

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657134

研究課題名(和文)リン酸化・脱リン酸化酵素が構成する「相互抑制ループ」の解析

研究課題名(英文)Reciprocal inhibition loop of protein kinase and phosphatase

研究代表者

持田 悟 (Mochida, Satoru)

熊本大学・大学院先端機構・特任助教

研究者番号：60590304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が分裂するには細胞内の多くのタンパク質が時間的、空間的に適切にリン酸化/脱リン酸化される必要がある。本研究では、解析の進んでいない脱リン酸化酵素について解析した。その結果、複数種の脱リン酸化酵素複合体が染色体分配に重要な機能を持つことが明らかになった。また、別の脱リン酸化酵素を制御しているタンパク質alpha-endosulfine自身に珍しいチロシン残基のリン酸化を発見し、そのリン酸化部位の重要性も試験管内で示した。これらの結果から、これまで分かっていなかった脱リン酸化酵素がいかに細胞分裂に寄与するかの興味深い示唆を与えた。

研究成果の概要(英文)：Cell division needs hundreds of protein phosphorylation that should be temporally and spatially regulated. This research project focused on functions of protein phosphatases, that attracted less attention than protein kinases till today. We found that multiple phosphatase complexes play different roles for faithful chromosome segregation on cell division at kinetochores. We also found that alpha-endosulfine, an important regulator for other kind of phosphatase, is phosphorylated on its tyrosine residue. Importance of the residue was shown in a test tube by us. These results imply how protein phosphatases could contribute to the cell division in combination with protein kinases.

研究分野：生物学

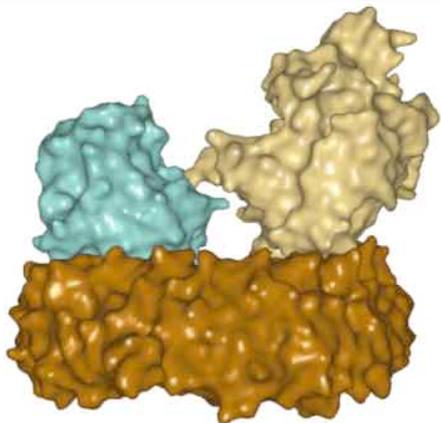
科研費の分科・細目：生物科学 細胞生物学

キーワード：細胞周期 タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

1980年代、分裂期に進入するために重要な因子 Cdc2/CDK (Cell division cycle 2/cyclin-dependent kinase) が発見され、これがリン酸化酵素であることが報告された。一方、CDKの基質タンパク質を脱リン酸化する脱リン酸化酵素の探索も1990年代まで精力的に行われたものの、異論が多く今も未解決の問題である。申請者は、Cdc2の基質を脱リン酸化する脱リン酸化酵素活性が細胞周期と同調して上下することを発見し (Mochida and Hunt, 2007, Nature, 449, pp336-)、次いでこの活性の分子同定(すなわち、PP2A<sup>B55</sup> 複合体、2A型脱リン酸化酵素にB55制御サブユニットが結合したヘテロ三量体)に成功していた(図1) (Mochida et al., 2009, EMBO Journal, 28, pp2777-)。

図1、PP2A<sup>B55</sup> ヘテロ三量体の立体構造 (茶色：足場サブユニット、薄茶：B55サブユニット、水色：触媒サブユニット)



さらに、このPP2A<sup>B55</sup>複合体について、その基本的な活性制御メカニズムを分子レベルで解明していた (Mochida et al., 2010, Science, 330(6011), pp1670-; Castilho et al., 2009, Mol. Biol. Cell, 20(22), pp4777-)。このメカニズムを簡潔にまとめると、まず「①分裂期には、PP2A<sup>B55</sup>はCDKの活性によって抑制される(図2の左側)」。次に「②間期には、PP2A<sup>B55</sup>はCDKの活性を抑制している(図2の右側)」ということである。

