

科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年 5 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19057006

研究課題名（和文） 初期発生における正及び負の細胞周期制御の研究

研究課題名（英文） Positive and negative controls of the cell cycle in early development

研究代表者

佐方 功幸 (SAGATA NORIYUKI)

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：80142024

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では主にアフリカツメガエル卵を用いて、初期発生過程における様々な正および負の細胞周期制御因子の発現や機能制御に関して詳細な研究を行った。その結果、未受精卵の分裂停止で重要な機能を果たす Emi2 タンパク質の活性が様々なリン酸化酵素や脱リン酸化酵素によって制御されていることを明らかにした。また、神経形成や形態形成が FoxM1、Wee1、Chk1、Cdc25B などの様々な細胞周期制御因子によって巧妙に制御されていることなどを示した。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we have studied the detailed mechanisms of both positive and negative controls of the cell cycle during early development of the amphibian *Xenopus*. We showed that the activity of Emi2, an meiotic inhibitor in unfertilized egg, is finely regulated by both various kinases and phosphatases. Furthermore, we demonstrated that neurogenesis and morphogenesis in early embryos are regulated by various cell-cycle regulators, such as FoxM1, Wee1, Chk1 and Cdc25A. Thus, our results revealed the important roles of various cell cycle regulators in early development of *Xenopus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,700,000	0	11,700,000
2008年度	19,500,000	0	19,500,000
2009年度	35,100,000	0	35,100,000
2010年度	40,600,000	0	40,600,000
2011年度	34,600,000	0	34,600,000
総計	141,500,000	0	141,500,000

研究分野：分子発生細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ツメガエル、初期発生、細胞分化、タンパク質、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

初期発生における細胞周期の様式は体細胞のそれと著しく異なっている。そして、初期発生の正および負の細胞周期制御は、細胞

分裂のみならず、細胞分化や形態形成にも密接に関係している。従って、初期発生過程を細胞周期の制御の観点からとらえることの意義は大きい。しかし、初期発生と細胞周期

制御の分子レベルでの関係は未だ大きな謎に包まれていた。本研究では、これらの視点及び申請者のこれまでの研究成果を踏まえ、実験操作の点などで多くの利点を持つアフリカツメガエル（以下ツメガエル）の系を中心に、初期発生過程における正および負の細胞周期制御の研究を行った。

2. 研究の目的

初期発生において細胞の増殖・分裂と分化は相互に密接に関係している。従って、初期発生過程を細胞周期制御の観点からとらえることの意義は大きい。本研究では、分子生物学的知見や実験操作の点などで多くの利点を持つアフリカツメガエルの系を中心に、初期発生過程における正および負の細胞周期制御の研究を行った。具体的には、(1)卵成熟(減数分裂)における細胞周期制御、(2)受精・卵割における細胞周期制御、(3)中期胞胚遷移(MBT)および形態形成における細胞周期のリモデリング、において機能する様々な正および負の細胞周期制御因子の発現制御、機能・役割を解析した。また、分担研究として、ゼブラフィッシュの MBT における Cdk9 の活性制御等を検討した。

3. 研究の方法

平成 19 年度：(1)受精における Cdc25A の合成開始機構を、Cdc25A mRNA の非翻訳領域に作用するトランス・タンパク質の単離同定によって明らかにする；(2)ゼブラフィッシュ Cdk9 と複合体を作るサイクリン T の cDNA をクローン化する（分担研究）。

平成 20 年度：(1)卵割期における Plx1 の機能を Plx1 結合タンパク質との関係において生化学的に解析する；(2)MBT における ATR の活性化機構を卵割期における DNA 合成阻害等で生化学的に解析する；(3)受精卵における Cdk9 のキナーゼ活性を解析し、その制御因子群を単離する（分担研究）。

平成 21 年度：(1)MBT において、ATR/Chk1 経路の標的候補である Wee1/Myt1 の活性制御や役割を生化学的に解析する；(2)MBT 後の ATR/Chk1 経路の不活性化機構を DNA 複製関連因子の発現阻止等で解析する(3) Cdk9 活性制御と MBT の転写開始機構を分子レベルで解析する（分担研究）。

平成 22 年度：(1)MZT における正の胚性細胞周期因子（Cdc25B やサイクリン E2 など）の役割を生化学・細胞生物学的に解析する；(2)MZT における負の胚性細胞周期因子（Wee1B や CKI など）の役割を同様な手法で解析する；(3)引き続き、Cdk9 の活性制御と MBT の転写開始機構を解析する（分担研究）。

平成 23 年度：(1)上記正・負の胚性因子の胚部域・組織特異的発現を whole mount 法や共焦点イメージ解析法などで解析する；

(2)上記正・負の胚性因子の発現制御をそれぞれの転写因子の同定によって解析する；
(3) Cdk9 活性制御/MBT 転写開始に関連する因子の生化学的解析を行なう（分担研究）。

