

2004年3月23日
独立行政法人 理化学研究所

未知の細胞分裂制御メカニズムを解明

- 新タイプの制がん剤開発に道 -

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、細胞分裂の準備が出来るまで分裂を止めておく仕組みの一端を分子レベルで解明しました。中央研究所抗生物質研究室の渡辺信元・前任研究員、長田裕之主任研究員らの研究グループによる研究成果です。

細胞分裂にはMPF(M-phase promoting factor; 細胞分裂促進因子)と呼ばれるタンパク質をリン酸化する酵素が中心的な役割を担っています。細胞分裂開始の準備が整うまでMPFは、Wee1というリン酸化酵素によって不活性化されています。染色体の複製完了など分裂の準備が整うとMPFの活性化が起こりますが、そのメカニズムは明らかにされていませんでした。今回、研究チームは、Wee1の不活性化に関与する分子群としてタンパク質分解に関わる一連の因子(SCFb-TrCP; b-TrCPをFボックスタンパク質として含むSCF複合体型ユビキチンリガーゼ)を同定しました。細胞分裂の開始時に活性化し始めたMPFは、他のリン酸化酵素とともにWee1をリン酸化し、Wee1を不要なタンパク質として目印を付けて、分解する経路の引き金となっていました。MPFは自身を抑えるWee1が減少することで、より活性化し、さらにWee1を分解させることが可能になります。このようなフィードバック機構は細胞分裂開始時におけるMPFの急速な活性化を可能にするメカニズムとして古くから想定されていましたが、今回の発見はその存在を分子レベルで証明した世界初の研究成果です。

がん治療には細胞分裂のいろいろなステップを抑える薬剤が、がん細胞の異常な増殖を抑えるために使われています。今回の成果を応用し、Wee1の分解を抑える薬剤を開発できれば、これまで全く無かった新しいタイプの制がん剤の開発へつながるものと期待されます。

本研究成果は、東邦大学理学部、米国ソーク研究所との共同研究によるもので、米国科学アカデミー紀要『Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America : PNAS』のウェブサイト (<http://www.pnas.org>、3月22日付け、日本時間3月23日) に発表され、3月30日号に掲載されます。

1. 背景

1つの細胞が2つになる時、すなわち細胞分裂の開始時には遺伝情報が記録されている染色体が正しく倍加されているなど、その準備が完全でなければなりません。さもないと2つになった細胞がそれぞれ生きていけないからです。細胞分裂開始時に中心的な役割を持つMPF(分裂促進因子;サイクリンBとCdc2の複合体)は、この準備が整うまで不活性化されています。Wee1というタンパク質リン酸化酵素が、MPFの構成成分であるCdc2をリン酸化することで、この不活性化を行っています(図1)。

細胞分裂の準備が整うと、Cdc25という脱リン酸化酵素によって、Cdc2は脱リン酸化され活性化します。この時、Wee1が不活性化されることがMPFの急速な活性化に必要ですが、その仕組みは明らかではありませんでした。

2. 研究手法と成果

研究チームはすでに、細胞分裂期に Wee1 がタンパク質分解によって不活性化されることを示してきました。その後、我々を含むいくつかのグループは Wee1 がユビキチン化・プロテアソーム依存分解系^{*1} (図 2) という生体内のタンパク質が分解されるのによく利用されるシステムで分解されることを明らかにしてきました。

今回、Wee1 が細胞分裂期に分解されるのに先立ちリン酸化されることに注目しました。リン酸化されたタンパク質を目印に結合し、ユビキチン化する SCF 複合体型ユビキチンリガーゼ (図 3) が生体内の重要な制御に関わっていることが明らかになってきていたからです。実際、出芽酵母 (パン酵母) で予備的な実験を行ったところ、酵母内に導入したヒト Wee1 の分解が SCF 複合体型ユビキチンリガーゼの変異酵母株では起こりませんでした。

