

氏 名	まつもと ゆたか 松 本 裕
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2109 号
学位授与の日付	平 成 11 年 5 月 24 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	サイクリン依存性キナーゼによる中心体複製の制御

論文調査委員 (主 査) 教 授 西 田 栄 介 教 授 柳 田 充 弘 教 授 平 野 丈 夫

論 文 内 容 の 要 旨

中心体は、互いに直角をなして近接している2個の中心小体とその周囲を覆っている不定形の中心小体周辺物質から成っており、微小管はこの中心小体周辺物質から伸長しているように見える。細胞が分裂していない間期では、核に近接している中心体から放射状に伸びる微小管ネットワークが、小胞体やゴルジ体などの内膜系を支え、dynein や kinesin などのモータータンパク質を介した小胞輸送経路として機能している。DNA が複製されるS期で、2個の中心小体それぞれの側面から新たな中心小体が1個ずつ形成され、それぞれ1組の中心小体をもつ2個の中心体が生じる。複製した2つの中心体は紡錘体の2つの極となるが、中心体から伸びた微小管の先には染色体が結合しており、複製した2組の染色体は1組ずつ娘細胞に分配される。このように中心体の複製は、染色体の等価な分配に不可欠な現象である。

興味深いことに、この中心体複製は、DNA 複製を阻害してS期進行を止めても、タンパク質合成を阻害してM期進行を止めても行なわれることがある。すなわち中心体複製は細胞周期から独立して起こりうる。しかも中心体の複製に関与する分子はこれまで何も同定されていなかった。したがって、どのようにして中心体の複製が細胞周期と結びついているのかについては不明であった。

本論文では哺乳類培養細胞においてサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase 2: Cdk 2) が中心体の複製に必要であることを初めて明らかにした。

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞における中心体を、中心小体の構成成分の g-tubulin に対する抗体による蛍光染色で観察した。中心体の複製は、S期の初期に arrest させる hydroxyurea によって阻害されずに続行し、G1後期で arrest させる mimosine によっては阻害された。これは電子顕微鏡による観察でも確認できた。hydroxyurea 処理された細胞では主に4個の中心小体、すなわち2個の中心体が観察され、mimosine 処理された細胞では主に2個の中心小体、すなわち1個の中心体が観察された。したがって、中心体の複製は、G1期とS期の境界で起こる何らかの事象によって開始されることが考えられた。その候補として最も可能性が高いと思われたのが Cdk 2 である。これは、G1期とS期の境界でサイクリン E との複合体, cyclin E-Cdk 2 として活性化し、またS期が進行する間にサイクリン A との複合体, cyclin A-Cdk 2 として活性化するキナーゼと知られている。

そこで mimosine もしくは hydroxyurea で処理した CHO 細胞における Cdk 2 の活性を測定した。Cdk 2, cyclin E, cyclin A を免疫沈降して、それぞれヒストン H1 を基質とするキナーゼ活性を測定したところ、hydroxyurea 処理された細胞よりも mimosine 処理された細胞の方が cyclin E-Cdk 2 活性, cyclin A-Cdk 2 活性ともに低く、全 Cdk 2 活性も低かった。つまり mimosine は Cdk 2 の活性化よりも前に細胞周期を arrest するが、hydroxyurea で細胞周期を arrest しても Cdk 2 の活性化は抑制できないことが明らかになった。

以上の結果から、中心体の複製は Cdk 2 活性に依存しているのではないかと考え、この仮説を証明するため、中心体複製における Cdk 2 活性の必要性を検証した。

まず、hydroxyurea 処理された細胞において、Cdk 阻害タンパク質 p 21 の発現や Cdk 2 特異的阻害剤 butyrolactone I,

roscovitine によって Cdk 2 活性を抑制したところ、中心体複製は阻害された。さらに、mimosine 処理された細胞において、Cdk 2 の強制発現によって cyclin E-Cdk 2 活性、cyclin A-Cdk 2 活性をともに上昇させたところ、mimosine 処理による中心体複製の阻害が回復された。電子顕微鏡によって Cdk 2 の発現細胞内で 4 個の中心小体、すなわち 2 個の中心体が観察されたことから、完全な構造の中心小体を含む中心体が新たに生じていることも確認できた。これはキナーゼ不能型の Cdk 2 の発現では実現できなかったことから、誘導された中心体の複製が Cdk 2 のキナーゼ活性に依存していることがわかった。

これらの結果から中心体複製が Cdk 2 活性によって制御されていることが明らかになった。この発見によって、中心体複製を細胞周期と結びつける機構の一端が解明された。

