

氏名	本多 玲子
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第142号
学位授与の日付	平成7年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	G ₂ /M期におけるcdc2キナーゼ活性を制御する因子の解析 (Regulation of mammalian p34 ^{cdc2} kinase at G ₂ /M phase.)
論文審査委員	(主査) 大場 義樹 (副査) 中西 義信, 二階堂 修 山口 和男, 安田 秀世

学位論文要旨

Summary The cdc2 kinase activity is regulated by its phosphorylation and dephosphorylation. In mammalian cells, phosphorylation of cdc2 kinase at 14-Thr and 15-Tyr residues inhibits the activity. At the onset of mitosis, cdc2 kinase becomes dephosphorylated at 14-Thr and 15-Tyr, resulting in activation. The enzymes which phosphorylate or dephosphorylate the enzyme must play very important roles on the regulation of the activity of cdc2 kinase and of cell cycle progression. In this study, I tried to identify these enzymes and then to clarify the mechanism of the regulation of the identified enzymes.

First, I showed that human cdc25B phosphatase expressed in *E.coli* dephosphorylated both 14-Thr and 15-Tyr residues of cdc2 kinase to activate it. That is, cdc25B phosphatase is a dual specific phosphatase, specific for cdc2 kinase molecule. Second, I showed that the human weel kinase phosphorylated the 15-Tyr residue, not 14-Thr. Then I isolated the murine weel kinase cDNA which was 1.5 fold longer than the human weel cDNA was. The murine weel kinase had regulatory and catalytic domain in the N-terminal and C-terminal half, respectively. The regulatory domain was phosphorylated at mitosis and its kinase activity was inhibited. The kinase responsible for the inactivation of weel kinase remained to be elucidated, though cdc2/cyclin B kinase could phosphorylate the kinase. Further, as a weel kinase regulatory protein, I cloned the 14-3-3 protein by use of yeast two hybrid system. Since this protein has been reported to be the inhibitor of protein kinase C or the activator of the raf-1 kinase, whether it activates or inhibits the weel kinase is very interesting subject to be clarified in future.

cdc2 キナーゼは M 期で著しい活性上昇を示すが G₁期にはいるとすぐに不活性化される。このように cdc2 キナーゼは細胞周期の G₂期から M 期の一時期にのみ活性を生じる。このような活性の変動は cdc2 キナーゼ分子のリン酸化, 脱リン酸化とサイクリン B との結合, 分解によって制御されている可能性が高い。本研究では cdc2 キナーゼをリン酸化, 脱リン酸化する酵素の同定およびそれら酵素の活性制御機

構について解析を行った。

1. cdc2の磷酸化, 脱磷酸化

1-1 cdc2を脱磷酸化する酵素

G₂/M期における cdc2キナーゼの活性はN末から14番目のトレオニン残基 (¹⁴T) と15番目のチロシン残基 (¹⁵Y) での磷酸化, 脱磷酸化によって制御されている。細胞抽出液中で磷酸化された cdc2キナーゼは tryptic phosphopeptide mapping の結果によれば¹⁴T および¹⁵Y の両方か, またはどちらか一方が磷酸化されていた。これらの分子の混合物について H1 ヒストンに対する磷酸化活性を測定するとその活性はほとんどみられなかった。したがって, ¹⁴T または¹⁵Y のいずれかが磷酸化されれば cdc2 キナーゼの活性は抑制されると結論づけた。しかし, 逆に cdc2 キナーゼが活性化されるには両方の残基での脱磷酸化が必要であるということになる。これまでに cdc2 キナーゼの¹⁵Y の脱磷酸化は cdc25 フォスファターゼ (cdc25) によることが示されてきた。これに加え¹⁴T の脱磷酸化が必須であるならば, これは何によって制御されているのだろうか。¹⁴T および¹⁵Y の両方か, またはどちらか一方が磷酸化された分子の混合物に大腸菌で発現させた cdc25B を添加すると P-¹⁴T および P-¹⁵Y を含むスポットおよび P-¹⁵Y のみを含むスポット, P-¹⁴T のみを含むスポットのいずれもが消失した。したがって, cdc 25 B はチロシン残基のみならずトレオニン残基をも脱磷酸化する活性をもっていると結論づけた。このとき cdc25B で処理した分子が H1 ヒストンを磷酸化する活性は未処理の分子に比べ数十倍にも上昇していたことから, cdc2 キナーゼは¹⁴T および¹⁵Y の両方が脱磷酸化され, 活性化されることが確かめられた。そして, これを脱磷酸化する cdc 25 B はチロシンホスファターゼであるとともにトレオニンホスファターゼ活性を有する dual specific phosphatase であり, cdc2 キナーゼの脱磷酸化は cdc 25 という単一の分子によって制御されている可能性が示されたといえる。

