

氏名	なか じま ひろ ゆき 中 嶋 洋 行
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 60 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 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	Plk1 の新規基質 Myt1 の細胞分裂期における機能の解析

論文調査委員 (主査)
教授 西田 栄介 教授 垣塚 彰 教授 上村 匡

論 文 内 容 の 要 旨

細胞分裂期である M 期では、DNA を含む細胞の内容物を均等に分配するために、細胞骨格や DNA、生体膜において劇的な構造変化が引き起こされ、かつそれらの一連の現象が高度に調節を受けながら進行していく。これらの調節は主にタンパク質のリン酸化によって担われており、様々なタンパク質が M 期の適切な時期、適切な場所においてリン酸化、もしくは脱リン酸化され、その結果、それらのタンパク質のコンフォメーションや活性が変化し種々の細胞内現象が引き起こされる。そのため、M 期におけるキナーゼの機能の解析は、M 期の現象の全貌を解明するにあたって極めて重要な位置を占める。

Plk1 は、酵母からヒトまで高度に保存されているセリン・スレオニンキナーゼで、M 期への移行や、中心体の成熟や分離、姉妹染色体の分離、M 期中期から後期への移行、細胞質分裂、ゴルジ体の断片化といった M 期の様々な局面において重要な役割を果たす。第一章で申請者は、Plk1 の既知の基質である Cdc25C のリン酸化部位周辺における体系的なアミノ酸置換を行い、Plk1 のリン酸化のコンセンサス配列の決定を行った。その結果、リン酸化部位 (Ser/Thr) に対して +1 位の疎水性アミノ酸と、-2 位の酸性アミノ酸が Plk1 によるリン酸化に重要であることを見出した。さらにこれを利用して Plk1 の新規基質を探索した結果、MPF (M 期促進因子) を負に制御する因子である Myt1 を新規基質として見出し、Myt1 内のコンセンサス配列に合致する部位が、実際に *in vitro* および細胞内で Plk1 によってリン酸化されることを明らかにした。

高等真核生物では、ゴルジ体は M 期になると層板構造がくずれ、無数の小胞や小管に断片化して細胞質中に分散することが知られている。このようなゴルジ体の断片化は、このオルガネラの均等な分配のために重要であると考えられている。近年の報告から、この断片化の過程に Plk1 が関与することがわかってきた。第二章において、Plk1 による Myt1 のリン酸化の意義に関して検証を行った結果、このリン酸化が Plk1 によって誘導されるゴルジ体の断片化に重要な役割を果たすことを見出した。また、Myt1 はゴルジ体と小胞体に局在することが報告されているが、Plk1 によるリン酸化部位をグルタミン酸に置換してリン酸化状態を模した Myt1 では野生型の Myt1 に比べてゴルジ体への局在が弱まった。そのため、Plk1 によるリン酸化が Myt1 のゴルジ体からの解離を引き起こし、それによってゴルジ体の断片化に関与する可能性が示唆された。

Myt1 は、MPF のコンポーネントである Cdc2 を抑制するキナーゼであることから、M 期への移行を抑える働きを持つと考えられてきた。第三章では、主に siRNA を用いて Myt1 の機能解析を行った。siRNA によって Myt1 の発現を抑制しても、M 期移行のタイミングの促進は起こらなかった。ところが、これらの細胞では興味深いことに、M 期終期におけるゴルジ体の再構成に異常が見られ、正常なゴルジ体の層板構造を形成できなくなっていた。この結果は、Myt1 が M 期移行の制御ではなく、M 期終期におけるゴルジ体の再構成に必須の役割を持つことを示している。この際、野生型の Myt1 を発現させると表現型の回復が見られたが、キナーゼ不活性型の Myt1 では回復しなかった。さらに申請者は、Myt1 がゴルジ体に局在するサイクリンである cyclin B2 と結合することを見出した。そして siRNA によって cyclin B2 の発現を抑制

したところ、Myt1 の siRNA で引き起こされるゴルジ体の再構成における異常が部分的に回復したことから、Myt1 が cyclin B2/Cdc2 活性を抑制することで M 期終期においてゴルジ体の再構成に必須の役割を持つことが示唆された。

このように本研究では、M 期キナーゼである Plk1 のリン酸化のコンセンサス配列の決定から新規基質 Myt1 の同定を行い、その機能解析の結果、Myt1 の新たな役割を見出した。

論文審査の結果の要旨

細胞は、自己複製により自己の内容物を倍化し、分裂の際にそれらを 2 つの娘細胞に均等に分配・継承しながら増殖を行う。細胞分裂期 (M 期) では、倍加した細胞の内容物を均等に分配するために、細胞骨格や DNA、生体膜において劇的な構造変化が起こり、かつそれらの一連の現象が高度に調節を受けながら進行する。このような調節は主にタンパク質のリン酸化によって担われており、その際リン酸化反応を触媒するキナーゼの果たす役割は極めて大きい。申請者は、M 期の進行に関わるキナーゼである Plk1 および Myt1 について解析を行った。

Plk1 は、全ての真核生物に保存されているキナーゼで、M 期の様々な局面において重要な役割を果たす。本論文において申請者はまず、Plk1 の既知の基質である Cdc25C のリン酸化部位周辺における体系的なアミノ酸置換を行い、Plk1 のリン酸化のコンセンサス配列の決定を行った。その結果、リン酸化部位 (Ser/Thr) に対して +1 位の疎水性アミノ酸と、-2 位の酸性アミノ酸が Plk1 によるリン酸化に重要であることを示した。さらにこれを利用して、MPF (M 期促進因子) を負に制御する因子である Myt1 を Plk1 の新規基質として見出し、Myt1 内のコンセンサス配列に合致する部位を Plk1 によるリン酸化部位として同定した。次に、Plk1 による Myt1 のリン酸化の意義に関して検証を行った結果、このリン酸化が Plk1 によって誘導されるゴルジ体の断片化に重要な役割を果たすことを示した。また、Myt1 はゴルジ体と小胞体に局在することが報告されているが、Plk1 によるリン酸化部位をグルタミン酸に置換してリン酸化状態を模した Myt1 では野生型の Myt1 に比べてゴルジ体への局在が弱まることを示しており、Plk1 によるリン酸化が Myt1 のゴルジ体からの解離を引き起こし、それによってゴルジ体の断片化に関与する可能性を提示した。Myt1 は、MPF のコンポーネントである Cdc2 を抑制するキナーゼであることから、M 期への移行を抑える働きを持つと考えられてきた。しかしながら本論文において申請者は、siRNA を用いた解析から、Myt1 が M 期移行の制御ではなく、M 期終期におけるゴルジ体の再構成に必須の役割を持つことを示した。この際、野生型の Myt1 を発現させると siRNA の表現型の回復が見られたが、キナーゼ不活性型の Myt1 では回復しなかった。さらに申請者は、Myt1 がゴルジ体に局在するサイクリンである cyclin B2 と結合することを見出した。siRNA によって cyclin B2 の発現を抑制したところ、Myt1 の siRNA で引き起こされるゴルジ体の再構成における異常が部分的に回復することを明らかにしており、Myt1 が M 期終期において cyclin B2/Cdc2 活性を抑制することでゴルジ体の再構成に必須の役割を持つ可能性を提示した。

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あるものと認められる。さらに、平成18年1月23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。