

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370083

研究課題名(和文) Cdk1リン酸化モチーフ(S/T-P)のM期制御における役割の解明

研究課題名(英文) Study of the roles of Ser/Thr-Pro consensus motifs for Cdk1 in mitotic regulation

研究代表者

佐方 功幸(Sagata, Noriyuki)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80142024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、Cdk1の新規「非S/TPモチーフ」のコンセンサス配列を同定し、そのリン酸化と古典的S/TPモチーフのリン酸化との関係を明らかにした。また、複数のM期キナーゼとS/TPモチーフの結合の一般性、及びそれらの結合様式を見出した。さらに、S/TPモチーフへの各M期キナーゼの結合による協調的M期制御を示した。結果として、本研究でCdk1がM期のマスター制御因子として機能する分子基盤の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, first we identified the consensus sequence of the novel phosphorylation motif (non-S/TP motif) of Cdk1 and clarified the relationship between Cdk1 phosphorylations of the non-S/TP motif and the classical S/TP motif. Furthermore, we showed the binding of multiple M phase kinases to the S/TP motif and also the mode of the bindings. Moreover, we demonstrated the concerted regulation of the M phase by binding of the multiple M phase kinases to the S/TP motif. Thus, our study showed the molecular basis of the mechanism by which Cdk1 functions as the master M phase kinase.

研究分野：生物学

キーワード：細胞周期 M期 Cdk1キナーゼ リン酸化モチーフ ツメガエル卵

1. 研究開始当初の背景

真核生物の体細胞周期は G1、S、G2、M 期の 4 つの相より成る。M 期(分裂期)は、染色体凝縮、紡錘体形成、染色体分離など劇的な形態変化を伴う時期であり、Cdk1-サイクリン B 複合体(以下 Cdk1 と略記)が M 期の「マスター制御因子」とされている。しかし、M 期には他の重要な M 期キナーゼ (Plk1 や Aurora-A/B など)も存在し、なぜ Cdk1 のみが M 期の「マスターキナーゼ」として機能できるのかは分かっていない。

Cdk1 は基質タンパク質の Ser/Thr-Pro 配列(以下「S/TP モチーフ」)を特異的にリン酸化するとされている。しかし、Cdk1 はいくつかのタンパク質(ビメンチンやミオシン など)で Ser/Thr の +1 位に Pro を持たない配列(以下、「非 S/TP モチーフ」と呼ぶ)をリン酸化することが旧来示されている。また、最近の M 期リン酸化タンパク質のプロテオソーム解析から非 S/TP モチーフが何らかの“コンセンサス”配列を形成している可能性がある。これらのことから、S/TP モチーフと非 S/TP モチーフとの関係の解析は、Cdk1 の機能の解明に非常に重要と考えられる。

我々は最近、ツメガエルの卵母細胞や初期胚を用いて、Emi2(別称 Erp1; APC/C コピキチンリガーゼの阻害因子)の Cdk1 による機能制御に関して以下の発見をした。すなわち、1)Emi2 には 8 個の S/TP モチーフが存在し、Cdk1 によってリン酸化される。2)これらの S/TP モチーフには Cdk1 自身、Plk1、CK1 の 3 つの M 期キナーゼが「直接的に結合」する。3)結合した Cdk1 と CK1 は Emi2 の C 末端をリン酸化し、Emi2 を不活性かさせる。4)C 末端の Cdk1 リン酸化部位は「非 S/TP モチーフ」である。これらの結果から、Emi2 においては、リン酸化された S/TP モチーフに(Cdk1 を含む)複数の M 期キナーゼが「直接結合」すること、結合した Cdk1 が「非 S/TP モチーフ」をリン酸化できることを示した。

以上の研究背景から、我々は、一般的に Cdk1 が古典的な S/TP モチーフの他に新規の「非 S/TP モチーフ」をリン酸化すると考えた。また、S/TP モチーフが(Cdk1 を含む)複数種の M 期キナーゼの「共通基質認識(結合)部位」として機能すると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究背景・動機の下に、次の 3 つの事項を明らかにすることを目的とした。

(1)Cdk1 の「非 S/TP モチーフ」のコンセンサス配列の決定と S/TP モチーフとの関係

Emi2 や他のタンパク質の非 S/TP モチーフやペプチドライブラリーを用いて、同モチーフの Cdk1 リン酸化のコンセンサス配列を決定する。また、このモチーフと S/TP モチーフの Cdk1 によるリン酸化の度合いや相互依存性等を *in vitro*、*in vivo* で検証する。

(2)S/TP モチーフへの M 期キナーゼの結合とその様式

S/TP モチーフを多重に持つ重要な Cdk1 の基質(Wee1、Cdc25 など)と結合する M 期キナーゼを同定し、それぞれの結合 S/TP モチーフを特定する。更に、各 M 期キナーゼと S/TP モチーフを介して結合する他の M 期タンパク質を同定する。加えて、各々の M 期キナーゼの最適結合 S/TP モチーフ配列を決定する。

