

論文の内容の要旨

論文題目 テロメア伸長因子 Tankyrase1 の新規機能解析

指導教員 鶴尾 隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 大石 智一

〔序論〕真核生物の染色体末端は種を通じて高度に保存されたテロメアとよばれる保護的構造を有しており、テロメア結合タンパク質とともに複合体を形成している。ヒトにおいて約 9 割の癌細胞において、テロメア合成酵素のテロメラーゼはテロメアを伸長維持し、このことが、癌細胞の無限増殖能の根拠となっている。テロメラーゼによるテロメア伸長を阻害する TRF1 に結合する蛋白質として同定された Tankyrase1 は、蛋白質相互作用を行うアンキリンドメインと、ポリ (ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)と呼ばれる酵素活性部位を持っている。Tankyrase1 はアンキリンドメインを介して TRF1 と結合し PARP 活性によって TRF1 の働きを阻害することから、テロメラーゼの働きを助長するテロメア伸長因子であると考えられる。Tankyrase1 は間期においてゴルジ体、核膜孔、テロメアに局在するのに対し、細胞分裂期には紡錘体極（中心体）およびその周辺に局在することから、細胞分裂期においてなんらかの働きを担っていると考えられてきた。近年、細胞分裂期における PARP 活性が安定な細胞分裂に不可欠であることが報告され、さらに siRNA を用いた検討によって PARP

ファミリーの中でも特に、Tankyrase1 による PARP 活性が正常な細胞分裂に重要であることが明らかになりつつあるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究においてこれまで未知に等しかった細胞分裂期における Tankyrase1 の中心体での働きを検討した。

[方法・結果]

1. 細胞分裂期に Tankyrase1 は主に中心体に局在しリン酸化される。

Tankyrase1 の細胞分裂期における局在を検討するため、HeLa. I.2.11 細胞をメタノールで固定後、抗 Tankyrase1 抗体と、抗 γ -tubulin 抗体によって免疫染色を行った。Tankyrase1 は細胞分裂中期において中心体マーカーの一種である γ -tubulin と一部局在が一致したことから、細胞分裂期に主に中心体およびその周辺で機能している可能性が示唆された (Fig.1)。次に細胞分裂期における修飾を検討するため、Nocodazole によって細胞分裂期にブロックすると、Tankyrase1 のバンドが上にシフトすることが明らかとなった。次にこのバンドシフトがリン酸化によるものかを、セリン/スレオニン残基のリン酸基特異的脱リン酸化酵素の Protein Phosphatase1 (PP1) を用いて検討した。15分、30分と継時的に処理すると上にシフトしていた Tankyrase1 のバンドは元の 160Kda の位置に戻るのに対し、同様の検討を Protein Phosphatase 阻害剤存在下で行うと、バンドは上にシフトしたままであった。これらの結果から、Tankyrase1 は細胞分裂期において中心体およびその周辺に局在し、Tankyrase1 のセリン/スレオニン残基がリン酸化されることが明らかとなった (Fig.2)。



Fig.1 Tankyrase1 と γ -tubulin の細胞分裂中期における局在。

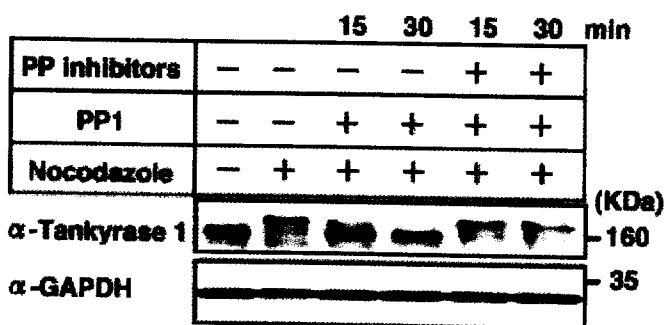


Fig.2 Tankyrase1 の細胞分裂期におけるリン酸化の検討。

2. 細胞分裂期に Tankyrase1 は Aurora A と一部局在が一致する。

細胞分裂期における Tankyrase1 の中心体局在およびリン酸化から、細胞分裂期に紡錘体極で機能するセリン/スレオニンキナーゼの Aurora A との関与を検討した。細胞分裂期において Tankyrase1 と Aurora A の局在は一部中心体部位で一致した。(Fig.3)

