

## 論文内容の要旨

### 論文題目

サイクリン依存性キナーゼ (CDK) は Chromosome Passenger Complex (CPC) のリン酸化を介して染色体の二方向性結合を制御する

(Cyclin-Dependent Kinase (CDK) regulates the bipolar attachment of sister chromatids through the phosphorylation of Chromosome Passenger Complex (CPC))

塚原 達也

### <序>

真核細胞は、複製した姉妹染色分体のペアを分裂の際に均等に分配することでゲノムの恒常性を維持している。染色体分配のミスは癌化や細胞死の原因となるため、その過程は精巧に制御されている。中でも、姉妹染色分体の動原体ペアが両極から伸びたスピンドル微小管によって捉えられる機構（二方向性結合の確立）は、正確な染色体分配のために必須である。細胞は分裂期において、動原体とスピンドル微小管との間に生じる間違った結合を修正しながら、二方向性結合を確立していく。全ての染色体で二方向性結合が確立すると、細胞は分裂後期へと移行し、姉妹染色分体が娘細胞へと均等に分配される。

二方向性結合を確立する機構において重要な役割を果たす因子として、Aurora B, INCENP, Survivin, Borealin の4者から成る Chromosome Passenger Complex (CPC) が知られている。CPC は進化的に保存されたタンパク質複合体であり、分裂前中期にセントロメアに局在して、動原体とスピンドル微小管との間に生じる間違った結合を一時的に解除することで、二方向性結合を促進する機能がある。CPC がその機能を発揮するためにはセントロメアに局在することが非常に重要であるが、CPC がどのようにセントロメアに局在するかについては、多くが謎に包まれていた。近年の我々の分裂酵母を用いた解析から、進化的に保存されたセントロメアタンパク質であるシュゴシンファミリーに属する因子 Sgo2 が、CPC のセントロメア局在を促進していることが示された。しかしながら、Sgo2 が CPC をセントロメアへと局在化させる分子機構は未解明であり、分裂期特異的な CPC の局在制御機構も不

明であった。

染色体分配の過程は細胞周期の進行と密接に結びついている。細胞周期の進行はサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-Dependent Kinase, CDK) の活性によって制御されている。CDK は、その制御サブユニットであるサイクリンによって活性が調節されており、活性の上昇が DNA 合成期及び分裂期への進行に、活性の低下が分裂期の終了に必要である。サイクリンには G1/S・S・M サイクリンの三種類が存在し、それぞれが特異的な因子と結合することで細胞周期の時期依存的な CDK の基質特異性を生み出している。DNA 合成期における CDK の基質としては染色体の複製開始因子などが知られており、分裂期における基質としては、染色体凝縮因子や、スピンドルの形成やダイナミクスに重要なモータータンパク質などが知られ、様々な現象を制御していると考えられている。さらに、出芽酵母及びヒト培養細胞を用いた解析から、CPC のサブユニットである INCENP 及び Survivin が CDK によりリン酸化されることが示唆されているがその生理的意義はほとんど明らかになっていない。

<結果>

私は、CPC のセントロメア局在を制御する分子機構を明らかにするため、Sgo2 と相互作用する CPC のサブユニットを検討した。分裂期の細胞から Sgo2 を免疫沈降したところ Bir1/Survivin が特異的に共沈したことに加え、酵母ツーハイブリッド解析の結果 CPC のサブユニットの中で Bir1 のみが Sgo2 と直接相互作用することが明らかになった。また、Bir1 と Sgo2 との相互作用は、Bir1 の N 末端側 300 アミノ酸と Sgo2 の保存された coiled coil 領域を介していることを示した。これらの結果から、Bir1 が Sgo2 と CPC のインターフェースになることが示唆されたが、CPC と Sgo2 は分裂前中期から中期にかけてのみ共局在するため、分裂期特異的な制御が存在する可能性が考えられた。そこで、Bir1 タンパク質の細胞周期における挙動を解析したところ、Bir1 は分裂期特異的にリン酸化修飾を受けることが明らかになった。Bir1 は *in vitro* における CDK のよい基質となることに加え、アミノ酸 1 次配列中に CDK によるリン酸化の標的コンセンサス配列を 8 ヶ所持つ。これら 8 ヶ所すべてをアラニンに置換したタンパク質 Bir1-8A は、*in vitro* における CDK によるリン酸化をほとんど受けず、分裂期における Bir1 のバンドシフトもほとんど消失することが判明した。これらの結果から Bir1 は分裂期に CDK によるリン酸化修飾を受けることが明らかになった。

