

科学研費補助金研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21570003

研究課題名(和文)：細胞質分裂時におけるセプチンタンパクの修飾制御の解析

研究課題名(英文)：Analysis of regulations of septin modifications in cytokinesis

研究代表者

菊池 淑子 (KIKUCHI YOSHIKO)

学習院大学・理学部・研究員

研究者番号：00138124

研究成果の概要(和文)：

出芽酵母細胞質分裂領域に局在するセプチンリングの構成因子 Cdc3 は SUMO リガーゼ Siz1 により M 期のみ一時的に SUMO 化された。また、Cdc3 は Rsp5 ユビキチンリガーゼ依存的にユビキチン化されたが、PY モチーフには依存していなかった。セプチンと Siz1 や SUMO との融合タンパクを種々の変異株に発現させて表現型を調べ、SUMO 化はセプチン脱重合を誘導すること、ポリ SUMO 化された Siz1 が Slx8/Slx5 によりユビキチン化され、タンパク質分解されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Budding yeast Cdc3 is a component of septin rings which localize at the neck region and is essential for cytokinesis. Cdc3 was transiently sumoylated by Siz1, a SUMO ligase only during M-phase. Cdc3 was ubiquitinated in Rsp5-dependent way, but the PY-motif of Cdc3 was not required for the ubiquitination. We examined the phenotypes of various mutants when Siz1-septin or SUMO-septin fusion proteins were over-expressed. Results suggested that the septin sumoylation induces the depolymerization of septin rings, and that the sumoylated Siz1 was ubiquitinated by Slx8/Slx5 ubiquitin ligase for its degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：分子遺伝、細胞周期、細胞質分裂、SUMO 化、ユビキチン化、セプチン

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母セプチンタンパク Cdc3, Cdc10, Cdc12, Cdc11 はオリゴマーを形成し、さらにオリゴマーが重合してリング構造を形成する。セプチンリングは細胞質分裂の場となる母細胞と娘細胞の境界領域であるネックに局在し、細胞質分裂前に、hourglass 状から 2本のリングへと構造変化を起こし、細胞質分裂後に脱重合する。我々はセプチン構成因子 Cdc3 がユビキチン類似タンパクである Smt3 (SUMO)によりタンパク質修飾を受けること、さらに、その SUMO 化は Siz1 に依存し、Siz1 が PIAS タイプの SUMO リガーゼであること初めて明らかにした。また、Siz1 は M 期に核から細胞質に排出され、セプチンリングと共局在する。SUMO リガーゼは基質に特異的に結合し、SUMO 結合酵素より SUMO 分子を受け取り基質にイソペプチド結合させるアダプターであることを示した。しかし、セプチンの SUMO 化の生物学的意義については未解決のままである。

一方、セプチンリングに欠損がある場合はその異常を感知して細胞周期を阻害するチェックポイント機構が働く。G2 期から M 期への移行が阻害され、芽の先端成長が持続するために、細長い細胞形態になることが知られている。通常の細胞周期 G2/M 移行期に、CDK である Cdc28 をリン酸化して負に制御する Swe1 (Wee1) キナーゼはセプチンリング上で種々のリン酸化を受けた後、ユビキチン化され分解されるが、チェックポイント機構が働くと Swe1 タンパクが安定化し、CDK 活性を抑えたままになると考えられている。しかし、この Swe1 と拮抗する Mih1 (Cdc25) フォスファターゼの活性制御についてはあまり解析が進んでいなかった。

2. 研究の目的

(1) セプチンの SUMO 化やユビキチン化：

セプチンリングは細胞質分裂前に、構造変化を起こすが、この現象にセプチン分子の修飾状態がどのように関与しているのか？リング中央部のセプチン分子が SUMO 化されてユビキチン化し、タンパク質分解されたり、エンドサイトーシスすることにより、セプチンリングの構造変化を起こし、アクトミオシンリング収縮の場を提供している可能性を検証し、複雑な細胞質分裂機構を解明する一助とすることを目的とした。

(2) Mih1/Cdc25 の機能解析

Swe1 と拮抗する Mih1 (Cdc25) フォスファターゼの活性制御機構を調べ、Swe1 以外の、CDK 活性を制御するチェックポイント機構を明らかにし、シグナル経路の上流に位置するセプチンの修飾制御との関係を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セプチンの SUMO 化やユビキチン化：

セプチンの SUMO 化が細胞周期に一過的に起こることを説明するため、ポリ SUMO 化されたタンパクを標的にするユビキチンリガーゼ Slx8・Slx5 複合体などの関与を調べた。また、セプチン Cdc3 には WW-ドメインと結合する PY-モチーフが存在するため、WW-ドメインを持つ Rsp5 ユビキチンリガーゼとの関係を調べた。

