

論文の内容の要旨

論文題目 キネシン様蛋白質 Kid の同定と機能解析

The cloning and functional analysis of a member of the kinesin-family protein, Kid, kinesin-like DNA binding protein.

氏名 渡海（西住）紀子

遺伝情報の自己複製と細胞の分裂とは、生命の営みの最も基本的な過程である。この細胞分裂過程において、複製された染色体を2つの娘細胞に正確に分配するため、分裂装置である紡錘体が、重要な役割を担っている。紡錘体は、微小管と、微小管結合蛋白質等により成り立っており、細胞分裂の進行に伴い非常にダイナミックに構造を変化させる。細胞分裂前期には2つの星状体が核の両端に移動し、前中期に核膜が崩壊すると染色体を捕捉し赤道面に整列させる。後期には紡錘体は伸長し、分離した姉妹染色分体を紡錘体の両極に移動させる。この紡錘体の統率のとれたダイナミックな動きは、微小管に沿って動くモーター蛋白質であるキネシン様蛋白質ファミリーや細胞質ダイニンが協調的に働くことで実現する。しかし、この紡錘体微小管や染色体などの一連の動きがどのような分子機構によるのか解明されているのはほんの一部であるため、新しいキネシン様蛋白質の同定や、機能の解析が必須である。

本研究では、新規のキネシン様タンパク質 Kid (*kinesin-like DNA binding protein*)を同定し、その細胞分裂における機能を解析した。当初、癌原遺伝子 c-erbB2 のプロモーター領域に結合する蛋白質を同定する目的でスクリーニングしたが、得られた分子は癌原遺伝子 c-erbB2 の転写調節因子ではなく、DNA 結合活性をもつ新規のキネシ

ン様の微小管モーター蛋白質であった。この蛋白質は、N末側(41-376a.a.)にキネシン様蛋白質の微小管モーター領域、中央には coiled-coil 構造 (465-506a.a.) を有し、C末端側は、クローニングの経緯から DNA 結合すると考えられた(図 1 A)。そこで、これを Kid と命名し、以下の解析を行った。

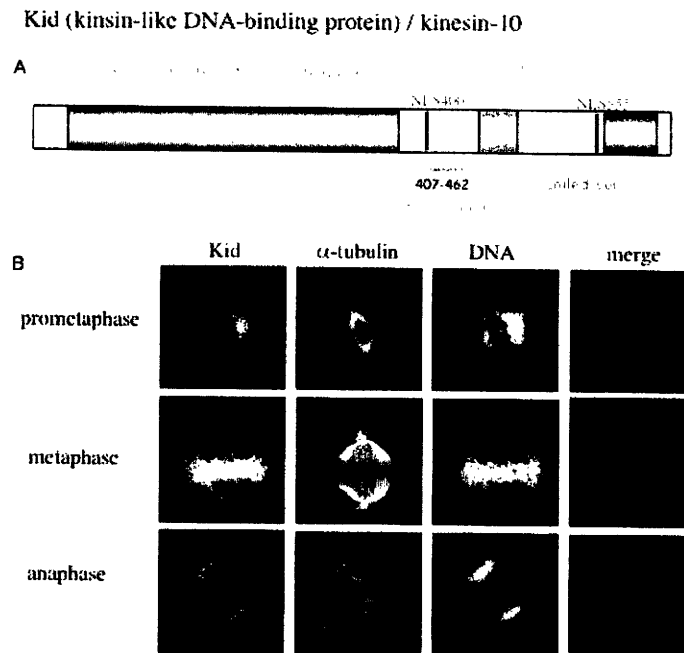


図 1 Kid の構造、および、細胞内局在

A. Kid の構造の模式図。

A. Kid の M 期での局在を示す。U2OS 細胞を固定し、抗 Kid 抗体 (merge 緑)、抗 α -tubulin 抗体 (merge 赤)、また DNA 染色には Hechst33342 (merge 青) を用いて蛍光免疫染色した。

はじめに Kid の DNA 結合活性について検討した所、DNA セファロース結合アッセイや、ゲルシフトアッセイ等、複数の方法で確認できた。さらに Kid が結合する DNA 塩基配列について検討した結果、ある程度の配列特異性を持って DNA に結合する事が明らかとなった。また、細胞内に DNA 結合領域を高発現させると、M 期染色体の異常凝集が見られる事から、M 期で Kid は染色体に強く結合する可能性が示唆された。

一方、Kid のキネシン様モーター領域は、微小管結合能を持ち、ATP 存在下で微小管から離れる事、また、微小管依存的な ATPase 活性を有する事から、微小管モーター