次に、このリン酸化の意義を検討するため、非リン酸化型 *bir1-8A* 変異株の表現型を解析したところ、lagging chromosome と呼ばれる染色体が多くの細胞で観察された。Lagging chromosome とは、分裂後期にスピンドルの中央部に取り残された染色体のことで、一本の染色体が両極から引っ張られることで生じる。すなわち、分裂前中期における間違っただ結合の修正の異常を反映していると考えられている。さらに、分裂前中期における CPC の局在を観察したところ、*bir1-8A* 変異株では CPC のセントロメア局在が顕著に減少していることが明らかになった。これに対し、8 ヶ所のリン酸化サイトをすべてアスパラギン酸に置換したリン酸化模倣型 *bir1-8D* 変異株では lagging chromosome がほとんど観察されず、CPC の

セントロメア局在もほとんど正常だった。このことから、Bir1 のリン酸化が CPC のセントロメア局在に必要であることが明らかになった。さらに、*bir1-8A* 変異株では、Bir1 と Sgo2 の相互作用が失われており、ツーハイブリッド法による相互作用も Bir1 のリン酸化に依存していたことから、Bir1 のリン酸化は Sgo2 との相互作用を安定化することで CPC のセントロメア局在を促進していることが示唆された。また、Bir1-8A を強制的にセントロメアへと局在化させると正常に機能したことから、Bir1 のリン酸化はセントロメア局在に特異的に寄与していると考えられる。減数分裂期の細胞の解析から、このリン酸化の制御は減数分裂の染色体分配にも同様に重要な働きを持つことが示唆された。

次に、CDK の基質認識に関わる *cdc13* (M サイクリン) の変異株で、染色体分配に欠損を示しその表現型が *bir1-8D* 変異により抑圧されるようなものをスクリーニングした。その結果同定された *cdc13-1* 変異株は、高頻度で lagging chromosome が観察され、CPC のセントロメア局在も有意に減少していた。これらの表現型が *bir1-8D* 変異により部分的に抑圧されたことから、CDK による Bir1 のリン酸化が、CPC のセントロメア局在に重要な意義を持つことが強く示唆された。

シュゴシン及び CPC、CDK はいずれも進化的に保存されていることから、ヒト培養細胞においても上述の制御機構が存在するかを検討した。まず、ヒト培養細胞における CPC のセントロメア局在がシュゴシンに依存するかを検討した。その結果、hSgo1 及び hSgo2 の両者を同時に RNAi でノックダウンすると CPC のセントロメア局在がほぼ消失した。また、酵母ツーハイブリッド解析の結果、CPC のサブユニットの中で hBorealin が hSgo1 及び hSgo2 と特異的に相互作用することが明らかとなった。hBorealin は CDK の標的コンセンサス配列を 7 ヶ所持つため (うち 6 ヶ所は弱いコンセンサスのクラスター)、それら全てをアラニンに置換すると、CDK による *in vitro* のリン酸化及び *in vivo* での hBorealin のバンドシフトが消失した。さらに、シュゴシンとの相互作用がリン酸化に依存することも示した。内在性の hBorealin を RNAi でノックダウンし非リン酸化型 hBorealin を発現させた細胞では CPC のセントロメア局在が減少し、染色体の整列にも異常をきたした。これらの解析から、CDK によるリン酸化に依存した CPC とシュゴシンの相互作用は、CPC のセントロメア局在における進化的に保存された中心的制御であることが明らかになった。

