

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題

「細胞周期/チェックポイント制御たんぱく質の
構造と機能の解析」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者：佐方 功幸

(九州大学大学院理学研究院、教授)

§ 1 研究実施の概要

1.1 研究の背景

通常動物体細胞においては、G1/S/G2/M 期からなる細胞周期の進行はさまざまなサイクリン依存性プロテインキナーゼ(Cdk)によって駆動されている。これらの中、Cdc2/サイクリン A・Bは細胞周期の重要な転移 - G2/M 転移 - を制御する主役たるキナーゼである(図 1 参照)。Cdc2 は S/G2 期にサイクリン A または B と結合するが、この間、その活性は Wee1/Myt1 キナーゼによるチロシン 15(Y15)のリン酸化によって抑制されている。そして、G2/M 転移において Cdc25 A・B・C ホスファターゼによる Y15 の脱リン酸化で活性化し、M 期を誘起・促進する。(Cdc25A は G1/S 期で Cdk2/サイクリン E も活性化する。)また、M 期開始において Cdc25C は上流のキナーゼ Plk1 によって活性化され、M 期進行においては Cdc25C と Wee1 は Cdc2 自身によって正および負のフィードバック制御を受けるとされている(図 1)。

一方、DNA 傷害や DNA 複製障害は負の細胞周期制御系であるチェックポイントを活性化させる。このチェックポイント制御では、ATM(ataxia telangiectasia 病の原因遺伝子)や ATR が活性化され、細胞は DNA 修復・複製が終了するまで G1 期や G2 期で停止する。主たる G2 チェックポイントキナーゼである ATR は直下の Chk1 キナーゼをリン酸化/活性化する(図 1)。そして、Chk1 は Cdc25C のリン酸化/不活性化および Wee1 のリン酸化/活性化を介して Cdc2 の活性を阻害し、細胞を G2 期で停止させるとされている。多くの癌細胞では、癌抑制蛋白質 p53 に変異があるため無秩序な増殖が起こるが、これらの細胞では G1 チェックポイントは破壊されており、唯一 G2 チェックポイントだけが機能すると考えられている。

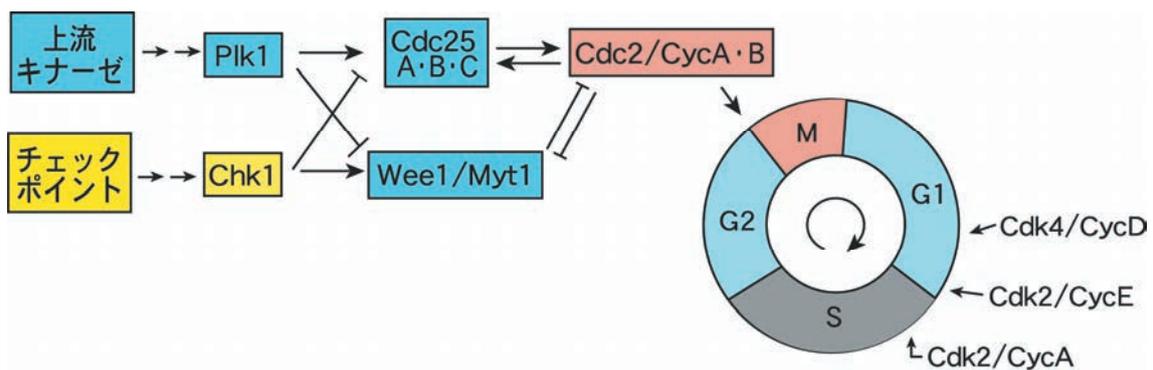


図 1 細胞周期における G2/M 転移とそのチェックポイント制御の概略図

1.2 研究構想の概要と意義

G2/M 転移とそのチェックポイント制御はゲノムの安定性を保証する重要な機構の 1 つであり、前記のように、それらを正・負に制御する蛋白質群とそのリン酸化経路の大要が

判明している。しかし、非常に意外なことに、この経路における個々の制御蛋白質の相互作用やリン酸化等による構造と機能の制御についてはよく分っていない。例えば、M期開始における Wee1/Myt1 のリン酸化や構造・機能の制御、M期進行における(Cdc2による)Wee1 のフィードバック制御の分子機構などについてはほとんど分っていない。また、G2 チェックポイントにおける Chk1 のリン酸化や相互作用による構造と機能の制御、Chk1 による Cdc25(A, B, C)の詳細な不活性化機構などについても分かっていない。本研究では、これらの G2/M 細胞周期・チェックポイント制御蛋白質の諸素過程における構造と機能の制御機構の解明を目指した。本研究は、G2/M 転移・チェックポイント制御の本質的理解のみならず、G2 チェックポイントを標的とした抗癌剤の開発等のためにも重要な基礎研究である。

1.3 研究の実施と成果の概要

上記研究構想に基づき、主に G2/M 転移の解析に適したツメガエル卵母細胞・初期卵、それらの無細胞抽出液系、及び組み換え蛋白質等を用いた *in vitro* 系を併用して研究を進めた。ツメガエル卵は生理的な G2/M 転移あるいは G2 チェックポイントの解析系として、無細胞系はそれらを人為的に制御できる系としてきわめて有用である。以下、代表的な研究成果の概略を示す。

(1) M 期開始における Myt1 キナーゼの抑制的キナーゼの同定

Myt1 キナーゼは Cdc2 の抑制的キナーゼであり、細胞周期の G2/M 転移で負に働く。ツメガエル卵の減数分裂においては、Mos/MAPK 下流の p90^{rsk} キナーゼが Myt1 と結合し、その活性を阻害している。しかし、p90^{rsk} は受精に伴う Mos の分解で不活性化される。本研究で、受精後には Polo 様キナーゼ Plx1 (Plk1) が Myt1 と結合し、その活性を阻害することを見出した。具体的には、受精後の M 期に、Cdc2 が Myt1 の Thr478 をリン酸化し Plx1 との結合を可能にすること、そして、この結合により Plx1 が Myt1 をリン酸化・不活性化することが判明した。また、卵減数分裂においても Myt1 の Thr478 はリン酸化されているが、Myt1 と Plx1 の結合は p90^{rsk} による Myt1 のリン酸化で阻害されていることが分った。以上の結果から、ツメガエル卵の受精において Myt1 の抑制キナーゼが p90^{rsk} から Plx1 に切り換えられること、体細胞周期の M 期開始においては Plx1 が Myt1 の直接的な抑制キナーゼであることが示された。

(2) M 期進行における Wee1 キナーゼの不活性化機構の解明

Wee1 キナーゼは Cdc2 の抑制的キナーゼであり、その活性は M 期進行に伴い阻害される。しかし、その機構については永らく不明であった。本研究では、Wee1 の不活性化に関わるドメインおよびその分子機構を明らかにした。まず、Wee1 の N 末端にその活性を正に制御する小さなドメイン (Wee-box と命名) を同定した。面白いことに、Wee-box は M 期に Cdc2 によりリン酸化され、このリン酸化が Wee1 キナーゼの不活性化に必要

であることが判明した。更に、このリン酸化部位にプロリンイソメラーゼ Pin1 が結合し、その異性化活性によって Wee1 が不活性化されることが判明した。また、Wee-box は様々な生物の Wee1 で保存されていることが分った。以上の結果から、Wee1 は M 期に Cdc2 によりフィードバック的にその正の制御領域 (Wee-box) をリン酸化され、このリン酸化部位の Pin1 による異性化で Wee-box の機能が阻害され、不活性化されることが初めて示された。

(3) チェックポイントキナーゼ Chk1 の活性化機構の解明

チェックポイントキナーゼ Chk1 は、未複製 DNA に応答して ATR キナーゼを介したリン酸化・活性化を受ける。しかし、Chk1 の活性化機構の詳細は分っていない。本研究では、ツメガエル Chk1 のドメイン構造と ATR による活性化機構を解析した。まず、Chk1 の C 末端に自己抑制的領域 (AIR) が存在し、これが非常に長い二極性の核移行シグナルと重複していることを見出した。そして、ツメガエル卵に AIR と Chk1 のキナーゼドメインを共発現させると、AIR はキナーゼドメインと結合しその活性を阻害できるが、全長の Chk1 とは結合 (阻害) できないことから、Chk1 分子内での相互作用により AIR がキナーゼドメインを阻害することが示された。更に、AIR に ATR によるリン酸化領域を接続すると、AIR はもはやキナーゼドメインを阻害できなかつた。以上の結果から、複製チェックポイントにより活性化された ATR が Chk1 をリン酸化することで、AIR とキナーゼドメインの抑制的結合が解かれ、Chk1 が活性化することが初めて示された。

(4) Chk1 による Cdc25A の新規阻害機構の発見

Cdc25 ホスファターゼは、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) を活性化することで、細胞周期の進行を促進させる役割を持っている。脊椎動物では、DNA 傷害等に応答し、Chk1 と Chk2 が Cdc25A の N 末端領域をリン酸化し、その分解を誘導する。本研究で、Chk1, Chk2 の内 Chk1 のみがツメガエル Cdc25A の C 末端 (Thr504) をリン酸化し、同ホスファターゼと様々な Cdk-サイクリンとの相互作用を阻害することが明らかになった。重要なことに、この阻害は Cdc25A の分解よりも早く起こり、複製チェックポイントでより必須の役割を果たすことが判明した。(リン酸化 Thr504 に 14-3-3 タンパク質が結合することが示されたが、この結合はその阻害効果には必須でなかつた。) 更に、ヒトから酵母までの他の様々な Cdc25 にも Thr504 に相当する部位が存在し、これらの Chk1 によるリン酸化でも様々な Cdk-サイクリンとの相互作用が阻害されることが分った。以上の結果から、Chk1 が様々な Cdc25 を新規の共通機構で阻害することが初めて明らかになった。

(5) 卵減数分裂周期における第二減数分裂中期停止の機構解明

脊椎動物卵の第二減数分裂中期での分裂停止 (Meta-II 停止) では、細胞分裂抑制因子 (CSF) が APC/C ユビキチンリガーゼを抑制することで、最終的にサイクリン B の分解を阻害している。これまで CSF は Mos-MAPK 経路と Erp1 (別名 Emi2) という 2 つの要因

から成るとされてきたが、それらの相互関係は不明なままであった。本研究でツメガエル卵を用いて、Mos-MAPK 経路が直接的に Erp1 にリンクしていることを明らかにした。まず、成熟卵で Mos-MAPK 経路を特異的に不活性化したところ、Erp1 の Meta-II 停止活性が Mos-MAPK 経路依存的であることが判明した。次に、in vitro および in vivo の解析から、Mos-MAPK 経路下流の p90rsk キナーゼが Erp1 の 335 番目のセリンと 336 番目のトレオニンをリン酸化することを見いだした。さらに重要なことに、これらのリン酸化は Erp1 を安定化するだけでなく、Erp1 の APC/C 結合活性を上げることで Meta-II 停止に必須であることが明らかとなった。以上の結果から、CSF が Mos→MEK→MAPK→p90rsk→Erp1 という一つの経路であることが明らかとなった。

§ 2 研究構想及び実施体制

2.1 研究構想

ツメガエルを含む脊椎動物細胞においては、Cdc2/サイクリン A は M 期の開始、Cdc2/サイクリン B は M 期の進行で働く。また、これらの複合体の活性化ホスファターゼである Cdc25A, B, C はそれぞれ S-M 期、M 期開始、M 期進行で働き、抑制的キナーゼである(核局在型)Wee1 と(膜結合型)Myt1 は G2 期で働く。本研究では、下記のように、これらの正・負の制御蛋白質およびチェックポイント蛋白質の蛋白質相互作用やリン酸化による構造と機能の制御機構を、G2/M 転移および G2 チェックポイント経路の各素過程に沿って包括的に解析する(図 2 参照)。(図で①〜⑤の番号は下記の各研究項目の番号に対応する。) また、本研究で共通に使う手法としては、蛋白質の相互作用(結合)の検出には免疫沈降法や tag を用いた pull-down 法、リン酸化部位の同定には抗リン酸化抗体や TOF-MS 法、酵素活性や基質特異性の変化の解析には特異基質や非特異的基質(あるいは自己触媒)を使った in vitro での活性測定など、主に生化学的手法を用いる。

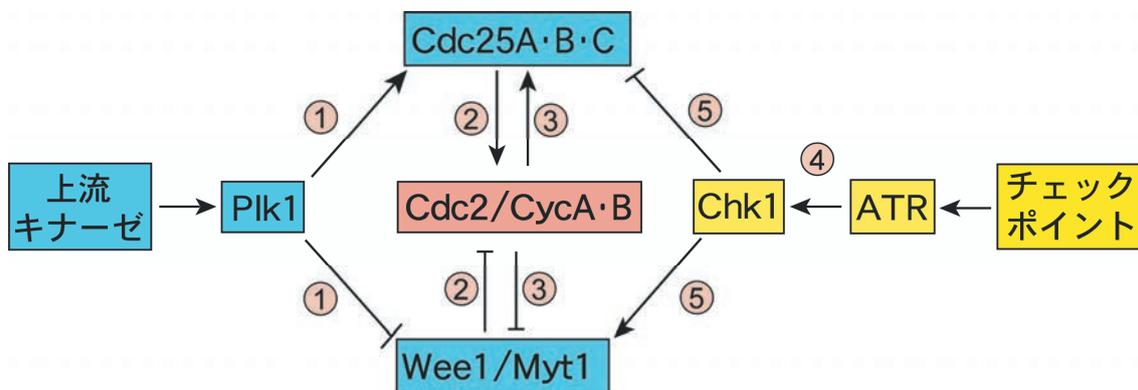


図 2 G2/M 転移・G2 チェックポイント制御の経路

① M 期開始における制御

M 期の開始に当り、多機能キナーゼ Plk1 (ツメガエルの Plx1) は Cdc25C をリン酸化／活性化することが判明している。しかし、同キナーゼが Myt1/Wee1 をリン酸化／不活性化する可能性も考えられる。そこで、これらの蛋白質 (特に Myt1) の Plk1 との結合や Plk1 によるリン酸化等を解析することにより、M 期の開始における Myt1/Wee1 の構造と機能の制御を明らかにする。(佐方グループ)

② G2/M 転移における制御

Wee1/Myt1 キナーゼとこれに拮抗する Cdc25A・B・C ホスファターゼがどのようにして共通な基質 Cdc2 を時期特異的に識別するか、また各 Cdc25(A・B・C) が Cdc2/サイクリン A, B のいずれを認識するかを明らかにすることは、G2/M 期の制御機構を理解する上で重要な課題である。ここでは、G2/M 期制御におけるこれら Cdc2 制御蛋白質とサイクリン A・B 間の相互作用をドメイン解析を中心に解析する。(小林グループ)

③ M 期進行におけるフィードバック制御

M 期の開始で一旦活性化された Cdc2/サイクリン A・B は逆に Cdc25C をリン酸化／活性化する一方、Wee1 をリン酸化／不活性化すると考えられている。このフィードバック制御は、Cdc2 活性を増幅させることで M 期の安定な進行を保証する重要な機構とされるが、その分子機構は分っていない。ここでは、Cdc2 による Wee1 のリン酸化部位や他の蛋白質との相互作用を解析することにより、M 期進行時における Cdc2 による Wee1 活性のフィードバック制御の本質を明らかにする。(佐方グループ)

④ G2 チェックポイントにおける Chk1 の制御

DNA 傷害や複製阻害による G2 チェックポイントではまず ATR が Chk1 を特異的にリン酸化／活性化する。この時、ATR は Chk1 の Ser-Gln (SQ) モチーフをリン酸化する。しかし、Chk1 がいかにして活性化されるかは全く分っていない。ここでは、Chk1 のドメイン解析や、ATR によるリン酸化が Chk1 の構造に与える影響等を解析することにより、G2 チェックポイントにおける Chk1 活性化の分子機構を明らかにする。(佐方グループ)

⑤ G2 チェックポイントの Chk1 による制御

G2 チェックポイントで活性化された Chk1 は Cdc25C を不活性化する一方、Wee1 を活性化することで Cdc2 活性を阻害し、G2 停止を起こすことが示されている。一方、我々 (佐方グループ) は、Chk1 が Cdc25A の活性も抑えることを見い出している。このことは、Chk1 が Cdc25A・B・C の全てのメンバーを (おそらく共通の部位で) リン酸化し、何らかの方法でそれらの活性を制御する可能性を示唆している。ここでは、Chk1 による Cdc25A, B, C のリン酸化部位の同定や、そのリン酸化の in vivo 及び in vitro での Cdc25 活性に与える影響等を解析することにより、G2 チェックポイントにおける各 Cdc25 メンバーの

活性制御機構を明らかにする。(佐方グループ)

以上の項目の研究を下記表1のスケジュールに従って進める。

表1 研究の進め方

項目	平成 15 年 度(6 ヶ月)	平成 16 年 度	平成 17 年 度	平成 18 年 度	平成 19 年 度	平成 20 年 度(6 ヶ月)
設備の整備	←————→					
実験試料の調製・ 準備	←————→					
研究項目①,②,④ のデータ取得	←————→					
研究項目②,③,⑤ のデータ取得		←————→				
研究項目②,⑤の データ取得					←————→	
まとめ						←————→

⑥ その他の解析

最後に、本研究の新展開に伴い、卵減数分裂におけるG2/M制御、神経分化におけるG2/M制御の役割等の解析も、平成18年度から適宜進めることにした。(佐方グループ)