4. 研究成果

卵成熟の細胞周期制御

1. 卵の減数分裂周期の進行は、CPEB のユビキチン系に依存した分解により誘導される。今回、ツメガエル CPEB の N 末端に分解に関与するドメイン(TSG motif と命名)を同定した。また、リン酸化された TSG motif に SCF(β TrCP)ユビキチンリガーゼが結合することを示した。更に、TSG motif のキナーゼとして Plx1 を同定し、Plx1 が CPEB の分解に必須なことを示した。
2. 脊椎動物の未受精卵の Meta-II 停止には細胞分裂抑制因子(CSF)が関わっており、CSF は Mos-MAPK 経路と Emi2 から成るとされてきた。今回、ツメガエル卵の CSF では Mos-MAPK 経路下流の Rsk キナーゼが Emi2 を直接的にリン酸化することを見いだした。さらに、このリン酸化が Emi2 を安定化・活性化することで CSF 活性を示すことを明らかにした。
3. Rsk による Emi2 の安定化・活性化の分子機構を生化学的手法で詳細に解析した。これに先立ち、まず Emi2 の C 最末端(RL tail と命名)が APC/C(anaphase-promoting complex/cyclosome)と結合し、その活性を阻害することを示した。また、Cdk1-サイクリン B が Emi2 の N 末端をリン酸化し、そこに結合した Cdk1 自身や Plk1 が他の N 末端や RL tail を含むいくつかの部位をリン酸化し、Emi2 を不安定化・不活性化させることを見出した。そして、重要なことに Rsk によるリン酸化部位(S335/T336)には PP2A ホスファターゼが結合し、Cdk1 や Plk1 によるリン酸化に拮抗することで Emi2 を安定化・活性化させることを明らかにした。これらの結果から、Mos-MAPK 経路(Rsk/PP2A)による Emi2 の活性化・安定化がきわめて動的な制御—正の空回り制御—によっていることが判明した(図 1)。

受精と卵割の細胞周期制御

1. ツメガエル卵の受精における Cdc25A の翻訳開始機構を明らかにする目的で、Cdc25A mRNA の 3' UTR 領域に様々な変異を導入し、受精時における同 mRNA の翻訳を調べた。その結果、3' UTR に存在する 2 つの C/U に富んだ領域が翻訳開始に必須であることが分かった。また、この領域にトランスに働く因

子が存在することが示された。

2. 多機能キナーゼであるPlx1が受精に際して正の細胞周期因子Cdc25C及び負の因子Myt1と結合することを見出した。さらに、この結合とリン酸化によって、Cdc25Cが活性化される一方、Myt1が不活性化され、卵割期における早いCdc2の活性化が可能になることが示された。

MBTとその後の細胞周期制御

1. 卵割期におけるATRキナーゼ活性がDNA合成阻害、過剰核の存在、(MBTでのDNAと同量の)プラスミドの導入によって上昇することから、MBTがDNA複製チェックポイントによることを直接的に示した。また、過剰(未複製)DNAにATRが結合し、活性化されることを示した。
2. MBTでは、Cdc25A以外にWee1/Myt1キナーゼもATR/Chk1経路の標的になる可能性がある。実際、Chk1はin vivo 及びin vitroでWee1(母性Wee1A)のC末端をリン酸化し、その活性を阻害することで、MBTでの細胞周期伸長に関与することが示された。
3. Cdc25BやサイクリンE2がMBT直後から発現されることを見出した。そこで、これらの正の(胚性)細胞周期因子の発現をモルフォリーノオリゴやsiRNA法で阻害し、これらが原腸胚期後での細胞周期リモデリングで機能することを示した。一方、胚性型Wee1(WEE1B)やCKIの一種が原腸胚期に発現することを見出した。そして、これらの負の(胚性)細胞周期因子の発現をモルフォリーノオリゴ/siRNA法で阻害し、それらが脊索等の形成に関与することを示した。
4. 哺乳動物細胞でG2/M転移に重要とされる転写因子(FoxM1)のツメガエル胚発生における役割を分子生物学・発生学的手法で解析した。その結果、FoxM1がMBT後のCdc25B、サイクリンB1などG2/M制御因子の発現に必須であることを見出した。さらに、FoxM1がこれらの細胞周期制御因子の発現を介して神経分化のために重要な役割を果たすことを示した(図2)。

5. Cdc25には新規Cdc25Dが存在し、肝臓原基などに発現することを見出した。また、細胞運命決定に重要なNotchがCdk2などによって負に制御され、神経分化に関与することを示した。

分担研究(ゼブラフィッシュのMBTとCdk9)