論文審査の結果の要旨

中心体は微小管形成中心として、染色体の分配や、細胞の極性の決定に大きく関わっている。複製した 2 つの中心体は紡錘体の 2 つの極となるが、中心体から伸びた微小管によって複製した 2 組の染色体は 1 組ずつ娘細胞に分配される。染色体の等価な分配に不可欠である中心体の複製は中心体を構成する 2 個の中心小体の複製という形で行なわれていることが、電子顕微鏡による観察によってわかっていた。DNA が複製される S 期で、2 個の中心小体それぞれの側面から新たな中心小体が 1 個ずつ形成され、それぞれ 1 組の中心小体をもつ 2 個の中心体が生じる。このように見かけ上、中心体の複製は細胞周期と結び付いている。

一方、この約 10 年間に中心体複製が細胞周期から独立して起こる事例がいくつか見つかった。DNA 複製を阻害しても、タンパク質合成を阻害することで細胞分裂を止めても、中心体複製が起こることが観察された。すなわち中心体複製が細胞周期から独立して起こりうるのである。

しかし、中心体複製を細胞周期に同調させる分子機構についてはこれまでほとんど何も明らかにされていなかったばかりか、中心体複製に関与する分子さえ何も同定されていなかった。

申請者は、中心体の複製が開始される G 1 期と S 期の境界に注目し、mimosine、hydroxyurea という 2 つの細胞周期阻害剤を用いたところ、それぞれの中心体複製への効果の違いを見出した。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞において、中心体の複製が S 期の初期に arrest させる hydroxyurea によって阻害されずに続行することはすでに知られていたが、同じ系で G 1 後期で arrest させる mimosine によって中心体の複製が阻害されることを初めて観察した。これは、中心小体の構成成分の g-tubulin に対する抗体による蛍光染色像だけでなく、電子顕微鏡像でも確認している。この結果から申請者は、中心体の複製は G 1 期と S 期の境界で起こる何らかの事象によって開始されると考え、その候補として最も可能性が高いと思われたサイクリン依存性キナーゼ 2 (cyclin-dependent kinase 2: Cdk 2) に着目した。

そこで、申請者は、mimosine もしくは hydroxyurea で処理した CHO 細胞における Cdk 2 の活性を測定し、hydroxyurea 処理された細胞より mimosine 処理された細胞の方が cyclin E-Cdk 2 活性、cyclin A-Cdk 2 活性、全 Cdk 2 活性の上昇が阻害されていることを示したつまり mimosine は Cdk 2 の活性化よりも前に細胞周期を arrest するが、hydroxyurea で細胞周期を arrest しても Cdk 2 の活性化は抑制できないことを明らかにした。したがって、申請者は、Cdk 2 の活性が中心体の複製に必要なではないかと考え、この仮説を検証した。

hydroxyurea 処理された細胞において、Cdk 阻害タンパク質 p 21 の発現や Cdk 2 特異的阻害剤 butyrolactone I, roscovitine によって Cdk 2 活性を抑制することによって、中心体複製が阻害されることを示した。しかも、申請者は、Cdk 2 の強制発現によって mimosine 処理による中心体複製の阻害が回復されることも明らかにした。電子顕微鏡像内で Cdk 2 の発現細胞を同定し、完全な構造の中心小体を含む中心体が新たに生じているを確認した。また Cdk 2 の強制発現によって mimosine 処理による細胞の cyclin E-Cdk 2 活性、cyclin A-Cdk 2 活性、全 Cdk 2 活性が上昇していることも示した。さらにコントロールとして作成したキナーゼ不能型の Cdk 2 の発現では以上の結果は得られなかった。したがって誘導された中心体の複製が Cdk 2 のキナーゼ活性に依存していることを明らかにした。

以上のように、申請者は多角的で一貫性のある証拠を挙げて、中心体の複製における Cdk 2 活性の必要性を証明した。哺乳類培養細胞において、細胞周期のマスターエンジンであるサイクリン依存性キナーゼ 2 (cyclin-dependent kinase 2: Cdk 2) が中心体の複製に必要であることを、初めて、また確実に明らかにした意義は高い。中心体複製の異常によって形成

される多極紡錐体が、ガン抑制因子のノックアウトマウス細胞や実際のガン細胞に見られたという知見が最近相次いで報告され、中心体複製の異常がガン細胞のゲノム不安定性の一因ではないかと言われ始めている。したがって、中心体複製機構の全貌の解明の重要性は高く、申請者のこの発見がその糸口の一つとなることは間違いないものであり、本申請論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値あるものとして認められる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績について試問した結果、合格と認めた。