

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590290

研究課題名（和文） 姉妹染色体分体の分配を支配する PKU- β /TLK1 の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of PKU-beta/TLK1 that regulates chromosome segregation

研究代表者

伊達 孝保 (DATE TAKAYASU)

金沢医科大学・付置研究所・教授

研究者番号：50019676

研究成果の概要：

RNA干渉によるPKU-beta/TLK1ノックダウン細胞を用いた実験から、プロテインキナーゼPKU-beta/TLK1はミオシンII調節軽鎖（MRLC）のリン酸化を介して細胞分裂期の中心体移動、染色体の均等分裂、収縮環の形成を制御していることを見出した。単離したPKUは直接MRLCを基質にできないことから、PKU-beta/TLK1はMRLCキナーゼの活性調節を行っていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・基礎医学 細目：医化学一般

キーワード：PKU-beta/TLK1, chromosome, segregation, mitosis, myosin II regulatory light chain (MRLC), centrosome, contractile ring

1. 研究開始当初の背景

細胞は、分裂時に様々な分子が協調しあい、複製された親細胞の染色体を時間的、空間的に娘細胞に正確に分配していく。M期におけるこの過程は、染色体の凝集と中心体の移動から始まり、微小管はじめ、ミオシンやキネシンなどのモータータンパク質が染色体の分配に関与している。PKU-beta/TLK1は我々が発見した核局在のプロテインキナーゼである (Yamakawa A et al, Gene 202, 193-202, 1997)。PKU-beta/TLK1は、

ヒストンシャペロンである Asf1 のリン酸化を行うという報告 (Sillje et. al, *EMBO J.*, **18**: 5691-702)や、放射線を細胞に照射すると、ATM、Chk1により不活化され、それによってクロマチン形成を抑える (Sillje HH et. al, *EMBO J.*, 18:5691-702, 1999; Groth A et al., *EMBO J.*, 22:1676-87, 2003)という報告など、他のグループによりその機能が明らかにされてきた。我々は、PKU-beta/TLK1ノックダウン細胞は染色体異数を引き起こすこと、中心体の移動のな

い細胞が増加していることを見出し、とくに後者の表現形はミオシン阻害剤処理細胞 (Sunavala-Dossabhoy G et. al., *BMC Cell Biol.*, 4:16, 2003) に酷似していたことから、ミオシンII調節軽鎖 (MRLC) のリン酸化に焦点をあてた研究を進めてきた。そしてそのリン酸化レベルが、コントロールに比べ優位に低下していることを見出した。また免疫沈降した PKU-beta/ TLK1 を用いて MRLC の T18/S19 部位のリン酸化を *in vitro* で行ったところ、リン酸化できないことから、PKU-beta/TLK1 による MRLC 経路の解明と、その経路途中に存在する MRLC キナーゼの同定が課題となった。

2. 研究の目的

PKU-beta/TLK1 ノックダウン細胞は異数性の染色体発生を誘導する。PKU-beta/TLK1 が染色体分配にどのように関与しているのか、その機構を明らかにすることを研究目的にして、

(1) PKU-beta/TLK1 ノックダウン細胞で中心体不分離の形態を示すものは僅かであり、これだけでは異数性発生を説明できない。ノックダウン細胞の M 期の細胞に他に細胞形態学的変化がないかを調べる。

(2) 中心体不分離をはじめ、(1) で見つかった異常が MRLC の低リン酸化に起因するのかわ、ノックダウン細胞に変異 MRLC 発現プラスミドを導入した補償実験により確かめる。

(3) PKU-beta/TLK1 から MRLC へのシグナル経路の中間体 (MRLC キナーゼ) を同定する。

3. 研究の方法

(1) 細胞は主として MCF7 細胞を用い、重要な現象については HeLa 細胞を用い重複実験を行った。PKU-beta/TLK1 ノックダウン細胞は干渉 RNA を発現する pSilencer プラスミドを使用した。核 (DAPI)、微小管、MRLC、P-MRLC、セントリンは免疫染色は抗体を用いて解析した。

(2) MRLC のリン酸化部位をアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化体 MRLC (DD-MRLC) やアラニンに置換した変異 MRLC (AA-MRLC) 発現プラスミドと pSilencer を細胞に共導入し、免疫染色、FACS 解析を行った。

(3) 定量的解析を行うため、YFP と MRLC の組換え体を作成し、非導入細胞と低発現細胞を FACS で除去した細胞集団を作成し (全体の約 2/3)、染色体の表現形を観察に用いた。

(4) PKU-beta/TLK1 で制御される MRLC キナー

ゼの候補を探すため、既存の MRLC キナーゼのノックダウン細胞を作成し、PKU ノックダウン細胞と比較検討した。

4. 研究成果

(1) MCF7細胞のMRLCとリン酸化MRLC(P-MRLC)の量的変化を細胞周期ごとにみると、両者ともにS期に低値を示し、M期の開始とともに増加し始めた。分裂後期においては、MRLCはS期の約2倍に、P-MRLCはS期の約3倍にも達した。PKU-beta/TLK1ノックダウン細胞のMRLCとP-MRLC量はそれぞれ、コントロールの約85%と40%程度であった。

(2) PKU-beta/TLK1ノックダウンにより、複製した中心体が近接したままの細胞 (染色体が二つの中心体を囲むようにU字形となり非対称を呈する) が多数生じることを申請前に見つけていた。それを定量的に解析した。

ノックダウン細胞で二つの中心体間の距離は、MCF7で $3.0 \pm 1.8 \mu$ で正常細胞のmetaphaseの $5.8 \pm 1.0 \mu$ の約半分、S期の 2μ 以下よりは大きく、HeLa細胞のノックダウンでも同様のことが観察された。非対称型を示した細胞の割合は、M期の細胞100中15細胞に観察された (表1、1-3段)。残り85細胞の中心体は正常に分離し、紡錘糸の欠損は認められなかった。