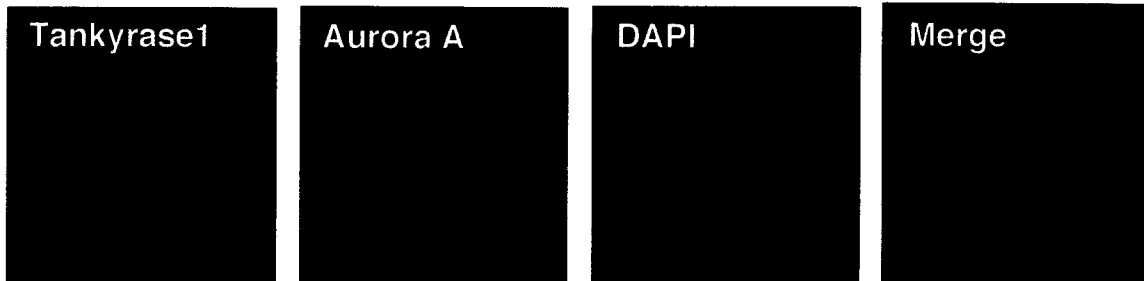


Fig.3 Tankyrase1 と Aurora A の細胞分裂中期における局在。

3. Tankyrase1 は Aurora A と細胞内および試験管内で結合する。

次に HTC75 細胞を用いて細胞内における Tankyrase1 と Aurora A の結合を検討した。Nocodazole 処理により細胞分裂期でブロックした細胞抽出液から Aurora A で免疫沈降すると、Tankyrase1 の共沈降が検出できた(Fig.4A)。さらに、Tankyrase1 と Aurora A が直接結合しているかどうかをビーズに結合させた GST 融合蛋白質と Aurora コンストラクトを用いてプルダウンアッセイを行うと、野生型 (WT)および不活性変異型 (K162R)の HA タグ付き Aurora A を用いた時のみバンドが検出された。このことから、Tankyrase1 と Aurora A が直接結合することが明らかとなった。(Fig.4B)

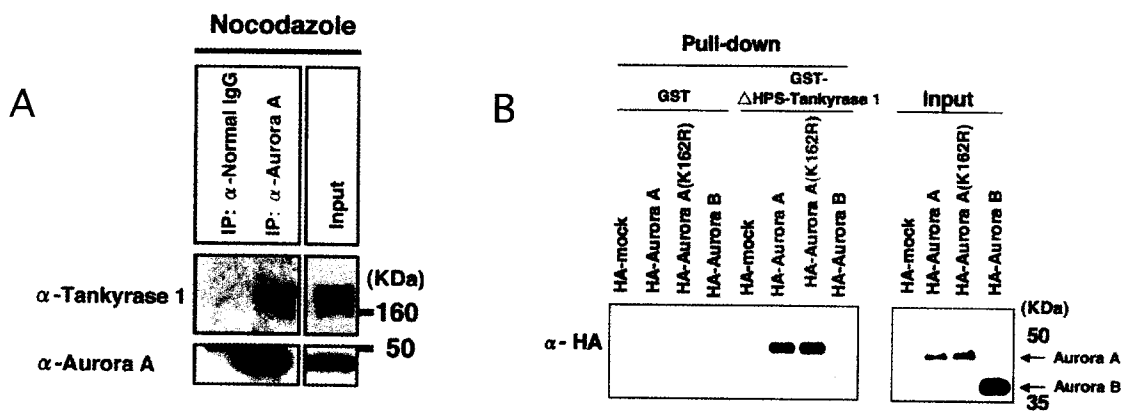


Fig.4 Tankyrase1 と Aurora A の結合。

4. Tankyrase1 は Aurora A をポリ(ADP-リボシル)化する可能性が示唆された。

Tankyrase1 と Aurora A が直接結合することが明らかになったことから、

Tankyrase1 が Aurora A をポリ (ADP-リボシル)化するかを検討した。HTC75 細胞に FLAG タグのみ(mock)、FLAG タグおよび核移行シグナル(NLS)付きの FN-Tankyrase1 をステイブルに発現させた細胞を Nocodazole で 12h 処理し、細胞抽出液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、試験管内で PARP assay を行った。Tankyrase1 と Aurora A を加えると、ポリ (ADP-リボシル)化された Tankyrase1 と Aurora A を検出できた。一方、PARP 阻害剤の 3 AB を加えると、ポリ (ADP-リボシル)化された Tankyrase1 と Aurora A のシグナルが著しく抑えられた。これらのことから、試験管内において Tankyrase1 が Aurora A をポリ (ADP-リボシル)化することが示唆された。