1-2 cdc2を磷酸化する酵素

分裂酵母の遺伝学的研究から cdc2 キナーゼを磷酸化する酵素が weel キナーゼであることが示されていた。酵母 weel キナーゼは Ser / Tyr dual kinase であるので¹⁴T を磷酸化することが期待されたが, 実際は cdc2 キナーゼ分子の¹⁵Y のみを磷酸化することが報告されている。しかし, 酵母においては¹⁴T の磷酸化そのものが確認されていないことから, 酵母 weel キナーゼに¹⁴T を磷酸化する活性はないのかもしれない。それではヒトやマウスにおいてはどうかであろうか。大腸菌で発現したヒト weel キナーゼを用いてその活性を測定したところ, ヒト weel キナーゼは cdc2 キナーゼのチロシン残基を磷酸化するが, 酵母 weel キナーゼと異なり, tyrosine specific kinase である可能性が高いと考えられた。しかし, これまで単離されていたヒト weel キナーゼが酵母と比較して分子量が約2分の1であること, in frame に終始コドンをもたないことからこのヒト weel キナーゼが full length ではないと考えられたので, 新たにマウス weel キナーゼのクローニングを試みた。ヒト weel キナーゼの kinase domain VIII, IX, X に相当する配列をプローブに用いてスクリーニングを行いマウス weel キナーゼホモログを単離した (図1参照)。マウス weel キナーゼは全長2258 bp, 646個のアミノ酸からなり,

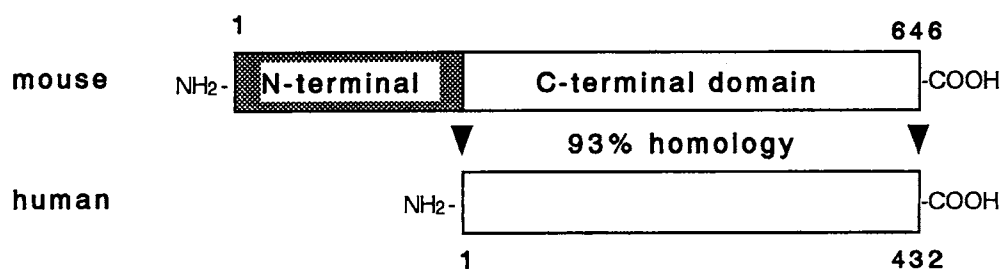


図1 マウス weel とヒト weel の比較

ヒト weel キナーゼの1.5倍の長さであった。マウスとヒトの配列を比較すると、マウス weel キナーゼの C 末側 3 分の 2 とヒト weel キナーゼはアミノ酸レベルで 93% の相同性があったが、残りの N 末側 3 分の 1 はマウスにのみ存在していた。しかし、この N 末側は種特異的に存在しているわけではなく、後になってマウス weel キナーゼと同じ長さをもつヒト weel キナーゼが単離された。このマウス weel キナーゼは N 末側に Ser / Pro または Thr / Pro という配列が多く存在することが特徴的であった。

