

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 3 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570001

研究課題名(和文) SCFCdc4 ユビキチンリガーゼによる M 期制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of Mphase progression by the SCFCdc4 ubiquitin ligase.

研究代表者

岸 努 (KISHI, Tsutomu)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：80260024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：細胞周期G1期に機能するタンパク質群の発現を活性化する転写因子Swi5は、G1後期にユビキチンリガーゼSCFCdc4に依存して分解される。分解を受けずに安定化する安定化型Swi5を発現する細胞では、S期開始、染色体の分離、M期の終了が阻害された。この機構を解析した結果、G1期には、以降の細胞周期の進行を阻害する因子が存在すること、それらの発現をSwi5が活性化すること、Swi5がSCFCdc4によって分解されると細胞周期の円滑な進行が可能となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Swi5 is a transcription factor that activates transcription of genes required for G1 functions in yeast. We previously showed that Swi5 is degraded by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. In this study, we constructed a stabilized Swi5 by modifying residues required for the SCFCdc4-dependent degradation. We found that onset of S-phase, chromosome segregation, and M-phase exit are inhibited in cells expressing the stabilized Swi5. We found a novel regulatory mechanism of cell cycle: Swi5 induces expression of Sic1 that inhibits initiation of S phase and chromosome segregation, and of Amn1 that inhibits M-phase exit; and degradation of Swi5 by the SCFCdc4 ubiquitin ligase allows proper progression into cell cycle.

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：ゲノム構築・再編・維持 細胞周期 染色体分離 ユビキチンリガーゼ 転写

1. 研究開始当初の背景

S 期開始を制御するユビキチンリガーゼ SCF^{Cdc4} が M 期も制御するということが、1994 年に遺伝学的に示された。それ以降現在に至るまで、分子機構は明らかになっていない。この機構を解明するためには、ユビキチンリガーゼ SCF^{Cdc4} によってユビキチン化・分解される標的タンパク質の同定が不可欠である。

これまでに申請者は、ユビキチン化の基質を系統的にスクリーニングする手法開発に取り組んできた。two-hybrid システムと遺伝学的手法を組み合わせた新しいスクリーニング系を確立し、基質がユビキチン化を受けずに安定化される条件下で、two-hybrid スクリーニングを行うことを可能とした (T. Kishi et al. PNAS 2007, 2008)。この方法は極めて有効で、出芽酵母 SCF^{Cdc4} の新規基質の一つとして、G1 初期の転写プログラムを活性化する転写因子 Swi5 を同定した。

ユビキチン化に必要なリン酸化部位をアラニンに置換した変異型 Swi5 は分解を受けずに安定化した。この安定化する Swi5 (安定化型 Swi5) を発現する細胞では、S 期開始と M 期の進行 (染色体分離と核の分裂の両方) が遅延することを明らかにした。この結果は、Swi5 が S 期開始と M 期進行を阻害することを意味する。Swi5 は転写因子であるので、Swi5 に依存する遺伝子発現が、S 期開始と M 期進行を阻害する因子の発現を誘導することが示唆される。

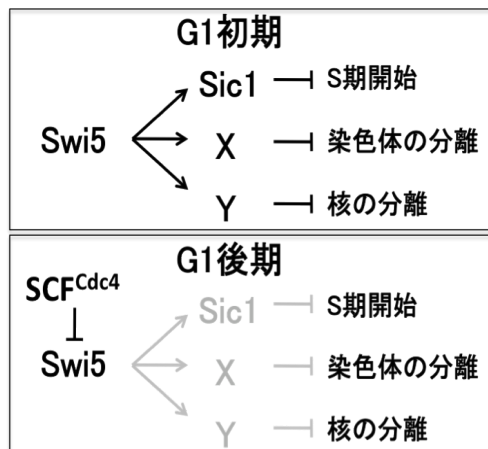
2. 研究の目的

以上の背景をもとに申請者は以下の作業仮説を立てた (下図)。

Swi5 は S 期開始、染色体分離、M 期終了の阻害因子の転写を活性化することにより G1 初期にこれらの過程をブロックする。

ユビキチンリガーゼ SCF^{Cdc4} は Swi5 を分解することによって阻害因子の「発現を抑制し、その結果、G1 期に確立した細胞周期進行のブロックが解除される。

本研究ではこの作業仮説の検証を行った。



3. 研究の方法

まず Swi5 によって転写が活性化される因子の中で、染色体分離あるいは M 期終了を阻害する因子を同定する。

染色体分離は紡錘体の伸長や染色体分離を直接阻害するセクリンの分解を経時的に調べることにより追跡する。

M 期終了を伸長した紡錘体の消失や M 期サイクリンの分解を経時的に調べることにより追跡する。

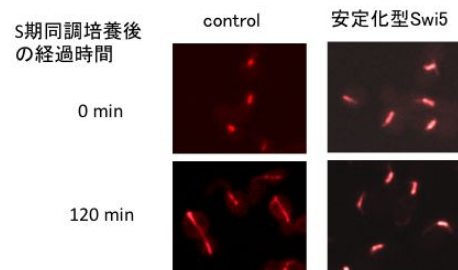
同定した因子が、染色体分離や M 期終了の制御のどの段階を阻害するか明らかにすることにより、阻害機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 安定化型 Swi5 による染色体分離の阻害機構の解明