この結果から、ヒト細胞中でも SCF 複合体型ユビキチンリガーゼが Wee1 の分解に関わっていると考えました。図 3 に示しましたように、SCF 複合体型ユビキチンリガーゼではその構成成分の F ボックスタンパク質^{*2} が標的タンパク質を認識し結合します。そこで Wee1 に結合すると考えられる F ボックスタンパク質の候補を遺伝子データベース配列情報から予想し実験を行ったところ、 β -TrCP という F ボックスタンパク質が Wee1 に結合すること、 β -TrCP を含む SCF 複合体型ユビキチンリガーゼが Wee1 をユビキチン化出来ることを見いだしました。

β -TrCP はタンパク質のリン酸化を認識し結合します。われわれは Wee1 中のアミノ酸配列の中で β -TrCP の結合に必要なリン酸化部位の解析を行い、53 位と 123 位のセリンがリン酸化されることが結合に必要で、53 位のセリンは細胞分裂開始時に活性化される Plk1 (Polo like kinase 1; ポロ様キナーゼ, ショウジョウバエの Polo という名前のタンパク質リン酸化酵素と類似の配列を持つヒトのリン酸化酵素のひとつ) というリン酸化酵素、123 位のセリンは MPF そのものによってリン酸化されることを見いだしました。すなわち Wee1 はこれらの 2 つの酵素によってリン酸化されることで β -TrCP に結合することが可能になり、ユビキチン化され分解されることが明らかになりました (図 3)。

また、これらのセリンをリン酸化されないアミノ酸と置き換えた Wee1 は細胞内で安定になること、 β -TrCP を干渉 RNA 法^{*3} で阻害すると Wee1 が安定化することなど、細胞中で Wee1 のリン酸化と β -TrCP 結合が Wee1 の安定性に関わっていることも確認しました。さらに Wee1 が安定化すると細胞分裂期の開始も遅れることからこの Wee1 の分解が細胞分裂開始にとっても大事な役割をしていることを証明しました。

3. まとめと今後の展開

細胞分裂開始時には MPF は Cdc25 によって脱リン酸化され活性化します。活性化した MPF が逆に Cdc25 をリン酸化し活性化し安定化するという正のフィードバックループ (図 4; 陽) は MPF の急速な活性化を引き起こします。Plk1 がこのようなループの引き金になるリン酸化を起こすことも示されていました。

今回の成果は、MPF を不活性化する Wee1 分子上に MPF が「リン酸化による分解シグナル」を形成するという負のフィードバック (図 4; 陰) が存在することを証明したものです。このようなフィードバックも MPF の急速な活性化に重要でその

存在が予想されていましたが、その実体はこれまで不明でした。また正のフィードバックを開始する Plk1 は、負のフィードバックも「リン酸化による分解シグナル」を形成することで開始します。Plk1 は細胞分裂の準備が出来たことを監視する機能の制御を受けていることが知られており、分裂の準備から MPF の活性化の間で重要な機能を担っています。

がん治療には細胞分裂のいろいろなステップを抑える薬剤が、がん細胞の異常な増殖を抑えるために使われています。特に細胞分裂に中心的役割を持つ MPF の活性、MPF を活性化する脱リン酸化酵素 Cdc25 の活性を阻害する様な薬剤は、有力な抗がん剤として研究開発が進められています。今回の成果を応用し、Wee1 の分解を抑える薬剤を開発できれば、やはりがん細胞の増殖を抑えることが予想され、これまで全く無かった新しいタイプの抗がん剤の開発へつながるものと期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所
中央研究所 抗生物質研究室

前任研究員 渡辺 信元

Tel : 048-462-1111

(代表)

主任研究員 長田 裕之

Tel : 048-467-9541 / Fax : 048-462-4669

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ユビキチン化・プロテアソーム依存分解系

ユビキチンとは 76 アミノ酸からなるタンパク質で、E1, E2, E3 という 3 種の酵素による一連の反応でユビキチンの C 末端のグリシンが標的タンパク質のリジンに共有結合する。ユビキチンはユビキチン内のリジンにも共有結合するのでユビキチンの連なったポリユビキチン鎖が標的タンパク質に結合することになる。ポリユビキチンは不要になったタンパク質に付けられた目印となり、ポリユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームという細胞内の巨大なタンパク質分解酵素複合体に運ばれて分解される。この経路で E3 は標的タンパク質を認識しユビキチン化する最終決定を行う。すなわちタンパク質の運命を決定するという重要な役割をする。