1. ゼブラフィッシュのMBTにおけるCdk9の活性制御を検討する目的で、発現抑制のためのモルフォリーノオリゴ微小注入で受精直後の卵を処理した。その結果、MBTで転写される少なくとも5つの遺伝子に転写異

常在が検出され、同時にCdk9キナーゼの標的であるRNAポリメラーゼIIのリン酸化が抑制されていることを示した。

2. Cdk9タンパク質は中期胞胚遷移(MBT)頃までは胚に一定量存在しその後増加し始めるが、それは母性mRNAのpoly(A)鎖伸長で翻訳反応が促進されることにより生じ、胚性転写に依存するものではないことを明らかにした。
3. mRNAのpoly(A)鎖伸長を阻害することで翻訳効率を低下させることが可能な、モルフォリーノオリゴヌクレオチドを用いた新規アンチセンス法を開発した。

以上、本研究によってツメガエル初期発生における細胞周期制御の詳細な分子機構が明らかになった。これらの成果は本分野に大きなインパクトを持つものであり、また本分野の更なる進展のフレームワークになるものである。

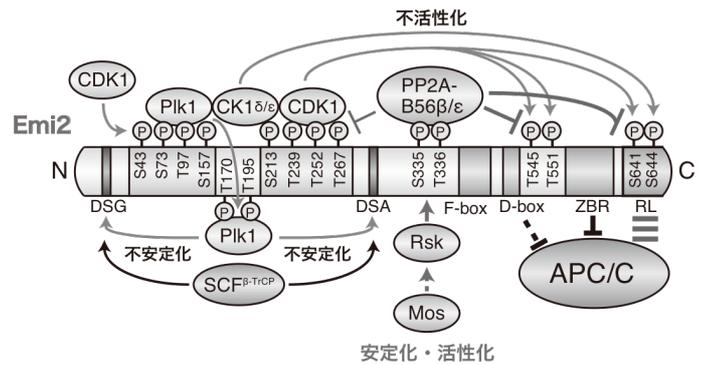


図1 ツメガエル未受精卵におけるEmi2制御の分子機構

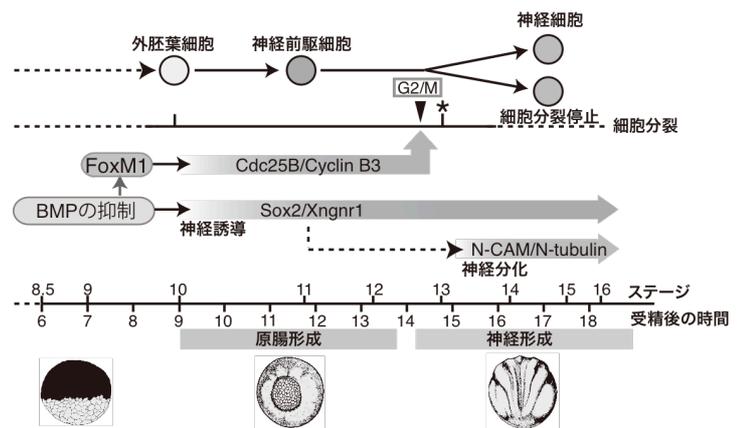


図2 ツメガエル胚における細胞分裂と神経分化の関係

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 18 件)

- ① 磯田道孝、迫洗佑、鈴木和広、西野一明、中條信成、大江宗理、江崎孝則、兼森芳紀、井上大悟、上野裕之、佐方功幸、Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs、Dev. Cell、査読有、Vol. 21、2011、506-519
- ② 中條信成、井上大悟、上野裕之、剣持千尋、志牟田健、佐方功幸、Temporal and spatial expression patterns of Cdc25 phosphatase isoforms during early *Xenopus* development、Int. J. Dev. Biol.、査読有、Vol. 55、2011、627-632
- ③ 種田拓也、Zhu Wenyuan、Cao Qingfu、渡辺肇、山口雄輝、半田宏、和田忠土、Erythropoiesis is regulated by the transcription elongation factor Foggy/Spt5 through gata1 gene regulation、Genes Cells、査読有、Vol. 16、2011、231-242
- ④ 大江宗理、河村嘉子、上野裕之、井上大悟、兼森芳紀、妹尾千春、磯田道孝、中條信成、佐方功幸、Emi2 inhibition of the APC/C absolutely requires Emi2 binding via the C-terminal RL tail、Mol. Biol. Cell、査読有、Vol. 21、2010、905-913
- ⑤ 和田忠土、半田宏、山口雄輝、Evidence that cleavage factor Im is a heterotetrameric protein complex controlling alternative polyadenylation、Genes Cells、査読有、Vol. 15、2010、1003-1013
- ⑥ 磯田道孝、兼森芳紀、中條信成、内田早苗、山下克美、上野裕之、佐方功幸、The Extracellular Signal-regulated Kinase - Mitogen-activated Protein Kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF-TrCP-dependent degradation for cell-cycle arrest、Mol. Biol. Cell、査読有、Vol. 20、2009、2186-2195
- ⑦ 上野裕之、中條信成、渡辺稔、磯田道孝、佐方功幸、FoxM1-driven cell division is required for neuronal differentiation in early *Xenopus* embryos、Development、査読有、Vol. 135、2008、2023-2030
- ⑧ 安藤梢、平尾聡、加部泰明、小倉裕次、佐藤巖、山口雄輝、半田宏、和田忠土、A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity、Nucleic Acids Res.、査読有、Vol. 36、2008、4327-4336