2.2 実施体制

本研究の実施体制は以下の通りである。

グループ名	研究代表者又は主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
佐方グループ	佐方 功幸	九州大学・理学研究院・生物科学部門・教授	M 期開始、M 期進行及び G2 チェックポイントの制御と発生過程における G2/M 期制御
小林グループ	小林 英紀	九州大学・医学研究院・分子生命部門・准教授 岡山大学教育開発センター・教育システム研究開発部門・教授	G2/M 期転移における制御

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 M 期開始の制御 (九州大学/佐方グループ)

<M 期開始における Myt1 の不活性化機構の解析>

(1) 研究の背景とねらい

体細胞周期の M 期の開始には、M 期促進因子 (MPF) である Cdc2/サイクリン B 複合体の活性化が必須である。M 期開始での MPF の活性化は、MPF を正に制御する Cdc25C ホスファターゼの活性化と、MPF を負に制御する Wee1/Myt1 キナーゼファミリーの不活性化により引き起こされる。これまで、Cdc25C の活性化や Wee1 の不活性化についての解析はなされているが、Myt1 の不活性化の機構についてはほとんど解析がなされていなかった。一方、ツメガエル卵の減数分裂周期 M 期においては、Mos-MAPK 経路下流の p90rsk キナーゼが Myt1 を不活性化するとされている。しかしながら、受精後に p90rsk は不活性化することから、体細胞周期の M 期開始では p90rsk 以外の何らかの Myt1 不活性化因子の存在が示唆された。そこで、ツメガエル卵をもちいて、体細胞周期における Myt1 の不活性化因子およびその不活性化機構を明らかにしようと試みた。

(2) 研究実施内容及び成果

まず、Myt1 の免疫沈降による解析から、ツメガエル卵の減数分裂周期 M 期においては p90rsk が専ら Myt1 と結合しているが、受精後の体細胞周期 M 期においては Polo 様キナーゼ Plk1 が結合していることが判明した。この結果から、体細胞周期 M 期における Myt1 の不活性化因子が Plk1 であることが示唆された。実際、*in vitro* キナーゼアッセイにより、Plk1 が Myt1 をリン酸化し、かつその活性を抑えることが示された。さらに、Plk1 が Myt1 と結合するために必須な Myt1 中のトレオニン 478(Thr478)のリン酸化を見いだした。そして Thr478 のリン酸化に対するリン酸化特異抗体をもちいた実験から、Thr478 は体細胞周期の M 期において MPF によりリン酸化されることが判明した。重要なことに、Thr478 のアラニン置換変異体では、Plk1 による結合および抑制的リン酸化が著しく抑えられ、その強制発現は受精後の体細胞周期 M 期の進行を有意に遅延させた(図3)。すなわち、リン酸化 Thr478 を介して結合した Plk1 による Myt1 の抑制が M 期進行に重要であることが明らかになった。

一方興味深いことに、Thr478 は減数分裂周期 M 期においてもリン酸化されていた。しかしながら、この時期 Plk1 は Myt1 と結合できなかった。この機構について解析するため、Plk1 と Myt1 が結合している体細胞周期において恒常活性型の p90rsk を異所的に発現させた。その結果、Plk1 と Myt1 の結合が阻害され、逆に p90rsk が Myt1 と結合することが明らかとなった。さらに *in vitro* の解析から、p90rsk が Myt1 をリン酸化することで Plk1 と Myt1 との結合を阻害することが示された。すなわち、卵減数分裂周期では p90rsk が、体細胞周期 M 期では Plk1 が、それぞれ Myt1 の不活性化因子として機能すること、及びその切り替わり機構が明らかになった(図4)。

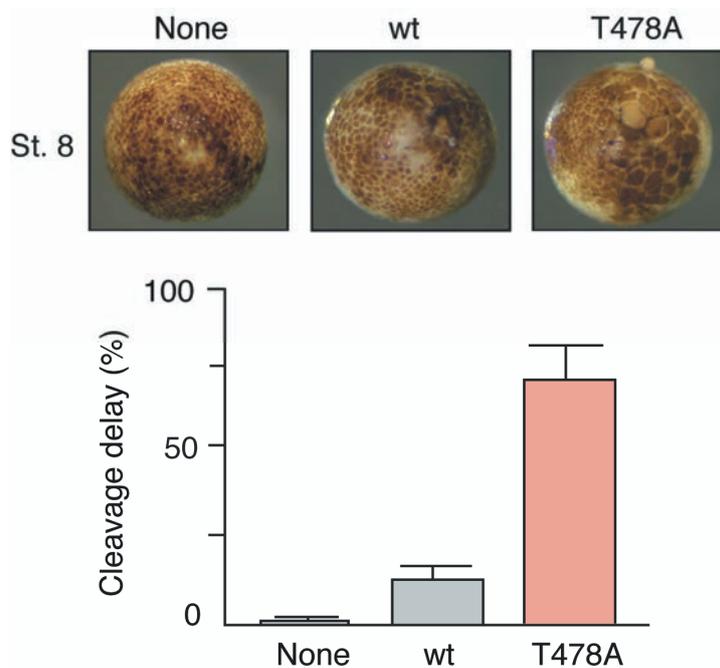


図3 Myt1 の Thr478 リン酸化による活性制御

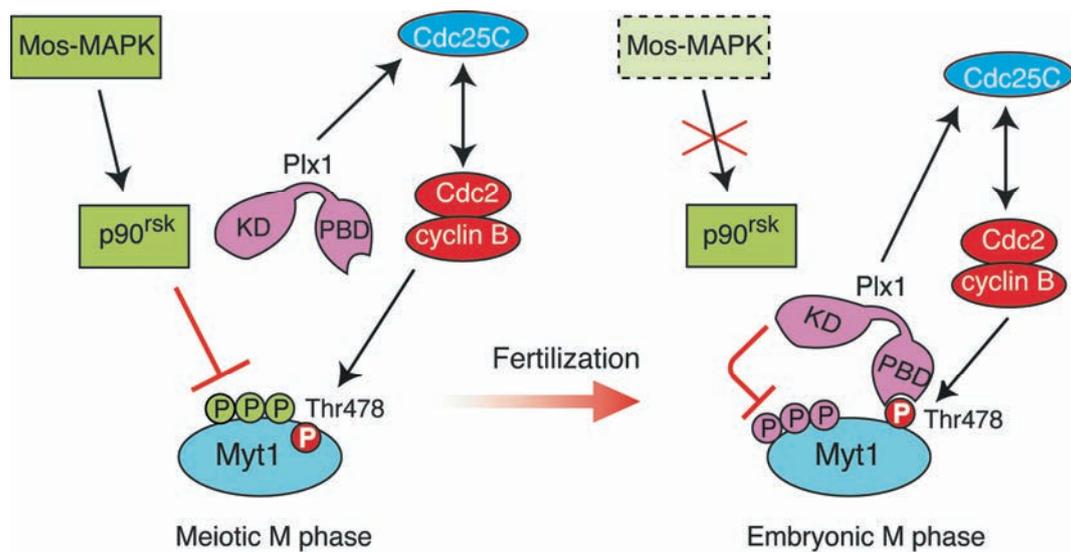


図4 受精前後における Myt1 の不活性化機構

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究において、体細胞周期 M 期における Myt1 の不活性化因子が Plk1 であること、及びその不活性化機構を明確に示した。これは、長い間不明であった M 期開始における Myt1 の不活性化機構を明らかにしたものできわめて重要な成果である。今後、M 期以外の細胞周期における Myt1 の制御および機能の解明も細胞周期の新たな知見に繋がるものと考えられる。さらに、本研究は、減数分裂周期と体細胞周期で Myt1 の制御因子が切り替わることを示したことでシグナル伝達経路の新たな一面を提示し、細胞周期のみならず他分野にもインパクトを与えられよう。また、M 期開始の分子機構の重要な局面を解明した点で、今後 M 期開始・進行の異常による疾病等の予防・治療にも繋がるものと期待される。

3.2 G2/M 転移の制御(九州大学/岡山大学/小林グループ)

<サイクリン—Cdk 複合体の基質識別の解析>

(1) 研究の背景とねらい

サイクリン依存性キナーゼ(Cdk)は細胞周期進行に関わるタンパク質を選択的にリン酸化する。基質となるタンパク質はサイクリンに捕捉されたあと Cdk と結合し、サイクリン—Cdk 複合体のキナーゼ活性によってリン酸化を受ける。細胞周期 M 期では、M 期制御に関わる調節タンパク質自身も Cdc2—サイクリン複合体によりリン酸化され、Cdc2 キナーゼの活性調節に重要な役割を果たしている。これら M 期調節タンパク質がどのようにして Cdc2 と選択的に結合し、リン酸化基質として認識されるのか？ この M 期における Cdc2 基質識別の仕組みを明らかにすることは、G2/M 期転移を理解する上できわめて重要

な課題である。本研究では、Cdc2-サイクリン複合体による基質識別の分子基盤を知ることを目的として、M期におけるCdc2制御タンパク質とサイクリンの分子間相互作用を解析した。

(2) 研究実施内容及び成果

具体的には、Cdc2キナーゼ活性化に関与するCdc25ホスファターゼ、これに拮抗してCdc2キナーゼ不活性化に関与するWee1/Myt1キナーゼとサイクリンB間との相互作用を担う基質識別部位を解析した。サイクリンBのサイクリンボックス(CBF2)N末端にあるRRASKモチーフは、B型サイクリンに特異的な保存配列である(図5A)。Cdkの基質識別におけるRRASKモチーフの役割を知る目的で、サイクリンB2のRRASKモチーフ変異体を作成して、M期基質であるCdc25C、Myt1、Wee1との結合、リン酸化、Cdc2キナーゼ活性化に対する効果を調べた。RRASKモチーフの変異体はCdc2と結合できるにもかかわらず、*in vivo*, *in vitro*のCdc2キナーゼ活性化能を消失した。また、RRASKモチーフの変異サイクリンBと結合したCdc2は、Cdc25Cホスファターゼ依存のT14/Y15の脱リン酸化が起こらなかった。一方、Cdc25C依存の脱リン酸化部位を構成的に脱リン酸化させた活性型Cdc2-AFにRRASKモチーフ変異サイクリンBを結合させた複合体は、Cdc2の一般的な基質であるヒストンH1をリン酸化するが、選択的基質であるCdc25Cを*in vitro*でリン酸化できなかった(図5B)。さらに、RRASK変異によりサイクリンB-cdc2複合体に対するCdc25Cの結合能が低下した。同様に、Myt1とWee1の*in vitro*リン酸化もRRASK変異により阻害された。これらの結果に一致して、RRASKモチーフの変異サイクリンは卵母細胞の卵核胞崩壊を誘導しないし、G2/M転移においてCdc2キナーゼを活性化できなかった。これらの解析は、サイクリンBのRRASKモチーフはCdc2キナーゼの選択的基質識別に重要な役割を持つことを示している(図6)。

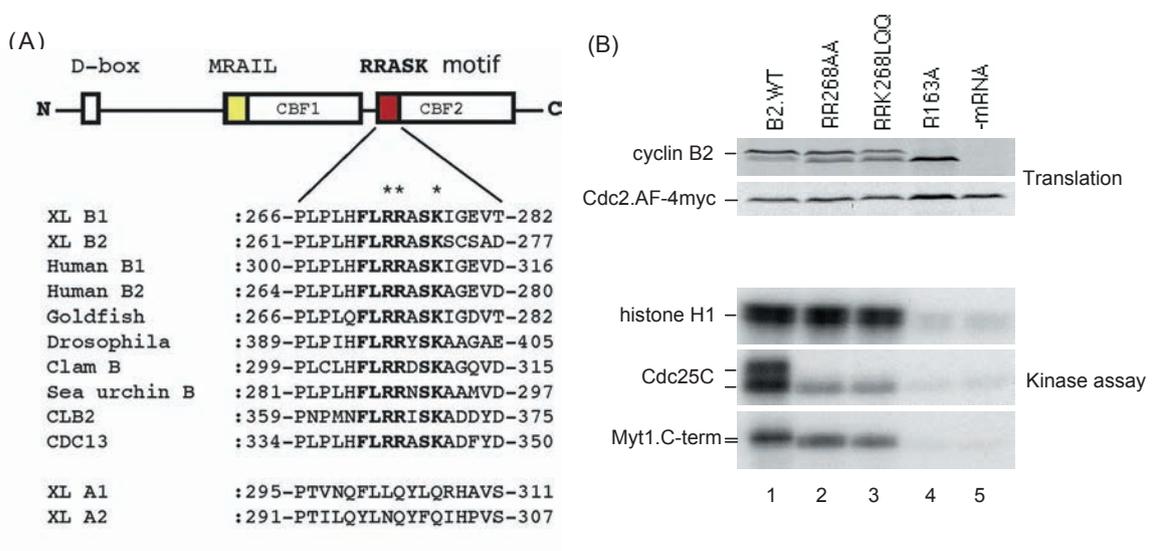


図5 サイクリン B の RRASK モチーフ (A)と基質(Cdc25C, Myt1)への結合 (B)

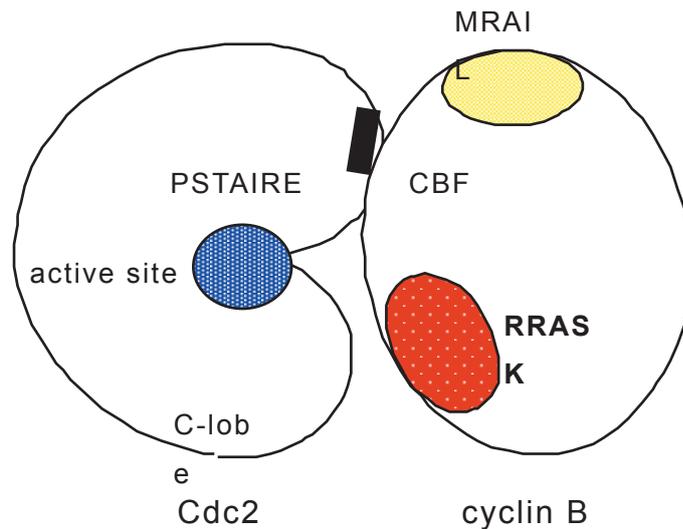


図6 サイクリン B Cdc2複合体の基質識別のモデル図
 基質識別にはサイクリン B の RRASK モチーフが関与する。

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究により、サイクリンBの RRASK 配列は、G2/M 期の共通な Cdc2基質である Cdc25C、Myt1 と Wee1 などの調節タンパク質の基質識別に重要な役割を持つモチーフであることが明らかになった。S 期と M 期では Cdk の基質親和性(代謝回転)が著しく異なり、そのことが S 期と M 期の基質選択性を規定していると推測されている。現在推し進めている S 期基質 (Cdc6等) の識別特異性を明らかにすることにより、なぜ S 期と M 期の基質が順番にリン酸化されるのか、即ち、細胞はなぜ S 期と M 期を交互に繰り返すのかに関し、その周期性を生み出す分子基盤を解明することができると期待される。

<細胞周期における M 期サイクリンの分解制御タンパク質 XDRP1 の解析>

(1) 研究の背景とねらい

サイクリン依存性キナーゼ Cdk の調節サブユニットであるサイクリンは、細胞周期進行で分解時期が異なり、それぞれ選択的な分解制御を受けている。G2/M 期においては、サイクリン A と B の分解時期と分解パターンが異なること(サイクリンの選択的分解)、また、M 期サイクリンが E3 リガーゼによりユビキチン化された後も長く分解されないまま維持され、M 期後期で突然に分解されること(cyclin destruction)は以前から観察されていたが、どのように調節されているのかは長らく不明であった。本研究では、G2/M 期におけるサイクリンの選択的分解制御を解明するため、ツメガエル卵を用いて M 期サイクリンの分解に関わる制御因子を同定し、卵抽出液による生化学的手法と酵母の分子遺伝学的手法を併用してその調節制御のしくみを解析した。

(2) 研究実施内容及び成果

ツメガエルの cDNA ライブラリーからサイクリンと相互作用する新規因子を同定し、XDRP1(Xenopus-Dsk2-Related-Protein 1)と命名した。XDRP1 は N 末端に UBL(Ubiquitin-like)ドメインを C 末端に UBA(Ubiquitin-associated)ドメインを持つ出芽酵母 UBL-UBA タンパク質 Dsk2 と高い相同性を示した。UBLドメインはプロテアソームと結合し、UBA ドメインは細胞内のポリユビキチン鎖に結合した(図 7)。塩基配列の解析結果から XDRP1 には UBL ドメインに異なるアミノ酸配列を含む2つアイソフォーム(XDRP1L と XDRP1S)が存在した。また、ツメガエル卵抽出液(CSF 抽出液)で、XDRP1 はサイクリン B の分解を促進し、サイクリン A の分解を阻害するという選択的効果を示した。