※2 F ボックスタンパク質

F ボックスという共通の機能ドメインを持つタンパク質群の総称。SCF 複合体型ユビキチンリガーゼ中で標的タンパク質を認識する役割を持つ構成成分である。F ボックス領域とは SCF 複合体中で SKP1 との結合に必要な領域で、サイクリン F に相同性があることからこのように名付けられた。ヒトでは約 60 種類の F ボックスタンパク質が知られユビキチン化する標的タンパク質の多様性に対応していると考えられるが、未だ標的が明らかになっていない F ボックスタンパク質がほとんどである。

※3 干渉 RNA 法

特定の遺伝子配列の一部 (21 塩基程度) の 2 本鎖 RNA (small-interfering RNA (siRNA)) を細胞に導入することで、その遺伝子 mRNA からのタンパク質合成を阻害する方法。数年前に開発された方法で、細胞内の特定のタンパク質を特異的に減少させることができるので、特定のタンパク質の機能を調べるのに広く使われている。

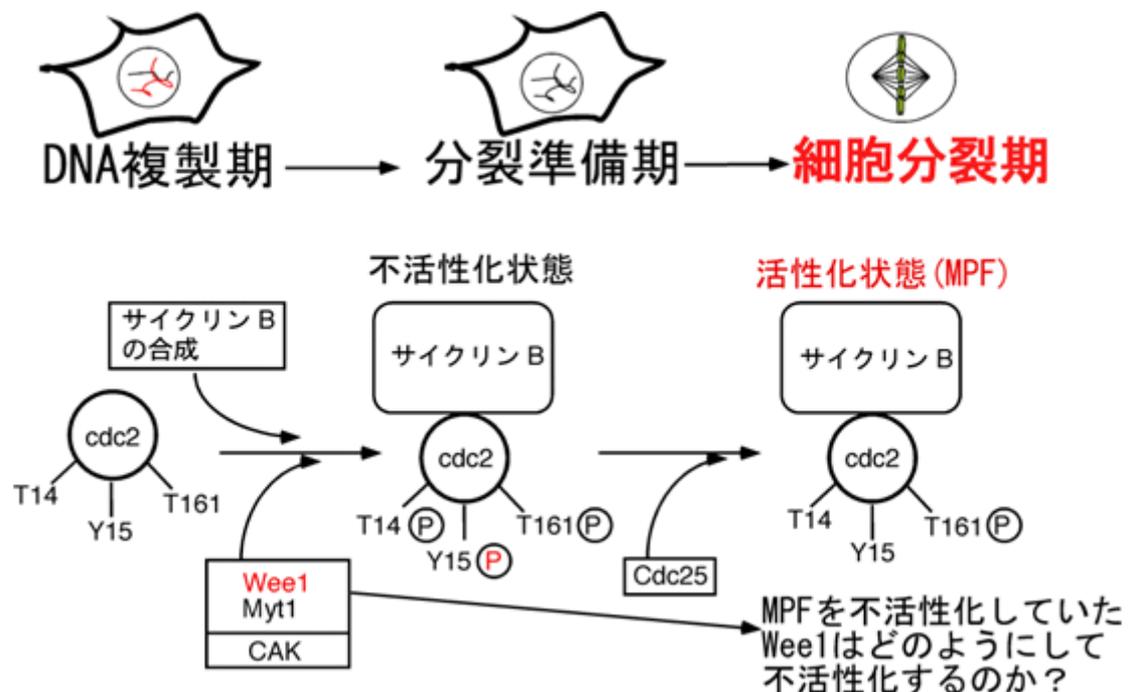


図1 細胞分裂に重要な役割を持つMPF(サイクリンB, Cdc2複合体)の細胞分裂開始時における活性調節機構

MPFは細胞分裂開始の準備ができるまでリン酸化によって不活性化されている。Wee1はこのリン酸化を行うリン酸化酵素である。細胞分裂開始時には、Wee1が不活性化されることがMPFの急速な活性化にとって必要である。今回、その経路に関するタンパク質分解経路に関連した因子群とその作用メカニズムを明らかにした。