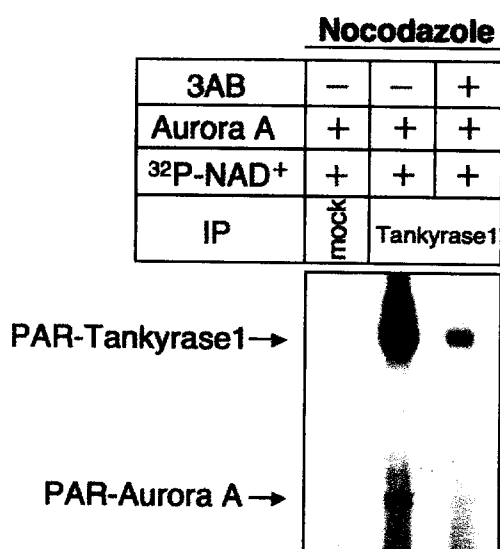


Fig.5 Tankyrase1 による Aurora A のポリ (ADP-リボシル)化。

5. 核における Tankyrase1 過剰発現は Aurora A の効果を抑制する。

細胞内において Tankyrase1 と Aurora A の結合の意義を検討するため、HTC75 細胞を用いて各種 Tankyrase1 ステイブル発現細胞を作製した。Tankyrase1 は核にも細胞質にも存在しているが、FLAG タグ付 Tankyrase1 はほとんどが細胞質に局在する。このことから、核における Tankyrase1 の働きを検討するために、FLAG タグおよび NLS 付きの Tankyrase1 を発現させた FN-Tankyrase1、FLAG タグおよび NLS 付きで PARP 活性を失活させた FN-Tankyrase1 (HE)、FLAG タグ付きの F-Tankyrase1 をステイブルに発現させた細胞を樹立した。これまで Aurora A を過剰発現させると細胞質分裂の異常に起因した中心体の過形成が起こることが報告されていることから、前述の細胞に対する Aurora A 過剰発現の効果を検討した。Mock ではこれまでの報告と同様に、中心体の過形成が観察さ

れた。一方で、FN-Tankyrase1 ステイブル発現細胞では Aurora A 過剰発現による中心体の過形成が抑えられていた。しかし、PARP 活性の失活した FN-Tankyrase1(HE)ならびに F-Tankyrase1 では Aurora A による効果を抑えることができなかった (Fig.6)。これらの結果から、核における Tankyrase1 は PARP 活性に依存して Aurora A の効果を抑制している可能性が示唆された。