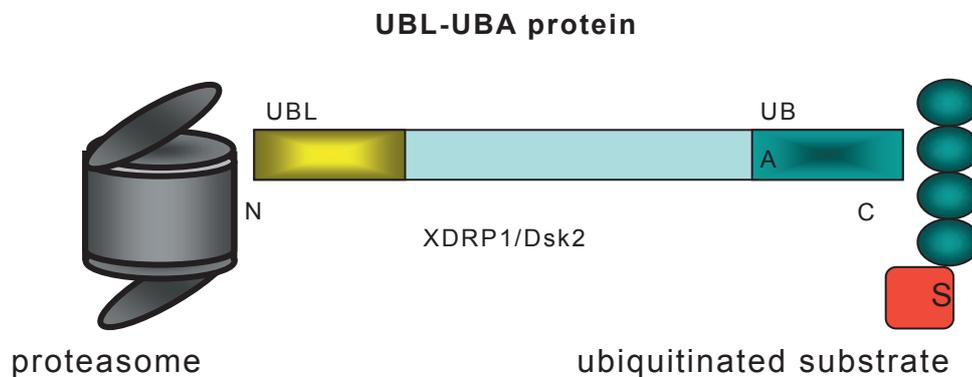


図7 タンパク質分解における UBL-UBA タンパク質の役割

次に、CSF 抽出液を用いて、XDRP1 とサイクリンの結合及び分解との関係を解析した。ポリユビキチン化したサイクリン A と B は XDRP1L と XDRP1S の UBAドメインと結合した。一方、XDRP1L と XDRP1S の UBLドメインはプロテアソームと結合した。さらに、ポリユビキチン化していないサイクリン A、B が XDRP1S の UBLドメインに結合した。また、非リン酸化型サイクリンは XDRP1S の UBLドメインと結合するが、Cdc2キナーゼによりリン酸化されたサイクリンは XDRP1S の UBLドメインと結合できなかった。XDRP1S から UBLドメインを欠失させると、サイクリンとの結合能もサイクリン分解の阻害も解除された。そして、サイクリン A-UBLドメインの場合は、サイクリン A のリン酸化状態に加え、Cdc2キナーゼによる UBLドメイン自身のリン酸化も関与した。これらの結果は、Cdc2キナーゼ活性に依存したサイクリンと分解制御因子 XDRP1 の相互作用によって、M 期におけるサイクリン分解のタイミングが調節されていることを示している。これらの結果から、Cdc2キナーゼに依存したリン酸化によるサイクリン A-XDRP1S UBLドメイン間の結合解除が、サイクリン A 分解でみられた選択的阻害効果を引き起こしていると考えられる(図8)。

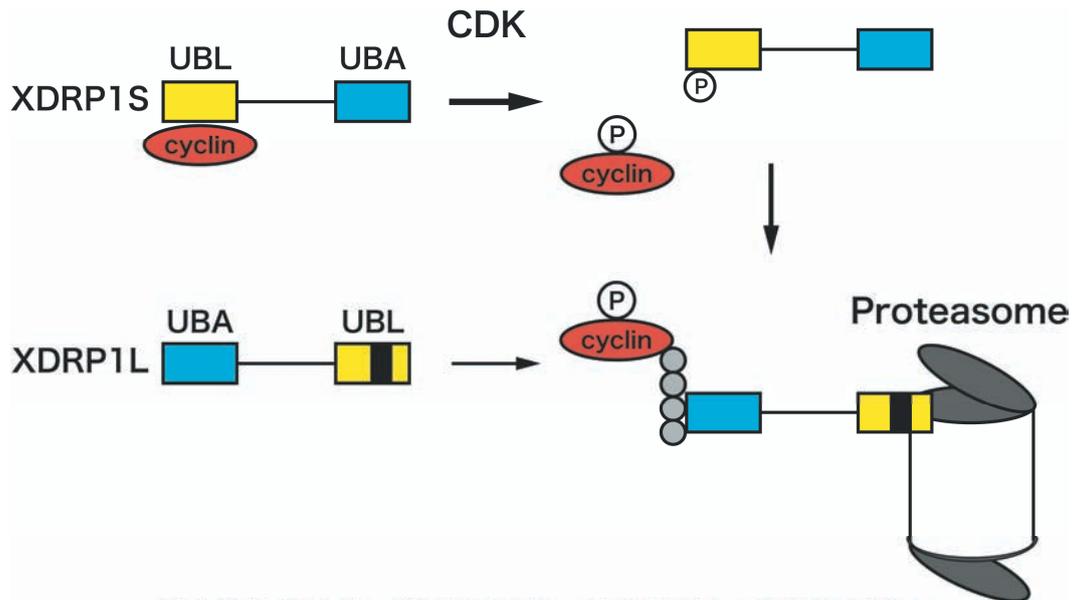


図8 UBL-UBAタンパク質XDRP1は、CDKに依存してM期サイクリンの分解制御に関わる調節因子である

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究により、サイクリン分解が、ユビキチン-プロテアソーム分解経路の配送因子 (UBL-UBA タンパク質) と分解基質サイクリンとの相互作用を介して、Cdc2キナーゼ活性に依存した制御を受けていること、また、UBLドメイン-分解基質間の結合により分解基質 (サイクリン) を分子内隔離し、その分解を抑制していることをはじめて明らかにした。これらの研究成果は、今後、長らくその分子実体が不明であったサイクリン分解における Cdk 依存の制御機構の解明に貢献すると思われる。

3.3 M 期進行のフィードバック制御 (九州大学/佐方グループ)

<M 期における Wee1 キナーゼの不活性化機構の解析>

(1) 研究の背景とねらい

M 期の開始で一旦活性化された Cdc2/サイクリン A・B は逆に Cdc25C をリン酸化/活性化する一方、Wee1 をリン酸化/不活性化すると考えられている。このフィードバック制御は、Cdc2 活性を増幅させることで M 期の安定な進行を保証する重要な機構とされるが、その分子機構は分っていない。これまで、Cdc2 は基質の Ser/Thr-Pro モチーフをリン酸化することが知られている。面白いことに、リン酸化 Ser/Thr-Pro モチーフは cis/trans プロリルイソメラーゼ Pin1 の結合・異性化モチーフでもある。従って、このリン酸化モチーフ部位の Pin1 による異性化で Cdc25C や Wee1 の活性が制御されている可能性がある。実際、M 期で Cdc25C は多数の Ser/Thr-Pro でリン酸化され、かつ Pin1 と結合していることが知られている。一方、我々は Wee1 で同様なことを観察していた。そこ

で、Cdc2 による Wee1 のリン酸化部位と Pin1 結合部位との関係や、Pin1 による活性制御機構などを解析し、Cdc2 による Wee1 活性のフィードバック制御機構の解明を試みた。

(2) 研究実施内容及び成果

まず、Wee1(体細胞型 Wee1B)の活性制御に関与するドメインを同定すべく、様々な欠変異体をつメガエル卵に発現させ、その生理活性(分裂阻害活性)を調べた。その結果、Wee1 の活性に N 末端 160-200 のアミノ酸が必須であることが分かった。興しいことに、この領域には NINPFTP という酵母からヒトまで高度に保存された配列があった(Wee-box と命名)(図9)。更なる解析で、Wee-box 中の NIN 配列(NIN モチーフと命名)は Wee1 活性に正に、TP 配列(TP モチーフと命名)は負に働くことが判明した。TP モチーフが Cdc2 によるリン酸化モチーフであることから、Cdc2 による(TP モチーフ中の) Thr186 のリン酸化を調べたところ、in vitro 及び in vivo で Cdc2 によってリン酸化されることが分かった。これらの結果から、Wee-box は本来 NIN モチーフにより Wee1 活性に正に働くが、近接した TP モチーフの Cdc2 によるリン酸化で負に制御されると考えられた。しかし、予想に反して in vitro では Cdc2 は Wee1 を不活性化できなかった。そこで、リン酸化 TP モチーフが異性化酵素 Pin1 の結合モチーフでもあることに注目し、無細胞系の M 期で Wee1 と Pin1 の結合を調べたところ、Thr186 のリン酸化に依存して Pin1 が結合することが判明した。(このことは、Thr186 を含む合成リン酸化ペプチドを用いても確かめられた。)そこで更に、Pin1 の結合が M 期における Wee1 の不活性化に必須であるか否かを、卵及び無細胞系で優性不能型の Pin1 を強制発現させることで調べた。その結果、これらの系では Wee1 の不活性化が起こらず、卵あるいは無細胞系は G2 期で停止していることが判明した。これらの結果から、Wee1 は Wee-box という正の制御領域を持つが、M 期にはその中の TP モチーフが Cdc2 によってリン酸化され、その結果 Pin1 による結合・異性化を受け、不活性化されることが示された(図10)。

<i>S. pombe</i>	FMSTGLLSKQHRPRK NIN F TPL PPSTPSK PSTF VRPH
<i>S. cerevisiae</i>	SPLSEAKYHAHDRHN QTN IL SP TNSLVTN SSP QTLH
<i>Daphnia</i>	KSTDKKDNLDTPPAAN VN P F T P TGMLLT SK KRTRSKR
<i>Drosophila</i>	SLPLHNRK LPTQ D TAN V N P F T P D SL MAH NK KRCRTQF
<i>Strongylocentrotus</i>	RRSTRIPKTRQ QNVAN V N P F T P S AML Q NAT KKRLRQE
<i>Danio (embryonic)</i>	RFLRLSTAFER VPSV NIN P F T P D T VR RN SEHYKRKSQ
<i>Danio (somatic)</i>	SKACLDGKR NQ T PRV NIN P F T P D S ILV QS STLQRN NR
<i>Xenopus (embryonic)</i>	FVAGTGAELDD PSLV NIN P F T P E S YR Q TH F Q P NGKRK
<i>Xenopus (somatic)</i>	EKAPKPEF VYST P QV NIN P F T P D S LEI Q SSAGLCRGR
<i>Gallus (somatic)</i>	RSEKQDSDIR Q T PHV NIN P F T P D S M FL H NS ER Q CRRR
<i>Homo (embryonic)</i>	TPAPLKDE MTSL ALV NIN P F T P E S Y KK L FL Q S GGKRK
<i>Homo (somatic)</i>	KSGKREFD V R Q T P Q V NIN P F T P D S LL LH SS G Q C RRR
	Wee-box

図9 様々な生物の Wee1 における Wee-box の保存

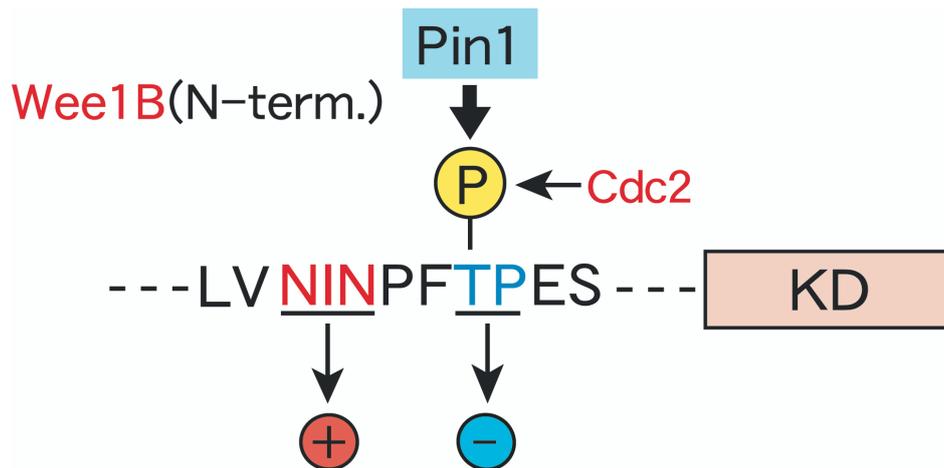


図 10 M 期進行における Wee1 活性のフィードバック制御

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、Wee1 の活性制御ドメインが同定され、M 期進行におけるそのフィードバック制御の分子機構が明らかになった。今後、その活性制御ドメインの機能と高次構造との関係が重要な課題になると考えられる。また、一般に Pin1 等による蛋白質の異性化の検証は実験的に困難な点が多いが、高次構造の解析により Wee1 活性の異性化による制御が解明されると思われる。一方、Wee1 は重要な細胞周期制御因子の1つであり、その発現や活性の人為的な制御はがん等の治療に有効とされている。従って、Wee1 の機能ドメインとその制御機構を明らかにした本研究成果は、Wee1 を標的にした創薬等の基礎情報になり、今後社会へ還元されると考えられる。

3. 4 G2 チェックポイントにおける Chk1 の活性制御 (九州大学/佐方グループ)

<ATR による Chk1 の活性化機構の解析>

(1) 研究の背景とねらい

DNA 傷害や複製障害による G2 チェックポイントではまず ATR が Chk1 を特異的にリン酸化/活性化する。この時、ATR は Chk1 の Ser-Gln (SQ) モチーフをリン酸化する。しかし、このモチーフのリン酸化がいかにして Chk1 を活性化するのは全く分っていなかった。一方、我々は世界に先駆けて、Chk1 の C 末端側調節ドメインに自己抑制的領域が存在するのを見い出していた。そして、通常はこの抑制的領域とキナーゼドメインの相互作用により Chk1 の活性が抑制されているが、G2 チェックポイントでは ATR による SQ モチーフのリン酸化がその相互作用に負に働き、Chk1 が活性化するというモデルを提唱した。その後、Chk1 キナーゼドメイン断片 (KD) と C 末端調節ドメイン断片 (CRD) が卵細胞内で実際に相互作用 (結合) できるのを見い出した。そこで、CRD との相互

作用が KD の (Chk1) キナーゼ活性に与える影響や、ATR による (CRD 内の) SQ モチーフのリン酸化が CRD と KD の相互作用に与える影響等を *in vivo* 及び *in vitro* で調べることで、我々のモデルの検証を試みた。

(2) 研究実施内容と成果

Chk1 の CRD に存在する自己抑制的領域を特定するため、まず Chk1 の CRD の様々な欠失変異体を卵内に発現させ、その活性を卵成熟阻害活性として調べた。その結果、CRD の C 末端 80 個のアミノ酸が自己抑制的領域 (AIR と命名) であることが判明した。興し로운ことに、AIR は Chk1 の核移行シグナル (NLS) と同一領域であることも示された。また重要なことに、AIR を含む CRD は Chk1 の KD (キナーゼドメイン) と卵内で結合できるのみならず (CRD は全長 Chk1 とは結合できなかった)、KD のキナーゼ活性を抑制することが示された (図 11)。すなわち、チェックポイント非存在下では、AIR と KD が分子内で相互作用することで Chk1 の活性が抑制されていることが示された。次に、G2 チェックポイント活性化時の CRD (AIR) と KD の結合やその結合が Chk 活性に与える影響を調べるため、まず、CRD と KD を共発現する卵を G2 チェックポイント誘起剤である DNA 阻害剤アフィディオリン (APD) で処理した。その結果、APD 処理により CRD と KD との結合の解離が起こり、KD の活性が飛躍的に亢進することが示された。この結果が、ATR による CRD 内の SQ モチーフのリン酸化に依るか否かを、SQ モチーフの Ser を Ala に変換

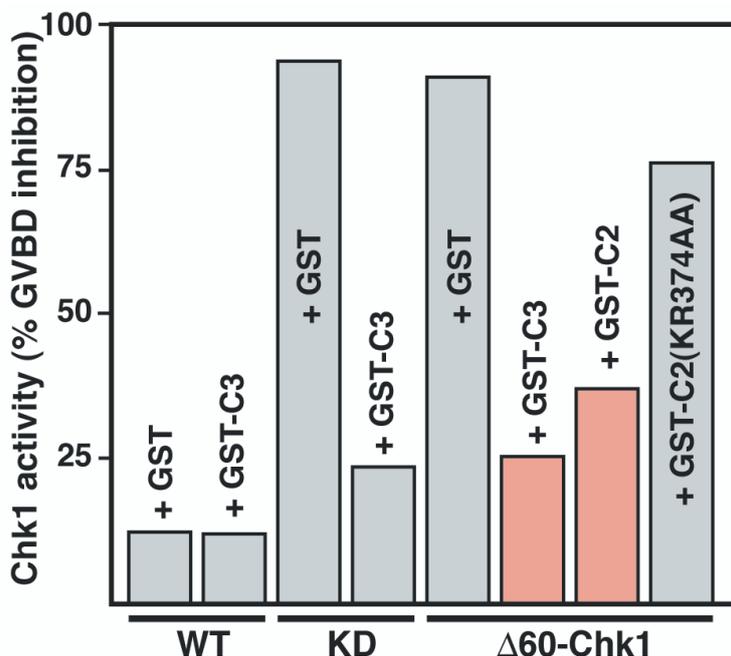


図 11 AIR による Chk1 活性の不活性化

C 末端を欠く恒常活性型 Δ60-Chk1 の活性は、AIR を含む GST-C3 または GST-C2 の共発現で抑制される。

した CRD 変異体を用いて調べたところ、APD 処理にも関わらずこの CRD 変異体と KD の結合は解離しないことが示された。更に、SQ モチーフをリン酸化をまねる EQ モチーフ (Ser→Glu) に変換したところ、この CRD 変異体は (APD 処理なしでも) KD と結合できないことが示された。以上の結果から、G2 チェックポイントで ATR により Chk1 の SQ モチーフがリン酸化され、その結果 CRD (AIR) と KD の結合が解離し、Chk1 の活性が上昇することが示された (図 12)。

