

氏名	まつむら 松村 繁
学位(専攻分野)	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第122号
学位授与の日付	平成19年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	分裂期の染色体整列の制御機構におけるPlk1及びBubR1の機能の解析

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 米原 伸 教授 松本 智裕

論文内容の要旨

細胞周期は、遺伝情報を正確に分配し娘細胞に伝えるのに必要不可欠な細胞機能である。分裂期において、細胞は形態的に非常に大きく変化する。分裂期の複雑な過程の制御には複数のキナーゼが重要な役割を果たしているが、その一つに Polo-like kinase1 (Plk1) がある。Plk1は、酵母からヒトまで高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼである。Plk1はG2期からM期にかけて様々な細胞内局在変化を示すが、細胞内局在変化はPlk1の機能に重要であると考えられている。Plk1が紡錘体形成時である分裂期前期、前中期に中心体及び動原体に局在するが、動原体でのPlk1の役割については不明であった。以下の実験において我々はヒトの培養細胞であるHeLa細胞を用いた。最初にsiRNAを用いてPlk1の分裂期前中期でのPlk1の機能解析を行った。siRNAを用いてPlk1の発現量を抑制すると染色体の不整列を起こす細胞が観察された。この時、Plk1の関与が示されている紡錘体や中心体の異常がみられる細胞も存在したが、染色体の不整列のみが見られる細胞も多く観察された。そこで分裂期前中期の細胞に微小管重合阻害剤であるnocodazoleを処理し、紡錘体及び染色体の整列が再構成される速度をPlk1 siRNA処理の有無で比較したところ、染色体整列の遅延がPlk1 siRNA処理した細胞で見られた。このことから、Plk1は染色体整列に関与することが示された。次にPlk1のターゲットとしてBubR1に注目した。BubR1は分裂期前期、前中期において動原体に局在し、動原体モーター蛋白質であるCENP-Eを介して染色体整列にも関与することが示唆されている。まず、GFP融合蛋白質であるGFP-Plk1を用いた免疫細胞染色実験により、分裂期前中期においてPlk1とBubR1は整列が完了していない染色体の動原体に共局在することを示した。また、BubR1とPlk1は分裂期前中期に結合していることを免疫沈降法により示した。nocodazole処理によって分裂期前中期に停止した細胞において、BubR1は高度にリン酸化され電気泳動によるモビリティシフトが起こることが報告されているが、Plk1 siRNAによりBubR1のモビリティシフトが消失することを示した。また、in vitroにおいてPlk1はBubR1のキナーゼドメイン内のPlk1のリン酸化コンセンサス配列に合致する4つのセリンまたはスレオニンのうち2つ（スレオニン792番及びスレオニン1008番）をリン酸化した。最後に、Plk1によるBubR1のリン酸化の意義を検証した。この目的で、BubR1のsiRNA耐性変異体を作成し（BubR1 WT (sRr)）、さらにBubR1の2つのスレオニンをグルタミン酸に置換したリン酸化模倣変異体（BubR1 2E (sRr)）やアラニンに置換したリン酸化されない変異体（BubR1 2A (sRr)）を作成した。BubR1 siRNAを処理した細胞では染色体の不整列が観察された。このとき、BubR1 WT (sRr) およびBubR1 2E (sRr) を発現させた細胞では、染色体の不整列が回復することがわかった。一方、BubR1 2A (sRr) では染色体不整列は回復しなかった。また、BubR1及びPlk1の両方のsiRNA処理をした細胞において、BubR1 2E (sRr) は染色体不整列が回復したがBubR1 WT (sRr) では回復しなかった。これらの結果からPlk1によるBubR1のリン酸化が染色体の整列に正に寄与していることが示唆された。以上の結果により、本研究では、BubR1がPlk1の新たな基質であることを見だし、Plk1及びBubR1が分裂期の染色体整列の促進に働いていることを見出した。

論文審査の結果の要旨

細胞の正確な自己複製には、正確な細胞周期の制御が必要不可欠である。染色体の分配や細胞質分裂の起こる分裂期において、細胞は形態的に非常に大きく変化する。このような分裂期の複雑な過程の制御には複数のキナーゼが重要な役割を果たしていることが知られている。その一つにPolo-like kinase1 (Plk1)がある。Plk1は、酵母からヒトまで高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、G2期からM期にかけて様々な細胞内局在変化を示す。この細胞内局在変化はPlk1がそれぞれの場所と時間において機能するのに重要であると考えられている。Plk1は、分裂期前中期に動原体に局在するが、この時動原体でのPlk1の役割については不明であった。

申請者は、ヒトの培養細胞であるHeLa細胞を用いた。Plk1siRNAを処理し分裂期前中期でのPlk1の機能解析を行った結果、Plk1は紡錘体形成及び染色体の整列に関与することが示された。申請者は次にPlk1のターゲットとしてBubR1に注目した。BubR1は分裂期前中期において動原体に局在し、動原体モーター蛋白質であるCENP-Eを介して染色体整列にも関与することが示唆されている。前中期においてPlk1とBubR1は整列が完了していない染色体の動原体に共局在することを示し、BubR1とPlk1は分裂期前中期に結合していることを免疫沈降法により示した。さらに、BubR1が高度にリン酸化されるのにPlk1が必要であることを見出した。また、in vitroキナーゼアッセイにより、BubR1のキナーゼドメイン内のスレオニン792番及びスレオニン1008番をPlk1がリン酸化すること、Plk1によるBubR1のリン酸化がBubR1のキナーゼ活性を上昇させることが示唆された。最後に、Plk1によるBubR1のリン酸化の意義を検証し、Plk1によるBubR1のリン酸化が染色体の整列を促進していることが示された。これらの結果より、整列の完了していない染色体の動原体において、Plk1がBubR1をリン酸化し、BubR1のキナーゼ活性を上昇させ、BubR1のキナーゼ活性を通して染色体整列の促進に働いていることが示された。

以上のように、本論文で述べられた成果は非常に重要であり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値のあるものと認められる。さらに、平成19年4月10日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。