(3)S/TP モチーフへの多重な M 期キナーゼの結合による「協調的 M 期制御」

各 M 期キナーゼと S/TP モチーフとの結合を特異的に阻害し、各 M 期現象への影響を調べる。更に、各 M 期キナーゼと S/TP モチーフとの結合を同時に阻害し、S/TP モチーフへの結合(すなわち、Cdk1 の機能)を介した M 期キナーゼによる協調的な M 期の制御を検証する。

以上の研究で、Cdk1 が M 期の「マスター制御因子」として働く分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

上記「研究目的」に沿って以下の方法で研究を行った。

(1)Cdk1 の非 S/TP モチーフのコンセンサス配列の決定と S/TP モチーフとの関係の解析

ビメンチンやデスミンなどの既知の非 S/TP モチーフと GST との融合タンパク質を作成後、Cdk1 での *in vitro* キナーゼアッセイを行い、非 S/TP モチーフの特徴を検討した。

非 S/TP モチーフのコンセンサス配列をより組織的に解析・同定するために、上記の結果を元に位置走査ペプチドライブラリーを作成し、Cdk1 での *in vitro* キナーゼアッセイを行なった。

非 S/TP モチーフと S/TP モチーフの Cdk1 によるリン酸化の度合いを上記ペプチドライブラリーの *in vitro* キナーゼアッセイで比較した。

Cdk1 による非 S/TP モチーフと S/TP モチーフのリン酸化の相互依存性をツメガエル卵抽出液を用いて解析した。

(2)S/TP モチーフへの「M 期キナーゼ」の結合とその様式の解析

Emi2 の S/TP モチーフに結合する Cdk1/Plk1/CK1 以外の M 期キナーゼを、ツメガエル卵抽出液を用いて免疫沈降法や質量分析法(MS)などで解析した。

S/TP モチーフを多重に持つ Cdk1 の重要な基質(Wee1 や Cdc25)と結合する M 期キナーゼをツメガエル卵抽出液と免疫沈降法で解析した。また逆に、M 期キナーゼと結合する(S/TP モチーフを多重に持つ)M 期タンパク質を MS で網羅的に解析した。

各 M 期キナーゼの結合する最適 S/TP モチーフを各基質の S/TP モチーフ配列の比較や

変異導入 S/TP モチーフを用いて解析した。

(3)S/TP モチーフへの多重な M 期キナーゼの結合による「協調的 M 期制御」の解析

Cdk1 基質の S/TP モチーフに結合する M 期キナーゼが他の部位をリン酸化出来るか否かを、S/TP AP 変異体のツメガエル卵・HeLa 細胞での発現や MS 等によって解析した。

各 M 期キナーゼの最適結合 S/TP モチーフペプチドをツメガエル卵・HeLa 細胞に過剰導入し、各々の諸 M 期現象への影響を細胞生物学的に解析した。

上記の S/TP モチーフペプチドの混合物および(Cdk1 を含む)M 期キナーゼと S/TP モチーフの結合の一般的阻害剤(MPM-2 抗体など)の諸 M 期現象への影響を比較した。

4. 研究成果

上記「研究の目的」および「研究の方法」に沿って以下の成果を得た。

(1)Cdk1 の「非 S/TP モチーフ」のコンセンサス配列の決定と S/TP モチーフの関係

ビメンチン、ミオシン、デスミン、Emi2 などの *in vitro* での Cdk1 によるリン酸化部位を詳細に解析し、これらのリン酸化部位(S/T)が共通して+2,3 位にアルギニン/リジン(K/R)を持つ非 S/TP モチーフを形成していることを明らかにした。

上記の結果をより一般的にするために、位置走査志向ペプチドライブラリーを用いて Cdk1 による *in vitro* キナーゼアッセイを行った。結果として、Cdk1 による非 S/TP モチーフのコンセンサス配列として最も簡単な配列 S/T-X-X-K/R(X は任意のアミノ酸)およびより適切な配列 P-X-S/T-X-[K/R]₂₋₅ を同定した。

Cdk1 による S/TP モチーフと非 S/TP モチーフのリン酸化の度合いを比較した。結果として、下流に多くの K/R を持つ非 S/TP モチーフ(S/T-X-[K/R]_{4,5})は一般の S/TP モチーフよりも強く Cdk1 によってリン酸化されることが判明した。また、非 S/TP モチーフ P-X-S/T-X-[K/R]₅ は最適 S/TP モチーフ S/T-P-X-K/R よりも強くリン酸化されることが判明した(図 1)。