安定化型 Swi5 の発現は染色体分離を阻害する

出芽酵母を HU で処理し S 期に同調した後、ガラクトースで転写を誘導できる GAL1 プロモーターを用いて安定化型 Swi5 を発現した。経時的に細胞を分取してセクリンの分解を調べたところ、その分解が阻害された。同様に、チューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法を用いて紡錘体の伸長を観察したところ、安定化型 Swi5 を発現する細胞では紡錘体の伸長が阻害された (下図)。このことから、安定化型 Swi5 の発現は染色体分離を阻害することが明らかとなった。



安定化型 Swi5 は染色体分離を阻害する

安定化型 Swi5 は Sic1 を介して染色体分離を阻害する

次に、Swi5 に依存して転写される因子の中から染色体分離を阻害する因子の同定を行った。Swi5 が転写を誘導する因子の中に CDK (サイクリン依存キナーゼ) のインヒビターである Sic1 がある。そこで、安定化型 Swi5 が Sic1 を介して染色体分離を阻害する可能性を検討した。もし安定化型 Swi5 による染色体分離の阻害が Sic1 を介するのなら、sic1 破壊株では染色体分離は回復するはずであ

る。そこで *sic1* 破壊株を HU で処理し S 期に同調した後に安定化型 Swi5 を発現し、染色体の分離を調べた。その結果、*sic1* 破壊株では染色体分離は回復した。したがって、Swi5 は Sic1 を介して Cdk 活性を阻害し、その結果、染色体分離の阻害が引き起こされたことが判明した。

このことは別の実験からも支持された。Sic1 は Cdk 活性を阻害するならば、Cdk のサイクリンサブユニットを過剰発現すると、安定化型 Swi5 の発現による Sic1 の影響が回避されることが予想される。実際、M 期サイクリン遺伝子を他コピーで酵母に導入すると、安定化型 Swi5 による染色体分離の阻害は相補された。

以上の結果から、安定化型 Swi5 は Sic1 を介して染色体分離を阻害することを明らかにした。

安定化型 Swi5 は紡錘体チェックポイントを介して染色体分離を阻害する

染色体分離は、ユビキチンリガーゼ APC^{Cdc20} によるセキュリンの分解によって制御されている。安定化型 Swi5 による染色体分離の阻害がセキュリンの分解阻害が原因であるのか検討した。もしセキュリンの分解阻害が原因であるならば、セキュリンの破壊株 (*pds1* 破壊株) は、安定化型 Swi5 による影響を受けずに染色体分離は正常に起こるはずである。これを確かめるために *pds1* 破壊株を HU で処理し S 期に同調した後に安定化型 Swi5 を発現し、染色体の分離を調べた。その結果、*pds1* 破壊株では染色体分離は正常であった。したがって、安定化型 Swi5 による染色体分離の阻害がセキュリンの分解阻害を介していることを明らかにした。

次に、安定化型 Swi5 はセキュリンの分解制御にどのように関わるのか検討した。ユビキチンリガーゼ APC^{Cdc20} の活性は、サブユニットのリン酸化による活性化と紡錘体チェックポイント、DNA 損傷チェックポイントによって制御される。もし安定化型 Swi5 による染色体分離の阻害が紡錘体チェックポイントを介するのなら、紡錘体チェックポイントを調節する Mad2 を欠失した *mad2* 破壊株破壊株では染色体分離は回復するはずである。そこで *mad2* 破壊株を HU で処理し S 期に同調した後に安定化型 Swi5 を発現し、染色体の分離を調べた。その結果、*mad2* 破壊株では染色体分離は回復した。したがって、Swi5 は Sic1 を介して Cdk 活性を阻害し、その結果、染色体分離の阻害が引き起こされたことが判明した。

一方 DNA 損傷チェックポイントは関与していなかった。DNA 損傷チェックポイントが活性化すると、DNA 損傷チェックポイントを制御する Rad53 タンパク質がリン酸化される。しかし、安定化型 Swi5 を発現する細胞では Rad53 のリン酸化は検出されなかった。

以上の結果から、安定化型 Swi5 は Sic1 を介して Cdk 活性を低下させる。Cdk 活性の低下は紡錘体チェックポイントを介して染色体分離を阻害することを明らかにした。

(2) 安定化型 Swi5 による M 期終了の阻害機構の解明

安定化型 Swi5 の発現は M 期終了を阻害する

先に記したように、*sic1* 破壊株では安定化型 Swi5 による染色体分離の阻害は回復した。しかし、安定化型 Swi5 を発現しない場合と比べて、伸長した紡錘体の消失が阻害されていることを見いだした。このことから安定化型 Swi5 の発現は M 期終了も阻害することがわかった。

