

Regulation of CDC25B subcellular localization

著者	内田 早苗
著者別名	Uchida, Sanae
journal or publication title	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
volume	平成16年12月
page range	260-264
year	2004-12-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/16630

氏名	内田早苗
生年月日	
本籍	福岡県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第621号
学位授与の日付	平成16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	Regulation of CDC25B subcellular localization (CDC25Bの細胞内局在制御機構に関する研究)
論文審査委員(主査)	山下 克美(自然科学研究科・助教授)
論文審査委員(副査)	松永 司(薬学部・教授) 中西 義信(医学系研究科・教授) 善岡 克次(医学系研究科・教授) 中村 暢宏(薬学部・助教授)

学位論文要旨

Abstract

CDC25B dual-specificity phosphatase plays important roles in the control of G2/M cell cycle transition and checkpoint. There are some reports indicating that CDC25B is one of the proteins regulated by their subcellular localization. CDC25B subcellular localization was modulated by 14-3-3 binding, following the phosphorylation of some specific serine residues, in addition to own NES and NLS. In order to verify the mechanism of the regulation of CDC25B subcellular localization by 14-3-3, I studied the binding site preferences of all 14-3-3 isoforms. All 14-3-3 isoforms were found to bind to CDC25B wild type *in vivo*, and all the isoforms except 14-3-3 σ were revealed to bind exclusively near serine-309 of CDC25B. In contrast, 14-3-3 σ bound preferentially to a site around serine-216, and the presence of serine-137 or -309 enhanced its binding. In addition to the difference of binding site preferences, I found all 14-3-3 isoforms, except 14-3-3 σ , drive CDC25B from nucleus to cytoplasmic by binding to the site around serine-309 of CDC25B. During analysis how 14-3-3 enhances the cytoplasmic localization of CDC25B, I identified a novel functional NES on CDC25B at a site different from previously reported one (Davezac *et al.*, 2000). My studies revealed that the deletion of the published NES region from 28 to 40, did not influence the subcellular localization of CDC25B, instead, specific mutations in newly identified NES from 52 to 65 abolished the cytoplasmic localization of CDC25B. Additionally, I demonstrated that 14-3-3 binding inhibits nuclear import of CDC25B, which may result in the enhancement of cytoplasmic localization of CDC25B by co-expression with 14-3-3.

I. 序論

有核生物の細胞周期はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の活性により進行していく。細胞が娘細胞に正確に遺伝情報を伝えるためには、CDK の秩序だった活性化と不活性化が重要であり、CDK の活性は種々の分子により正または負に制御されている。Wee1/Myt1 が Thr-14 と Tyr-15 をリン酸化することにより Cyclin/CDK を不活性化し、CDC25 がこれらの部位を脱リン酸化することによって活性化する制御機構はその代表例である。CDC25 はヒトでは A・B・C の 3 種類が同定されており、それぞれに違う役割を担っている。その中で CDC25B は M 期の開始因子と考えられている。この CDC25B も、また、いくつかの制御をうけている。近年、この蛋白の細胞内局在変化によって制御されていることが示唆されてきている。これらの報告によると、CDC25B の局在は自身の核外・核外輸送シグナルに加え、14-3-3 との結合によっても制御を受けているとされているが、その制御機構については不明な点も多い。本研究は CDC25B の細胞内局在制御機構を明らかにすることを目的として行った。