ツメガエル卵抽出液を用いて、Emi2 や Wee1 などの多重な S/TP モチーフへの Cdk1 の結合が同タンパク質に存在する非 S/TP モチーフのリン酸化に必要なことが示された。

以上の結果から、Cdk1 の非 S/TP モチーフのコンセンサス配列が同定され、そのリン酸化と S/TP モチーフのリン酸化との関係も明らかになった。

(2)S/TP モチーフへの M 期キナーゼの結合とその様式

これまでツメガエル卵抽出液を用いて、Emi2 の S/TP モチーフに Cdk1、PIk1、CK1 の諸 M 期キナーゼが結合することを示してきた

が、今回更に他の M 期キナーゼ(Chk1 および CaMK)が Emi2 の S/TP モチーフに有意に結合することを見出した。

ツメガエル卵抽出液を用いて、Cdk1 の重要な基質である Cdk1 活性化因子(Cdc25)および Cdk1 不活性化因子(Wee1)の N 末端調節領域に存在する S/TP モチーフが Cdk1 自身に強く結合する一方、他の M 期キナーゼ(PIk1 と Chk1)に弱く結合することを見出した。また、Cdc25、Wee1 以外に、S/TP モチーフを多重に持つ M 期タンパク質である Cdc27(APC/C の構成因子の 1 つ)やコンデンシン が S/TP モチーフを介して Cdk1 および PIk1 と有意に結合することが示された。すなわち、少なくとも Cdk1 と PIk1 が少なくとも 4 種の M 期タンパク質の S/TP モチーフに結合することが示された。

これまで Emi2 で示されたように、各種 M 期キナーゼ(Cdk1、PIk1 および Chk1)の結合する最適 S/TP モチーフ配列は必ずしも同一ではなく、Cdk1 では塩基性アミノ酸、PIk1/Chk1 では疎水性アミノ酸が S/TP モチーフに隣接することが示された。

以上の結果から、複数の M 期キナーゼと S/TP モチーフの結合の一般性、及びそれらの結合様式が明らかにされた。

(3)S/TP モチーフへの多重な M 期キナーゼの結合による「協調的 M 期制御」

Wee1 や Cdc25 の S/TP モチーフに結合する M 期キナーゼ(Cdk1 や PIk1)がそれぞれの基質の他の部位をリン酸化できるかを、ツメガエル卵・HeLa 細胞、S/TP AP 変異体および MS を用いて解析した。その結果、Cdk1、PIk1 が共に Wee1 と Cdc25 の他の部位をリン酸化することが判明した。また、Cdk1 の場合、そのリン酸化部位が非 S/TP モチーフであることが示された。

Cdk1、PIk1、Chk1 の最適結合 S/TP モチーフペプチドをそれぞれツメガエル卵あるいは HeLa 細胞に過剰導入し、諸 M 期現象への影響を細胞生物学的に解析した。その結果、Cdk1 の S/TP モチーフペプチドでは M 期進入自身(染色体凝縮や核膜崩壊)が阻害された。一方、PIk1 の S/TP モチーフペプチドでは M 期諸現象の大幅な阻害あるいは遅延が起こり、Chk1 の S/TP モチーフペプチドでは紡錘体形成の不全が見られた。

諸 M 期キナーゼと S/TP モチーフの結合の一般的阻害剤である MPM-2 抗体や Pin1 の導入によって、ツメガエル卵・HeLa 細胞での M 期進入が期待通り完全に阻害された。一方、PIk1 と Chk1 の最適結合 S/TP モチーフペプチドの混合物によっても同様な M 期進入の阻害が観察された。すなわち、Cdk1 の S/TP モチーフへの結合と PIk1/Chk1 などの M 期キナーゼの S/TP モチーフへの結合は機能的に類似することが示された。

以上の結果から、S/TP モチーフへの各 M 期キナーゼの結合による「協調的 M 期制御」の存在が示された。

以上、本研究によって、Cdk1 がいかにかして M 期のマスター制御因子として機能するのか、その分子的基盤の一端が明らかになった(図 2)。これらの成果は細胞生物学の分野に大きなインパクトを持つものであり、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。

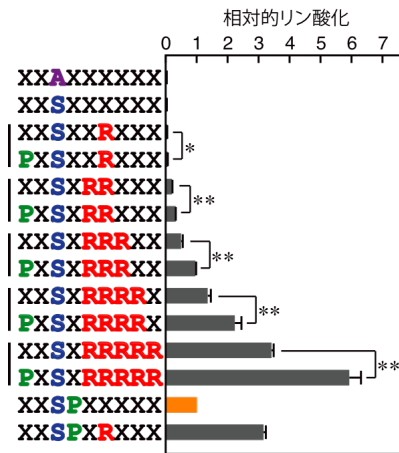


図 1 Cdk1 による非 S/TP モチーフのリン酸化

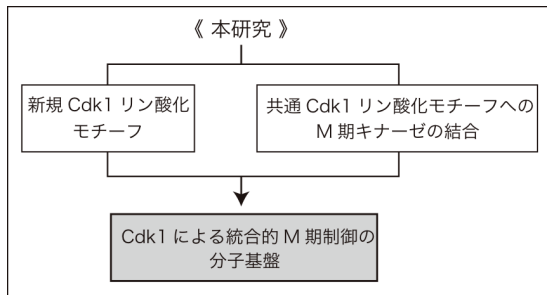


図 2 Cdk1 による統合的 M 期制御の機構

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)