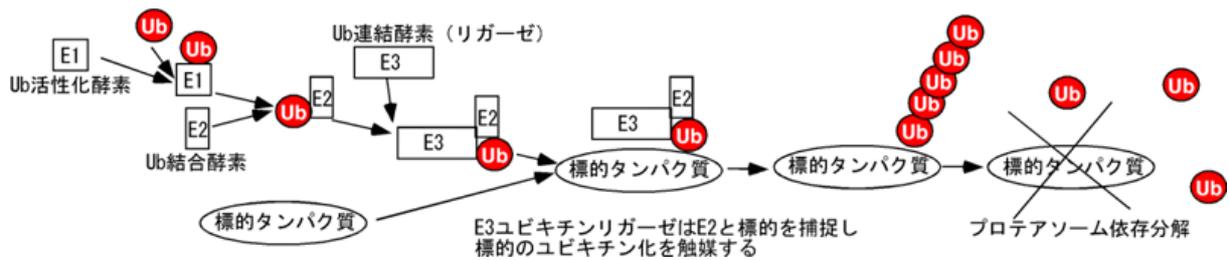
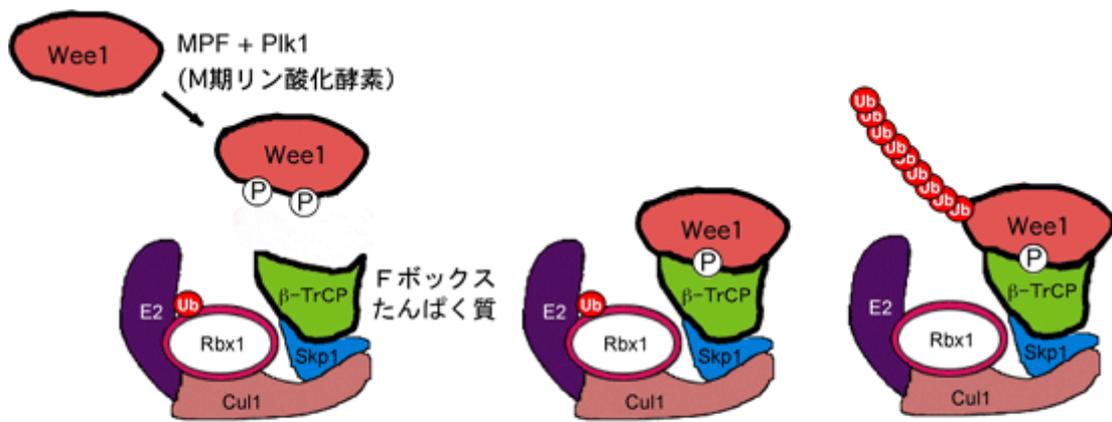


図2 タンパク質のユビキチン化・プロテアソーム依存分解経路

ユビキチンとは 76 アミノ酸からなるタンパク質で、E1, E2, E3 という 3 種の酵素による一連の反応でユビキチンの C 末端のグリシンが標的タンパク質のリジンに共有結合する。ユビキチンはユビキチン内のリジンにも共有結合するのでユビキチンの連なったポリユビキチン鎖が標的タンパク質に結合することになる。ポリユビキチンは不要になったタンパク質に付けられた目印となり、ポリユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームという細胞内の巨大なタンパク質分解酵素複合体に運ばれて分解される。この経路で E3 は標的タンパク質を認識しユビキチン化する最終決定を行う。すなわちタンパク質の運命を決定するという重要な役割をする。



SCF複合体型ユビキチンリガーゼ
 Skp1: F ボックスタンパク質とCul1の結合
 Cul1: E2-ユビキチン複合体を捕捉
 F ボックスタンパク質: ユビキチン化する標的タンパク質を認識・結合

図3 Wee1 は、MPF と Plk1 という細胞分裂期に活性化するリン酸化酵素でリン酸化されると、 β -TrCP という F-ボックスタンパク質を含む SCF 複合体型 E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化される。