(2) Mih1/Cdc25 の機能解析：

MIH1 は必須遺伝子ではないため、まず、*MIH1* 欠失体が表現型を示すような遺伝的バックグラウンドを探索し、さらに制御に関与する

と考えられるアミノ酸残基を変異させ、その効果を調べた。タンパク量や修飾状態、GFP融合タンパクの細胞内局在などを調べた。

4. 研究成果

(1) セプチンのSUMO化やユビキチン化：

セプチン Cdc3、及び Shs1 のSUMO化の細胞周期依存性を詳細に調べた結果、M期から細胞質分裂時にSUMOリガーゼ Siz1により一過的にSUMO化された。また、Cdc3はRsp5ユビキチンリガーゼ依存的にユビキチン化されたが、PYモチーフには依存していなかった。セプチンと共沈殿するタンパクにはユビキチン化されたものが複数種存在することが分かった。Cdc10-Siz1やCdc3-Smt3融合タンパクを *siz1*, *rsp5*, *slx5*, *slx8* 変異株に過剰発現させて、増殖阻害や細胞形態が細長くなるかなどを観察した結果、セプチンのSUMO化はセプチンリング構造の脱重合を誘導すること、自身によりポリSUMO化されたSiz1がSlx8/Slx5によりユビキチン化され、タンパク質分解されることが示唆された。従って、セプチン Cdc3 のSUMO化はSiz1タンパクが核より細胞質に排出され、セプチンリングに結合してCdc3をSUMO化する。その後、自身によりポリSUMO化されたSiz1-SUMO結合体がユビキチン化され、分解されることによりSUMOリガーゼが消失するため、セプチンの脱SUMO化へと進むと考えられ、セプチンのSUMO化が細胞周期依存的に一過性であることを説明できた。

(2) Mih1/Cdc25の機能解析：

G2サイクリン Clb1, 2, 3, 4のうち、Clb2だけを発現させたバックグラウンドで *MIH1* を欠失すると温度感受性となった。このシステムを利用してMih1の活性を調べた。まず、ドメイン解析により、酵素活性を持つ中央部

分のみで活性があり、N-末領域、C-末領域部分は制御機構に関与すると示唆された。C-キナーゼ(Pkc1)によるリン酸化サイトが存在することから、リン酸化を受けるセリン残基を変異させたところ、グルタミン酸に変異して疑似リン酸化させると活性を失った。従って、Pkc1によるリン酸化によりMih1は負に制御されると示唆された。また、GFPとの融合タンパクを過剰発現し細胞内局在を観察したところ、野生型Mih1は核内に、疑似リン酸化タイプのMih1は細胞質に局在したことから、Pkc1によるリン酸化はMih1を核外放出させ、機能を低下させることが分かった。G2/M移行期にPkc1活性が下がり、Mih1が核移行して細胞周期進行に正に働き、さらに、ストレス時のチェックポイントとして、Pkc1がMih1をリン酸化し、その核局在を阻害して、Mih1を負に制御していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Yasushi Saeki, Tai Kudo, Takayuki Sone, Yoshiko Kikuchi, Hideyoshi Yokosawa, Akio Toh-e1 and Keiji Tanaka.

Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome.

The EMBO Journal (2009) 査読有 Volume 28, 359-371. DOI: 10.1038/emboj.2008.305

② Rintaro Suzuki, Heisaburo Shindo, Akira Tase, Yoshiko Kikuchi, Mitsuhiro Shimizu, Toshimasa Yamazaki.

Solution structures and DNA binding properties of the N-terminal SAP domains of

SUMO E3 ligases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Oryza sativa*.

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. (2009) 査読有 Volume 75, 336-347. DOI: 10.1002 /prot.22243

③ Yukifumi Uesono, Akio Toh-e, Yoshiko Kikuchi, Ichiro Terashima.

Structural analysis of compounds with actions similar to local anesthetics and antipsychotic phenothiazines in yeast.

Yeast (2011) 査読有 Volume 28, 391-404. DOI: 10.1002/yea.1846

④ Kouitiro Yano, Yukifumi Uesono, Satoshi Yoshida, Akihiko Kikuchi, Jun Kashiwazaki, Issei Mabuchi, Yoshiko Kikuchi.

Mih1/Cdc25 is negatively regulated by Pkc1 in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genes to Cells (2013) 査読有 Volume 18, 425-441. DOI: 10.1111/gtc.12047

[学会発表] (計3件)

① Kouitiro Yano and Yoshiko Kikuchi.

Regulations of Mih1-phosphatase in budding yeast. 第32回日本分子生物学会年会

2009/12/9-12 横浜

② 荒木智之、東江昭夫、菊池淑子、寺島一郎、上園幸史

局所麻酔剤テトラカインによる出芽酵母の翻訳開始阻害機構. 第34回日本分子生物学会年会 2011/12/13-16 横浜

③矢野興一郎、上園幸史、吉田知史、菊池韶彦、馬淵一誠、菊池淑子

出芽酵母Mih1はPkc1により負に制御される。

第44回酵母遺伝学フォーラム 2011/9/5-7 九大

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 淑子 (KIKUCHI YOSHIKO)

学習院大学・理学部・研究員

研究者番号：00138124

(2) 研究分担者

上園幸史 (UESONO YUKIFUMI)

東京大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：30251408