的に行かせたところ、図4のように姉妹染色分体が両方とも母細胞または娘細胞に分配された細胞が観察された。このことはSwi5を分解できない細胞が染色体と紡錘体の誤った結合を修正できないことを示している。