Wee1 を認識する F-ボックスタンパク質として β -TrCP を見いだした。さらに β -TrCP との結合に必要な Wee1 中のリン酸化部位を決定した。このリン酸化は細胞分裂開始時に活性化する MPF と Plk1 というリン酸化酵素によって行われることも明らかになった。

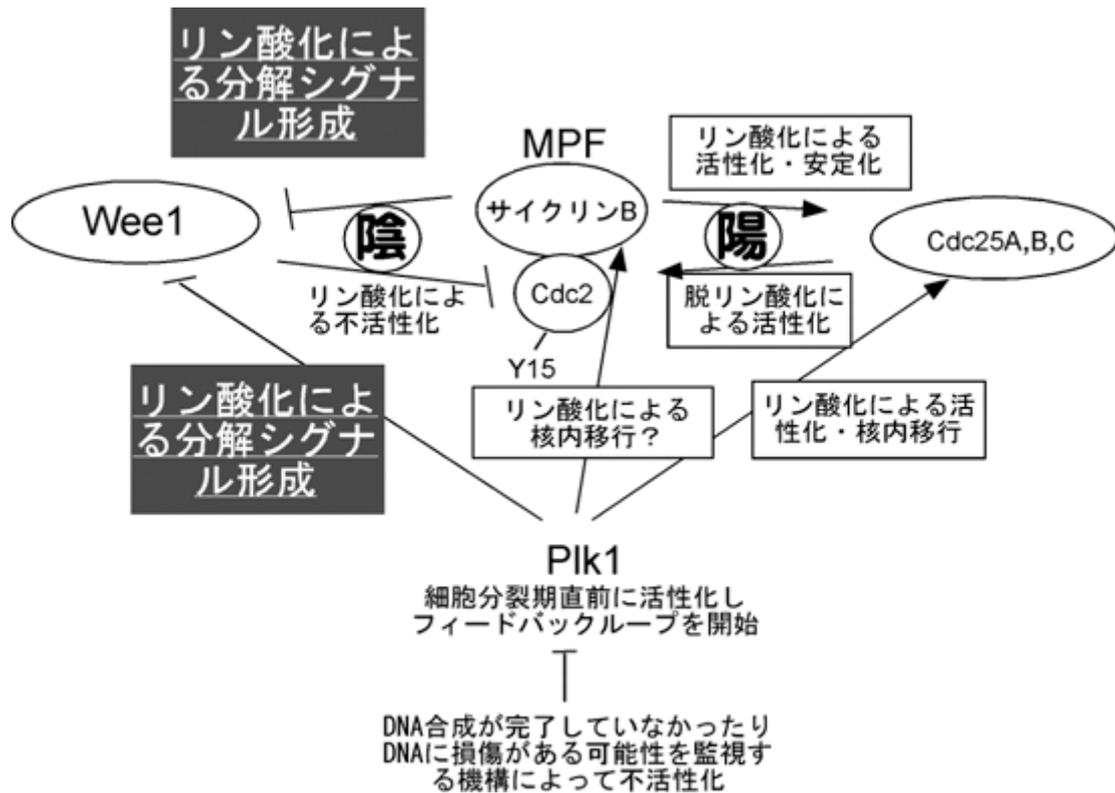


図4 細胞分裂開始時におけるMPFの急速な活性化を可能にする2つのフィードバックループとそれを開始させるリン酸化酵素Plk1

細胞分裂開始時にはMPFはCdc25によって脱リン酸化され活性化する。活性化したMPFが逆にCdc25をリン酸化し活性化し安定化するという正のフィードバックループ（陽）はMPFの急速な活性化を引き起こす。今回、MPFを不活性化するWee1分子上にMPFが「リン酸化による分解シグナル」を形成するという負のフィードバック（陰）が存在することを証明した。正のフィードバックを開始することが知られていたPlk1は、負のフィードバックも「リン酸化による分解シグナル」を形成することで開始する。Plk1は細胞が分裂の準備が出来たことを監視する機能の制御を受けていることが知られており、分裂の準備からMPFの活性化の間で重要な機能を担う。