#### <展望>

本研究で、CDK によるリン酸化に依存した CPC とシュゴシンの相互作用が CPC のセントロメア局在に重要であることを示したが、*bir1* の非リン酸化型変異株において CPC のセントロメア局在は *sgo2* 破壊株に比べ顕著に減少していた。この観察結果は、Bir1 のリン酸化がシュゴシンとの相互作用以外にも機能を持つことを示唆している。*bir1* の非リン酸化型変異株における分裂前中期の CPC の局在を詳細に検討すると、核小体にシグナルが観察された。分裂酵母及びヒト培養細胞において CPC は間期に核小体に局在することが知られていることから、Bir1 のリン酸化は CPC の核小体からの放出に寄与している可能性が示唆される。また、*bir1* の非リン酸化型変異株においても CPC のセントロメア局在は非常に弱い

ながらも観察されることから、CPC のセントロメア局在には CDK による Bir1 のリン酸化とは独立な経路が存在すると考えられる。実際に、当研究室の山岸により、ヘテロクロマチンタンパク質 Swi6 が、H3 Thr3 をリン酸化するキナーゼである Haspin をセントロメアを含むヘテロクロマチン領域に局在化すること、H3 Thr3 のリン酸化に依存して CPC のセントロメア局在が促進されることが明らかになった。また、当研究室の川島と作野により、減数分裂期において I 型カゼインキナーゼ Hhp1 及び Hhp2 が CPC のセントロメア局在を促進することが示された。これらの経路はシュゴシンを介した経路とは独立であることが示唆されている。今後 CDK による Bir1 のリン酸化とこれらの経路との関係性を解析することで、リン酸化反応による CPC のセントロメア局在の制御ネットワークの全体像が明らかになると考えられる。

また、CPC は分裂後期においてセントロメアから解離してセントラルスピンドルに移行し、スピンドルの伸長や細胞質分裂に重要な機能を持つ。分裂後期には CDK の活性が低下し、Bir1 のリン酸化レベルも低下していたことから、この脱リン酸化が CPC のセントロメアからの解離に関わっている可能性も考えられた。しかし、*bir1-8D* 変異株において分裂後期の CPC のセントラルスピンドルへの局在は正常であったため、セントラルスピンドルへの移行は Bir1 の脱リン酸化のみでは制御されていないと考えられる。出芽酵母において、INCENP ホモログ Sli15 の微小管結合ドメインに対する CDK によるリン酸化が CPC のスピンドル局在に阻害的に働いており、分裂後期に Cdc14 ホスファターゼにより Sli15 が脱リン酸化されることがセントラルスピンドルへの移行に重要であることが示唆されている。分裂酵母においても CPC の CDK による複合的なリン酸化及び脱リン酸化により、CPC のセントロメア局在及びセントラルスピンドル局在が制御されている可能性が考えられる。今後は Bir1 以外の CPC サブユニットに対する CDK によるリン酸化とその意義を解析することにより、CPC の細胞周期依存的な局在制御機構のより深い理解が得られることが期待される。

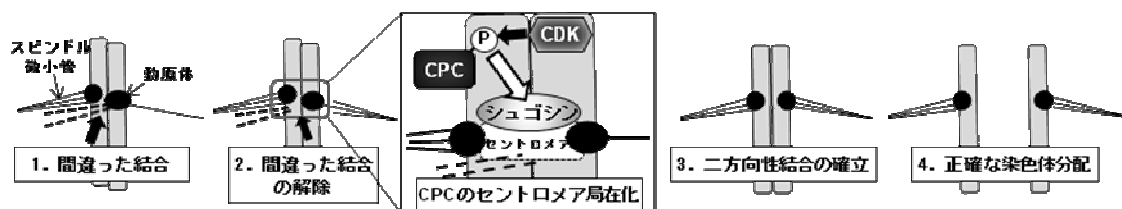


図1. 動原体とスピンドル微小管の間の二方向結合が確立していく流れ