

研究報告書

「細胞分裂周期の *in vitro* 再構成への挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 持田 悟

1. 研究のねらい

生命としての条件のうちの自己複製能について、DNA 複製は既に試験管内(*in vitro*)再構成が基本的なレベルで成功しているため、次の段階である「細胞」の複製を司る細胞分裂周期の構成的理解は現在の重要課題の一つである。本研究では、細胞分裂周期を統制しているタンパク質リン酸化のスイッチ的な変動メカニズム、具体的にはリン酸化酵素と脱リン酸化酵素を制御する機構の統合的解明を目指した。細胞分裂は、単細胞生物では生存環境に合わせた増殖戦略に、多細胞生物では発生・分化や癌など医学的側面において基盤的知見となるため、生命の理解という観点のみならず非常に重要なテーマである。

細胞分裂周期において、DNA 複製などを行う間期と染色体分配のための分裂期はゲノム安定性の観点から時間的に隔てられていなければならない。間期と分裂期の生化学的な差は、数百種あるサイクリン依存性キナーゼ(CDK)基質のリン酸化レベルの違いであり、それが高い時にのみ基質タンパク質の物理化学的性質が変化して核膜崩壊や染色体凝縮といった分裂期のイベントを誘起している。このリン酸化の制御において、リン酸化／脱リン酸化酵素がどのように間期と分裂期をスイッチ的に隔てるか(より具体的には、いかに閾値や履歴効果を生み出すか)を構成的に理解することで、細胞分裂周期の中核的な仕組みの確かな理解を目指した。

研究計画を立てるにあたって、リン酸化酵素に比べて脱リン酸化酵素の解析は一般にかなり遅れていること、CDK 基質に対する脱リン酸化酵素 PP2A^{B55} が CDK によって間接的に活性抑制されることを我々は見出していたことから、以下の4つの研究テーマを設定した。

- A. 簡便なリン酸化検出系の確立
- B. 分裂期キナーゼと対となる脱リン酸化酵素の同定
- C. 間期→分裂期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成
- D. 分裂期→間期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成

2. 研究成果

(1) 概要

本研究において、タンパク質リン酸化をいかに早く、簡便、かつ定量的に測定できるかがプロジェクトの推進にとって最初に解決すべき技術的課題であった。そのため近年発展の著しい光るタンパク質を利用したリン酸化検出光プローブ分子の開発に着手した。細胞内カルシ

ウムプローブとして利用されていたウミシイタケルシフェレースを利用したタンパク質性プローブ分子 (Saito et al., 2012, Nat. comm.) を CDK によるリン酸化で光強度が変化するように改変を加えたところ、リン酸化前後で光強度が2倍に増強するものを取得することができた(図1、最終的には4倍まで向上)。この分子は脱リン酸化されるとリン酸化前の光強度に戻るという可逆性も持ち合わせていた。これによってそれまで約2日かかっていたリン酸化の定量的解析がおよそ30分程度に短縮され、また発光測定器の導入によりデータ取得の自動化が可能となり、時間分解能も飛躍的に上昇したことから、当初の目論見を上回る検出系が出来上がった。

次に細胞分裂周期の間期→分裂期進行に関わると予想していた CDK、PP2A、および PP2A 抑制経路に関わるタンパク質を精製し、*in vitro* 再構成を試みた(図2)。ここでは CDK 以外の因子の濃度は細胞内と同じ一定濃度とし、CDK のみ徐々に増量させるという通常の細胞の間期で起こっている変化を模倣した。その結果、ある CDK 濃度を超えると急激な基質リン酸化レベルの上昇が観察された。このことからこの再構成系が閾値を創り出せることを直接証明することができた。さらにリン酸化酵素阻害剤スタウロスポリンを用いることで、この再構成系が履歴効果を持つことを示すことにも成功した。

一連の再構成実験において、数理解析を同時に行うことは重要な推進力となる。適切なパラメーター(反応定数や結合/解離定数)が決まればコンピューターシミュレーションにより実験実施前に結果が予測でき、実験計画立案に非常に役立つからである。そこで細胞分裂周期分野における数理解析のスペシャリストであるオックスフォード大(英国)の Bela Novak 博士との共同研究により、すべての実験結果を説明出来るパラメーターセットの取得に成功し、さらに再構成した図2のタンパク質ネットワークが閾値を創り出せることも数理的に証明することができた。

(2) 詳細

テーマ A 「簡便なリン酸化検出実験系の確立」

前出の Saito et al., (2012) で報告されたカルシウムプローブを出発点に、カルシウム検出部位をリン酸化配列とリン酸化ペプチド結合ドメイン(WW)で置換した(図1)。これにより CDK にリン酸化されると発光強度が2倍になるものを取得した。そこからさらにリン酸化配列の長さやアミノ酸配列を変えることにより、発光が4倍となるプローブを取得している。また、元々のプローブは精製条件下で半減期20分程度と、リン酸化動態を解析するには不安定すぎたため、バッファ組成の検討やルシフェレース部分への変異導入により、半減期を約200分に延長することに成功した。このように本テーマでは当初の目的を十分に達成できた。