図2、「リン酸化酵素と脱リン酸化酵素による相互抑制ループ」

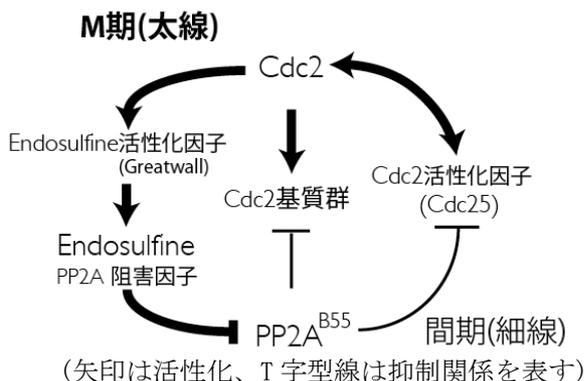


図2を見ると、互いに拮抗する Cdc2 と PP2A<sup>B55</sup> が一つの「相互抑制ループ」を形成し、これにより効率的なリン酸化力(リン酸化酵素活性と脱リン酸化酵素活性の和)の制御が実現されていることが分かる。しかしさらに考えを発展させると、この閉じたループだけでは、間期と分裂期の間で遷移がおこる「きっかけ(トリガー)」に関するメカニズムについては全く分からない。このループが細胞のリン酸化力を決定する機構であるのなら、ここに外からのインプットがあるに違いない。そこで、本研究ではこの「相互抑制ループ」がどのように外的因子によって調節されているのかを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞周期進行に重要なタンパク質リン酸化がどのように制御されているのかについて、生化学的な解析手法を用いてその包括的な理解を目指す。特に申請者が最近新たに提唱した、リン酸化酵素-脱リン酸化酵素間にある「相互抑制ループ(図2)」の証明をさらに押し進めることが主目的である。

3. 研究の方法

本研究では、生理的な脱リン酸化酵素活性を測定するのに適したアフリカツメガエル(学名 *Xenopus laevis*) 卵実験系(図3)を主に用い、前出の「相互抑制ループ」のさらなる分析とそれに影響を及ぼすループ外要因を探索する。この実験系は非希釈の細胞抽出液が得られるという点で、他の実験系に無い利点を有する。

図3、実験に用いたアフリカツメガエル(成体メス)と、遠心分離で抽出した卵細胞質(中層の茶色部分)



4. 研究成果

(1) 脱リン酸化酵素と動原体

研究代表者をふくむ国際共同研究チーム(スペイン国立がん研究センター、アメリカロックフェラー研究所)は、染色体の動原体部分に存在する脱リン酸化酵素が複数種ある事があきらかにし、さらにそれらが互いに

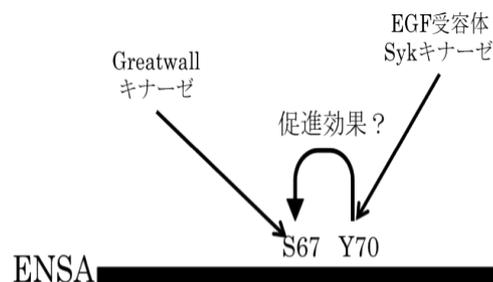
異なる機能を果たしていることを示した。姉妹動原体同士の結合には Sgo1 タンパク質が必要であることが分かっていたが、今回は Sgo2 タンパク質 (Shugosin 2) の解析を行い、このタンパク質が Sgo1 (Shugosin 1) とは異なり、「姉妹動原体同士の結合には必要ない」こと、そしてそのかわり「二極性の分裂期放線体の形成に必要である」ことが明らかとなった。このように配列上は互いに良く似た Sgo1、Sgo2 両タンパク質は異なる機能を持っているが、その違いは結合している PP2A 脱リン酸化酵素の種類によって生み出されている事を示すことができた。

