

論文内容の要旨

論文題目

Polo-like kinase 1 標的中心体蛋白質 Kizuna とその結合蛋白質による

紡錘体極形成機構の解析

(The centrosomal Plk1 substrate Kizuna and its binding protein
regulate mitotic spindle pole formation)

氏名 押森 直木

細胞分裂は遺伝的に同一の娘細胞を生み出す最も根本的な生命現象である。中でも染色体の均等分配は、分裂期に形成される双極の紡錘体に依存する。体細胞では、微小管形成中心である中心体が紡錘体の極の役割を担う。したがって、中心体の数や機能は紡錘体形成と密接に関連している。特に癌細胞では、中心体数の増加と多極紡錘体形成が頻繁に見出されているため、染色体分配異常と癌形質獲得の因果関係が示唆されている。しかし、紡錘体極として機能する中心体の制御機構は不明な点が多い。

中心体に局在する分裂期キナーゼ Polo-like kinase 1 (Plk1)は、双極の紡錘体形成に必須の役割を果たす。しかし、Plk1 の生理的な基質はわずかしか同定されておらず、Plk1 による中心体制御機構はほとんど明らかにされていない。第一章では、Plk1 の新規基質を同定し、基質蛋白質の機能と Plk1 によるリン酸化の意義を解析することで、Plk1 による分裂期制御や中心体制御の新たな機構を明らかにすることを目的とした。まず、Plk1 基質を固相リン酸化法により探索した。本法は、蛋白質の発現を誘導した HeLa cDNA ライブラリーのプラークを膜に写し取って、その膜上で Plk1 と放射性標識 ATP を用いてリン酸化酵素反応を行い、リン酸化されたプラーク蛋白質、すなわち基質を同定する方法である。このスクリーニングによって 20 個以上の Plk1 基質候補分子を同定し、そのうちの 1 つを以下に明らかにする理由により Kizuna (Kiz)と名付け、解析した。

Kiz 蛋白質は細胞周期を通じて中心体に局在し、Plk1 の発現が増加する分裂期において高度にリン酸化されていた。In vitro の解析から、Kiz の 379 番目の Thr 残基が Plk1 によりリン酸化されるこ

とを見出し、細胞内においても分裂期特異的な Thr-379 のリン酸化が確認された。このことから、Kiz は中心体における Plk1 の生理的基質であると考えられた。

Kiz の機能を解析するために RNA 干渉 (RNAi) 法による Kiz 発現抑制の実験を行った。分裂期の Kiz 発現抑制細胞において、高頻度に多極紡錘体がみられた (図 1)。中心体数の増加は多極紡錘体を引き起こすが、Kiz 発現抑制細胞の中心体の数は正常であった。そこで、多極紡錘体の原因を探るため、中心体構造に着目した。中心体の核を構成する中心小体は、多極紡錘体のいずれか 2 つの極に存在した。一方、中心小体を取り囲む中心小体周辺物質 (pericentriolar material, PCM) の構成蛋白質は、全ての極に存在していた (図 2)。核膜崩壊前にはこのような中心小体と PCM の不一致は見られないため、Kiz 発現抑制は分裂期における中心体構造の崩壊を引き起こすことが示唆された。そして崩壊した PCM が紡錘体極として働いた結果、多極紡錘体が形成されたと考えられた。

では Kiz 発現抑制時、どのような要因で中心体崩壊が起こるのであろうか？核膜崩壊後、中心体と染色体は微小管によってつながり、微小管の伸縮制御やモーター蛋白質の作用によって染色体の運動が起こり、染色体を赤道面に整列させる。しかし同時に、中心体には染色体整列運動によって派生する反作用の力がかかると考えられる。そこで、微小管を介した力によって中心体の崩壊が起こるのではないかという仮説を立てた。これを検証するために、2 つの実験を行った。まず、紡錘体微小管を脱重合させる実験では、確かに Kiz 発現抑制下でも中心体崩壊は抑制された。また、Kiz と同時に染色体整列運動に関わるクロモキネシン Kid の発現を抑制する実験でも、中心体崩壊を有意に抑制することができた。これらの実験的検証から、Kiz は紡錘体形成時に中心体構造を安定に保つ機能を担っていることが示唆された。