バキュロウイルス系で発現したマウス weel キナーゼはヒトのものと同様 cdc2 キナーゼのチロシン残基のみをリン酸化したことから、マウス weel キナーゼもまた¹⁴T をリン酸化する活性を有しないことが明らかとなった。しかし、マウス weel キナーゼは自己リン酸化によってセリンをリン酸化するとともに、cdc2 キナーゼのチロシン残基をリン酸化することから、酵母同様 Ser / Tyr dual kinase であるといえた。おそらくヒト weel キナーゼも N 末側が存在すればセリン残基をリン酸化するのであろう。また、cdc2 キナーゼ非存在下、存在下での weel キナーゼのリン酸化の度合を比較すると cdc2 キナーゼ存在下で weel キナーゼのリン酸化が 10 倍近く増加することから、マウス weel キナーゼは cdc2 キナーゼによってリン酸化されたといえる。このリン酸化はセリン残基をリン酸化するものであった。このようにヒト、マウス、いずれの weel キナーゼも少なくとも *in vitro* で合成した蛋白質では¹⁴T をリン酸化する活性をもたないことが分かった。¹⁴T kinase は weel キナーゼと全く別に存在するのか、あるいはその活性には co-factor を必要とするのか、いずれにせよ現段階では不明である。

2. マウス weel kinase の活性制御

2-1 マウス weel のリン酸化と活性

哺乳類 cdc2 キナーゼの活性は cdc25 と weel キナーゼそして¹⁴T kinase の活性のバランスによって調節されているといえる。いいかえれば、cdc25、weel キナーゼそして¹⁴T kinase の各々の活性の制御が複雑に絡み合っているといえる。これまで cdc25 の活性は mRNA の発現によって制御されていると考えられていた。しかし、サイクリンによって活性化されるという報告や cdc2 キナーゼによるリン酸化で活性化されるという報告がなされ、細胞周期進行を制御する酵素の蛋白質量以外の活性制御が注目された。

そこで本研究においてマウス weel キナーゼの細胞周期での変化を調べたところ M 期でリン酸化されることが *in vivo*、*in vitro* で示された。*in vitro* においてこのリン酸化の一部は cdc2 キナーゼによることが示されたが、cdc2 キナーゼによってリン酸化された weel キナーゼと非リン酸化型の weel キナーゼでは活性に差はみられなかった。しかし、このリン酸化型 weel キナーゼを M 期の細胞抽出液中で incubation するとわずかではあるが SDS-PAGE 上の移動度が遅れ、cdc2 キナーゼ分子をリン酸化する活性が約 2 分の 1 に減少した。したがってマウス weel キナーゼの活性は cdc2 キナーゼによるリン酸化ではなく、別の M 期特異的なキナーゼによりリン酸化され抑制されると結論づけられた。しかしながら、cdc2 キナーゼによるリン酸化の意義について考えたとき、cdc2 キナーゼによってリン酸化された分子だけが阻害的リン酸化を受けるとも考えられるし、また cdc2 キナーゼによるリン酸化は蛋白質の安定化に寄与しているとも考えられる。

2-2 マウス weel 結合蛋白質の単離

このように、マウス weel キナーゼの活性を調節するひとつの因子はリン酸化であった。また cdc25 においてもリン酸化は重要な制御機構であることが報告されている。それではリン酸化のみが weel キナーゼの活性を制御しているのだろうか。最近になって酵母の two-hybrid system を用いてある特定の蛋白質に結合する蛋白質のクローニングが盛んに行われている。キナーゼもまたリン酸化する際に基質に結合する蛋白質であるので、weel キナーゼをリン酸化するキナーゼも含めて weel キナーゼに結合する蛋白質を two-hybrid system によって単離することを試みた。