II. 結果

1. CDC25B における 14-3-3 結合部位の同定

Myc タグをつけた 14-3-3 (Myc-14-3-3) と FLAG タグをつけた CDC25B (FLAG-CDC25B) を 293 細胞で共発現し、タグを利用して相互に免疫沈降を行ったところ、結合量に差は見られたが、全てのヒト 14-3-3 蛋白が CDC25B と結合することがわかった。次に、CDC25B におけるそれぞれの 14-3-3 ファミリー蛋白結合部位を同定した。まず、14-3-3 結合共通配列 (RxxpS/pT: pS/pT はリン酸化されたセリンまたはスレオニン、x はすべてのアミノ酸) を元に CDC25B 上の 14-3-3 の結合予測配列 5 箇所 (78-RRAS-81, 134-RFQS-137, 213-RPSS-216, 306-RSPS-309, 358-RSKS-361) を抽出し、それぞれの配列中のリン酸化可能なセリンをアラニンに置換した変異体を作成した。結合部位同定のため、私は 2 グループの変異体を作成した。第 1 グループは、5 つの結合予測配列のうちひとつのセリンだけをアラニンに置換した変異体で、S81A, S137A, S216A, S309A, S361A と名付けた。第 2 グループは 5 つのうち 4 個のセリンをアラニンに置換し、ひとつのセリンのみを残した変異体で、それぞれ、81S, 137S, 216S, 309S, 361S と名付けた。さらに 5 つのセリン全てをアラニンに置換した 5SA 変異体も作成した。これらの変異体および野生型 FLAG-CDC25B と Myc-14-3-3 を 293 細胞で共発現し、FLAG タグを利用して CDC25B を免疫沈降し、沈殿物に含まれる 14-3-3 蛋白を抗 Myc 抗体で検出した。

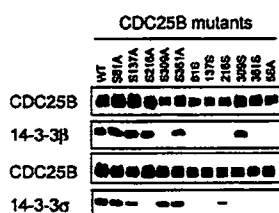


図1 14-3-3 蛋白結合部位の同定 (14-3-3β とσ)

14-3-3 isoforms	Binding to CDC25B mutants											
	WT	S81A	S137A	S216A	S309A	S361A	81S	137S	216S	309S	361S	5SA
β	++	++	++	++	±	++	-	-	-	++	-	-
ε	++	++	++	++	±	++	-	-	-	++	-	-
γ	++	++	++	++	±	++	-	-	-	++	-	-
η	++	++	++	++	±	++	-	-	-	++	-	-
ζ	++	++	++	++	±	++	-	-	-	++	-	-
θ	++	++	++	++	±	++	-	-	-	++	-	-
σ	++	++	+	-	++	++	-	-	+	-	-	-

表1 14-3-3 ファミリー蛋白結合部位の同定(まとめ)
 ++: 強い検出, +: はっきりと検出
 ±: 長く露出すると検出可能, -: 検出不能

図1で示したように、14-3-3β は CDC25B の Ser-309 をアラニンに置換すると著しく結合が阻害され、また、Ser-309 さえ存在すれば野生型に対するものと同じ程度に結合できることがわかった。

一方、14-3-3 σ は Ser-216 をアラニンに置換すると著しく結合が阻害され、逆に第 2 変異体グループの中では 216S 変異体に対してのみ結合が検出された。また、Ser-137 や Ser-309 は σ の Ser-216 への結合を補強した。他の5つの 14-3-3 蛋白についても同様に結合部位を同定したところ、7つの 14-3-3 蛋白のうち、 σ 以外の全てが β と同じ様式で CDC25B と結合した(表1参照)。

2. 14-3-3 は Ser-309 周辺配列への結合を介して CDC25B の細胞内局在を制御する

これまでの実験から 14-3-3 ファミリー蛋白は CDC25B に対する結合部位の違いから二つのグループに分けられることがわかった。これまでに、Ser-309 の変異は CDC25B の細胞質局在を阻害することが報告されていたので、私は結合部位の違う 14-3-3 蛋白が CDC25B の細胞内局在に及ぼす影響を共発現系で解析した。まず、CDC25B の細胞内局在を定量的に測定する実験系を構築した。FLAG-CDC25B 発現細胞を間接蛍光免疫法で染色し、その局在を核型(N>C)、分散型(N=C)、細胞質型(N<C)に分類し細胞の割合を算出した。