## (2) alpha-endosulfine のチロシンリン酸化による制御

リン酸化プロテオームデータベース

(<http://www.phosphosite.org/homeAction.do?jsessionid=9DF2B5233F658D0F53CA5047C4789177>) から、ALPHA-ENDOSULFINE がこれまで予想していた以上のリン酸化を受けている事が分かり、研究の発展方法が広がった。特にチロシン残基がリン酸化されているという知見は、この ALPHA-ENDOSULFINE タンパク質が増殖やストレス等の刺激を受け取り、それを生化学的な力に転換している可能性をしめしていた。この結果を受け、ALPHA-ENDOSULFINE が細胞外シグナルを受け取り、細胞分裂を制御している受容分である可能性を検証した。ALPHA-ENDOSULFINE にはチロシン残基が 4 つ存在するが、その中でも中央領域に存在する Y64 と Y70 が生物種を通じて保存されており、かつ細胞内でのリン酸化が報告されていた。しかし、当時このリン酸化の機能は全くの不明であった。これに対し、特に Y70 周辺配列が受容体型チロシンキナーゼの 1 つである EGF 受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor) に基質認識配列に合致したことから、EGF 受容体を用いて ALPHA-ENDOSULFINE を試験管内でリン酸化した。その結果、EGF 受容体は ALPHA-ENDOSULFINE タンパク質をリン酸化することが明らかになった (図 4)。他のチロシン残基周辺の配列を考慮すると、Y70 が EGF 受容体の標的であると思われる。同様の解析からさらに Syk キナーゼ (Spleen tyrosine kinase) 等も ALPHA-ENDOSULFINE をリン酸化する候補に挙げた。これらの結果は、ALPHA-ENDOSULFINE が細胞外からの増殖シグナルを受容し、リン酸化バランスを変化させることによって細胞分裂を微調整する可能性を示したものである。ALPHA-ENDOSULFINE は細胞分裂以外にも生理的な機能が次々と報告されており、その重要性はますます高まっている。

図 4. 「ALPHA-ENDOSULFINE の Y70 のリン酸化と、それが S67 のリン酸化に及ぼす効果」



その後、さらなる ALPHA-ENDOSULFINE 中央領域の Y70 残基について更なる解析を行ったところ、Tyr70 残基はそれ自身が EGF 受容体や Syk キナーゼなどのチロシンキナーゼによってリン酸化される可能性と同時に、この残基が Greatwall キナーゼによる S67 残基のリン酸化に必要であることが実験から明らかになった。Y70 残基をアラニンに置換した ALPHA-ENDOSULFINE 変異タンパク質は、S67 残基のリン酸化効率が 1/3 程度に低下した。このことから Y70 残基がリン酸化された場合には、逆に S67 残基のリン酸化が亢進することも考えられる (図 4)。一方で S67 残基を挟んで反対側 (N 末端寄り) にある Y64 残基の置換変異は、S67 残基の Greatwall キナーゼによるリン酸化には正負ともに大きな影響を与えなかった。以上の結果は Y70 残基のリン酸化が S67 残基のリン酸化に細胞内でも影響を及ぼす可能性を示唆しており、細胞の増殖開始シグナルが分裂期の制御にも何らかの形で関わっているのかもしれない。その中で ALPHA-ENDOSULFINE タンパク質は複数残基のリン酸化によって制御されることによって、その両者の接点となる分子なのかもしれない。これまでに細胞周期制御因子の中でチロシン残基がリン酸化されているものはごく限られており、ALPHA-ENDOSULFINE のチロシン残基のリン酸化は非常に珍しく、それだけに重要なものと考えられる。

これらの結果は脱リン酸化酵素が、これまで考えられていたよりも多様、かつ動的な制御を受けつつ、細胞内の様々な局面で機能し得ることを示したものであり、今後更なる発展が期待できる。

## 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 2 件)

### (1) 持田 悟

学研メディカル秀潤社 **細胞工学** (細胞分裂 131 年目の真実 ~ キナーゼ と ホスファターゼ の関係による細胞周期制御 ~) (Cell cycle control by a cooperation of protein kinase and phosphatase) 査

読なし (2013年) 32, pp309-313

( 2 ) Rivera T., Gheniou C.,  
Rodriguez-Corsino M., Mochida S.,  
Funabiki H. and Losada A. “Xenopus  
Shugosin 2 regulates the spindle assembly  
pathway mediated by the chromosomal  
passenger complex”  
**EMBO Journal**, 査読あり (2012年) 31,  
1467-1479  
DOI : 10.1038/ emboj.2012.4

[学会発表] (計2件)

(1) 持田 悟

「リン酸化/脱リン酸化酵素間にある 協調  
的な活性制御」第6回日本プロテインフォ  
スファターゼ研究会学術集会 2014年02月  
20日 三重大学医学部看護棟

(2) 持田悟

「Changing the balance of protein kinase  
and phosphatase for the cell cycle  
control」日本分子生物学会年会 2011年12  
月15日 パシフィコ横浜(横浜)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://cellcyclecontrol.jp>

アウトリーチ

大学祭にて一般向け研究紹介ポスターの展  
示

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

持田 悟 (MOCHIDA, Satoru)

熊本大学・大学院先端機構・特任助教

研究者番号：60590304

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号：