一活性を持つ可能性が高いことが分かった。以上のことから、Kid は DNA を微小管に添って運ぶキネシン様モーター蛋白質である事が強く示唆された。

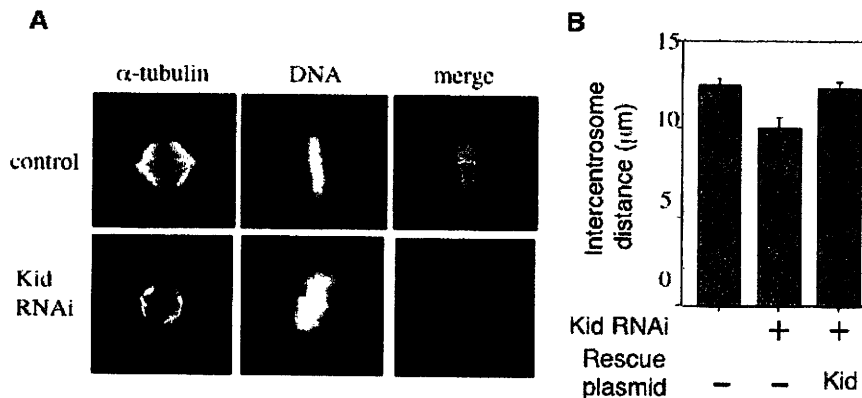


図2 Kid 発現抑制細胞は M 期中期で、染色体腕が広がり、紡錘体が小さくなる

A. Kid-RNAi HeLa 細胞、および、control-RNAi HeLa 細胞の紡錘体及び DNA の様子。

A. Kid-RNAi 細胞、control-RNAi 細胞、及び、Kid-RNAi 細胞に Kid の発現を戻した時の、極間距離をそれぞれ 30 個の細胞で測定し、平均値をグラフ化した。エラーバーは標準偏差を示す。

次いで Kid の抗体を作製し、細胞内での Kid の細胞周期における局在を蛍光免疫染色、および免疫電顕により調べた。その結果、間期には Kid は核に局在した。M 期に核膜が崩壊すると、Kid は染色体だけではなく紡錘体にも局在し、中期では染色体全体と紡錘体に局在した (図 1 B, prometaphase, metaphase)。後期に入ると染色体腕全体ではなく、極に近い側の染色体の間に筋状に局在を変えた (図 1 B, anaphase)。その後、核膜が出来始め染色体が脱凝集する時期には染色体上、および核内に局在した。これらの結果から、Kid は M 期に於いて、染色体や紡錘体上で、染色体の動きや紡錘体形成に関与している可能性が考えられた。

そこで、細胞内での Kid の機能を解析するため、RNAi 法により Kid の発現を抑制した HeLa 細胞を観察した (図 2)。その結果、M 期中期の Kid-RNAi 細胞において、染色体腕が極側に広がる様子が観察された (図 2A)。このことから、Kid は M 期前中期において染色体腕を極から赤道面へ押す力 (polar ejection force) を担っていることが示された。また、Kid 発現抑制細胞に Kid の変異体を戻し発現するレスキュー実験により、Kid が polar ejection force を発揮するためには DNA 結合能とモーター活性の両方が必要な事を明らかにした。また、Kid 発現抑制 HeLa 細胞では、M 期中期において紡錘体の大きさが短くなっていた。Kid 発現抑制細胞に Kid 全長蛋白質を戻し発現させると、紡錘体の大きさが戻ったことから、Kid が紡錘体の大きさの維持に寄与している事が確認された (図 2B)。