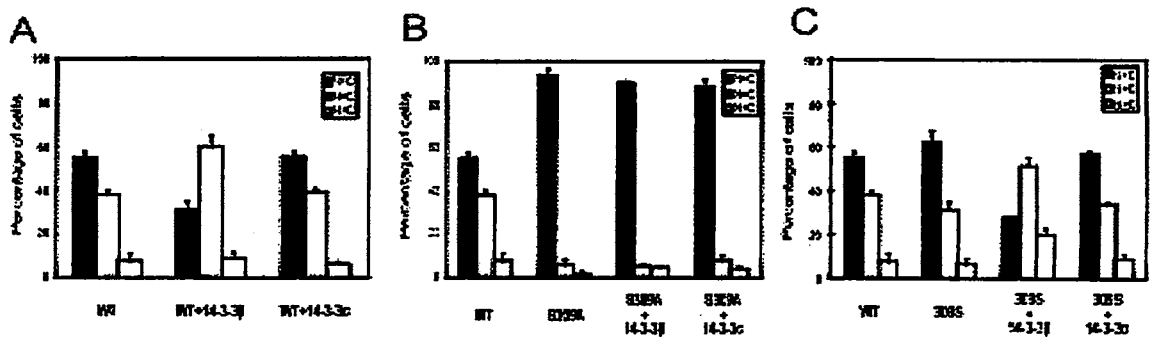


図2 14-3-3 β の共発現は CDC25B の局在を細胞質へと移行させる

図2で示したように単独発現された CDC25B 野生型は主に核型であったが、14-3-3 β を共発現すると分散型が増加した。一方で 14-3-3 σ の共発現群は単独発現と同じ局在が観察された。第 1 変異体グループの中で S309A 変異体のみが著しい核局在を示し(他は野生型と同様)、14-3-3 β 共発現下での局在変化はなかった。第 2 変異体グループでは 309S のみが野生型と同様な局在を示し(他は核型)、14-3-3 β を共発現するとその局在が分散型&細胞質型へ移行した。他の5つの 14-3-3 蛋白の解析でも、14-3-3 β と同じ結果を得た。つまり、 σ 以外の 14-3-3 蛋白は Ser-309 周辺配列への結合を介して CDC25B の細胞内局在を制御することが明らかとなった。

3. CDC25B の新規核外輸送シグナルの同定

14-3-3 による CDC25B 局在制御機構の解析を行うため、CDC25B の核外輸送配列(NES)欠失変異体を作成することにした。28-HLPGLLLGSHGLL-40 配列が CDC25B の NES であるという報告があったので、この NES 内の LLL をアラニンに置換した変異体の局在を調べた。CDC25B は核移行シグナルも持っているため NES を失うと局在は核型のみになるはずであったが、この変異体の局在は野生型と全く同じであった。そこで、新規 NES の同定を行った。解析を行った結果、52-VTTLTQTMHDLAQL-65 配列が NES として働くことがわかった。図3で示すようにこの配列をもった GFP は細胞質局在を示し、この蛋白を CRM1 阻害剤、Leptomycin B (LMB)で処理すると細胞質局在が阻害された。また、太字で示した H・L・L をアラニンに置換する変異(mNES)は GFP の細胞質局在を失わせるとともに、CDC25B の局在も著しい核型へと移行させた。