安定化型 Swi5 の発現は M 期終了を阻害する

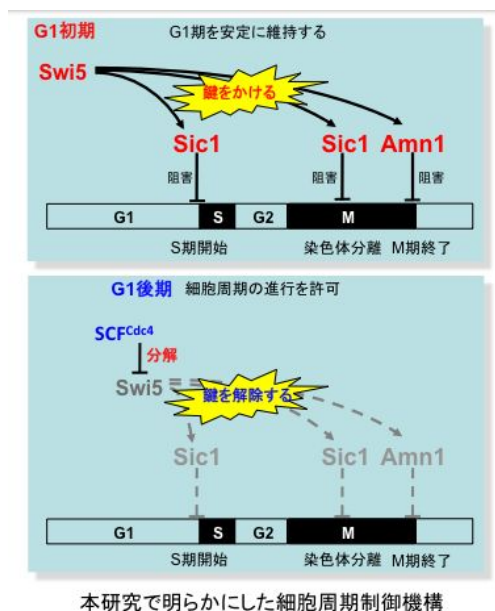
M 期終了は M 期サイクリンの分解によって引き起こされる。M 期サイクリンの分解はユビキチンリガーゼ APC^{Cdh1} によって行われるが、このユビキチンリガーゼ APC^{Cdh1} の活性は MEN 経路 (M 期終了ネットワーク) によって調節される。

そこで、Swi5 に依存して転写される因子の中から M 期終了を阻害する因子の同定を行った。Swi5 が転写を誘導する因子の中に MEN 経路のインヒビターである Amn1 がある。そこで、安定化型 Swi5 が Amn1 を介して染色体分離を阻害する可能性を検討した。

もし安定化型 Swi5 による M 期終了の阻害が Amn1 を介するのなら、*amn1* 破壊株では M 期終了は回復するはずである (*sic1* 破壊株ではないと紡錘体が伸長しないため、実際には、*sic1 amn1* 二重変異株を用いた)。そこで *amn1* 破壊株を HU で処理し S 期に同調した後に安定化型 Swi5 を発現し、紡錘体の消失を追跡した。その結果、*sic1 amn1* 破壊株では伸長した紡錘体の消失は回復した。したがって、安定化型 Swi5 による M 期終了の阻害は Amn1 を介した MEN 経路の阻害によることを明らかにした。

以上のように、Swi5 に依存した転写は染色体分離や M 期終了という異なるイベントを阻害する。逆に Swi5 が分解されると、細胞周期の円滑な進行が回復する。このように Swi5 は G1 期を維持するためのマスターレギュレーターとして機能していると考えられる。分裂したばかりの細胞は G1 期を維持し、新しい分裂周期・分化・アポトーシスへ向かうかの細胞運命が決定されるまで待機する。G1 初期に活性化される転写プログラムが、細胞周期阻害因子を発現することは合目的である。

細胞周期は3つのユビキチンリガーゼ (SCF^{Cdc4}、APC^{Cdc20}、APC^{Cdh1}) が交互に機能することにより制御されている。安定化型 Swi5 を発現する細胞では、M 期に入っても APC^{Cdc20} と APC^{Cdh1} が活性化されず、その結果、染色体分離と M 期終了が阻害される。このことは、SCF^{Cdc4} による Swi5 の分解が APC^{Cdc20} と APC^{Cdh1} の活性化を誘導することを示唆する。したがって、SCF^{Cdc4} による M 期制御は、究極的には APC^{Cdc20} と APC^{Cdh1} の活性化のための機構でもあることが考えられる。



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 3 件)

Liu Y, Nakatsukasa K, Kotera M, Kanada A, Nishimura T, Kishi T, Mimura S, Kamura T. Non-SCF-type F-box protein Roy1/Ymr258c interacts with a Rab5-like GTPase Ypt52 and inhibits Ypt52 function. Mol. Cell Biol. 22:1575-84 (2011) doi: 10.1091/mbc.E10-08-0716. 査読あり

H. Hayashi and T.Kishi. Elucidation of inactivation mechanism of transcription of genes that function in G1 phase. Genes and Genetic systems. in press 査読あり

N.Watanabe, H. Hayashi and T.Kishi CDK is involved in the control of the spindle checkpoint.. in press 査読なし

[学会発表](計 5 件)

渡邊奈緒、林宏樹、岸 努: CDK は紡錘体チェックポイントの制御に關与する 第 86 回日本遺伝学会(20140919)長浜バイオ大学(滋賀)

林宏樹、岸 努: Swi5 の分解による G1 期関連遺伝子の転写の不活性化 第 86 回日本遺伝学会(20140919)長浜バイオ大学(滋賀)

田島裕人、岸 努: 細胞周期 M 期の進行を制御する MEN 経路の阻害因子 Amn1 のユビキチン化 化学系学協会東北大会(20130920)山形大学米沢キャンパス(山形)

奥彰太、渡邊奈緒、岸 努: CDK は紡錘体形成チェックポイントの制御に關与する 化学系学協会東北大会(20130920)山形大学米沢キャンパス(山形)

高橋健一郎、岸 努: DNA 損傷修復に關わるタンパク質の SUMO1 化機構の解析 化学系学協会東北大会(20130920)山形大学米沢キャンパス(山形)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸 努 (KISHI, Tsutomu)
日本大学・工学部・准教授
研究者番号: 80260024