

氏 名	谷 口 栄 里
学 位 の 種 類	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 5 号
学位授与の日付	平成 16 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 学 研 究 科 統 合 生 命 学 専 攻
学位論文題目	Polo-like kinase 1 (Plkl) の機能解析と双極性型核内移行シグナルの同定

論文調査委員 (主 査) 教授 西 田 栄 介 教授 石 川 冬 木 教授 米 原 伸

論 文 内 容 の 要 旨

Plklは*Drosophila melanogaster*で染色体分配欠損を引き起こす原因遺伝子(Polo)の哺乳類ホモログであり、中心体の成熟と分配、スピンドルの形成、染色体の分配、細胞質分裂といった、細胞分裂期のさまざまな現象に関わる分子量67kDaのセリン・スレオニンキナーゼである。G2期からM期にかけてタンパク質量は増加し、リン酸化によって活性化される。また、M期においては、中心体、スピンドル極、動原体、赤道面、中央体といった細胞内局在変化を見せる。このような複雑な細胞内局在の変化は、M期の開始から完了におけるPlklの多様な機能を反映していると考えられている。

以前、本研究室の豊島らによって、PlklはM期前期の核膜崩壊前に、サイクリンB1をリン酸化してそれらの核内移行を制御することが示された。Cdc25CはサイクリンB1同様、G2期には細胞質に局在し、M期になると核内へ移行することが知られている。本研究では、Cdc25Cの190~199アミノ酸からなる配列がNESとして機能していることを確かめ、さらにPlklがCdc25CのSer198を特異的にリン酸化することを明らかにした。このことから、PlklによるCdc25Cのリン酸化が、Cdc25Cの核内移行を制御していることが示唆された。また、PlklがサイクリンB1を直接基質として認識することから、PlklとサイクリンB1との結合を調べた。その結果、PlklがS期からG2期にかけてサイクリンB1と結合し始めることを見出した。M期以前のPlklの細胞内局在は、中心体への局在以外には詳細に調べられていない。そこで本研究において、M期以前のPlklの細胞内局在を詳しく調べ、Plklが細胞質と核内の両方に局在することを見出した。そしてこの核内移行を司る配列として、キナーゼドメイン内にある双極性型核内移行シグナル(nuclear localization signal; NLS)を同定した。核内移行シグナルに特徴的である塩基性アミノ酸残基全てをアラニン残基に置換すると、核内移行が完全に抑えられた。この配列はPlklの*Xenopus*ホモログであるPlxlや*Drosophila*ホモログであるPoloにおいて高度に保存されており、さらにRanの機能欠失型であるRanQ69L感受性をもっていた。

次に、同定した核内移行シグナル内部の塩基性アミノ酸残基をアラニン残基に置換したPlkl変異体を細胞に発現させると、その細胞はM期に進行することができず、G2期で停止した。同定した核内移行シグナルはキナーゼドメイン内部にあるにも関わらず、塩基性アミノ酸残基のアラニン残基への置換は、Plklのキナーゼ活性に影響を及ぼさなかった。また、Plkl変異体の発現は、内在性のPlklの細胞内局在には影響を与えなかった。このことから、過剰量のPlklの細胞質局在が、M期の開始になんらかの影響を及ぼしていることが示唆された。

以上のことから、双極性の核内移行シグナルによるPlklの核内移行が、M期の開始に必要なことが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Plklは、M期の開始から完了まで様々な現象に関わっており、M期開始のタイミングを制御する重要なキナーゼとして注目されている。PlklのM期の開始における機能について、最近、PlklがサイクリンB1の核内移行を制御しているという報告がなされた。Cdc25Cについても、サイクリンB1と同様、M期前期に核内移行することが示唆されていたが、そのメ

カニズムは不明であった。申請者は、様々な分子生物学的手法により、Cdc25Cの核内移行を司るNESを同定し、さらにその内部にPlklによるリン酸化部位を見出した。同定された部位のリン酸化はCdc25Cの核内移行に重要であるので、このことはPlklによるリン酸化がCdc25Cの核内移行を制御することを示唆するものであり、価値が高い。

次に申請者は、M期以前のPlklの細胞内局在について研究を行い、核にも局在することを明らかにした。M期以前のPlklの細胞内局在は、この時期における重要性が示唆されていたにも関わらず、中心体への局在以外は詳しく調べられていなかった。申請者は、Plklの核内移行を司る双極性型核内移行シグナルを同定し、さらに、同定されたシグナル依存的な核内移行がM期の開始に重要な役割を果たすことを示した。このことは、M期の開始におけるPlklの制御機構の新たな局面を示唆するものであり、今後のM期開始のチェックポイントの研究の進展において貢献するところが大きい。

以上本申請論文は、Plklの機能解析、および細胞内局在の制御機構とそれがM期の開始に与える影響について解析を行ったものであり、博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成16年1月26日、本申請論文に報告されている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。