

氏名 永 井 由貴子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第85号

学位授与の日付 平成6年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 ユビキチン活性化酵素のリン酸化と細胞周期

論文審査委員 主査 教授 桂 勲

教授 廣瀬 進

教授 中辻 憲夫

助教授 嶋本 伸雄

教授 岸本 健雄（東京工業大学）

論文内容の要旨

ユビキチンは真核生物で非常によく保存された分子量約 8,600 のタンパク質で、一連の酵素群を介し標的タンパク質に結合することにより機能する。ユビキチンは ATP 存在下でユビキチン活性化酵素 (E1)、続いてユビキチン結合酵素 (E2) に結合し、ユビキチンリガーゼ (E3) 存在下または非存在下で最終的に標的タンパク質に結合する。異常タンパク質、半減期の短い制御タンパク質などがユビキチン化され、その結果としてタンパク質の分解を引き起こす。一方、ヒストン、表層レセプターなど分解を受けない場合もある。このような標的タンパク質の多様性を担うのは、分子種ファミリーが存在する E2 であると考えられている。一方、哺乳類培養細胞を用いた系で、E1 遺伝子の変異により温度感受性の増殖阻害が起こることより、ユビキチンシステムが細胞周期の進行に必須な機能を果たすと考えられる。

ユビキチンシステムの細胞周期上での作用点を知る目的で、マウス乳がん由来 FM3A の温度感受性 E1 変異株を同調し、制限温度下での細胞周期停止点を観察した。G1, S, G2/M 期それぞれの点で周期の進行の停止が見られ、ユビキチンシステムの作用点が細胞周期上複数存在することが明らかとなった。

細胞周期制御に関わるユビキチンシステムを同定することを目的として、温度感受性 E1 変異株とその部分復帰変異株を用いて制限温度下でのユビキチン結合システムを検出した。E2 に対する変異 E1 のユビキチン結合活性の影響が分子種により異なること、また部分復帰変異は E1 の再変異であることを同定した。

以上の結果から、E1 の細胞周期における変動が細胞周期におけるユビキチンシステムの制御に関わることが考えられ、E1 の検出を試みた。抗血清を用いた免疫化学的方法により細胞周期上での E1 蛋白質の量的変動を検討すると、各周期での E1 の量的変動はほとんど見られなかった。そこで E1 の活性が翻訳後修飾によって行なわれていることを考え、リン酸化に着目した。*in vivo* で FM3A を ^{32}P で標識し、免疫沈降法により E1 を検出した。FM3A では E1 タンパク質は分子量の異なった 2 種類のアイソフォームが検出されるが、そのうち分子量の大きい E1 が ^{32}P で標識され、*in vivo* で E1 がリン酸化されていることが示された。リン酸化アミノ酸を調べるとセリン、スレオニンであったが、セリンのリン酸化が主であった。また、細胞周期における E1 のリン酸化をペプチドマッピングによりみると、主に 2ヶ所検出され、G1 期に最もよくリン酸化される部位と、M 期によくリン酸化される部位が存在した。さらに E1 のアミノ酸一次配列からリン酸化部位を検索すると、cdc2 キナーゼの認識配列が 5箇所存在した。cdc2 キナーゼは細胞周期に依存して活性の調節が行なわれているセリン/スレオニンキナーゼで G2/M 期の進行に重要な役割を果たしていることが知られている。また cdc2 キナーゼ活性の調節を担うサイクリンは *in vitro* でユビキチンシステムの標的になることが知られている。そこで抗 cdc2 キナーゼ抗体により cdc2 キナーゼを調製し、FM3A より精製した E1 タンパク質の *in vitro* でのリン酸化について検討した。E1 は cdc2 キナーゼによりリン酸化されたが、2つのアイソフォームのうち *in vivo* においてリン酸化される方がよい基質となった。*in vivo* と *in vitro* でのリン酸化部位を比較すると、*in vivo* での主な 2箇所のリン酸化部

位はいずれも *c d c 2* による *i n v i t r o*でのリン酸化部位と一致した。このうち分裂期にリン酸化の上昇する部位は、*i n v i v o*で *c d c 2* 温度感受性変異株を制限温度処理することによりリン酸化が減少し、*i n v i v o*での *c d c 2* キナーゼによる E 1 のリン酸化が示唆された。このリン酸化部位はアミノ末端から 4 番目のセリンであった。アミノ末端を削除した c D N A は、制限温度下での E 1 温度感受性変異株の G 2 / 分裂期停止を相補することができず、アミノ末端領域での G 2 / 分裂期進行の制御を示唆するものである。

以上のことよりユビキチンシステムが細胞周期の複数の点で機能すること、その制御に E 1 の *c d c 2* キナーゼによるリン酸化が関与している可能性が示された。

論文の審査結果の要旨

本論文の主要な内容は、E1（ユビキチン活性化酵素）の特定のセリン残基がcdc2キナーゼにより細胞周期特異的にリン酸化を受けることを示したものである。

G1→S→G2→Mというサイクルを繰り返して細胞が増殖するためには、細胞周期特異的に特定のタンパク質が合成されるだけでなく、分解される必要がある。このような、制御されたタンパク質分解には、ユビキチンという小さなタンパク質が、重要な役割を果たしている。ユビキチンは、まずE1に結合した後に一群のE2（ユビキチン結合酵素）に受け渡され、最後に各E2で異なる標的タンパク質群に渡される。そしてこのユビキチン化されたタンパク質を、細胞内のタンパク質分解酵素が識別して分解する。

一方、cdc2キナーゼは細胞周期の制御で最も重要なタンパク質の1つであり、M期にサイクリンBと結合することにより活性化される。

本研究は、培養細胞の様々なE1変異株がなぜ細胞周期の異なる時期に増殖を停止するのかという問題に始まり、E1の細胞周期特異的な修飾が各E2のユビキチン化の割合を変えて細胞周期制御タンパク質の分解を制御するという可能性を探るうちに、cdc2キナーゼによるE1のリン酸化を発見した。

本論文では、cdc2キナーゼによるリン酸化によってE1の活性や基質特異性がどのように変化するかを調べていないため、具体的な細胞周期制御機構の提示には至っていない。しかし、E1がcdc2キナーゼによりリン酸化されることについては、部分精製したcdc2キナーゼによる*in vitro*の反応が*in vivo*のリン酸化反応と対応することを示し、さらにcdc2キナーゼの温度感受性変異株を用いて確認している。また、ペプチドマップにより個々のリン酸化部位を分けて解析し、遺伝子操作による変異E1タンパク質を用いて、cdc2キナーゼによりリン酸化を受けるアミノ酸残基を同定している。このように、興味ある発見を行っただけでなく、物質的な面でリン酸化をきちんと解析した点で、本論文は、今後の研究の基礎となり得るものであり、博士論文としての条件を満たすものと判断した。

公開発表会とその後の口頭試問の両方において、本出願者は、質問に対し概ね適切な解答をしたので、博士論文に関係する専門分野およびその基礎となる分野に関して十分な学識を有するものと、審査委員会は判断した。外国語については、出願者の書いた英文の投稿論文の原稿を審査員全員で読み、課程修了に十分な能力を持つものと判断した。