

Title	Wee1+-like gene in human cells
Author(s)	五十嵐, 慎
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37999">https://hdl.handle.net/11094/37999</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【 2 】

氏名	い が らし まこと 五十嵐 慎
博士の専攻分野 の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 9938 号
学位授与年月日	平成 3 年 11 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	<b>Wee1<sup>+</sup>-like gene in human cells</b> (ヒト <i>wee1<sup>+</sup></i> 相同遺伝子の発見と解析)
論文審査委員	(主査) 教授 岡山 博人 (副査) 教授 松代 愛三 教授 羽倉 明

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

哺乳動物細胞において、その増殖、分化あるいは癌化といった現象を調べる上で、細胞周期に関与する遺伝子を単離、解析することは必要不可欠である。下等真核細胞である酵母では、変異株を用いた遺伝学的解析から、細胞周期の調節機構について、ある程度の研究が進んでおり、G2/M 期を調節する遺伝子として *cdc2<sup>+</sup>*, *cdc25<sup>+</sup>*, *wee1<sup>+</sup>*, *nim1<sup>+</sup>* などが知られている。このなかで *cdc2<sup>+</sup>*, *cdc25<sup>+</sup>* の相同遺伝子が哺乳動物細胞で単離されており、G2/M 期の調節機構は種を超えて保存されていると考えられる。分裂酵母において *cdc25<sup>+</sup>* は G2 期から M 期への移行を促進し、逆に *wee1<sup>+</sup>* 遺伝子は G2/M 期の移行を抑制する働きを持つ。*cdc25<sup>+</sup>*, *wee1<sup>+</sup>* 両遺伝子が適切に機能することにより細胞の分裂時期を決定していると考えられている。*cdc25<sup>+</sup>* の異常発現をともなう *wee1<sup>+</sup>* の機能欠損はそのタイミングを狂わせ、結果として染色体の異常を引き起こすことが知られている。一方、哺乳動物細胞の癌化と細胞周期遺伝子との関係に関しては現在のところ全く不明であるが、癌化の初期あるいは悪性化に伴う染色体の不安定化が分裂酵母における G2/M 期調節の破綻による染色体異常と類似していることから、このような細胞周期遺伝子が細胞の癌化に深くかかわっている可能性がある。しかしながら、*wee1<sup>+</sup>* 遺伝子に関しては、分裂酵母以外にその存在が明らかにされていない。本研究では、分裂酵母における mitotic inhibitor である *wee1<sup>+</sup>* 遺伝子に着目し、ヒトにおける *wee1<sup>+</sup>* 相同遺伝子を単離することによりその存在を明らかにすることを目的とした。

[方法ならびに成績]

#### 1. 分裂酵母 *wee1* 変異を相補するヒト cDNA の単離

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 温度感受性 *wee1* 変異株は高温下で G 2 期から M 期への促進が見られる。更にこの変異株内で mitotic inducer である *cdc 25<sup>+</sup>* 遺伝子を過剰発現させることにより、DNA 合成が完了する前に細胞の分裂が起こり染色体の不安定化を引き起こし致死を示す。そこでこの *cdc 25<sup>+</sup>* を過剰発現させた *wee1* 温度感受性変異株を宿主としてヒト繊維芽細胞 cDNA を酵母内に導入することにより遺伝子相補を行なった。約  $3 \times 10^6$  個の形質転換株から高温下 (37°C) で生育可能な 20 コロニーを選択し、その内の 1 コロニーから cDNA (*WEE1Hu*) を回収した。この cDNA を再び分裂酵母内に導入し、変異を強く相補することを確認した。*cdc 2* 変異株の一つである *cdc 2-3w* は *cdc 25<sup>+</sup>* 過剰発現株と似た性質を示し、*wee1* との二重変異株は、高温で同様に致死を示す。そこで得られた cDNA をこの変異株に導入したところ、高温下 (34-37°C) で強く相補した。