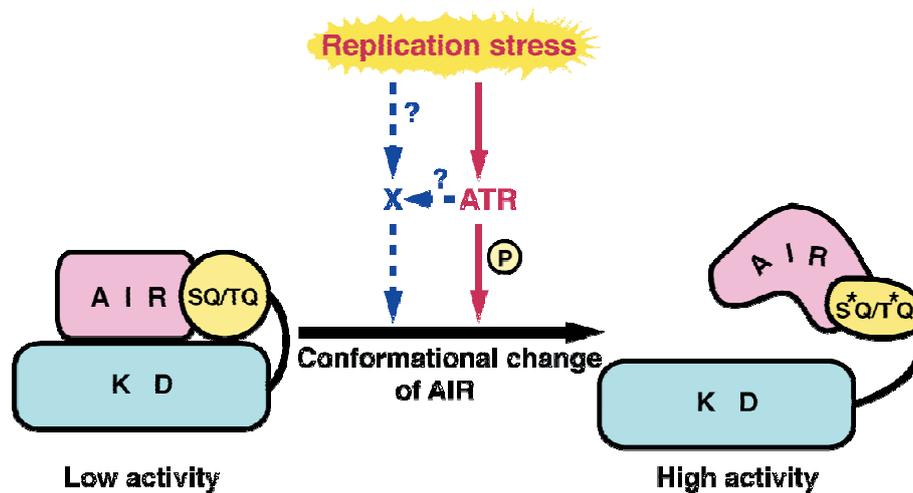


図 12 G2 チェックポイントにおける Chk1 の活性化機構

(3) 研究成果の今後期待される効果

G2 チェックポイントで ATR/Chk1 経路は中心的な役割を果たすが、本研究で ATR による Chk1 の活性化機構が明確に示された。これらの結果は主に Chk1 の断片 (機能ドメイン) を用いて得られたが、今後、全長 Chk1 や高次構造解析を含めた検証も進むものと思われる。一方、G2 チェックポイントは多くのがんで唯一機能しているチェックポイントであり、このチェックポイントを標的としたがん治療等は非常に有望視されている。従って、Chk1 の機能ドメインやその活性制御機構を明らかにした本研究成果は、G2 チェックポイントを標的とした制がん法の基礎情報になると考えられる。

3.5 G2 チェックポイントの Chk1 による制御 (九州大学/佐方グループ)

<Chk1 による Cdc25 の新規阻害機構の解析>

(1) 研究の背景とねらい

G2 チェックポイントで活性化された Chk1 は最終的に Cdc25C を不活性化する一方、Wee1 を活性化することで Cdc2 活性を阻害し、G2 停止を起こすとされている。実際、Chk1 は直接的なリン酸化で Cdc25C の (Cdc2 に対する) ホスファターゼ活性を下げ、Wee1 のキナーゼ活性を上げることが示されている。一方、Chk1 は Cdc25A の複数のセ

リン残基をリン酸化し、その分解を誘導することが知られている。しかし、我々は、この分解に先立って、Chk1 が Cdc25A を分解誘導とは異なる(未同定の)アミノ酸残基でリン酸化し、Cdc25C の場合と同様に、その活性を抑えることを見い出していた。このことは、それまでの一般的な考え方とは異なって、Chk1 が Cdc25A・B・C の全てのメンバーを(おそらく共通の部位で)リン酸化し、何らかの方法でそれらの活性を制御する可能性を示唆した。そこで、まず Chk1 による Cdc25A のリン酸化部位の同定や、そのリン酸化による Cdc25A の活性制御機構を解析し、G2 チェックポイントにおける(Chk1 による)各 Cdc25 メンバーに共通な活性制御機構の解明を試みた。

(2) 研究実施内容及び成果

まず、Chk1 による Cdc25A のリン酸化部位を *in vitro* キナーゼアッセイと MS を併用して調べたところ、新規の C 末端の Thr504 がきわめて強く Chk1 によってリン酸化されることが分った。この部位のリン酸化は、卵の G2 チェックポイント活性化時に Chk1 依存的に起こることから真の Chk1 リン酸化部位であることが示された。(興し로운ことに、Thr504 は Chk1 と類似の Chk2 ではリン酸化されないことも示された。)更なる解析から、Thr504 のリン酸化は Cdc25A の分解には全く関与せず、その不活性化のみに関与していることが判明した。そこで、Chk1 による Thr504 のリン酸化がいかにして Cdc25A を不活性化するのかを調べた。まず、このリン酸化が Cdc25A のホスファターゼ活性そのものに与える影響を *in vitro* で調べたが、結果はネガティブだった。そこで、このリン酸化が Cdc25A の基質認識に与える影響を検討した。まず、WT あるいは T504A 変異の Cdc25A と Cdk2/サイクリン A、Cdk2/サイクリン A、Cdk2/サイクリン E の卵内での結合を調べた。その結果、G2 チェックポイント活性化時に、WT は T504A 変異体にくらべ全ての Cdk/サイクリン複合体との結合が著しく低下していることが判明した(図 13)。また、G2 チェックポイント非

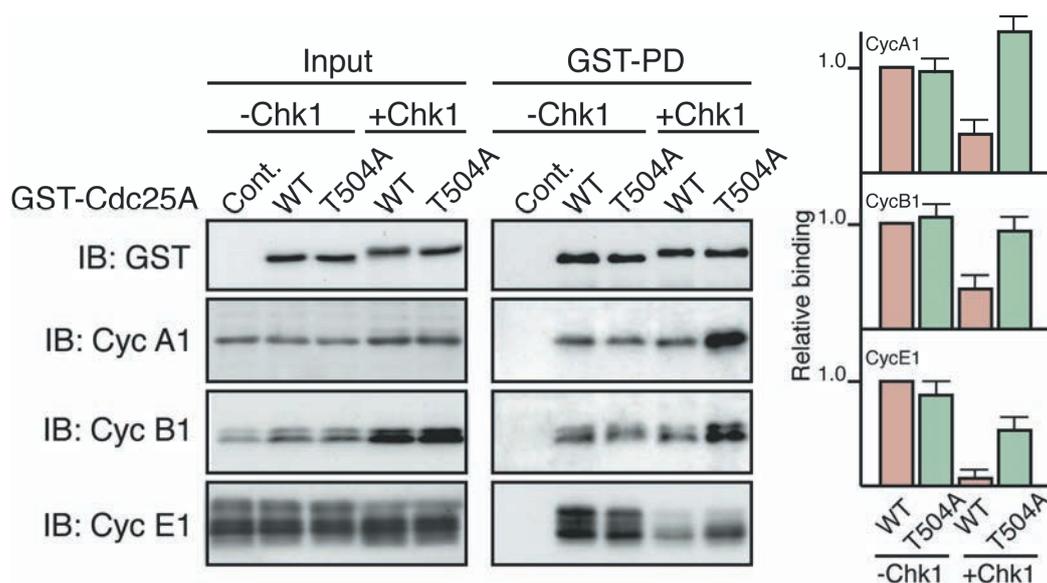


図 13 Thr504 のリン酸化による Cdc25A と Cdk/サイクリン複合体の結合阻害

存在下では、Cdc25A の(Thr504 を含む)C 末端 20 個のアミノ酸が各々の Cdk/サイクリン複合体との結合に必須であることが示された。これらの結果から、Chk1 による Thr504 のリン酸化で Cdc25A の基質認識(各 Cdk/サイクリン複合体との結合)が阻害され、その結果、Cdc25A の活性が抑制されることが示された。興し로운ことに、Thr504 に対応するアミノ酸が M 期のみで機能する Cdc25B、Cdc25C、(ショウジョウバエの)String の C 末端にも存在することが分った(それぞれ Ser549、Thr533、Ser457)。そこで、これらのアミノ酸残基の Chk1 によるリン酸化やその機能を Thr504 と同様に調べたところ、Cdc25B、Cdc25C、String も Cdc25A と同様な Chk1 による制御を受けることが分った。これらの結果から、様々な Cdc25 種が共通に Chk1 による新規阻害(基質認識の抑制)を受け、不活性化されることが明らかになった(図 14)。

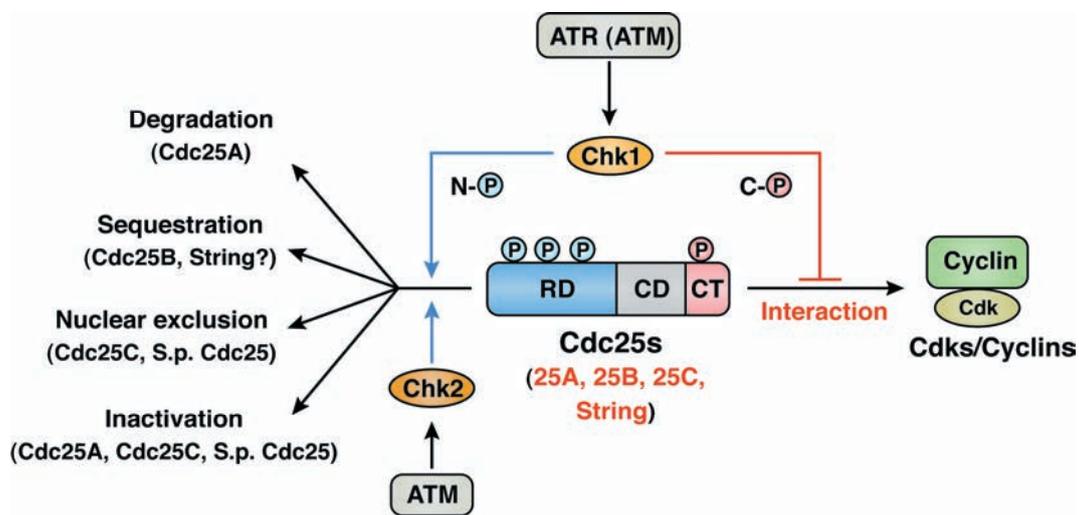


図 14 Chk1 による各種 Cdc25 の不活性化機構

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、G2 チェックポイントにおける、Chk1 による Cdc25 の普遍的な不活性化機構を明らかにした。同時に、各種 Cdc25 の C 末端が基質の Cdk/サイクリン複合体と結合する機能ドメインであることを示した。今後、その結合様式など高次構造を含めた解析が進むと考えられる。また、Chk1 は DNA 傷害・複製チェックポイントの主役のひとつであり、そのエフェクターとしての Cdc25 は重要な細胞周期制御因子である。従って、Cdc25 (特に Cdc25A) の発現や活性の人為的な制御はがん等の疾病の治療に有効とされている。Cdc25 の基質認識ドメインや G2 チェックポイント時のその活性制御を明らかにした本研究成果は、今後 Cdc25 を標的とした創薬等の社会還元につながると考えられる。

<Chk1 による Cdc25A の分解誘導機構の解析>

(1) 研究の背景とねらい

ユビキチン・プロテアソーム経路を介した蛋白質分解は、様々な細胞現象で重要な働きをしている。SCF(Skp1/Cul1/Rbx1/F-box 蛋白質)複合体は代表的なE3ユビチンリガーゼであり、可変サブユニットであるF-box 蛋白質が基質認識における特異性を生み出している。中でも注目されているF-box 蛋白質の β -TrCPは、基質蛋白質内のリン酸化DSGモチーフ(DpSGX Φ pS; Xは任意アミノ酸、 Φ は疎水性アミノ酸、pSはリン酸化されたセリン残基)を特異的に認識することが知られている。細胞周期制御因子のヒトCdc25Aホスファターゼは、G2チェックポイント活性化時にChk1キナーゼによってリン酸化され、DSGモチーフを介して β -TrCPと結合し、ユビキチン化/分解される。しかしながら、ツメガエルCdc25Aは典型的なDSGモチーフを持っていないにもかかわらず、Chk1によって β -TrCP依存的に分解される。我々はこのことに注目し、G2チェックポイント活性化時におけるツメガエルCdc25Aの β -TrCP結合部位の同定、及びその分解の分子機構の解析を行った。

(2) 研究実施内容及び成果

まず、我々はツメガエルCdc25Aの様々な断片をツメガエル卵に発現させ、 β -TrCPとの結合及びその結合部位の同定を試みた。その結果、ツメガエルCdc25AのN末端側には、DSGモチーフの2つのセリン残基のリン酸化を模倣した配列-DDG Φ XD(DDGモチーフと命名)-が存在し、このモチーフを介して β -TrCPと結合することが分かった。そして、Chk1活性化によりCdc25Aと β -TrCPとの結合能が増加し、Cdc25Aが分解されることが判明した(図15)。重要なことに、このDDGモチーフはヒトCdc25Aでも保存され

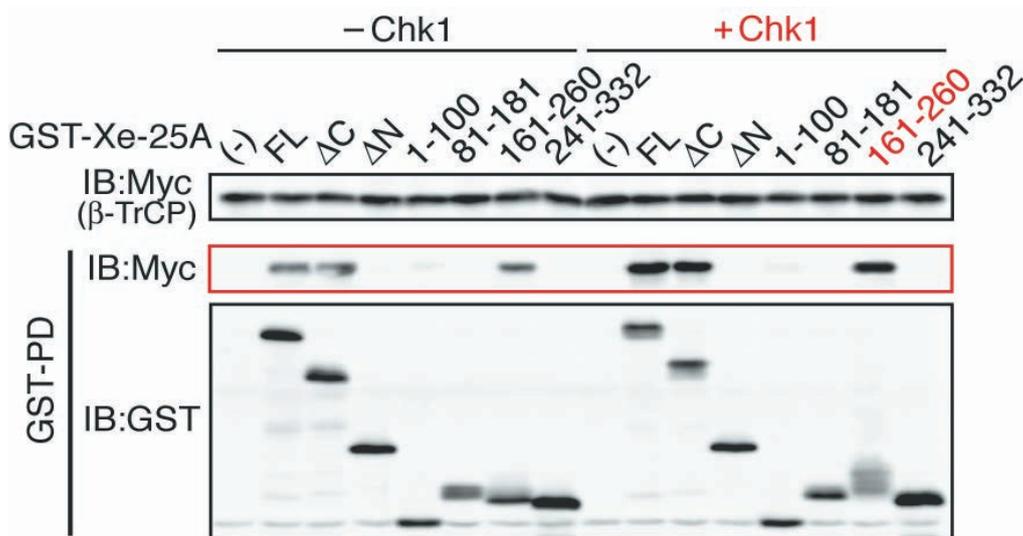


図15 Chk1によるCdc25Aと β -TrCPの結合の亢進
N末端161-260のアミノ酸にDDGモチーフがあり、
Chk1によって β -TrCPとの結合が亢進する。

ており、ヒト Cdc25A の DDG モチーフも β -TrCP との結合、分解に必要であることが分かった。これらのことから、ツメガエル Cdc25A は DDG モチーフのみ、ヒト Cdc25A は DSG 及び DDG モチーフの両方で β -TrCP と結合し、分解されることが明らかになった。さらに、ツメガエル Cdc25A の分解機構を詳細に調べた結果、Chk1 活性化後の Cdc25A と β -TrCP との結合能の増加には、DDG モチーフ上流のセリン (Ser219) とトレオニン (Thr222) の(何らかのキナーゼによる)リン酸化が関与していること、Cdc25A のユビキチン化の効率には PEST 配列 (Pro, Glu, Ser, Thr を多く含む配列) や Chk1 によるリン酸化が関与していることが明らかになった (図 16)。

また我々は、ヒト Cdc25B にも DDG モチーフが存在し、 β -TrCP により認識、分解されることを見いだした (Cdc25B は常に不安定な蛋白質であり、そのユビキチンリガーゼは同定されていなかった)。さらに、Cdc25B と β -TrCP との結合能に DDG モチーフ上流の酸性アミノ酸が関与することも明らかになった。最後に我々は、 β -TrCP が他の様々な蛋白質の DDG 様モチーフ (D-D/E-G- Φ -X-D/E) を認識することも見いだした。これらの蛋白質の中には、 β -TrCP を核に局在化させる hnRNP-U や β -アミロイドの産生を抑制する X11L などがあった。

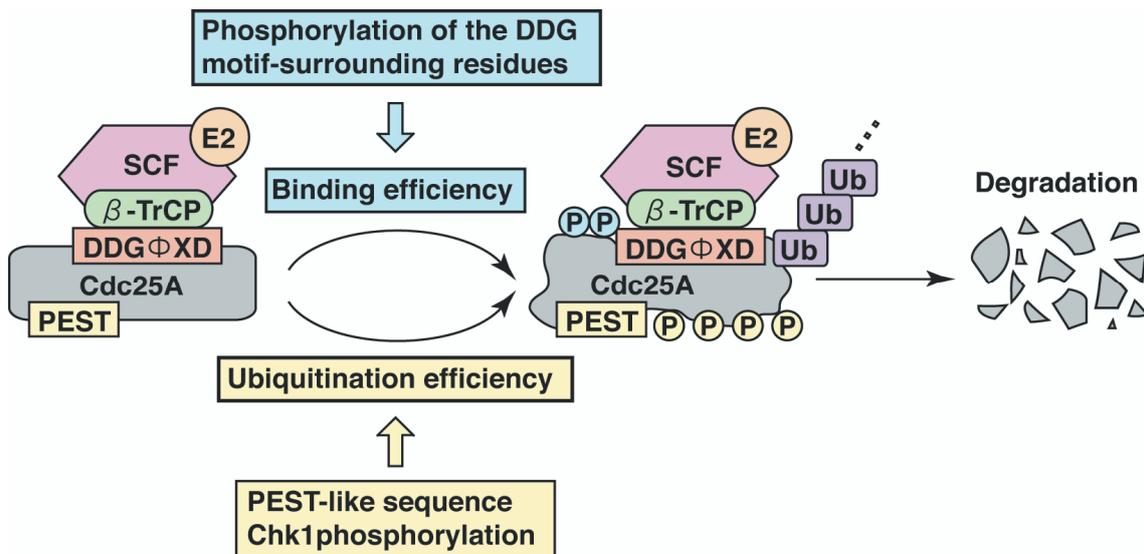


図 16 Chk1 による Cdc25A の分解誘導機構

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究により、 β -TrCP はリン酸化 DSG モチーフだけではなく、非リン酸化 DDG(様)モチーフも認識することが初めて示された。加えて、 β -TrCP とその基質蛋白質との結合効率に DDG モチーフ近傍の(陰性電荷を持った)アミノ酸が関与すること、ユビキチン化の効率に(β -TrCP との結合以外に)他の領域やリン酸化が関与することも示された。これらの研究成果により、今後 β -TrCP のさらなる基質蛋白質が数多く同定され、ユビ

