

論文内容の要旨

論文題目 The role and regulation of the Fizzy-related protein *Srw1p*
during the cell cycle and differentiation in fission yeast

和訳 分裂酵母の細胞周期と分化における Fizzy 関連蛋白 *Srw1p* の機能と制御

指導教官 岡山博人教授

ポールナース博士

東京大学医学系研究科

1998年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 山口聡子

真核生物では、細胞周期の進行と分化の前の G_1 期停止の両方において、サイクリン依存性キナーゼ(Cdk)の活性の調節が大切である。通常細胞は、 G_1 期で環境をモニターし、増殖を続けるか、増殖を停止して分化するかを決定する。栄養源が枯渇してきた場合、細胞が増殖を停止して分化するためには Cdk 活性の抑制が不可欠である。

分裂酵母は細胞周期を理解する上で非常に良いモデル生物である。分裂酵母のサイクリン依存性キナーゼ *Cdc2p* は、 G_1/S と G_2/M の両方の進行に必須であり、その活性化と不活性化のためにいくつかの異なった制御を受けている。まず、その活性にはサイクリンとの結合が必要である。*Cdc13p* は生存に必須の分裂期サイクリンであり、*Cig2p* は G_1/S 期の主なサイクリンであるが、その欠損株では代わりに *Cdc13p* が G_1/S 期の進行を行う。一方、*Cdc2p* 蛋白自体は、15番目のチロシン (Tyr15) のリン酸化によって負の制御を受けている。Tyr15 は G_1 期後半に *Wee1p*, *Mik1p* という二つのキナーゼによりリン酸化を受け不活性化されるが、 G_2 期に入ると *Cdc25* フォスファターゼによる脱リン酸化を受け活性化され、これが分裂期への進行開始を促す。また一方で、*Cdc2p* は *Rum1p* という Cdk 抑制因子が直接結合することによって不活性化される。

分裂酵母を用いて、*Cdc2* キナーゼの活性を抑制する因子を遺伝学的にスクリーニングを行った。*Cdc2* キナーゼ活性が過剰な場合、細胞は未熟な段階で分裂期に突入する(分裂期カタストロフィー)。このような温度感受性変異株の一つ、*rad1-1 wee1-50^{ts}* 株を宿主として選び、その分裂カタストロフィーの多コピー抑

制因子として、新規遺伝子 *srw1*⁺ (suppressor of *rad wee*) を単離した。シーケンス分析により、*srw1*⁺ は 556 のアミノ酸からなる、高度に保存されている Fizzy 関連蛋白の一員をコードしていることがわかった。*srw1*⁺ を低レベルで発現すると、分裂期カタストロフィーが抑制され、細胞は増殖を続けることができたが、*srw1*⁺ を高レベルで発現すると、細胞分裂が停止しちょうど *cdc13* 破壊株のように、DNA 合成期の繰り返しをまねいた。このことから *srw1*⁺ は Cdc2p/Cdc13p 複合体の活性を抑制する働きがあることが示唆された。*srw1* 破壊株は細胞増殖中には何らの欠陥を示さなかったが、分化において明らかな欠陥を示した。破壊株は窒素源枯渇に際して G₁ 期に停止することができず、接合することもできなかった。接合能は G₁/S 期サイクリンである *cig2*⁺ の破壊あるいは Cdc2 キナーゼの不活化によって回復された。このことは、Srw1p は Cdc2p/Cig2p の活性を抑制するか、拮抗するかの働きがあることを示唆している。

次に、Srw1p による Cdc2p の活性抑制機構について調べた。はじめに Cdc2p の Tyr15 のリン酸化との関係を調べた。*srw1* 破壊株は生存に全く影響が見られなかったが、Wee1 キナーゼを不活化したところ、致死であった。*mik1Δ weel*^{ts} の株とは対照的に、*srw1Δ weel*^{ts} の二重変異株は特に低窒素源の培地で分裂カタストロフィーに突入した。このことは、Srw1p が窒素源枯渇時に活性化されて Cdc2p/Cdc13p 活性を抑制する働きがあることを示唆している。また、*srw1*⁺ の発現は *mik1Δ weel*^{ts} の分裂カタストロフィーを抑制することから、Srw1p は Mik1, Wee1 キナーゼとは独立して機能することが示唆された。同様に、Tyr15 の制御を通じて細胞周期を S 期の初期で停止させるヒドロキシウレア (HU) が *srw1Δ weel*^{ts} の分裂カタストロフィーを抑えたこと、Tyr15 が置換されたりリン酸化不能型の Cdc2p が特に *srw1* 破壊株に強い毒性を示したことから、Srw1p は Tyr15 制御とは異なった制御機構に関与していることが示唆された。

Cdk 抑制因子 *rum1*⁺ の破壊株は *srw1* 破壊株と非常に似た表現型を示すため、Srw1p が Rum1p を通じて働いている可能性を試した。*srw1*⁺ の過剰発現は *rum1* 破壊株の接合能、および G₁ 停止能を部分的に回復することができた。したがって、Srw1p の機能は Rum1p に依存していないと結論づけられた。