#### 2. cDNA の塩基配列の決定

*WEE1Hu* の塩基配列を決定したところ、全長約 2.8 kb, 432 個のアミノ酸をコードし、その分子量は約 49k dalton であった。

#### 3. 分裂酵母 *wee1* 遺伝子との相同性

アミノ酸配列の結果よりコンピューターを用いた解析からこの遺伝子産物はセリン、スレオニンキナーゼ領域をその中央部に持ち、分裂酵母 *wee1<sup>+</sup>* 遺伝子のプロテインキナーゼ領域と最も高い相同性を示した (29%)。しかしながら、両末端の非キナーゼ領域については、分裂酵母 *wee1* 遺伝子との相同性は認められなかった。

#### 4. 分裂酵母 *wee1* 変異を相補する *WEE1Hu* の活性領域の検討

*WEE1Hu* から欠損、及びフレームシフト変異を作製し *wee1* を相補する cDNA の活性領域の検討を行なったところ、非キナーゼ領域を欠失しても相補能に変化は認められなかったが、キナーゼ領域を欠失あるいはフレームシフトすることによりその活性が失われた。

#### 5. 分裂酵母内での *WEE1Hu* 過剰発現の効果

分裂酵母 *wee1<sup>+</sup>* 遺伝子はその発現量に依存するかたちで G 2 期から M 期への移行を抑制し、結果として過剰発現された株ではその細胞体が伸長する。同様に *WEE1Hu* を SV40 プロモーターを用い分裂酵母内で発現させると若干の細胞の伸長が認められた。さらに強力なプロモーター (human cytomegalovirus promoter) を用いることにより、著しく長い (野生株の 4-6 倍) 細胞が観察された。一方、フレームシフトにより *wee1* 変異に対する相補能の失った cDNA では、細胞の伸長は観察されなかった。

#### 6. 哺乳動物細胞内での *WEE1Hu* 過剰発現の効果

Rat 細胞株 (normal rat kidney; NRK) に *WEE1Hu* を導入し flow cytometry を用いて DNA 量を測定することにより細胞周期の検討を行ったところ、導入した細胞のうち約 30% の株について G2/M 期の細胞の割合が増加する傾向を示した。一方、コントロール群に関しては、特に顕著な変化は認められなかった。

〔総括〕

得られたcDNA (*WEE1Hu*) は, 1). 分裂酵母 *wee1* 変異を相補した。2). その相補能には, 蛋白質リソ酸化酵素活性が必要であると考えられた。3). 発現量依存的に分裂酵母のG 2期を長くした。4). 哺乳動物細胞についても同様にM期への移行を抑制すると考えられた。5). 分裂酵母 *wee1*<sup>+</sup> 遺伝子と最も相同性が高かった。以上のことから, *WEE1Hu* は構造的にも機能的にも分裂酵母 *wee1*<sup>+</sup> 遺伝子のヒト相同遺伝子であると考えられた。*WEE1Hu* は哺乳動物細胞の細胞周期を抑制的に調節する遺伝子として初めて単離されたものであり, 細胞の増殖あるいは癌化を調べるうえで重要であると思われる。

### 論文審査の結果の要旨

分裂酵母 *wee1*<sup>+</sup> 遺伝子は, 細胞周期G 2期を調節する遺伝子の1つであり, 分裂期 (M期) への移行を抑制する機能を持つ。しかしながら, このような細胞周期抑制遺伝子の存在は分裂酵母以外では知られておらず, 高等真核細胞での細胞周期抑制の分子機構の実体は不明である。本論文は分裂酵母 *wee1* 変異を相補するヒト遺伝子を単離, 解析し, 機能的にも構造的にも分裂酵母 *wee1*<sup>+</sup> 遺伝子のヒト相同遺伝子であることを示し, 細胞周期G 2期の抑制的制御機構が酵母から哺乳動物細胞に至るまで広く存在することをはじめて証明したものである。従って, 本研究は学位に値するものとする。