

研修成果

派遣者名;山田 亜夕美

研究題目;Hsl7 による G2/M 期制御機構の解析

派遣期間;2002 年4月1日～2003 年 3 月 31 日

研究機関名;Duke University Medical Center, Dept. of Pharmacology and Cancer Biology

研究指導者;Sally Kornbluth

Duke 大学医学センター、Sally Kornbluth 博士の主宰する研究室においてポスドクフェローとして、脊椎動物における細胞周期制御、特に、G2/M 期制御機構の解析を行っている。真核細胞の G2/M 期進行の中心を担う Cdc2/サイクリン B 複合体は、G2 期には Wee1、Myt1 によりリン酸化を受け不活性化されているが、M 期移行に伴い Cdc25 による脱リン酸化により活性化される。しかしこれらの Cdc2/サイクリン B 制御に関わる因子が受ける活性制御の分子機構は未解明である。Wee1 蛋白質は、G2 から M 期の移行に伴い、高リン酸化を受け、その後、SFC プロテアソーム分解系により分解されることが、これまでに報告されている。さらに、DNA 複製阻害などによりチェックポイント機構が活性化されると、Wee1 分解は阻害され、M 期への進行を抑制することが知られている。しかしながら、その制御機構については明らかではない。これまでに共同研究者である Daniel Lew 博士の研究室において、出芽酵母の Wee1 の分解を制御する因子として Hsl7 が単離されている。ヒトにおいても、Hsl7 のホモログが単離されているが、その細胞周期における機能は不明である。さらに、このヒトホモログは mRNA スプライシングへの関与が報告されていることから、ヒト培養細胞を用いた系では、Hsl7 の細胞周期における機能のみを解析することは困難である。これに対し、アフリカツメガエル卵より調製した抽出液では、細胞周期を試験管内で再構築できるだけでなく、転写、スプライシングが不活性化されていることから、Hsl7 の細胞周期における機能解析には最も適していると考えられる。そこで、私は、アフリカツメガエルを実験系として、脊椎動物の Hsl7 の細胞周期における機能、特に Wee1 蛋白質の活性、もしくは分解制御における機能解明を目指し、以下の実験を行った。まず Hsl7 のアフリカツメガエルホモログを単離し、卵細胞抽出液中で Hsl7 が Wee1 と結合していることを明らかにした。さらに Hsl7 蛋白質を卵抽出液に加えることにより、Cdc2/サイクリン B 複合体が活性化

され、G2 期から M 期への進行が促進される結果を得た。これらの結果は脊椎動物においても Hsl7 が Wee1 を介して細胞周期を制御している可能性を強く支持している。さらにこの M 期への進行の促進は核構造の存在下でのみ見られた。この Hsl7 による細胞周期制御が、Wee1 を介したものでどうか解析するために、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた注入実験を行った。卵母細胞内には Wee1 は発現していないが、Wee1 を注入すると卵成熟に遅延が見られる。この時、Wee1 と共に Hsl7 を注入すると Wee1 による遅延が回避された。この結果から、Hsl7 の細胞周期における機能は Wee1 を介したものであると考えられる。続いて Hsl7 による Wee1 を介した細胞周期制御が、Wee1 の活性制御によるものか、もしくは Wee1 の分解制御によるものなのかを検討を行った。出芽酵母において、Hsl7 は Wee1 の分解を制御していることが示されていることから、まずは分解制御に着目し、卵母細胞を用いて解析を行った。卵母細胞に放射性同位体を用いてラベルした Wee1 蛋白質を注入し、その半減期を測定したところ、Hsl7 を強発現させた卵母細胞では、コントロールに比べ、Wee1 の消失が促進されていた。さらに興味深いことに Hsl7 は核内に存在する Wee1 の消失のみを促進していた。これは前述の試験管内の実験において Hsl7 の機能に核構造が必要であるという結果と一致する。この核内からの Wee1 の消失が、核外輸送によるものなのか、分解を促進した結果によるものかを明らかにするために、同様の実験を、核外輸送を阻害する薬剤(レプトマイシン B)存在下において行った。その結果、薬剤存在下においても、Hsl7 は核内の Wee1 の消失を促進したところから、Hsl7 は Wee1 の核内における分解を制御していることが強く示唆された。ところで、前述の通り Wee1 分解系はチェックポイント系において制御されていることが示されている。そこで、Hsl7 が細胞周期だけでなくチェックポイント経路にも関わっているかどうか検討した。DNA 複製ポリメラーゼ阻害剤であるアフィジコリンを加え、DNA 複製チェックポイントを活性化させた卵抽出液では、G2 から M 期への移行に遅延が見られるが、ここに Hsl7 を過剰に加えると、複製チェックポイントを乗り越えた M 期への進行が見られた。さらに、卵抽出液内における Wee1 と Hsl7 の結合を詳細に解析したところ、この結合には核構造が必要であり、DNA 複製チェックポイントの活性化により、結合が阻害された。

以上の結果、私は、脊椎動物の Hsl7 は G2/M 期進行に伴い、核内に存在する Wee1 の分解を促進することにより、細胞周期を正に制御する因子であることを明らかにした。またこの経路はチェックポイント機構による制御を受けていることも示した。現在、この Hsl7 がどのように核内 Wee1 の分解制御を行っているのか、その分子機構について研究を続けている。

以上の結果を The Journal of Cell Biology に2004年末に発表した。

DNA Replication checkpoint control of Wee1 stability by vertebrate Hsl7

Ayumi Yamada, Brad Duffy, Jeniffer A. Perry, and Sally Kornbluth

The Journal of Cell Biology, Vol. 167, No. 5, Dec. 6, 2004, 841–849