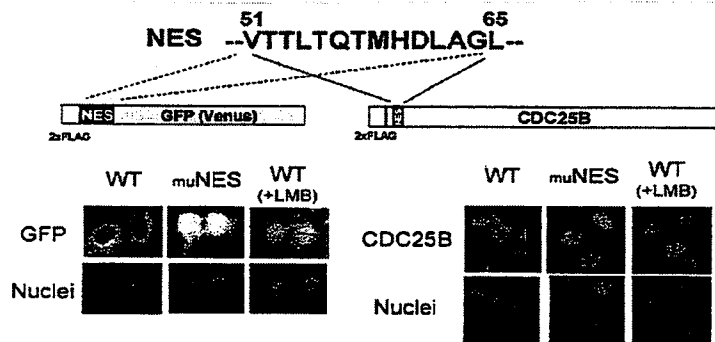


図3 CDC25B の新規 NES の同定

4. 14-3-3 による CDC25 細胞局在制御機構の解析

14-3-3 の結合による蛋白の細胞質への局在促進のメカニズムには二つの仮説がある。14-3-3 の NES 類似配列に由来した核外輸送促進説と 14-3-3 の結合が結合蛋白の NLS をマスクすることによる核内輸送抑制説である。私は 14-3-3 による CDC25B の細胞質局在はどちらのメカニズムによって制御されているかを明らかにするために、二つの実験を行った。まず、II-3 項で作成した NES 欠失変異体に 14-3-3 β 蛋白を共発現しその局在を調べた。14-3-3 の結合が核外輸送を促進するのならば分散型・細胞質型の増加が見込まれたのだが、14-3-3 β を共発現しても NES 欠失変異体の著しい核局在に変化はなかった。次に、LMB 処理による CDC25B の核集積に 14-3-3 β が及ぼす効果を調べた。CDC25B を LMB 処理すると図3でも示したように CDC25B は核に集積する。核局在細胞の割合は、単独発現群では 1.5 時間後に 90% を超えるが、14-3-3 共発現群では 6 時間後でさえ、65% までにしか達しなかった。以上の実験から 14-3-3 の結合によって CDC25B の核内輸送が阻害されることがわかり、図4で示すような機構で CDC25B は 14-3-3 によって制御されていると考えられる。

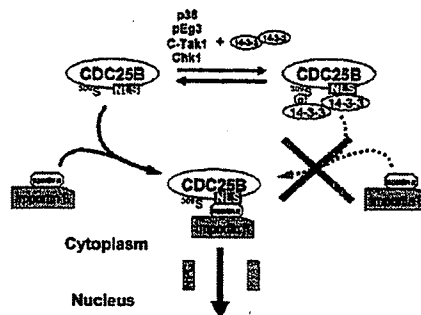


図4 14-3-3 による CDC25B の細胞内局在制御機構

III. 考察

この研究で 14-3-3 蛋白が Ser-309 周辺部への結合を介して CDC25B の細胞内局在を促進すること、およびその促進は 14-3-3 が CDC25B の核移行を阻害することによって引き起こされることを明らかにした。また、CDC25B の NES を新たに同定し CDC25B の細胞質局在には NES と 14-3-3 の結合の両方が必須であることも示した。今のところ CDC25B の細胞内局在については 2~3 の報告はあるものの、一致した見解が得られていない。また、CDC25B の局在が細胞周期の進行にどのように関わっているのかについても明らかにされていない。今回得られた知見が、CDC25B の局在制御機構のさらなる解析および、細胞周期進行におけるこの制御機構の意義の解明に貢献することを期待する。

学位論文審査結果の要旨

内田早苗氏から提出された学位論文につき、上記5名の審査委員による審査の後、平成16年2月3日に口頭発表会が行われた。同日に最終審査委員会が開催され、審議の結果、以下のとおり判定された。

ヒトのCDC25B遺伝子は、CDK1/cyclin B複合体を活性化することで細胞分裂期への進行を正に制御する細胞周期関連遺伝子である。内田氏は、CDC25Bの機能を解析する目的で、学位申請論文にかかわる研究を行った。内田氏は、まず、細胞内のリン酸化タンパク質結合因子として知られている14-3-3がCDC25Bと結合することを明らかにした後、CDC25Bタンパク質中の14-3-3との結合に必須な部位を明らかにした。次に、両タンパク質を細胞内で発現させることにより、CDC25Bが、特定の14-3-3と結合することがCDC25Bの細胞質局在に必須であることを示した。さらに研究を進め、CDC25B中に以前論文発表された所とは別の部位に、細胞質移行シグナル活性を発見し、この部位の欠損によりCDC25Bの細胞質局在が失われることを明らかにした。これらの結果より、CDC25Bの細胞内局在が14-3-3との結合、CDC25Bのもつ細胞質移行シグナル、核移行シグナルにより制御されることを明らかにした。

本研究は、CDC25Bの細胞内局在制御機構を明らかにし、今後のCDC25Bの細胞周期における役割についての研究に重要な貢献をしたものと評価され、博士(理学)の学位に値するものと判定した。