次に、Plk1 によるリン酸化の意義について調べた。リン酸化の影響は、RNAi によって内在性 Kiz の発現を抑制した細胞に、RNAi 抵抗性の野生型 Kiz または非リン酸化型 Kiz^{T379A} を導入することで検証した。野生型 Kiz を発現した細胞は双極紡錘体の形成を回復することができたが、Kiz^{T379A} 変異体を発現した場合、Kiz^{T379A} のシグナルは多極紡錘体いずれか 2 つの極に存在したものの、双極性は回復されなかった (図 3)。したがって、Plk1 による Kiz のリン酸化は、Kiz の細胞内局在には関与せず、中心体構造を安定に保つ機能に必須であると考えられた。さらに、リン酸化状態を模倣

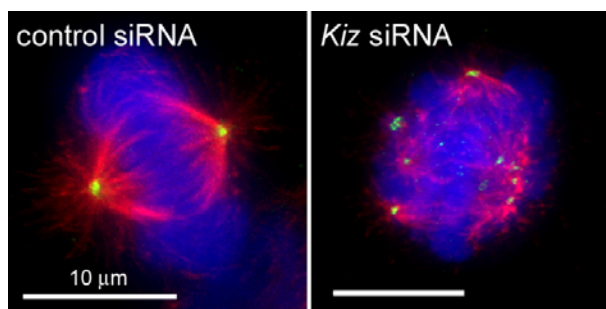


図 1. Control または Kiz 発現抑制細胞の紡錘体の様子。Kiz 発現抑制では多くの紡錘体極が小さな紡錘体を形成した多極紡錘体の表現型を示す。γ-tubulin (緑)、α-tubulin (赤)、DNA (青)。

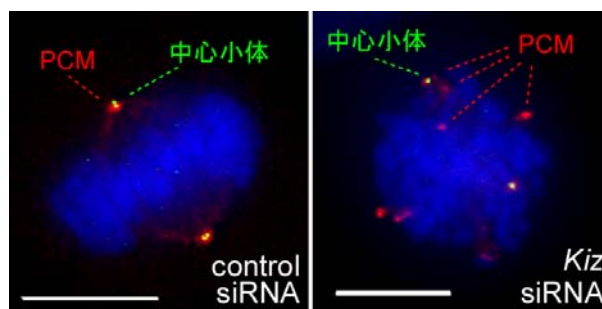


図 2. Control または Kiz 発現抑制細胞の中心体構造。中心小体はcentrin (緑)、PCMはPCMマーカーと共局在することを確かめたγ-tubulin (赤)で示した。DNA (青)。

する Kiz^{T379E} 変異体も野生型と同様に双極性を回復することができた。そこで、このリン酸化状態模倣型 Kiz^{T379E} 変異体が、Plk1 発現抑制の効果を回復できるか検討した。Plk1 発現抑制では中心体成熟と双極紡錘体形成の両方に表現型が見られる。 Kiz^{T379E} 変異体の発現は中心体成熟を回復する効果は示さなかったが、双極紡錘体形成を有意に回復することができた。このことから、Kiz は Plk1 が制御する双極紡錘体形成機構の重要な基質であると考えられた。

さらに、Kiz に結合する中心体蛋白質を免疫沈降により探索したところ、PCM 構造蛋白質 pericentrin が分裂期特異的に会合していることを見出した。また、その会合は Kiz^{T379A} 変異体では弱まり、 Kiz^{T379E} 変異体では強まった。以上の結果、Kiz が中心小体と PCM、または、PCM 同士の“絆”となり、さらに Plk1 はその会合を強固にすることで、紡錘体の双極性維持を制御していると考えられた。