キチン化の新たな分子機構も提示されると考えられる。さらには、 β -TrCPと様々な疾患(主にがん)との関わりが示唆されていることから、将来的には β -TrCPの基質認識を利用した新薬の開発等にも貢献すると考えられる。

<ERK-MAPK 経路による Cdc25A の分解誘導の解析>

(1) 研究の背景とねらい

Cdc25A は、サイクリン/Cdk 複合体を活性化させる正の細胞周期制御因子である。様々ながん細胞において、Cdc25A タンパクの過剰発現が見られることから、Cdc25A の分解は正常な細胞周期進行に重要であると考えられる。実際、Cdc25A は DNA 障害/複製チェックポイント活性化時に Chk1 キナーゼによってリン酸化され、SCF $^{\beta$ -TrCP ユビキチンリガーゼ複合体によってユビキチン化/分解を受け、その結果、細胞周期停止が引き起こされる。ERK-MAPK 経路は、重要な細胞内シグナル伝達機構のひとつであり、通常は細胞増殖、分化、細胞運動に関与するが、高活性条件下においては細胞周期停止を引き起こすことが知られている。しかし、その詳しいメカニズムは分かっていない。我々は、ツメガエル卵を用いて、ERK-MAPK 経路による細胞周期停止に Cdc25A の分解が関与する可能性を検討した。

(2) 研究実施内容及び成果

我々はまず、ERK-MAPK 経路の高活性化によってツメガエル Cdc25A が分解されるかを調べた。ツメガエル卵内に ERK キナーゼの上流キナーゼである MEK を発現させたところ、内在性 Cdc25A のすみやかなリン酸化及び分解が見られた。そこで、ERK-MAPK 経路による Cdc25A 分解への SCF $^{\beta$ -TrCP ユビキチンリガーゼの関与を調べた。 β -TrCP 非結合型変異体の Cdc25A や優性不能型変異体の β -TrCP を用いた実験から、結果として、ERK-MAPK 経路による Cdc25A の分解が、SCF $^{\beta$ -TrCP 依存的であることが分かった。さらに我々は、ERK-MAPK 経路による Cdc25A のリン酸化サイトの同定を試みた。in vitro キナーゼアッセイ及びアラニン置換変異体を用いた実験から、Cdc25A は、ERK の下流キナーゼである p90rsk から Chk1 のリン酸化サイトである 4 箇所のセリン残基(120、137、190、295)を、さらには ERK 自身から p90rsk とは別の 4 箇所のセリン残基(36、85、129、198)を、直接リン酸化されることが分かった。また、これら 8 箇所のセリン残基を全てアラニンに置換した Cdc25A(8A)変異体は、ERK-MAPK からの分解を全く受けないことが分かった。これらのことから、p90rsk と ERK はそれぞれ協調して Cdc25A の分解に関与することが明らかとなった。最後に我々は、ERK-MAPK 経路依存的な細胞周期停止における Cdc25A 分解の関与について調べた。ツメガエル受精卵内で ERK を活性化させると、内在性 Cdc25A の分解と共に細胞周期は G2 期で停止した。重要なことに、この細胞周期停止は野生型 Cdc25A の発現ではレスキューできなかったが、安定型の Cdc25A(8A)変異体の発現によってレスキューできた(図17)。このことは、ERK-MAPK

経路の高活性化による細胞周期停止に Cdc25A の分解が関与していることを強く示唆している。以上の結果から、ERK-MAPK 経路が Chk1 経路と非常によく似た方法で Cdc25A の分解を誘導し、細胞周期停止を引き起こすことが示された(図18)。

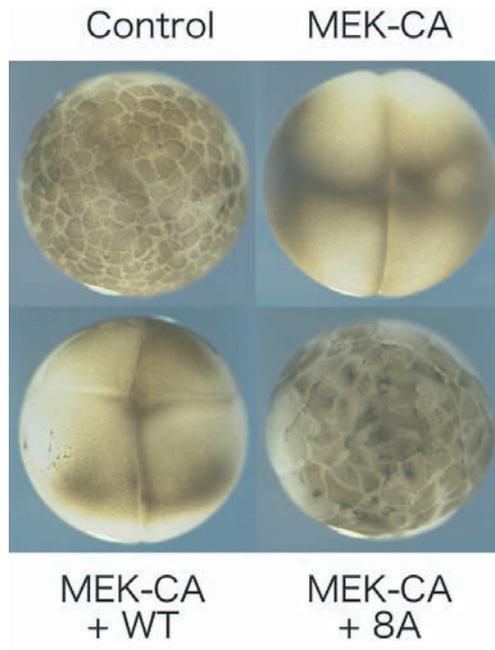


図 17 ERK 活性化によるツメガエル胚の細胞周期停止
MEK-CA は恒常活性型 MEK

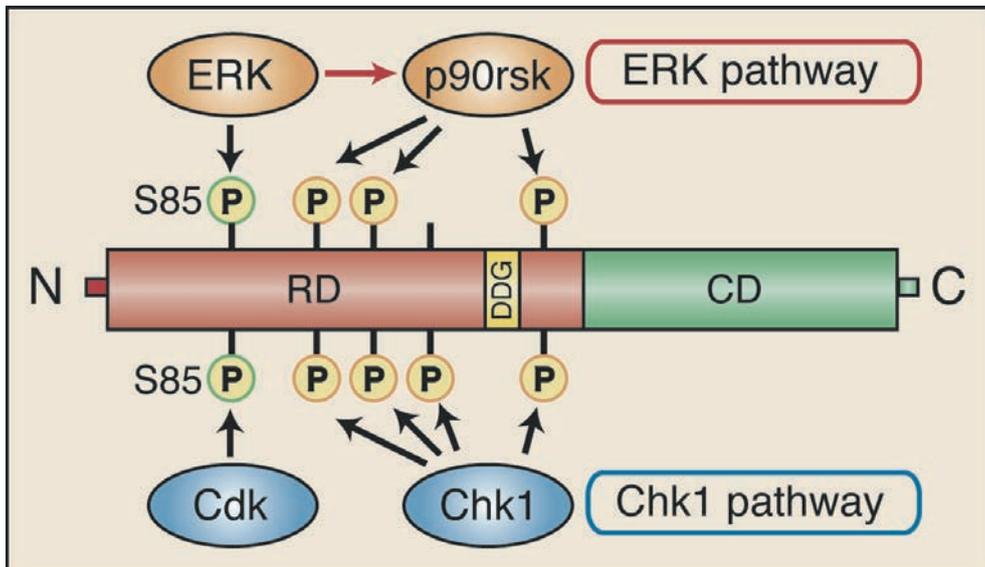


図 18 ERK-MAPK 経路による Cdc25A の分解誘導機構

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究により、Cdc25A が ERK-MAPK 経路の高活性化によって SCF ^{β -TrCP} 依存的に分解されることが初めて示された。さらに、この Cdc25A の分解は p90^{rsk} 及び ERK からリン酸化を必要とし、細胞周期停止を引き起こすことが分かった。これまでの知見から、Cdc25A の過剰発現及び弱い ERK-MAPK 経路の活性化は、共に細胞のがん化に関与することが知られている。これらのことから、本研究成果は、ERK-MAPK 経路の高活性化が Cdc25A の分解を介して細胞がん化を抑える可能性を示しており、今後、医療面への応用も期待される。

3.6 卵減数分裂周期における G2/M 制御(九州大学/佐方グループ)

<卵減数分裂における CPEB の分解機構の解析>

(1) 研究の背景とねらい

ツメガエルの卵成熟(卵減数分裂)は、細胞周期の観点から G2/M 転移と、S 期を省略した二回の連続した M 期(第一、第二減数分裂; MI, MII)から成る過程と見なすことができる。この卵成熟の進行は、主に母性因子として蓄えられた母性 mRNA の翻訳によって調節されている。mRNA 結合タンパク質 CPEB は、母性 mRNA の翻訳を正あるいは負に制御する因子として同定された。CPEB は、卵成熟の開始直後にリン酸化され、卵成熟特異的因子である Mos 等の翻訳を活性化する。一方、卵成熟の進行に伴い、CPEB は更に高リン酸化され、その結果ユビキチン・プロテアソーム経路に依存して分解される。この CPEB の分解は、第二減数分裂(MII)への侵入に必要な因子(サイクリン B 1 等)の翻訳を活性化するため、卵成熟の正常な進行に必須のイベントとして知られていた。しかしながら、CPEB の分解に関わる分子機構は不明であった。

(2) 研究実施内容及び成果

本研究では、CPEB の分解に関与する領域及び分子群(ユビキチンリガーゼ、キナーゼ)を同定し、分解へ導く一連の過程を明らかにした。まず、CPEB の分解に関与するユビキチンリガーゼが SCF ^{β -TrCP}であることを示した。実際、SCF ^{β -TrCP}の基質認識を司る F-boxタンパク質 β -TrCP のドミナントネガティブ変異体を卵母細胞に過剰発現させると、卵成熟における CPEB の分解が阻害されることを示した。また、CPEB は β -TrCP と相互作用することを明らかにした。次に、CPEB の分解に必要な領域を同定した。これに関して、CPEB の N 末端側に脊椎動物の CPEB において完全に保存されたアミノ酸配列 TSGFSS を同定し、これを TSG モチーフと命名した(図 19)。実際、TSG モチーフのアラニン置換変異体は有意に安定化し、かつ、 β -TrCP との結合が妨げられることを示した。また、TSG モチーフの複数ヶ所のリン酸化が SCF ^{β -TrCP} との結合に必要な十分であることを示した。更に、TSG モチーフをリン酸化するキナーゼとして、ツメガエル Polo 様キナ

ーゼ Plx1 (Plk1) を同定した。すなわち、TSG モチーフの Ser 残基 (Ser191) が Plx1 のリン酸化コンセンサスモチーフに合致することから、実際に Plx1 が Ser191 をリン酸化できることを示した。また、CPEB は Plx1 と相互作用することも見出した。そして、CPEB と Plx1 の結合に必要な部位 (Thr125) を同定した。すなわち、Thr125 のリン酸化が Plx1 との結合に必要なかつ十分であることを示し、そのキナーゼとして Cdc2 を同定した。まとめると、Cdc2 による Thr125 のリン酸化が出发点となり、このリン酸化部位に Plx1 が結合し、TSG モチーフのリン酸化及び β -TrCP との結合を引き起こし、CPEB の分解を誘導することが明らかになった (図 20)。

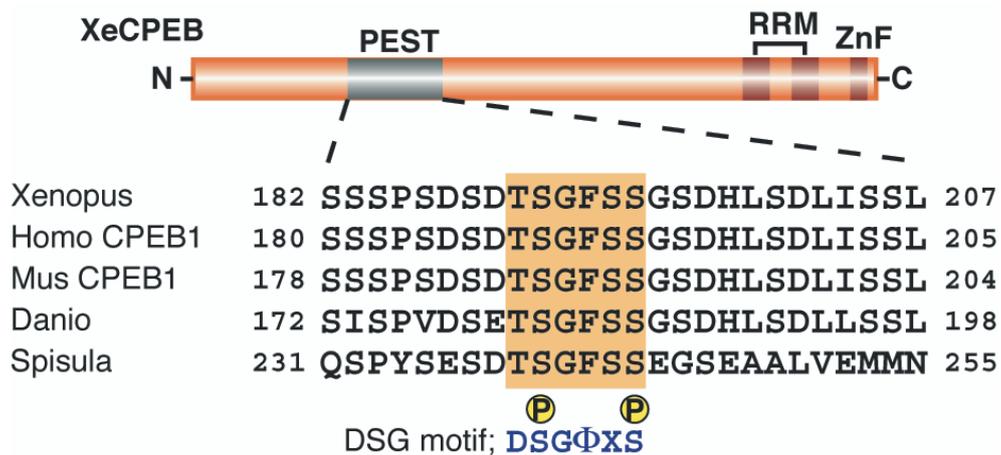


図 19 様々な生物の CPEB における TSG モチーフの保存

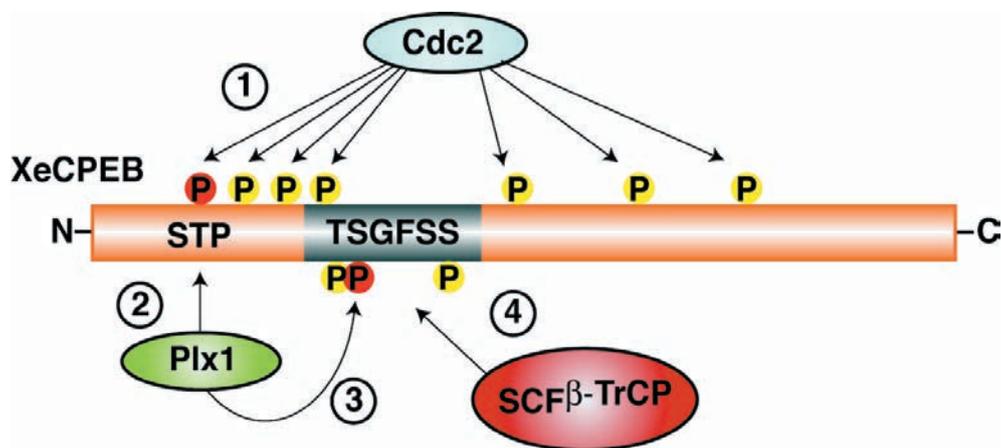


図 20 卵減数分裂における CPEB の分解機構

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、卵減数分裂での MII 進入に必須な CPEB の分解の分子機構を明らかにし、新たに SCF β TrCP の基質結合モチーフとして TSG モチーフを発見した。データベース上、TSG モチーフをもつタンパク質は数多く存在し、各々のタンパク質の分解が各局面において重要な役割をもつ可能性を示唆している。一方、CPEB は初期発生におけ

る翻訳制御に関わるだけでなく、神経系における役割が最近注目されている。すなわち、CPEB の分解が記憶の分子的基盤の一つとされる長期増強に関与している可能性が示唆されている。従って、本研究成果は、今後この分野の発展にも寄与すると考えられる。

<卵減数分裂周期における Erp1 の発現の解析>

(1) 研究の背景とねらい

脊椎動物の卵減数分裂周期は、DNA複製を省略した2回の連続した分裂期（第一減数分裂，MI:第二減数分裂，MII）から構成される。そして、MI期からMII期への進行（MI/MII転移）後、卵はMII期中期（Meta-II）で分裂周期を停止し、受精を待つ。このような卵減数分裂周期の失敗は不妊症や先天性遺伝子疾患（ダウン症など）の原因となるため、その分子機構解明は重要である。最近、Erp1（別名Emi2）はAPC/Cユビキチンリガーゼ（CyclinB等のユビキチン化に関与する）のinhibitorであり、Meta-II停止に必須の因子であることが示されている。しかしながら、Erp1は卵減数分裂を通じて恒常的に発現するとされている。従って、なぜ卵減数分裂がMeta-Iでは停止しないのかは謎であった。本研究で、我々はツメガエル卵を用いて、Erp1タンパクの発現パターンや卵減数分裂における役割についての再検討を行った。

(2) 研究実施内容及び成果

まず、我々は複数のErp1のポリクローナル抗体を作製し、Erp1のツメガエル卵減数分裂過程における発現パターンを再検討した。その結果、従来の報告と異なり、Erp1は強いリン酸化を受けること、MI期にはほとんど存在せずMI/MII転移頃から発現を開始することが分かった。加えて、3'非翻訳領域（UTR）を持ったErp1 mRNAを卵に導入すると、内在性Erp1とほとんど同様のタンパク発現パターンを示した。従って、Erp1はMI/MII転移期に発現を開始し、その発現調節にErp1 mRNAの3'UTRが関与していることが分かった。さらに、Erp1のモルフォリーノオリゴを用いてErp1の発現を特異的に阻害したところ、MI/MII転移後のCyclin Bの部分的な安定化が起こらず（すなわち、強く分解され）、その結果、Cdc2活性の低下、外部形態の異常、内部染色体・紡錘体微小管構造の異常、DNA複製などが起こり、卵はMI/MII転移を失敗した（図21）。モルフォリーノオリゴによるErp1発現阻害の影響は、Cyclin Bの動態をはじめとし、外来的にErp1タンパクを発現させることで全て回復した。従って、Erp1の発現がMI/MII転移時のAPC/Cの部分的抑制と、それに伴うCyclin Bの部分的安定化を引き起こし、MIIの進入を可能にしていることが示された。また、MI期にMeta-II量のErp1を外来的に発現させたところ、Cyclin Bの安定化とそれに伴うCdc2の恒常的な活性化が起こり、極体の放出も抑制され、卵はMeta-Iで停止した。従って、MI期にErp1が無いことがMIの進行に必須であることも示さ