次に、Srw1p が Cdc13p を通じて働いている可能性を試した。*cdc13*⁺ の過剰発現は、*weel*^{ts} 単独変異株にはそれほど強い作用を持たなかったが、*srw1Δ weel*^{ts} 二重変異株では制限温度下でも多くの細胞が分裂期カタストロフィーをおこしたために、*srw1* 破壊株では Cdc13p を抑える機能が低下していることが予想された。このことは生化学的な実験により確認された。野性株では窒素源枯渇による G₁

停止に伴い、Cdc13p および Cig2p が分解されることで Cdc2p 活性が抑制され、これらのサイクリンの過剰発現は G₁ 停止能の欠陥をもたらすことが報告されている。 *srw1* 破壊株では窒素源枯渇時、あるいは細胞周期変異株を用いた G₁ 期停止時に Cdc13p が分解されずに残ることがわかった。一方で Cig2p は *srw1* 破壊株でも野生株同様に分解されていた。これらの結果から、Cdc13p が G₁ 停止の際の Srw1p の標的であることが示唆された。一方、接合能の消失とは異なり G₁ 期停止能の不全は、*cig2*⁺ の破壊によっては回復されなかった。そればかりか、*cig2*⁺ の破壊は Cdc13p の分解も回復しなかった。このことから、Srw1p は間接的に Cdc2p/Cig2p 活性を抑制あるいは拮抗することによって接合を促し、Cdc13p の分解を促すことによって G₁ 停止を引き起こしていると考えられた。

Cdc13p のような細胞分裂サイクリンは細胞増殖中の分裂期からの脱出時と、G₁ 停止時の両方で分解されることが知られている。しかし、これらの分解が同じシステムによって行われているのか否かは、如何なる生物種においても明らかではなかった。解析の結果、Srw1p は G₁ 期停止時の Cdc13p の分解に必須であったが、分裂期脱出の際の Cdc13p の分解には係わっていないことがわかった。したがって、Cdc13p の分解には、細胞増殖中の分裂期脱出時と分化前の G₁ 期停止時とで独立した二つのシステムが働いていることになる。

すでに述べたように Srw1p は細胞分裂を抑えるが、それ単独の破壊株では分裂カタストロフィーが全く観察されない。そこで、Srw1p の活性は増殖中の細胞では抑制されていると仮定した。まず、特異抗体を作製し、62kD の Srw1p 蛋白が増殖中の細胞に複数のバンドとして検出されることを示した。脱りん酸化処理の結果から、Srw1p は増殖中の細胞ではりん酸化されていることがわかった。蛋白量は細胞周期を通じて一定であり、Srw1p は細胞周期を通じてりん酸化されていた。Srw1p が Cdc13p の分解に必要とされる G₁ 停止期でのりん酸化状態を調べたところ、G₁ 停止、Cdc13p の分解の時期に一致して Srw1p が脱りん酸化されることがわかった。このことから、脱りん酸化型の Srw1p が活性化型であることが示唆された。

Srw1p のりん酸化は Cdc2p あるいは Cdc13p の活性に依存していたため、Srw1p は増殖中の細胞では Cdc2p/Cdc13p 複合体によってりん酸化されていると結論づけた。Cdc2p/Cdc13p 複合体によるりん酸化は、S 期開始の直前におき、それと一致して Cdc13p が蓄積し、S 期の開始をもたらす。Cdc2p/Cdc13p 複合体によるりん酸化は、*in vitro* のキナーゼアッセイでも示された。Srw1p は全長に、4 つの Cdk りん酸化コンセンサスを持つ。これらの 4 つの S/T-P-X-R/K のセリンまたは

スレオニンアラニン置換することによって、リン酸化不能型の *srw1* (*srw1IA2A3A4A*) を構築した。このリン酸化不能型の Srw1p を野性型の Srw1p と比較した結果、このリン酸化は Srw1p 蛋白を不安定化する、つまり分解をもたらす働きがあることがわかった。したがって、このリン酸化は、Srw1p による Cdc13p 分解促進を抑制することによって、細胞周期の順序だった進行を保障するのに重要な役割を持つと考えられた。以上述べたように私は、Srw1p が Cdc2p 活性の制御を通じて、細胞が増殖から分化へ切り換える時に鍵となる働きを示した。

Srw1p のホモログは、近年さまざまな生物種で報告されている。出芽酵母の Hct1/Cdh1、ショウジョウバエとカエルの Fizzy 関連、哺乳類の Cdh1 などである。いずれの生物種でも Fizzy 関連蛋白は、分裂期サイクリンの分解を促進する働きがあることが示されている。特にショウジョウバエ及びカエルではちょうど分裂酵母と同様、G₁ 期に特異的に分裂期サイクリンの分解を促進することで分化を促す作用があることが示されており、分裂酵母の Srw1p の分化の開始を制御する機能は高等生物まで高度に保存されていると考えられる。