微小管形成中心として機能する中心体は、分裂期に紡錘体極として働く。中心体のプロテオミクスにより、100 個以上の蛋白質が中心体に存在することが明らかとなったが、どの蛋白質がどのように紡錘体極の機能を制御するのかについてはほとんど明らかにされていない。そこで第二章では、中心体制御の新たな側面を担う Kiz に結合する蛋白質を同定し、紡錘体極制御機構の詳細を解明することを目的とした。酵母 Two-hybrid 法により Kiz 結合蛋白質を探索したところ、機能未知の中心体蛋白質 Cep72 を同定した。Cep72 もまた細胞周期を通じて中心体に局在していた。Cep72 の機能を解析するために RNAi 実験を行ったところ、間期の中心体の γ -tubulin 量が顕著に減少し、微小管重合活性も著しく阻害された。また、PCM 構造蛋白質 CG-NAP の局在が Cep72 に依存していることを見出し、CG-NAP 発現抑制細胞でも中心体の微小管重合活性に低下がみられた。したがって、

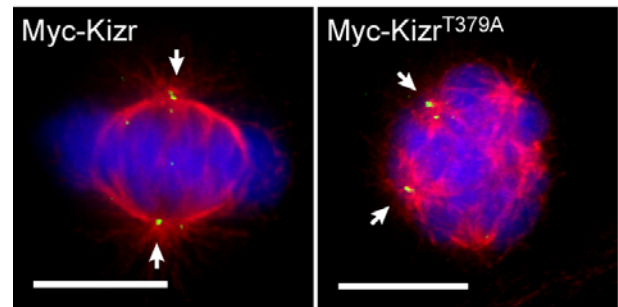


図3. Kiz発現抑制細胞にsiRNA抵抗性の野生型Kiz (Myc-Kizr)または非リン酸化型Kiz (Myc-Kizr^{T379E})を発現させた。矢印は、発現したMyc-Kizの場所を示す。Myc (緑)、 α -tubulin (赤)、DNA (青)。

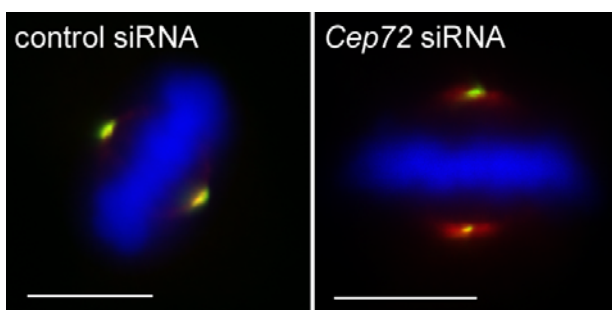


図4. ControlまたはCep72発現抑制細胞の紡錘体極の様子。Control細胞ではPCMマーカーのpericentrin (緑)と γ -tubulin (赤)がほぼ一致しているのに対して、Cep72発現抑制細胞では γ -tubulinが紡錘体極に収斂していない。DNA (青)。

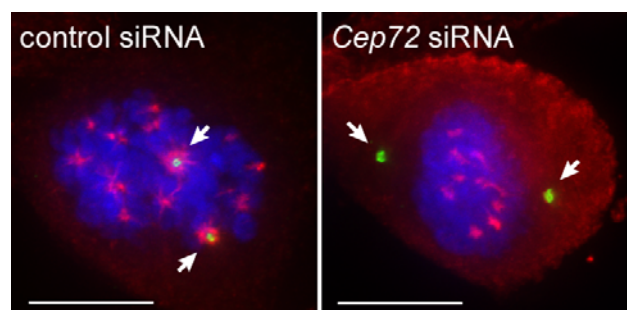


図5. 分裂期のcontrolまたはCep72発現抑制細胞の、微小管再重合アッセイの結果。染色体依存的な微小管重合はどちらの細胞からもみられるが、矢印で示した中心体からの微小管重合がCep72発現抑制細胞で顕著に阻害されている。pericentrin (緑)、 α -tubulin (赤)、DNA (青)。