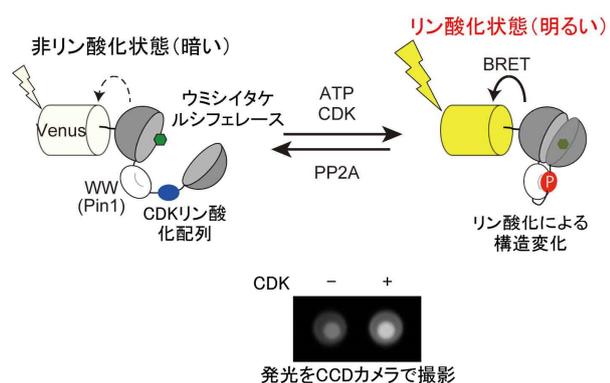


図1、リン酸化検出発光プローブの開発

テーマ B 「分裂期キナーゼと対となる脱リン酸化酵素の同定」

本テーマのためには脱リン酸化酵素の生理的な活性が保たれており、かつ酵素活性の直接測定が可能な実験系が必要である。アフリカツメガエル卵抽出液は抽出の過程で細胞内因子がほぼ希釈されておらず、穏和な抽出方法のおかげで多くの酵素活性が生理的に保たれている。さらに無細胞系であるため上記の要請を全て満たしている。そこでカエルゲノムにあるおよそ40種類(ヒトもほぼ同数)のセリン／スレオニン脱リン酸化酵素(触媒サブユニット)の cDNA クローニング、およびポリクローナル抗体を作成した。今後、卵抽出液からの抗体を用いた特定タンパク質の除去とキナーゼ基質の脱リン酸化活性測定法を併用することで、分裂期のリン酸化酵素と対になる脱リン酸化酵素を同定していく予定である。

テーマ C 「間期→分裂期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成」

間期から分裂期の進行時には、CDK 基質の急激なリン酸化レベルの上昇が見られる。この現象の原因として考えられるのは、(1)CDK の急激な活性化 (2)PP2A の急激な不活性化の2つである。(1)に関しては既にスイッチとして機能することが示されていた。しかし(1)を阻害した条件下でも卵抽出液において急激なリン酸化の上昇が見られたことから、(1)とは独立に、(2)もスイッチである可能性があった。そこで図2の経路にあるタンパク質8種を大腸菌と昆虫細胞を用いて発現／精製し(図3)、それらを試験管内で混合することで閾値現象を再現することに成功した(図4)。さらに双安定性と履歴効果も確認されたことから、わずかに8種のタンパク質でスイッチを再構成することに成功したと言える。間期→分裂期進行時には(1)(2)の二つのスイッチが互いに相互作用することでより頑強な仕組みを作り上げていることを論文報告した(論文発表4)。

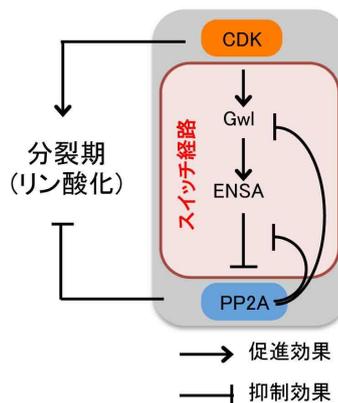


図2、再構成したタンパク質ネットワーク

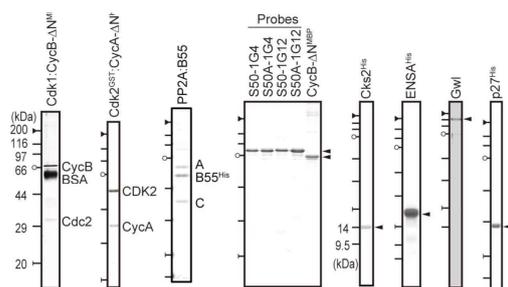


図3、再構成実験に使用した精製タンパク質たち

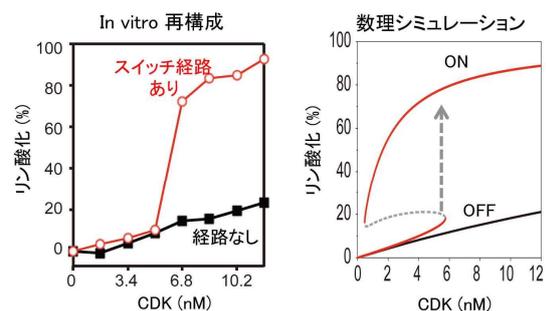


図4、再構成系での閾値(左)と、数理モデリングによる再現(右)

テーマ D 「分裂期→間期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成」

分裂期→間期進行は、間期→分裂期進行の単純な逆反応ではなく、(脱)リン酸化反応に加えてタンパク質のポリユビキチン化(APC/cyclosome E3 ligase)とタンパク質分解(proteasome)をリン酸化とリンクさせつつ再構成する必要がある。両者は10以上のサブユニ