鈴木 和広、迫 洗佑、秋山 和広、磯田 道孝、妹尾 千春、中條 信成、佐方 功幸、Identification of non-Ser/Thr-Pro consensus motifs for Cdk1 and their roles in mitotic regulation of C2H2 zinc finger proteins and Ect2, Sci. Rep., 査読有、Vol.5、2015、7929、DOI: 10.1038/srep07929

迫 洗佑、鈴木 和広、磯田 道孝、吉開 聡美、妹尾 千春、中條 信成、大江 宗理、佐方 功幸、Emi2 mediates meiotic MII arrest by competitively inhibiting the binding of Ube2S to the APC/C, Nat. Commun., 査読有、Vol.5、2014、3667、DOI: 10.1038/ncomms4667

[学会発表](計 8 件)

鈴木 和広、迫 洗佑、秋山 和広、磯田 道孝、妹尾 千春、中條 信成、佐方 功幸、Cdk1 の非 Ser/Thr-Pro コンセンサス配列の同定、及び C2H2 Zinc Finger タンパク質と Ect2 の同配列リン酸化による分裂期機能の制御、第 37 回日本分生学会年会、2014 年 11 月 25~27 日、パシフィコ横浜
迫 洗佑、鈴木 和広、磯田 道孝、大江 宗理、妹尾 千春、佐方 功幸、ツメガエル未受精卵の Meta- 停止: Emi2 による APC/C-Ube2S 結合の競合的阻害、第 36 回日本分生学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

鈴木 和広、迫 洗佑、村田 壮平、中條 信成、妹尾 千春、佐方 功幸、APC/C における Emi2 と Ube2S の結合サブユニットの解析、第 36 回日本分生学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

出野 結己、中條 信成、妹尾 千春、佐方 功幸、細胞周期依存的な Notch 細胞質内領域の分解、第 36 回日本分生学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

佐方 功幸、脊椎動物未受精卵の分裂停止: その研究小史と精巧な分子機構、第 7 回ツメガエル研究集会(招待講演)、2013 年 9 月 23 日~24 日、秋吉台国際芸術村

佐方 功幸、脊椎動物未受精卵の分裂停止機構、ライフサイエンス筑波研究センター研究連絡会(招待講演)、2013 年 5 月 11 日~12 日、理研・バイオリソースセンター
迫 洗佑、磯田道孝、村田 壮平、中條 信成、妹尾千春、佐方功幸、ツメガエル未受精卵での APC/C 制御における Emi2 と Ube2S の競合の解析、第 35 回日本分生学会年会、2012 年 12 月 11~14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

原野由衣、中條 信成、土田 奈々、長池 碧、妹尾千春、佐方功幸、APC/C 阻害因子 Emi1 の分解機構、第 35 回日本分生学会年会、2012 年 12 月 11~14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

[図書](計 5 件)

鈴木和広、迫 洗佑、佐方功幸、秀潤社、細胞工学「Cdk1 の非 Ser/Thr-Pro コンセンサス配列の同定と M 期の制御」、2015、印刷中

迫 洗佑、鈴木和広、磯田道孝、佐方功幸、羊土社、実験医学 vol.32 「脊椎動物未受精卵の分裂停止のメカニズム: Emi2 による APC/C-Ube2S 結合の競合阻害」、2014、2127-2130

佐方 功幸、医学書院、生体の科学「細胞周期学序説と卵減数分裂停止(下)」、2013、168-175

佐方 功幸、医学書院、生体の科学「細胞周期学序説と卵減数分裂停止(上)」、2013、72-79

佐方功幸、磯田道孝、迫 洗佑、鈴木和広、

妹尾千春、中條信成、羊土社、実験医学増刊「ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 2013」(中山敬一 編)「脊椎動物未受精卵の分裂停止-その研究小史と精巧な分子機構」、2013、24-32

〔その他〕

ホームページ：

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

2014年4月に Nat. Commun. の論文が読売新聞、毎日新聞等で報道された。また、2015年1月に Sci. Rep. の論文が Science Portal で紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐方 功幸 (SAGATA, NORIYUKI)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：80142024

(2) 連携研究者

中條 信成 (NAKAJO, NOBUSHIGE)

九州大学・理学研究院・講師

研究者番号：90294876