れた。以上の結果から、Meta-II停止以前の卵減数分裂におけるErp1の発現パターンとその役割が明らかとなった(図22)。

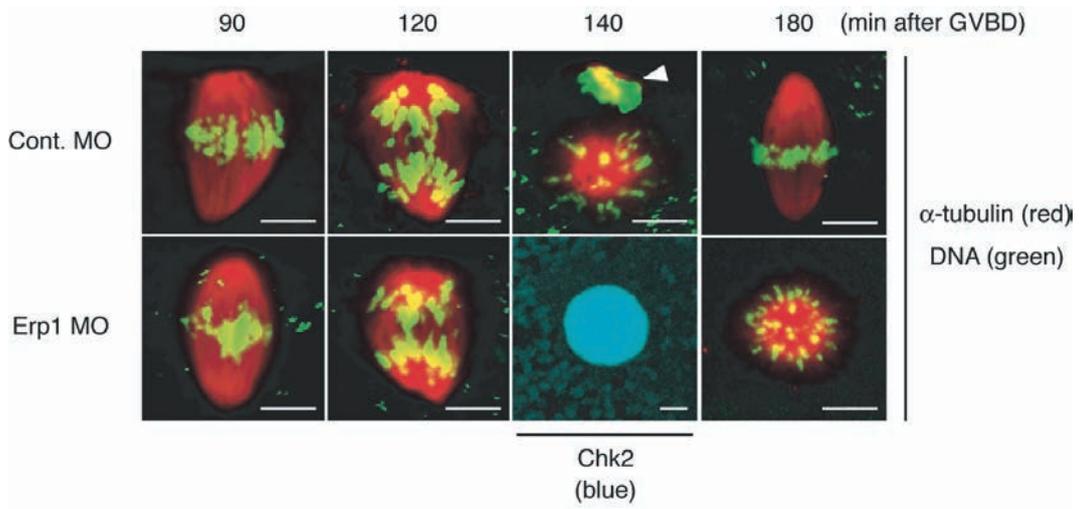


図21 Erp1のMI/MII転移への必要性

Erp1モルフォリーノオリゴ(Erp1-MO)処理卵では、MI後(GVBD後140分)に核が出てくる。

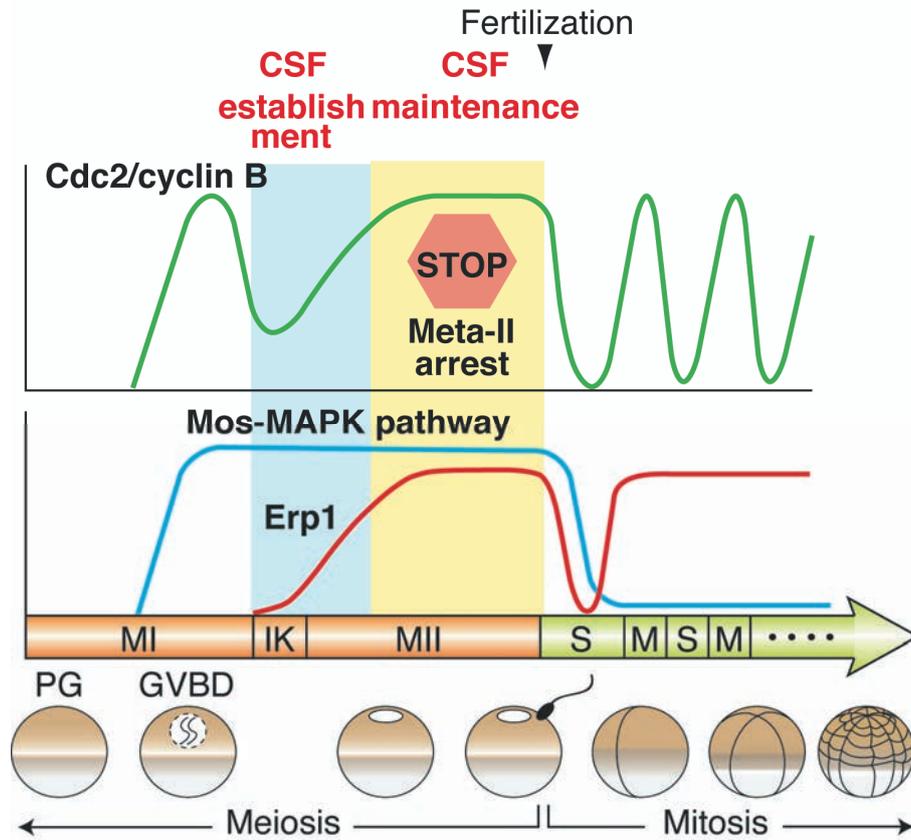


図22 Mos-MAPK経路とErp1の発現パターンとの関係

(3) 研究成果の今後期待される効果

本成果から、Erp1の卵減数分裂における役割が明確となり、これまでMI/MII転移とMeta-II停止に必須とされていたMos-MAPK経路との関係性が示唆された。そして、引き続き研究を行った結果、Mos-MAPK経路がErp1を活性化・安定化することが明らかになった(次項を参照)。卵減数分裂特異的に活性化するMos-MAPK経路の分子標的は20年来不明であり、この成果は大きなインパクトを与えている。また、本成果をはじめとし、卵減数分裂を制御する分子機構の解明・理解は、将来的に不妊症や先天性遺伝子疾患(ダウン症など)の新たな治療・予防法の開発など、社会への還元が期待される。

<卵減数分裂 M 期停止における Mos-MAPK 経路と Erp1 の関係の解析>

(1) 研究の背景とねらい

脊椎動物の未受精卵は、二回の連続した M 期を経て第二減数分裂中期(Meta-II)で分裂を停止する。Meta-II 停止は、未受精卵が単為発生するのを防ぐために極めて重要であり、細胞分裂抑制因子(CSF)が M 期促進因子(Cdc2/サイクリン B 複合体)の活性を維持することで引き起こされる。これまで、卵減数分裂に特異的な Mos-MAPK 経路が CSF として Meta-II 停止に必須であることが示されてきた。一方最近、ツメガエルおよびマウス卵において、Erp1(別称 Emi2)が分裂後期促進因子(APC/C)を抑制することでサイクリン B の分解を抑え、Meta-II 停止に必須の役割を果たすことが報告された。しかしながら、Mos-MAPK 経路と Erp1 の関係を含め、Meta-II 停止の最終的な分子機構は謎のままである。そこで、ツメガエル卵において両因子の関係を探ることで、Meta-II 停止の分子機構の解明を試みた。

(2) 研究実施内容及び成果

我々の先行研究(前項参照)から、Erp1 が第一減数分裂(MI)の終わり頃から発現をはじめ、第二減数分裂(MII)まで蓄積することが分かった。そこでまず、Erp1 の発現と Mos-MAPK 経路の関係を探るため、減数分裂において Mos-MAPK 経路を特異的に阻害した。その結果、Erp1 の発現がほぼ正常であるにもかかわらず、卵は Meta-II 停止に失敗することが分かった。この結果は、Erp1 の Meta-II 停止活性が Mos-MAPK 経路に依存していることを強く示唆した。実際、*in vitro* キナーゼアッセイから、Mos-MAPK 経路の最下流のキナーゼである p90rsk が Erp1 の Ser335 と Thr336 (S335/T336)を直接リン酸化できることを見いだした。そして、両リン酸化それぞれに対するリン酸化特異抗体を用いた実験から、S335/T336 は p90rsk の活性に依存的にして減数分裂過程でリン酸化されることを示した。次に、これらのリン酸化が Erp1 にどのような影響を及ぼすか調べるため、S335/T336 のアラニン置換変異体(2A)を作製した。2A 変異体を MII において発現させたところ、2A 変異体は野生型と比較して代謝的に非常に不安定であることが判明した。さらに、Erp1 のモルフォリン-オリゴ処理卵のレスキュー実験から、野生型

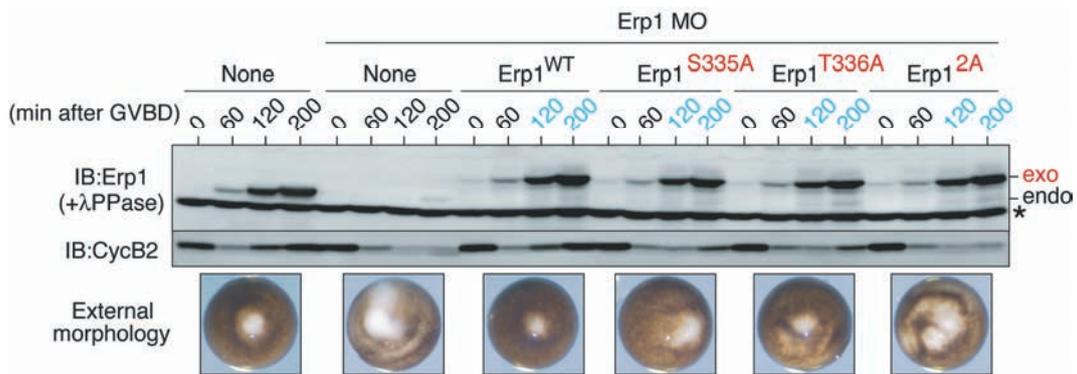


図 23 p90rsk による S335/Thr336 のリン酸化の Erp1 活性への必要性

Erp1 が Meta-II 停止を回復できるのに対し、2A 変異体は Meta-II 停止を引き起こせず、CSF 活性が著しく低下していることが示された(図 23)。すなわち、p90rsk による S335/T336 のリン酸化は、Erp1 の安定性と活性を維持することで Meta-II 停止に必須であることが判明した。これらの結果から、Mos-MAPK 経路と Erp1 との直接的なリンクが示され、Meta-II 停止の最終的な分子機構が明らかになった(図 24)。

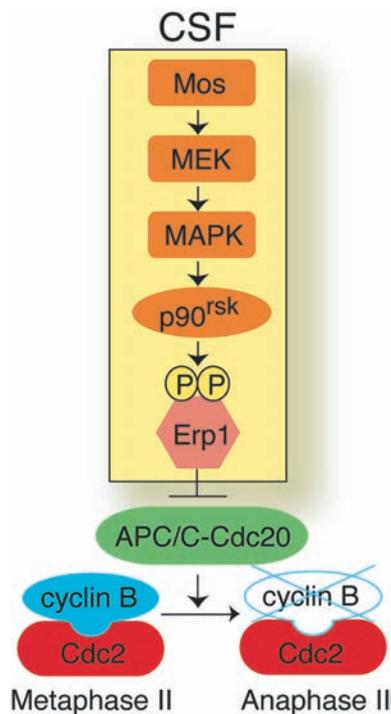


図 24 Meta-II 停止の分子経路と機構

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、Mos-MAPK 経路が Erp1 と直接的にリンクしていることを示し、約 30 年来謎のままであった CSF の全体像を明らかにした。本成果は、脊椎動物卵の Meta-II 停止機構の最終的な問題を解決をした点で卵減数分裂の分野に非常に大きなインパクトを与えている。今後、Erp1 のより詳細な制御を高次構造を含め解析することで更なる知見が得られると期待される。卵減数分裂における Meta-II 停止の失敗は、不妊や先天性疾患であるダウン症などの原因として注目されている。従って、本成果は、これらの治療・予防につながる基礎的な知見として社会に還元されると考えられる。

3.7 神経分化の G2/M 制御(九州大学/佐方グループ)

<神経前駆細胞の分裂と分化における FoxM1 の役割の解析>

(1) 研究の背景とねらい

細胞分裂の制御は多細胞生物の発生過程において厳密に制御されなければならない。近年、様々な動物種の初期発生過程で、神経外胚葉(および神経前駆細胞)では他の領域に比べ、細胞分裂が盛んであるという報告がなされた。この細胞分裂は、十分な数の神経細胞の確保にとって重要だと考えられるが、神経外胚葉で見られる細胞分裂がどのようにして促進されるかは明らかでない。また、最終分化を終えた神経細胞は M 期終了後の G0 期で細胞周期を停止しているが、最終分化に先立つ神経前駆細胞の細胞周期進行(分裂)が神経分化に重要か否かは検証されていない。そこで我々は、神経形成における細胞分裂制御とその意義を調べるため、哺乳類培養細胞の細胞分裂(G2/M 期進行)に必要であり、神経前駆細胞で発現している転写因子 FoxM1 について、ツメガエル初期胚を用いて解析した。

(2) 研究実施内容及び成果

まず我々は、ツメガエル初期胚における FoxM1 の発現領域を調べた。in situ hybridization 法による解析の結果、FoxM1 がツメガエル初期発生過程で神経領域に強く発現する事を見いだした。また、FoxM1 発現阻害実験により、FoxM1 は神経領域の細胞分裂に必要であり、同領域で Cdc25B や Cyclin B3 等の G2/M 期制御因子を転写している事がわかった。次に我々は、神経前駆細胞が盛んに細胞分裂を行う機構について解析した。初期発生過程において、神経前駆細胞は神経誘導を受けた外胚葉の細胞から形成される。神経誘導には、FGF シグナル、Wnt シグナル、BMP シグナルの抑制、の3つのシグナルが関与しているとされている。そこで我々は、これらのシグナルが予定神経外胚葉の細胞分裂に影響を与えるか否かを調べた。その結果、BMP 阻害因子によって BMP シグナルを抑制した時のみ、細胞分裂や FoxM1 を含む様々な細胞周期制御因子の発現が誘起された。また、この際 FoxM1 を阻害すると、G2/M 期制御因

子の発現や細胞分裂が抑制された(図25)。以上より、BMP 阻害因子は、外胚葉の神経化に加え、FoxM1 の発現を介した細胞分裂を誘導している事が明らかになった。

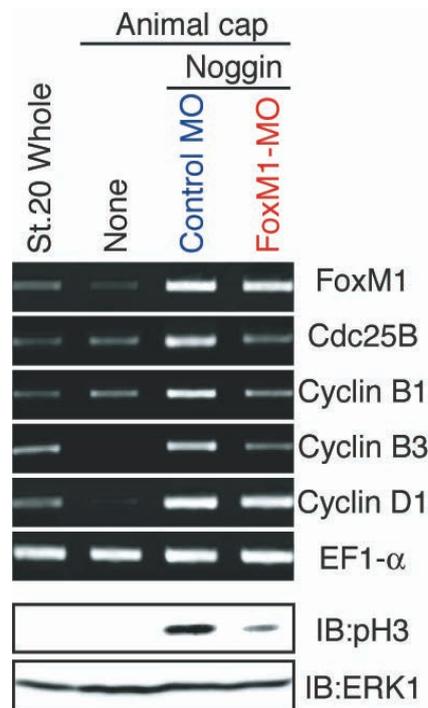


図 25 BMP シグナルの抑制による細胞分裂と諸細胞周期因子の発現の誘導

Animal cap は動物極細胞群、Noggin は BMP の阻害因子、pH3 は分裂期のマーカー。

さらに我々は、神経形成における FoxM1 の役割を調べるため、FoxM1 阻害胚での神経マーカーの発現を調べた。その結果、神経前駆細胞マーカー (Sox2 など) の発現は正常であったが、神経細胞マーカー (N-tubulin など) の発現は顕著に減少していた。この結果から、FoxM1 は神経前駆細胞の形成には必要でないが、神経細胞の分化には必須である事が示された。そこで我々は、神経分化に FoxM1 依存の G2/M 期進行が必要か否かを検証するため、FoxM1 下流の G2/M 期制御因子 Cdc25B の発現阻害を行い、神経分化に与える影響を調べた。その結果、FoxM1 阻害の場合と同様、神経領域の細胞分裂 (G2/M 期進行) と神経分化が阻害された。以上の結果から、FoxM1 に依存した神経前駆細胞の G2/M 期進行が神経分化に重要である事が示された (図26)。

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究により、神経分化には FoxM1 を介した適切な G2/M 期進行が重要であることが示された。これは、神経分化と細胞周期のクロストークを示唆するものであり、今後の研究でその詳細な分子メカニズムが解明されると考えられる。さらに、神経形成のみならず様々な組織形成に重要である BMP シグナルが細胞分裂を制御していることを示した。