- ⑨ 瀬戸山大樹、山下正兼、佐方功幸、Mechanism of degradation of CPEB during *Xenopus* oocyte maturation、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、査読有、Vol. 104、2007、18001-18006
- ⑩ 井上大悟、大江宗理、兼森芳紀、信井俊哉、佐方功幸、A direct link of the Mos- MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs、Nature、査読有、Vol. 446、2007、1100-1104
- ⑪ 岡本健吾、佐方功幸、Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase Wee1 at M phase、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、査読有、Vol. 104、2007、3753-3758
- ⑫ 大江宗理、井上大悟、兼森芳紀、佐方功幸、Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes、Dev. Biol.、査読有、Vol. 303、2007、157-164

[学会発表] (計 45 件)

- ① 磯田道孝、佐方功幸、Dynamic regulation of the APC/C inhibitor Emi2/Erp1 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs、特定領域「細胞周期フロンティア増殖と分化関連」国際シンポジウム、2011年6月29日～7月1日、箱根
- ② 磯田道孝、迫洗佑、鈴木和広、西野一明、江崎敬則、佐方功幸、CyclinB/Cdk1 に依る Emi2 の不活性化機構の解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日～10日、神戸ポートアイランド
- ③ 大江宗理、河村嘉子、佐方功幸、Inhibition mechanism of the APC/C by Emi2/Erp1、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日～12日、パシフィコ横浜
- ④ 上野裕之、中條信成、渡部稔、磯田道孝、佐方功幸、FoxM1-driven cell division is required for neuronal differentiation in early *Xenopus* embryos、第41回日本発生生物学会、2008年5月28日～30日、徳島
- ⑤ 井上大悟・大江宗理・兼森芳紀・信井俊哉・佐方功幸、The Mos-MAPK pathway upregulates Erp1/Emi2 for Meta-II arrest in *Xenopus* eggs、International Workshop/Oocyte Maturation and the cell cycle、2008年3月5～7日、京都

[図書] (計 18 件)

- ① 佐方功幸、京都大学学術出版会、卵子減数

- 分裂の分子機構「卵子学」(森崇英編)、2011、301-311
- ② 磯田道孝、迫洗佑、佐方功幸、羊土社、実験医学「脊椎動物未受精卵の分裂停止因子Emi2の制御メカニズム」、2011、Vol. 29、3132-3126
 - ③ 佐方功幸、稲垣昌樹、共立出版、細胞周期研究の現状と展望。「細胞周期フロンティア」(佐方功幸、稲垣昌樹、岸本健雄編)、2010、248-250
 - ④ 大江宗理、河村嘉子、磯田道孝、佐方功幸、共立出版、Mos-MAPK-Emi2経路による脊椎動物卵の減数分裂周期制御。「細胞周期フロンティア」(佐方功幸、稲垣昌樹、岸本健雄編)、2010、155-160
 - ⑤ 佐方功幸、南山堂、細胞周期と細胞分裂。「医学のための細胞生物学」(永田和宏・塩田浩平編)2009、144-154
 - ⑥ 佐方功幸、秀潤社、細胞工学 Cell Tech LETTER「私の Mos 研究の起承転結」、2009、Vol. 28、27-28
 - ⑦ 上野裕之、中條信成、佐方功幸、秀潤社、細胞工学「FoxM1 はツメガエル神経前駆細胞の分裂と分化に必須である」、2008、Vol. 27、804-805
 - ⑧ 井上大悟、大江宗理、佐方功幸、秀潤社、細胞工学「ツメガエル未受精卵における第二減数分裂中期停止の機構解明」、2007、Vol.26、924-926

[その他]

ホームページ：

http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~hassai/hassei_top_index.html

2011年8月に Dev. Cell の研究成果が毎日新聞、西日本新聞等で報道された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐方 功幸 (SAGATA NORIYUKI)

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：80142024

(2) 研究分担者

和田 忠士 (WADA TADASHI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：60262309