ットからなる巨大タンパク質複合体として機能するため独自に組換えタンパク質精製法を確立するのは難しい。幸い後者については市販品があるが、前者については市販品はなく、つい最近になって組換え技術による複合体の精製手法が確立されたばかりである。テーマCにおいて分裂期進行が再構成できたことから、ようやく本テーマに取り組む準備が整ったので今後精力的に推し進めていきたい。

3. 今後の展開

再構成したスイッチが示した不可逆的な性質は細胞内現象との齟齬であり、まだ未同定の因子があることを再構成系が示してくれていたということである(幸か不幸かこの因子は2015年にドイツのグループによって報告された)。今後もさらに細胞分裂周期の再構成を進めることにより推定を含まない確かな理解を積み上げるとともに、遺伝学等では探さきれていない重要因子の同定も行っていきたい。長期的には他分野における重要なスイッチなどの非線形現象の再構成的理解に挑戦したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は細胞分裂周期の再構成という目標を掲げて開始した。海外からの帰国後、独立ラボの立ち上げにあたり大型機器の購入や実験補助員の雇用が可能となり、また領域メンバーとの出会いからも刺激を受けることができた。期間前半はリン酸化検出系の確立(プローブ開発と精製系の改良)に費やし、予想以上の便利な系を作り上げることができた。期間後半ではテーマCでのスイッチ再構成に成功し、当該分野にとって画期的な技術的/概念的進展をもたらせたと考えている。テーマB、Dについてはまだ新規知見は得られていないが、抗体シリーズ作成と再構成系の確立により準備は着実に進んでいる。

本成果は細胞分裂周期分野にとどまらず、広範な生命現象の二者択一的な局面での意思決定メカニズムの解明にも寄与すると考えている。また *in vitro* でスイッチを再構成できた先例として、これまで変異体や数理モデルでの理解にとどまっていた多くの現象に対して、推定なしに実証しようという試みが生まれるきっかけになると期待できる。

(2) 研究総括評価

(研究総括)

細胞分裂周期の再構成という挑戦的な課題に対して着実に成果を出している。再構成系のCDK基質のリン酸化を定量的、かつリアルタイムに検出できる光プローブの開発と改良を行い、リン酸化によって3倍に光量が増加するという実用的なプローブを完成させた。さらに *in vitro* 系での発光量を安定させるためバッファー系の改良を行い、半減期を約10分から200分以上に延長させ、間期→分裂期に見られる急激なCDK基質のリン酸化レベルの上昇を精製タンパク質だけで部分的に再構成することに成功したことは、高く評価したい。本成果は、永井 健治アドバイザーとの共著で、論文、Current Biology, (2016)として、着実に結実した。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. <u>Mochida S.</u> “Regulation of alpha-Endosulfine, an inhibitor of protein phosphatase 2A (PP2A), by multisite phosphorylation” <i>FEBS J.</i> , (2014) 281(4), 1159–1169. |
| 2. Okumura E., Morita A., Wakai M., <u>Mochida S.</u> , Hara M. and Kishimoto T. “Cyclin B-Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a Greatwall kinase-independent mechanism.” <i>J. Cell Biol.</i> , (2014) 204(6), 881–889. |
| 3. Hino H., Tanaki K., <u>Mochida S.</u> “Inhibitor-1 and -2 of PP2A have preference between PP2A complexes” <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> (2015) 467(2), 297–302. |
| 4. <u>Mochida S.</u> *, Rata S., Hino H., Nagai T. and Novak B. * (*共責) “Two bistable switches govern M phase entry” <i>Current Biology</i> , (2016) in press (doi 10.1016/j.cub.2016.10.022) |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Mochida S., “Regulation of alpha-endosulfine, an inhibitor of PP2A-B55, by multisite phosphorylation” The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, 2013 年 11 月 於: National Health Research Institutes, Taiwan(招待講演)
2. Mochida S., “Toward Reconstitution of the Cell Cycle by Balancing CDK and PP2A” 細胞を創る研究会 7.0 Japanese Society for Cell Synthesis Research 7.0, 2014 年 11 月 13-14 日 於: 東京大学 弥生キャンパス(招待講演)
3. Mochida S., Takaki K. and Nagai T., “CDK, PP2A And CDK-dependent PP2A-inhibitory pathway Can Make A Switch-like Response of Mitotic Phosphorylation” EMBO Workshop: Cell Cycle 2015 年 9 月 4-7 日 於: Danubius Health Spa Resort, Budapest、ハンガリー
4. 持田 悟、Scott Rata、日野浩嗣、永井健治、Bela Novak “細胞周期の *in vitro* 再構成” 日本遺伝学会 第 88 回大会、2016 年 9 月 7-9 日 於: 日本大学国際関係学部 三島駅北口校舎(招待講演)

著作(総説論文)

1. Mochida S. and Hunt T. “Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis” *EMBO Rep.* (2012) 13(3), 197–203.
2. Mochida S. “Aurora borealis wraps Plk1 and CDK together” *Cell Cycle*, (2014) 13(12), 1835.
3. Mochida S. “PP1 inactivates Greatwall to release PP2A-B55 from mitotic confinement” *EMBO reports* (2015) 16(11), 1411–1412.

新聞報道

1. 熊本日日新聞 “細胞分裂「スイッチ」作成” 2016年11月24日