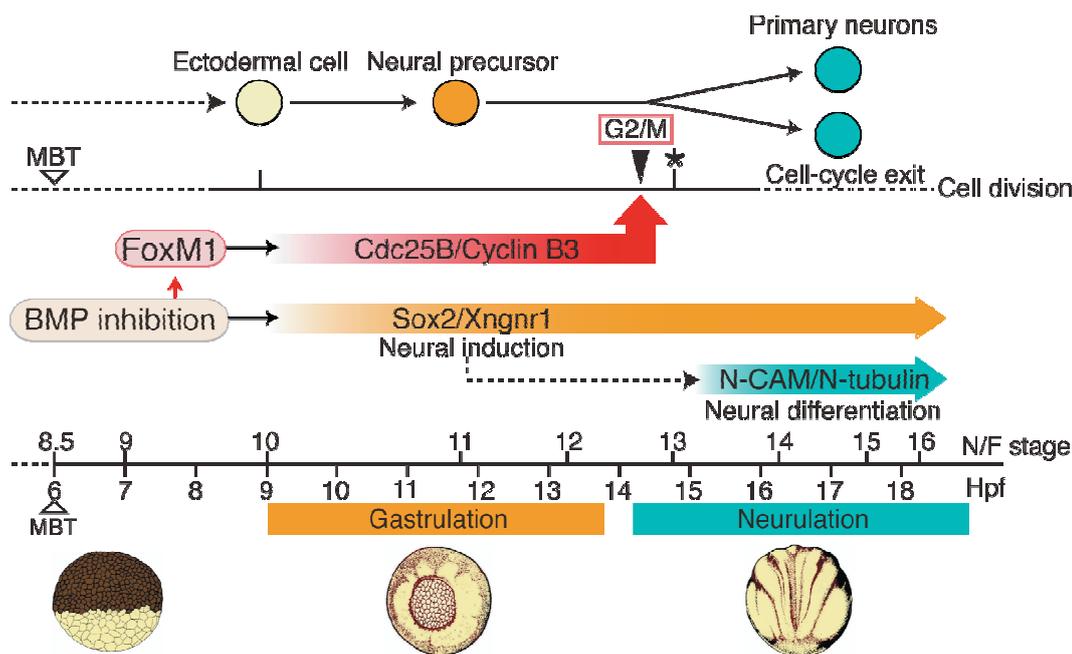


図 26 神経前駆細胞の分裂と分化における FoxM1 の役割

それ故、本研究成果を足がかりとし、初期発生や組織形成における細胞分裂制御の機構が解明されると考えられる。また、神経分化の異常や神経細胞の減少は様々な神経疾患に繋がることから、本成果は将来的に神経疾患の治療に貢献する事が期待される。

§ 4 研究参加者

① 佐方グループ (M 期開始、M 期進行、G2 チェックポイント及び初期発生の制御の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	佐方 功幸	九州大学 大学院理 学研究院	教授	研究総括	H15.10～H21.3
	中條 信成	九州大学 大学院理 学研究院	助教	G2 チェックポイントと神 経分化の解析	H15.10～H21.3
	岡本 健吾	九州大学 大学院理	助教	主に M 期進行の解析	H15.10～H19.9

		学研究院			
*	宇都 克裕	九州大学 大学院理 学研究院	CREST 研 究員	主に G2 チェックポイント の解析	H15.10～H17.4
*	葛城 美德	九州大学 大学院理 学研究院	CREST 研 究員	G2 チェックポイントの解 析	H15.10～H17.5
*	井上 大悟	九州大学 大学院理 学研究院 九州大学 大学院理 学研究院	CREST 研 究員 CREST 研 究員（委 託雇用）	M 期開始と卵減数分 裂の解析	H15.10～H19.9 H19.10～H20.9
*	権藤 幸代	九州大学 大学院理 学研究院	CREST 技 術補佐員	遺伝子クローニングとタ ンパク質の精製	H16.4～H17.5
*	磯村 美乃 里	九州大学 大学院理 学研究院	CREST 技 術補佐員	遺伝子クローニングとタ ンパク質の精製	H17.7～H18.10
*	叶 美心	九州大学 大学院理 学研究院	CREST 研 究補助員	研究の補助	H18.11～H21.3
*	後藤 恵子	九州大学 大学院理 学研究院	CREST チ ーム事務 員	チーム事務	H15.10～H21.3
*	兼森 芳紀	九州大学 大学院 システム生 命科学府	グローバル COE 学術 研究員	主に G2 チェックポイント の解析	H16.4～H17.1
*	伊佐 恵	九州大学 大学院 システム生 命科学府	修士課程 修了	M 期開始の解析	H16.4～H17.1
*	瀬戸山 大 樹	九州大学 大学院	大学院生	卵減数分裂の解析	H16.4～H21.3

		システム生 命科学府			
*	磯田 道孝	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生	主に G2 チェックポイント の解析	H16.4~H21.3
*	桧物 綾香	九州大学 大学院 システム生 命科学府	修士課程 修了	M 期進行の解析	H16.4~H18.3
*	仲地 義憲	九州大学 大学院 システム生 命科学府	修士課程 修了	G2 チェックポイントの解 析	H16.4~H19.3
*	上野 裕之	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生	主に神経分化と分裂の 解析	H17.4~H21.3
*	大江 宗理	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生	卵減数分裂の解析	H17.4~H21.3
*	西村 健太 郎	九州大学 大学院 システム生 命科学府	修士課程 修了	M 期開始の解析	H17.4~H19.3
*	松田 宇翔	九州大学 大学院 システム生 命科学府	修士課程 修了	M 期進行の解析	H17.4~H19.3
*	葛原 大士	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生	G2 チェックポイントの解 析	H18.4~H20.3
*	信井 俊哉	九州大学 大学院	修士課程 修了	卵減数分裂の解析	H18.4~H20.3

		システム生 命科学府			
*	宮本 太樹	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生 (研究補 助員)	主に卵減数分裂の解 析	H18.4~H21.3
*	副島 純美	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生 (研究補 助員)	M期進行の解析	H19.4~H21.3
*	張 おう文	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生 (研究補 助員)	主に神経分化の解析	H19.4~H21.3
*	諸熊 孝太 郎	九州大学 大学院 システム生 命科学府	M2(研究 補助員)	主にG2チェックポイント の解析	H19.4~H20.7
*	深田 明宏	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生 (研究補 助員/委 託雇用)	神経分化と分裂の解 析	H20.4~H21.3
*	河村 嘉子	九州大学 大学院 システム生 命科学府	大学院生 (研究補 助員/委 託雇用)	主にM期開始の解析	H20.4~H21.3

②小林グループ(G2/M 転移制御の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	小林 英紀	九州大学 医学研究 院 岡山大学 教育開発	准教授 教授	グループ研究総括	H15.10~H19.9 H19.10~H21.3

		センター			
*	舟越 稔	九州大学 医学研究 院	CREST 研究員	G2/M 転移の解析	H15.10～H16.9
	関口 猛	九州大学 医学研究 院	助教	G2/M 転移の解析	H19.4～H21.3
*	斎藤 洋平	九州大学 医学研究 院	CREST 研究員	G2/M 転移の解析	H17.7～H18.3
*	石井 健士	九州大学 医学研究 院 九州大学 医学研究 院	CREST 研究補 助員 CREST 研究員 (委託雇 用)	G2/M 転移の解析	H16.4～H19.3 H19.4～H20.3
*	佐々木 徹	九州大学 医学研究 院 岡山大学 教育開発 センター	CREST 研究補 助員 助教(委 託雇用)	G2/M 転移の解析	H18.6～H20.3 H20.4～H21.3
*	栗原 淑子	九州大学 医学研究 院	研究補 助員	研究の補助	H19.4～H20.3
	田中 佳苗	九州大学 医学研究 院	大学 院 生	G2/M 転移の解析	H17.4～H18.3

§ 5 招聘した研究者等

特になし

§ 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 25 件)

1. Yoshitome, S., Furuno, N., Hashimoto, E. and Sagata, N.: The C-terminal seven amino acids in the cytoplasmic retention signal region of cyclin B2 are required for normal bipolar spindle formation in *Xenopus* oocytes and embryos. **Mol. Cancer Res.**, 1, 589-597 (2003).
2. Furuno, N., Kawasaki, A., and Sagata, N.: Expression of cell-cycle regulators during *Xenopus* oogenesis, **Gene Expression Patterns**, 3, 165-168 (2003).
3. Goda, T., Nakajo, N., Sagata, N. and Kobayashi, H.: The RRASK motif in *Xenopus* cyclin B2 is required for the substrate recognition of Cdc25C by the cyclin B-Cdc2 complex. **J. Biol. Chem.**, 278, 19032-19037 (2003).
4. Katsuragi, Y. and Sagata, N.: Regulation of Chk1 by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation. **Mol. Biol. Cell.**, 15, 1680-1689 (2004).
5. Uto, K., Inoue, D., Shimuta, K., Nakajo, N. and Sagata, N.: Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. **EMBO J.**, 23, 3386-3396 (2004).
6. Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M. and Kobayashi, H.: Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. **J. Cell Sci.**, 117, 6447-6454 (2004).
7. Asai, A., Tsujita, T., Yamashita, Y., Akiyama, T., Akinaga, S., Funakoshi, M., Kobayashi, H. and Mizukami, T.: A new structural class of proteasome inhibitors identified by microbial screening using yeast-based assay. **Biochem. Pharma.**, 67, 227-234 (2004).
8. Inoue, D. and Sagata, N.: The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs. **EMBO J.**, 24, 1057-1067 (2005).
9. Ohno, A., Jee, J-G., Fujiwara, K., Tenno, T., Goda, N., Tochio, H., Kobayashi,

- H., Hiroaki, H. and Shirakawa, M.: Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with ubiquitin: Molecular determinants for ubiquitin recognition. **Structure**, 13, 521–532 (2005).
10. Kanemori, Y., Uto, K. and Sagata, N.: β -TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102, 6279–6284 (2005).
 11. Saitoh, Y., Ogawaa, K. and Nishimoto, T.: Brllp-A novel nuclear envelope protein required for nuclear transport. **Traffic**, 6, 502–517 (2005).
 12. Sasaki, T., Funakoshi, M., Endicott, J.A. and Kobayashi, H.: Budding yeast Dsk2 protein forms a homodimer via its C-terminal UBA domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 336, 530–535 (2005).
 13. Ryo, A., Tago, T., Nakai, T., Hirai, A., Yamaguchi, A., Suzuki, K, Hirayasu, Y., Kobayashi, H., Perrem, K., Liou, Y-C. and Aoki, I.: The prolyl-isomerase Pin1 accumulates in the Lewy bodies of Parkinson's disease and facilitates the formation of α -synuclein inclusions. **J. Biol. Chem.**, 281, 4117–4125 (2006).
 14. Tanaka, K., Funakoshi, M., Inoue, K. and Kobayashi, H.: Identification of two isoforms of Dsk2-related protein XDRP1 in *Xenopus* eggs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 350, 768–773 (2006).
 15. Tanaka, K., Funakoshi, M. and Kobayashi, H.: A Cdc2-sensitive interaction of the UbL domain of XDRP1S with cyclin B mediates the degradation of cyclin B in *Xenopus* egg extracts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 350, 774–782 (2006).
 16. Ishii, T., Funakoshi, M. and Kobayashi, H.: Yeast Pth2 is a UBL domain-binding protein that participates in the ubiquitin. **EMBO J.**, 25, 5492–5503 (2006).
 17. Okamoto, K. and Sagata, N.: Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase Wee1 at M phase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 104, 3753–3758 (2007).

18. Ohe, M., Inoue, D., Kanemori, Y. and Sagata, N.: Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. **Dev. Biol.**, 303, 157-164 (2007).
19. Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T. and Sagata, N.: A direct link of the Mos/MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. **Nature**, 446, 1100-1104 (2007).
20. Setoyama, D., Yamashita, M. and Sagata, N.: Mechanism of degradation of CPEB during *Xenopus* oocyte maturation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 104, 18001-18006 (2007).
21. Ueno, H., Nakajo, N., Watanabe, M. Isoda, M. and Sagata, N.: FoxM1-driven cell division is required for neuronal differentiation in early *Xenopus* embryos, **Development**, 135, 2023-2030 (2008).
22. Sekiguchi, T., Hayashi, N., Wang, Y. and Kobayashi, H.: Genetic evidence that Ras-like GTPases, Gtr1p and Gtr2p, are involved in epigenetic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 748-754. (2008).
23. Horiike, Y., Kobayashi, H., and Sekiguchi, T.: Ran GTPase guanine nucleotide exchange factor RCC1 is phosphorylated on serine 11 by cdc2 kinase in vitro. **Mol. Biol. Rep.** (2008). In press.
24. Isoda, M., Kanemori, Y., and Sagata, N.: The ERK-MAPK pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF ^{β -TrCP}-dependent degradation for cell-cycle arrest. Under submission.
25. Goda, T., Sasaki, T., Sagata, N., and Kobayashi, H.: Docking domain of cyclin A for the substrate Cdc6 in *Xenopus laevis*. In preparation.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演 (国内会議 12件、国際会議 2件)

1. 佐方功幸「Regulation of Chk1 by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation」京都大学 COE 国際シンポジウム(大津)(2003年11月29日～12月2日)
2. 佐方功幸「Chk1 regulation of Cdc25A in *Xenopus* embryos」第5回日英細胞周期国際学会(奈良)(2004年4月13日～4月16日)
3. 佐方功幸「ツメガエル中期胞胚遷移のチェックポイント制御」日本動物学会中部支部大会シンポジウム(静岡)(2004年7月23日～7月24日)
4. 佐方功幸「細胞周期のチェックポイント制御」大鵬薬品研究所講演会(徳島)(2004年8月6日)
5. 佐方功幸「DNA複製チェックポイントにおけるChk1によるCdc25の活性制御」第63回日本癌学会学術総会ワークショップ(福岡)(2004年9月29日～10月1日)
6. 小林英紀「Role of the UBA domain protein XDRP1 in the degradation of cyclin. “Frontier of cell cycle”」日本農芸化学会シンポジウム(広島)(2004年3月)
7. 佐方功幸「ツメガエル中期胞胚遷移(MBT)のチェックポイント制御」第27回日本分子生物学会ワークショップ(神戸)(2004年12月8日～12月11日)
8. 井上大悟・磯田道孝・佐方功幸「ツメガエル受精前後における Myt1 キナーゼの不活性化制御」第5回日本蛋白質科学会ワークショップ(福岡)(2005年6月30日～7月2日)
9. 佐方功幸「ツメガエル初期発生における細胞周期のチェックポイント制御」山口オンコロジーセミナー(山口)(2005年9月8日)
10. 井上大悟・佐方功幸「ツメガエル卵減数分裂周期および卵割体細胞周期における Myt1 キナーゼ活性の制御」第28回日本分子生物学会ワークショップ(福岡)(2005年12月7日～12月10日)
11. 舟越稔、石井健士、小林英紀「UBL-UBA タンパク質はポリユビキチン化分解蛋白質をプロテアソームに配送する shuttle 因子である」第28回日本分子生物学会ワークショップ(福岡)(2005年12月7日～12月10日)

12. 佐方功幸「Checkpoint regulation of the Mid-Blastula transition (MBT) in *Xenopus* embryos」第 77 回日本動物学会シンポジウム（島根）(2006 年 9 月 23 日)
13. 佐方功幸「ツメガエル卵減数分裂周期の制御機構」蛋白研セミナー(減数分裂)
(2006 年 11 月 21 日)
14. 佐方功幸「脊椎動物未受精卵の Meta-II 停止の分子機構」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ(横浜)(2007 年 12 月 11 日～12 月 15 日)

②口演発表 (国内会議 16 件、国際会議 1 件)

1. 岡本健吾・佐方功幸「M 期における Wee1 キナーゼ活性の制御」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
2. 葛城美徳・佐方功幸「Regulation of the kinase activity of Chk1 by an autoinhibition and by ATR-mediated phosphorylation」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
3. 井上大悟・中條信成・佐方功幸「ツメガエル polo 様キナーゼ 1 による Myt1 キナーゼ活性制御機構」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
4. 宇都克裕・井上大悟・志牟田健・中條信成・佐方功幸「アフリカツメガエル中期胚遷移における Cdc25A フォスファターゼの抑制機構」第 37 回日本発生生物学会(名古屋)(2004 年 6 月 4 日～6 月 6 日)
5. 宇都克裕・佐方功幸「DNA複製チェックポイントにおけるCdc25Aの制御」特定領域研究「細胞周期」全体進捗会議(北海道)(2004年9月14日～9月17日)
6. 宇都克裕・井上大悟・志牟田健・中條信成・佐方功幸「Chk1はCdc25とCdk-サイクリン複合体との結合を阻害する:Chk1によるCdc25の普遍的抑制機構」第27回日本分子生物学会(神戸)(2004年12月11日)
7. 佐方功幸「細胞周期／チェックポイント制御蛋白質の構造と機能の制御」たんぱく

質関連領域合成シンポジウム(東京)(2004年12月22日～12月23日)

8. 中條信成・住友洋美・毛利宣子・渡部 稔・佐方功幸「サイクリン E2 は原腸胚期以降のツメガエル正常発生に必要である」第 38 回日本発生生物学会(仙台)(2005年6月2日～6月4日)
9. 舟越稔・石井健士・小林英紀「UBL-UBAタンパク質はポリユビキチン化分解蛋白質をプロテアソームに配送する shuttle 因子である」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005年12月7日～12月10日)
10. 白川昌宏、藤原健一郎、大野綾子、小林英紀、菅沢薫、花岡文雄、天野剛志、栃尾豪人、廣明秀「UBL-UBAドメインの立体構造と分子認識」第 28 回日本分子生物学会ワークショップ(福岡)(2005年12月7日～12月10日)
11. 大江宗理、井上大悟、兼森芳紀、佐方功幸「ツメガエル卵減数分裂における Erp1/Emi2 の発現と機能の解析」第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学合同大会ワークショップ(福岡)(2007年5月28日～5月30日)
12. 井上大悟、大江宗理、兼森芳紀、信井俊哉、佐方功幸「Mos-MAPK 経路は Erp1/Emi2 をリン酸化することで、ツメガエル卵の MII 停止に必須である」第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学合同大会ワークショップ(福岡)(2007年5月28日～5月30日)
13. 大江宗理、井上大悟、兼森芳紀、信井俊哉、佐方功幸「アフリカツメガエル卵の減数分裂停止における、Mos-MAPK 経路の Erp1/Emi2 への直接的なつながり」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会(横浜)(2007年12月11日～12月15日)
14. 井上大悟、大江宗理、兼森芳紀、信井俊哉、佐方功幸「Erp1/Emi2 はツメガエル卵の第一減数分裂から第二減数分裂への移行に必須である」第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会合同大会(横浜)(2007年12月11日～12月15日)
15. 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」Oocyte maturation and the cell cycle(京都)(2008年3月5日～3月7日)