Trp (-), Leu (-), His (-) の選択培地で生育した 812 クローンのうち 64 クローンが β -gal の assay

で陽性であった。このうち12クローンのシーケンスを行った結果、10クローンが同じ配列をもち、残り2クローンはそれぞれ別の配列を有していた。10クローンのうち1クローンについて全塩基配列を決定し、データベースとホモロジー検索を行ったところ、ラット14-3-3と99.6%のホモロジーが得られた。したがって、このクローンはマウス14-3-3とであるとされた。14-3-3という遺伝子は1994年の秋に Raf1-kinase の activator であることが報告され、signal transducerとして現在注目されているものである。したがってこの遺伝子が weel キナーゼの活性調節因子である可能性は高く、*in vitro* でこの14-3-3が weel キナーゼの活性に影響を与えるかどうか調べるのが急務であると考えられる。以上まとめると、今回のクローニングで weel キナーゼの activator 候補が単離されたと思われる。このような因子の発見は weel キナーゼがリン酸化以外の制御を受けているという事実だけではなく、細胞膜からの情報伝達がこのような物質を介して M 期の開始までつながるかもしれないという点に重要な意味があると思われる。また、この蛋白質の結合によって weel キナーゼの活性に変化が生じ¹⁴T kinase の活性を持つようになるという可能性も考えられる。さらには酵母において14-3-3が細胞周期の check point に機能しているという事実と、以前より報告されてきた weel キナーゼが DNA 合成の完了に関連しているということを考えあわせると、S 期から M 期へ至る経路が weel キナーゼと14-3-3によって説明されるかもしれない。

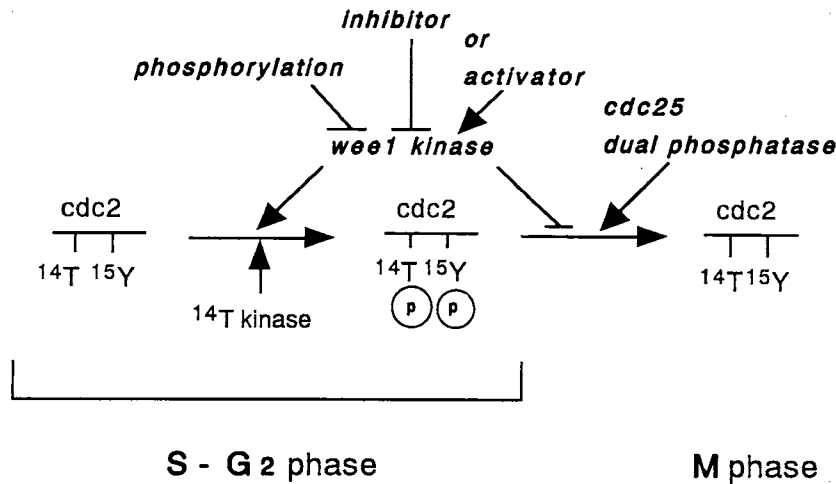


図2 SからM期における cdc2 の活性制御機構

学位論文の審査結果の要旨

本論文は細胞分裂周期を制御する要因を主として cdc2 kinase と呼ばれるリン酸化酵素の立場から解析したものである。cdc2 kinase は活性上昇により G₂ 期から M 期への移行を可能とするが、本酵素は 14Thr, 15Tyr のリン酸化により活性が抑制され、脱リン酸化により活性化される。著者はこの脱リン酸化酵素 cdc25B ホスファターゼを遺伝子レベルで合成し、その作用の解析結果、14Thr / 15Tyr dual phosphatase であることを発見した。一方リン酸化過程については weel kinase に着目し、これを遺伝子レベルで合成しその作用を解析した結果、cdc2 kinase の 15Tyr のみをリン酸化し cdc2 kinase を不活性化することを突き止めた。従って M 期への導入には weel kinase の不活性化が必要となり、その機構にもまたリン酸化が関与するが、それだけでは不十分で他に weel kinase 活性を制御する蛋白性因子が存在することを two-hybrid system の実験から予測した。

細胞分裂を制御する要因として cdc2 kinase の活性変動の研究は全世界的な関心テーマであり、激しい競争が展開されている。このような状況下で本多の研究結果は大きな意義を持つもので、多くの研究者の注目する処となろう。参考論文、副論文共にレベルの高いものであり、論文審査委員会は博士論文として十分なものであると判定した。