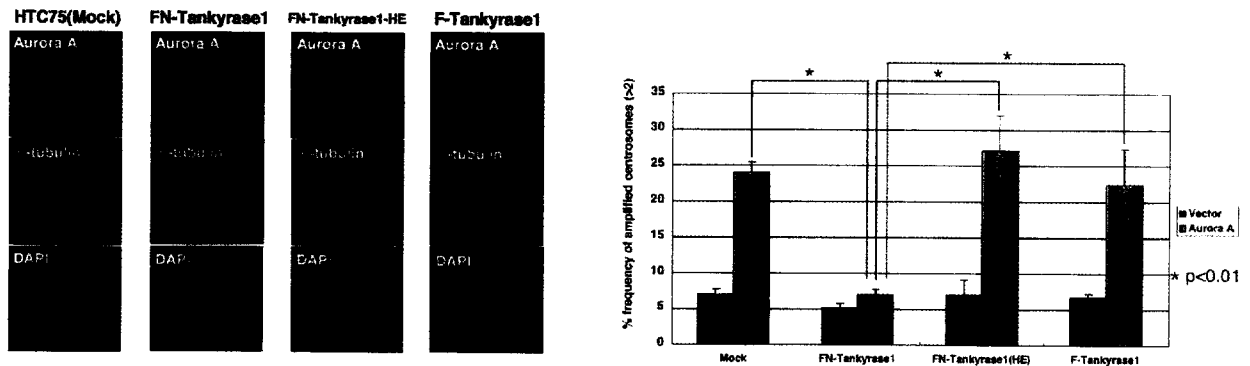


Fig.6 各種 Tankyrase1 ステイブル発現細胞に対する Aurora A の効果。

6. 核における Tankyrase1 過剰発現は Nocodazole 処理による細胞質分裂異常を抑制する。

Aurora A 過剰発現による中心体の過形成が FN-Tankyrase1 ステイブル発現細胞で有意に抑えられていたことから、さらに Nocodazole による細胞質分裂異常に対する Tankyrase1 の効果を検討した。Mock、FN-Tankyrase1、FN-Tankyrase1(HE)、F-Tankyrase1 ステイブル発現細胞は未処理で細胞周期に対する影響はほとんどなかった。これらの細胞を Nocodazole で 12 時間処理するとほとんどの細胞が細胞分裂期でブロックされた。さらに Nocodazole 12 時間処理によってラウンドアップした細胞を集めて別の dish で Nocodazole をさらに 18 時間継続処理すると、Mock、FN-Tankyrase1(HE)、F-Tankyrase1 ステイブル発現細胞は細胞質分裂に異常を起こし、4N および 8N の細胞が高頻度で観察されるのに対し、FN-Tankyrase1 ステイブル発現細胞では細胞質分裂が行われ、4N の細胞に加えて 2N の細胞が観察された。これらの結果から、核における Tankyrase1 は PARP 活性に依存して細胞質分裂の異常を抑制している可能性が示唆された。

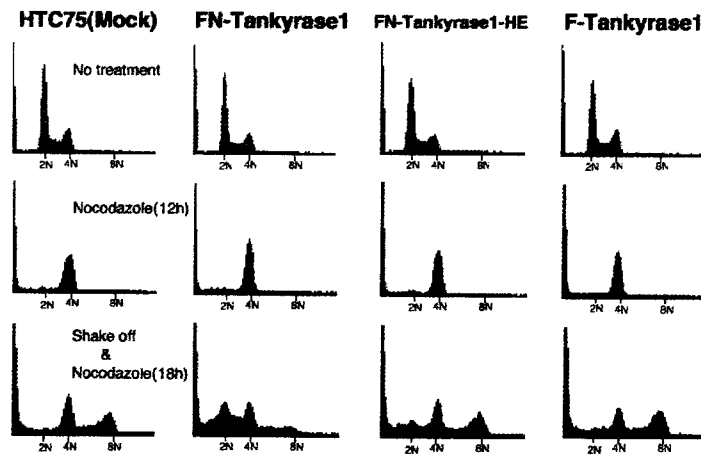


Fig.7 各種 Tankyrase1 ステイブル発現細胞に対する Nocodazole 長期処理の影響。

[総括]

細胞分裂期は多くのタンパク質のリン酸化によって進行し、その進行は分裂期リン酸化酵素によって厳密に制御されている。Aurora A は分裂期リン酸化酵素の一種であり、分裂期に重要な役割を果たしている。ヒトにおいて多くの悪性腫瘍で Aurora A の過剰発現が報告されており、腫瘍の悪性形質の維持に重要であると考えられるようになってきた。本研究において、PARP ファミリーの一種でありテロメア伸長因子の Tankyrase1 が Aurora A と直接結合し、核における Tankyrase1 過剰発現によって Aurora A の効果を抑制している可能性が示唆された。これまで Tankyrase1 はテロメア伸長という機能を有していることから、癌細胞にとって有利に働いているという感があったが、今回の結果から、Tankyrase1 は細胞分裂期に紡錘体極に局在し、細胞分裂を行わせることにより、異数体の出現を抑制している可能性が示唆された。ゲノムの安定性という観点から考えると、テロメア伸長も細胞分裂の制御も方向性は一致している。今後さらなる研究によって Tankyrase1 の細胞分裂期における機能の全貌の解明が期待される。