16. 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ワークショップ(徳島)(2008 年 5 月 28 日～5 月 30 日)
17. 磯田道孝・兼森芳紀・佐方功幸「ERK-MAPK 経路は Cdc25A をリン酸化し SCF ^{β} -TrCP 依存的な分解を誘導する」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ(神戸)(2008 年 12 月 9 日～12 月 12 日)

③ポスター発表 (国内会議 37 件、国際会議 7 件)

1. 井上和恵、舟越稔、西本毅治、小林英紀「UBA ドメイン蛋白質 XDRP1 のサイクリン分解に対する選択的阻害」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
2. 舟越稔、小林英紀「Dsk2 の過剰発現による生育阻止に耐性を示す変異株の分離と解析」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
3. 伊佐恵、上野秀一、佐方功幸「ツメガエル卵の受精における Cdc25A mRNA の翻訳制御機構」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
4. 古野伸明、吉留賢、中村博保、中條信成、佐方功幸「ツメガエル卵における Wee1A mRNA の翻訳調節」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
5. 兼森芳紀、宇都克裕、志牟田健、佐方功幸「DNA 複製チェックポイントにおける Cdc25A の分解機構の解析」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
6. 吉留賢、古野伸明、箸本英吉、佐方功幸「サイクリン B2 の細胞質保留シグナルの C 末 7 アミノ酸はツメガエル卵成熟及び初期卵割における二極性紡錘体形成に必要なである」第 26 回日本分子生物学会(神戸)(2003 年 12 月 10 日～12 月 13 日)
7. 舟越稔、小林英紀「Sem1 is a novel component of the 26S proteasome and functions in the proteasome stability in *Saccharomyces Cerevisiae*」第 5 回日英細胞周期国際学会(奈良)(2004 年 4 月 13 日～4 月 16 日)

8. 宇都克裕、井上大悟、志牟田健、中條信成、佐方功幸「Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism」第 5 回日英細胞周期国際学会 (奈良)(2004 年 4 月 13 日～4 月 16 日)
9. 井上大悟、中條信成、佐方功幸「Regulation of Myt1 by the Polo-like kinase1 (Plx1) in *Xenopus* eggs」第 5 回日英細胞周期国際学会 (奈良)(2004 年 4 月 13 日～4 月 16 日)
10. 葛城美德、佐方功幸「Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation」第 5 回日英細胞周期国際学会 (奈良)(2004 年 4 月 13 日～4 月 16 日)
11. 宇都克裕、井上大悟、志牟田健、中條信成、佐方功幸「Chk1, but not Chk2 inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism」第 57 回日本細胞生物学会 (大阪)(2004 年 5 月 26 日～28 日)
12. 葛城美德、佐方功幸「Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation」第 57 回日本細胞生物学会 (大阪)(2004 年 5 月 26 日～28 日)
13. 兼森芳紀、宇都克裕、佐方功幸「Cdc25AにおけるSCF^{B-TrCP}ユビキチンリガーゼの新規結合モチーフの同定」第27回日本分子生物学会 (神戸)(2004年12月8日～12月11日)
14. 舟越稔、小林英紀「出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Sem1 はプロテアソームの安定性を高めるプロテアソームの 19S RP のサブユニットである」第 27 回日本分子生物学会年会ワークショップ (神戸) (2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日)
15. 井上大悟、佐方功幸「The polo-like kinase Plk1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs」第 58 回日本細胞生物学会 (埼玉) (2005 年 6 月 15 日～6 月 17 日)
16. 兼森芳紀、宇都克裕、佐方功幸「Recognition of a novel nonphosphorylated destruction motif by SCF^{B-TrCP}」第 58 回日本細胞生物学会 (埼玉) (2005 年 6 月 15 日～6 月 17 日)

17. 吉留賢、佐方功幸、箸本英吉「サイクリン B2/Cdc2 による紡錘体の二極形成制御」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005 年 12 月 7 日～12 月 10 日)
18. 兼森芳紀、宇都克裕、佐方功幸「SCF ^{β -TrCP} ユビキチンリガーゼにおける非リン酸型分解モチーフの認識」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005 年 12 月 7 日～12 月 10 日)
19. 大江宗理、宇都克裕、佐方功幸「ツメガエル卵成熟(卵減数分裂)における Emi1 の発現および機能の解析」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005 年 12 月 7 日～12 月 10 日)
20. 岡本健吾、佐方功幸「M 期における Wee1 キナーゼの不活性化機構」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005 年 12 月 7 日～12 月 10 日)
21. 中條信成、上野裕之、渡部稔、住友洋美、毛利宜子・佐方功幸「サイクリン E2 はアフリカツメガエルにおける正常発生に必須である」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005 年 12 月 7 日～12 月 10 日)
22. 石井健士、舟越稔、小林英紀「出芽酵母 Pth2 は Rad23, Dsk2 と相互作用してユビキチン-プロテアソーム経路を阻害する UBL ドメイン結合蛋白質である」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005 年 12 月 7 日～12 月 10 日)
23. 田中佳苗、井上和恵、舟越稔、小林英紀「UBL-UBA タンパク質 XDRP1 の cyclin 分解に対する選択的阻害」第 28 回日本分子生物学会(福岡)(2005 年 12 月 7 日～12 月 10 日)
24. 田中佳苗、舟越稔、井上和恵、小林英紀「Identification of two isoforms of *Xenopus* Dsk2-related protein and their roles in degradation of mitotic cyclins」第 20 回国際生化学会・分子生物学会議(京都)(2006 年 6 月 18 日～6 月 23 日)
25. 石井健士、舟越稔、小林英紀「Yeast Pth2 is a UBL domain-binding protein that participates in the ubiquitin-proteasome pathway. 」第 20 回国際生化学会・分子生物学会議(京都)(2006 年 6 月 18 日～6 月 23 日)
26. 磯田道孝、兼森芳紀、佐方功幸「Induction of Cdc25A degradation by ERK in *Xenopus* eggs」第 20 回国際生化学会・分子生物学会議(京都)(2006 年 6 月 18

日～6月23日)

27. 瀬戸山大樹、佐方功幸「SCF-betaTrCP and the Polo-like kinase Plx1 cooperatively target CPEB for degradation during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes」第20回国際生化学会・分子生物学会議(京都)(2006年6月18日～6月23日)
28. 岡本健吾、佐方功幸「M期におけるWee1キナーゼの不活性化機構」日本分子生物学会2006フォーラム(名古屋)(2006年12月6日～12月8日)
29. 上野裕之、中條信成、渡部稔、佐方功幸「細胞周期制御転写因子FoxM1はツメガエル胚神経領域の細胞分裂と神経分化に必須である」日本分子生物学会2006フォーラム(2006年12月6日～12月8日)
30. 石井健士、舟越稔、小林英紀「ポリユビキチン化タンパク質の識別とプロテアソームへの運搬機構の解析」日本農芸化学会2007年度大会シンポジウム(東京)(2007年3月27日)
31. 石井健士、舟越稔、小林英紀「出芽酵母のPth2はdsk2, rad23と相互作用してユビキチン-プロテアソーム経路を阻害するUBLドメイン結合タンパク質である」第40回酵母遺伝学フォーラム(大阪)(2007年9月11日～9月13日)
32. 磯田道孝、兼森芳紀、佐方功幸「ERK-MAPK経路によるCdc25Aの分解誘導機構の解析」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会(横浜)(2007年12月11日～12月15日)
33. 井上大悟、大江宗理、兼森芳紀、信井俊哉、佐方功幸 Erp1/Emi2 はツメガエル卵の第一減数分裂から第二減数分裂への移行に必須である 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会(横浜)(2007年12月11日～12月15日)
34. 大江宗理、井上大悟、兼森芳紀、信井俊哉、佐方功幸「アフリカツメガエル卵の減数分裂停止における, Mos-MAPK経路のErp1/Emi2への直接的なつながり」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会(横浜)(2007年12月11日～12月15日)
35. 上野裕之、中條信成、渡部稔、佐方功幸「細胞周期制御転写因子FoxM1はツメ

- ガエル胚神経領域の細胞分裂と神経分化に必須である」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(横浜)(2007 年 12 月 11 日～12 月 15 日)
36. 瀬戸山大樹、佐方功幸「Mechanism of degradation of CPEB during *Xenopus* oocyte maturation」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(横浜)(2007 年 12 月 11 日～12 月 15 日)
37. 石井健士、舟越稔、小林英紀「出芽酵母の Pth2 は UBL-UBA タンパク質を介した分解基質の配送経路に関与する負の制御因子である」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会(横浜)(2007 年 12 月 11 日～12 月 15 日)
38. 佐々木徹、斎藤洋平、金子秀一、石井健士、舟越稔、小林英紀「ユビキチンプロテアソーム経路における配送因子 DSK2 のユビキチン化の役割」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会(横浜)(2007 年 12 月 11 日～12 月 15 日)
39. 王永剛、中島信孝、栗原淑子、佐藤哲也、藤博幸、関口猛、小林英紀「ストレス応答に働く G タンパク質の Gtr2 の 44 番目のスレオニンの変異が Gtr2 欠失変異を相補する」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会(横浜)(2007 年 12 月 11 日～12 月 15 日)
40. 磯田道孝・兼森芳紀・佐方功幸「ERK-MAPK 経路は Cdc25A をリン酸化し SCF ^{β} -^{TrCP} 依存的な分解を誘導する」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ(神戸)(2008 年 12 月 9 日～12 月 12 日)
41. 張瀚文・上野裕之・佐方功幸「M期におけるFoxM1分解機構」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会ワークショップ(神戸)(2008年12月9日～12月12日)
42. 上野裕之・中條信成・渡部稔・磯田道孝・佐方功幸「FoxM1依存の細胞分裂はツメガエル胚の神経分化に必須である」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会ワークショップ(神戸)(2008年12月9日～12月12日)
43. 瀬戸山大樹・佐方功幸「Undegradable xBora causes metaphase arrest in *Xenopus* oocytes」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合

同大会ワークショップ(神戸)(2008年12月9日～12月12日)

44. 吉留賢・上野秀一・岩尾康宏・佐方功幸・箸本英吉「モルフォリノオリゴによるサイクリンB2の発現阻害はアフリカツメガエル初期卵割を促進する」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会ワークショップ(神戸)(2008年12月9日～12月12日)

(3)特許出願

- ①国内出願 (0件)
- ②海外出願 (0件)

(4)受賞等

- ①受賞
なし

②新聞報道

西日本新聞 「未受精卵の分裂停止解明 不妊治療に道」2007年4月4日
時事通信 「卵細胞分裂停止の仕組み解明 不妊の治療法開発に期待」2007年4月5日
科学新聞 「脊椎動物未受精卵分裂停止の仕組み解明」、2007年4月13日
その他 地方紙多数(共同通信記事)「卵細胞分裂停止の仕組み解明」2007年4月4日～6日

③その他

NHK 総合テレビ(おはよう日本)
「九州大学研究グループ・不妊の原因解明に・研究成果に期待」2007年4月5日

(5)その他特記事項

本研究課題の成果として得られたその他の出版物として以下のものがある。

1. 佐方功幸、志牟田健、宇都克裕、井上大悟、中條信成：(2003) 初期発生における細胞周期のチェックポイント制御。「細胞周期研究の新局面」(野島博，中山敬一，田矢洋一 編)実験医学増刊 21, 48-54. 羊土社
2. 佐方功幸：(2003) 分子生物学・免疫学キーワード辞典(永田和宏，宮坂昌之，宮坂信之，山本一彦 編)(医学書院)

3. 佐方功幸：(2004) 初期胚発生における細胞周期・増殖の制御。「発生における細胞増殖制御」(竹内隆, 岸本健雄 編) 40-50. シュプリンガー・フェアラーク東京
4. 佐方功幸：(2005) 細胞生物学事典(石川統, 黒岩常祥, 永田和宏 編)朝倉書店
5. 小林英紀：(2005) サイクリン依存性キナーゼとその活性調節機構。「キーワードで理解する細胞周期イラストマップ」(中山敬一 編) 39-46. 羊土社
6. 井上大悟、佐方功幸：(2005) 卵減数分裂周期の制御機構。「キーワードで理解する細胞周期イラストマップ」(中山敬一 編)109-115. 羊土社
7. 佐方功幸：(2005) 減数分裂の制御機構:その核心に迫る。「細胞周期研究の最先端」(中山敬一 編)実験医学増刊 23, 124-129. 羊土社
8. 井上大悟、兼森芳紀、佐方功幸：(2005) 卵減数分裂を特徴づける細胞周期制御。「細胞周期研究の最先端」(中山敬一 編)実験医学増刊 23, 150-158. 羊土社
9. 兼森芳紀、佐方功幸：(2005) SCF ^{β -TrCP} によって認識される非リン酸化型分解モチーフの発見 (Hot Press)細胞工学 24, 708-709. 秀潤社
10. 兼森芳紀、佐方功幸：(2006) SCF ^{β -TrCP} による細胞周期/チェックポイント因子の制御 ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー「作動機構と病態生理」蛋白質核酸酵素増刊 51, 1386-1390. 共立出版
11. 大江宗理、井上大悟、佐方功幸：(2007) 未受精卵における分裂停止のしくみを解明 メディカルバイオ 7月号, 16-17. オーム社
12. 井上大悟、大江宗理、佐方功幸：(2007) 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, 細胞工学 26, 924-926 秀潤社
13. 佐方功幸：(2008)「生化学辞典(第4版)」(今堀和友, 山川民夫, 監修)(大島泰郎, 鈴木紘一, 脊山洋右, 新井洋由, 石浦章一, 大隈良典, 岸本健雄, 正木春彦, 山本一夫 編)東京化学同人

14. 上野裕之、中條信成、佐方功幸：(2008) 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(Hot Press)細胞工学 27, 804-805. 秀潤社
15. 佐方功幸：(2009) 私の Mos 研究の起承転結, 細胞工学 28, 27-28. 秀潤社
16. 佐方功幸：(2009)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)南山堂 印刷中

§ 7 研究期間中の主な活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2004年12月7日～12月9日	第27回日本分子生物学会	神戸	250人	細胞周期チェックポイントに関するワークショップを主催
2005年6月30日～7月2日	第5回日本蛋白質科学会	福岡	150人	細胞周期チェックポイントに関するワークショップを主催
2005年12月6日～12月8日	第28回日本分子生物学会	福岡	8,500人	年会長として学会を主催
2006年9月1日	チーム内ミーティング	九州大学	5人	研究方向の打ち合わせ
2006年12月6日～12月8日	日本分子生物学会2006フォーラム(分子生物学の未来)	名古屋	350人	細胞周期チェックポイントに関するワークショップを主催
2007年12月11日～12月15日	第30回日本分子生物学会年会・第80回生化学会大会合同大会	横浜	400人	細胞周期チェックポイントに関するワークショップを主催

§8 結び

研究代表者は、平成 10 年度から平成 14 年度まで、ツメガエル卵を用いて「初期発生における細胞周期制御の研究」という研究課題で科学研究費・特別推進研究を行った。その後、共同研究者と共に、主にツメガエル卵を用いて特別推進研究でなされた研究を本 CREST 研究(平成 15～20 年度)で発展させてきた。すなわち、それまでの研究で得られた発見・知見を元に、*in vivo*(発生系)および *in vitro*(無細胞系)の系で、様々な細胞周期制御因子やチェックポイント制御因子の構造と機能およびそれらの制御機構を解析してきた。そして、その結果得られた新たな発見や知見を EMBO, PNAS, Nature 誌等に発表してきた。今、当初の研究計画を考えると、これまでの研究の達成度は、自画自賛かもしれないが、非常に高いものであると考えている。また、得られた成果は、制がん等の基礎研究としても非常に意義のあるものであると考えている。今後も更なる研究の展開で、社会に還元できる研究を成し遂げたいと考えている。

中間評価結果として、総合的評価において研究全般を極めて高く評価して頂いたことは、その後のプロジェクトを推進するに当って大きな自信になった。一方で、その後の研究に向けての助言としての「高次構造の解析」、「創薬への応用」については、未だ十分な成果には至っておらず、今後挑戦したいと考えている。

本 CREST 領域は、基礎的な研究を自由度高く推進することのできる素晴らしいテーマ領域であったと思う。このために、思い切った研究の推進のみならず、結果として多くの若手の育成ができたと考えている。今後も、本領域のように幅広く基礎的な研究を推進できるテーマが CREST の新領域として設定されることを切に願っている。

最後に、5年もの長きに渡ってご指導、ご支援くださった大島総括、アドバイザーの先生方、ならびにたんぱく事務所の皆様にこころから御礼申し上げたい。



研究室研修旅行



JST News(2007年10月号)の記事より



実験室風景



研究室のホープ？



実験材料(ツメガエル)



本当の実験材料(卵)