Cep72 は CG-NAP の局在を制御することで、中心体の微小管重合活性に必須の役割をしていることが示唆された。

分裂期の Cep72 発現抑制細胞では、紡錘体極に Kiz が局在せず多極紡錘体が生じた。また、それぞれの極で γ -tubulin シグナルが収斂せず、雲状に局在していた。さらに、染色体整列にも著しい阻害がみられた。間期の中心体と同様、紡錘体極からも CG-NAP の局在が消えていた。分裂期の Cep72 発現抑制細胞においても、中心体の微小管重合活性が阻害されていることを見出した (図5)。分裂期では中心体と染色体の両方から微小管重合が起こる。染色体由来の微小管は、NuMA-dynein 複合体を介して中心体で重合された星状微小管と結合し、中心体へ輸送されると考えられている。しかし Cep72 発現抑制細胞では、NuMA の局在が紡錘体極から離れており、微小管のマイナス端に結合した γ -tubulin ring complex (γ TuRC) が、中心体周辺に雲状に存在していることが示唆された (図4)。以上より、Cep72 と CG-NAP が介する中心体の微小管重合活性は、染色体由来の微小管を中心体に結合させるために必要であり、その制御は赤道面への染色体整列を可能にする機能的な紡錘体形成に必須であると考えられた (図6)。

Cep72 は γ TuRC、CG-NAP、Kiz 等の中心体蛋白質を中心体にリクルートする働きをしていると考えられる。一方、CG-NAP に類似した PCM 構造蛋白質 pericentrin の局在は PCM-1 という他のリクルート蛋白質に依存することが知られている。したがって、第一章の結果と合わせると、Cep72 依存的な蛋白質群と PCM-1 依存的な蛋白質群は、Plk1 によって制御される Kiz-pericentrin の会合によって結びつくことが想定される。さらに Cep72 は CG-NAP のリクルートを介して分裂期中心体に微小管重合活性を与えており、一方、pericentrin は PCM の肥大化に必須であることが示されている。このように、機能の異なる2つの蛋白質群が別々の経路によって同時期に中心体へ輸送されているが、Cep72 によって運ばれるもう一つの重要な蛋白質 Kiz が Plk1 によって活性化されると、両蛋白質群を橋渡しし、安定した構造と機能を兼ね備えた分裂期中心体を構築できると考えられた。

本研究では、Kiz と Cep72 という新しい中心体蛋白質の同定と機能解析を通して、紡錘体極として機能するために必要な中心体制御の一端を明らかにできたものと考えられる。

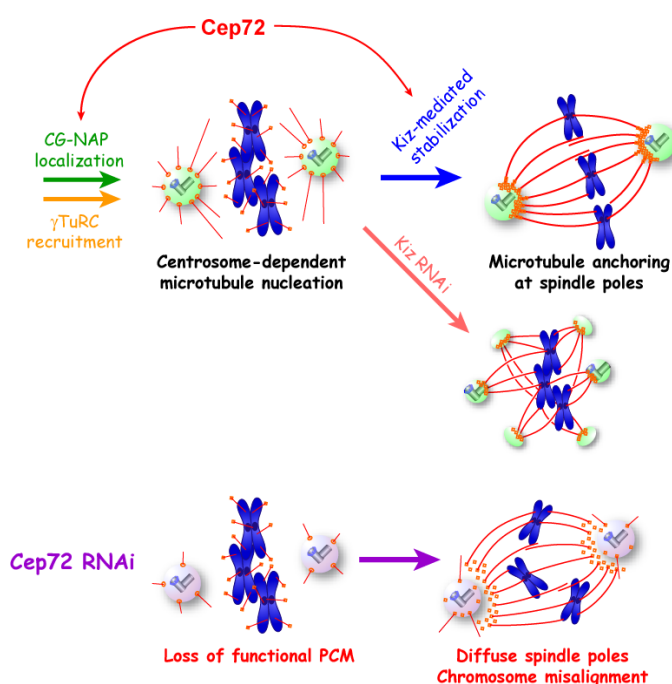


図6. Cep72とKizによる紡錘体極の制御のモデル図。Cep72はMTOC活性に必要な γ TuRCとCG-NAPの局在を制御する。その結果、中心体から重合された微小管は染色体依存的に重合された微小管と共に正常な紡錘体を形成し、染色体を赤道面に整列できるようになる。また、Kizは染色体整列運動によって生じる力から中心体構造を守り、紡錘体の双極性維持に必須の役割を果たす。