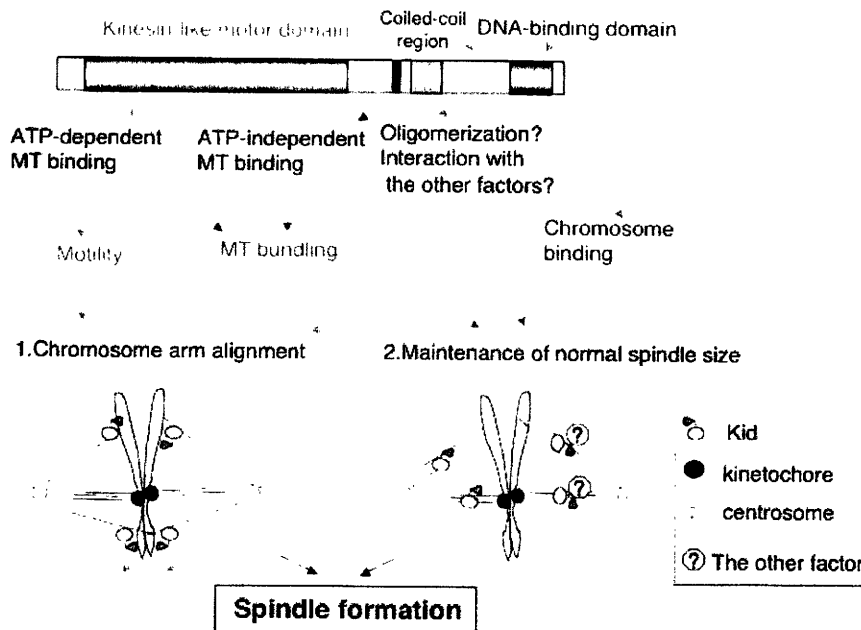


図 3 Kid の M 期前中期中期に於ける機能のモデル図

また、Kid の変異体を Kid 発現抑制細胞に戻す実験から、DNA 結合部位やモーター活性は、紡錘体の大きさの維持に必須ではないことが明らかとなった。すなわち、Kid は、M 期中期において、染色体腕を押す力とは独立して、紡錘体の大きさを維持する機能を持っていることが分かった。さらに Kid が紡錘体の大きさを維持するために必要な領域を調べるため、Kid 変異体を戻すレスキュー実験を行い、微小管束化活性に

必要な第2の微小管結合領域と coiled-coil 領域が必須であることを明らかにした。微小管束化活性は、紡錘体微小管を構造的に安定化させると考えられ、coiled-coil 領域と協調的に紡錘体の大きさ維持に働くと推測される。以上の結果から、細胞分裂 M 期前期から中期にかけて、Kid は少なくとも2つの独立した機能を有していることが明らかとなった。1つは、紡錘体形成過程において、polar ejection force を担っていること (図3-1左) であり、もう1つは、紡錘体の大きさの維持に貢献することである (図3-2右)。

さらに、M 期後期においては、Kid 発現抑制細胞では、染色体が分配されるものうまくまとまらず、最終的にいびつな形の核や微小核が形成された (図4B)。この結果、および、Kid が M 期後期に染色体の間に筋上に局在すること (図4A) から、Kid が M 期後期には染色体の間をつなぎ1つにまとめることで、二つの娘細胞への正確な染色体分配に寄与していることが強く示唆された。

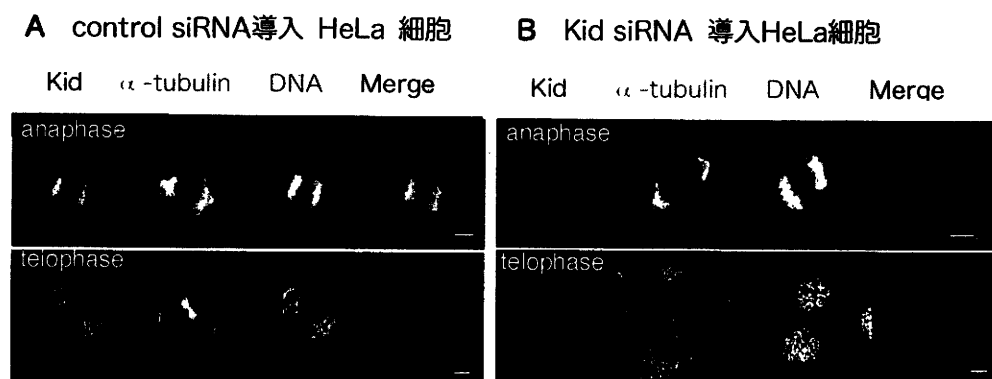


図4 Kid 発現抑制細胞の M 期後期では、染色体のまとまりが悪い

A. control-RNAi 細胞の Kid の局在及び染色体の様子

B. Kid-RNAi HeLa 細胞の染色体の様子。後期では染色体のまとまりが悪く、終期には核の形がいびつになり微小核が観察される。スケールバー 5 μ m

本研究において、新規のキネシン様蛋白質 Kid を同定し、この蛋白質が DNA に結合するキネシン様モーター蛋白質である事を見いだした。体細胞分裂 M 期前期から中期にかけて、Kid は染色体腕を紡錘体微小管に沿って運ぶことで赤道面に整列させ、紡錘体微小管束を安定化させる事で紡錘体サイズの維持する働きをしていることが分かった。また、M 期後期には、Kid は染色体をまとめることで正確な染色体分配を実現している事を明らかにした。このように体細胞分裂の染色体動態や、紡錘体形成過程において重要な機能を持つキネシン様蛋白質 Kid を同定したことは、細胞分裂の分子機構の解明に大きく貢献する重要な発見であると考えている。