表1. PKPKU-beta/TLK1pSilencerと変異MRLC発現プラスミドの導入の影響*

導入プラスミド	# 単	多極	多核
Control	0	0	0
pSilencer	15	1	0
pSilencer + Vector	17	1	1
pSilencer + WT-MRLC	12	0	5
pSilencer + AA-MRLC	11	11	11
pSilencer + DD-MRLC	2	0	5
WT-MRLC	0	0	0
AA-MRLC	0	0	3
DD-MRLC	0	0	0

* M期100細胞をカウント

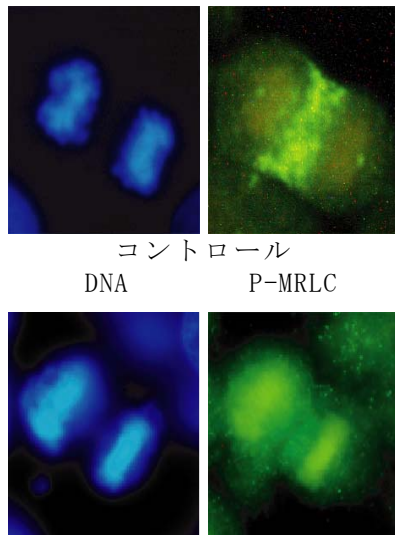
非対称二極：中心体を染色体が囲む。

(3) P-MRLC量が増加を始めるM期前期に、P-MRLCが中心体に一時的に局在することを見出した。TLK-beta/TLK1のノックダウン細胞には認められない。とくに(2)の形態を示す細胞のP-MRLC分布は細胞全体に低く、検出限界にぎりぎりであっ

た。このことから、中心体におけるMRLCのリン酸化とその移動との関連性が示唆された。

(4) PKU-beta/TLK1ノックダウン細胞の大部分は、一見、正常に分裂しているかのように見えた。しかし、M期後期の二つの姉妹染色体をDAPIで染色してみると、コントロール細胞の均等分配に対し、PKU-beta/TLK1ノックダウン細胞では不均等に分配されている像が得られた(図1)。

二つの娘細胞のDNA量比をDAPIの蛍光強度比で比較してみると、コントロール細胞では、98%が47.5:52.5比以内(5%以内)におさまるのに対し、ノックダウン細胞では54%が正常範囲を超えた不均等を示した(表2、図1)。そのうちの約半分は45:65以上の比であった。これらの不等分裂細胞の紡錘系や中心体の形態は正常であった。



コントロール
DNA P-MRLC

PKU-beta/TLK1ノックダウン細胞
DNA P-MRLC

図1. 染色体不均等分配とP-MRLCの細胞内局在の異常

(5) 不均等分裂細胞はP-MRLCの局在に異常を示した。コントロール細胞ではP-MRLCがM期終期に収縮環に強く集積するのにに対し、ノックダウン細胞では染色体上に集積した像が得られた。

(6) PKU-beta/TLK1→MRLC経路の存在を確認するため、ノックダウン細胞に擬似体DD-MRLC(リン酸化部位をアスパラギン酸に置換)発現させ、M期の異常が解消されるかを調べた。PKU-beta/TLK1-pSilencerとともに野生型および変異型MRLC発現プラスミドを細胞に導入し、解析

した結果は以下の通りである。

①中心体の分離不全でU字型の染色体をもつものは、DD-MRLCの発現により100細胞中、15から2に減少した(表1)。ただし、他方で多核化細胞が認められた(100中5細胞)。リン酸化部位をアラニンに置換したAA-MRLC発現細胞は、PKU-beta/TLK1のノックダウンにより紡錘系異常と多核化が顕著に誘導されている。これらの事実を合わせると、PKU-beta/TLK1の低発現は、中心体の不安定性を誘起した可能性がある。

②DAPI染色による娘染色体の分配比を見ると、姉妹染色体の不均等分配は56%から16%と激減し、しかも残りの16%の細胞の不均等も正常値より僅かにはずれた程度で、DD-MRLCはPKU-beta/TLK1の欠損を見事に補償した(表2)。

表2. 姉妹染色体のDNA量差

導入プラスミド	0-5%	5-10%	10%
Control	49	1	0
pSilencer + Vector	23	14	13
pSilencer + WT-MRLC	25	11	14
pSilencer + AA-MRLC	39	4	7
pSilencer + DD-MRLC	42	8	0
Vector	49	1	0
WT-MRLC	48	2	0
AA-MRLC	41	2	7
DD-MRLC	47	3	0

*それぞれ50細胞をカウントした

*pSilencerはPKU-beta/TLK1の干渉RNA発現ベクター

他のMRLC変異体では、AA-MRLCに若干の改善効果が認められたが、その原因は不明である。

③P-MRLCの収縮環の局在異常も減少する傾向が認められた。詳細は現在解析中である。

(7) PKU-beta/TLK1ノックダウン細胞のM期は、中心体の不分離、あるいは染色体の不均等分配、収縮環の形成不全を特徴とする。とくに、染色体の不均等分配は娘細胞に異数性を誘引する直接の原因となることは明白である。

ノックダウン細胞にDD-MRLC導入は細胞分裂の進行にどのような影響を与えるのかをFACSで観察した。PKU-beta/TLK1-pSilencer導入後72時間の細胞は、S期細胞の減少と異数性細胞の増加が見られる(図2)。これにDD-MRLC発現プラスミドを共導入させた細胞では異数性の

著減と「S」期の増加が認められた。

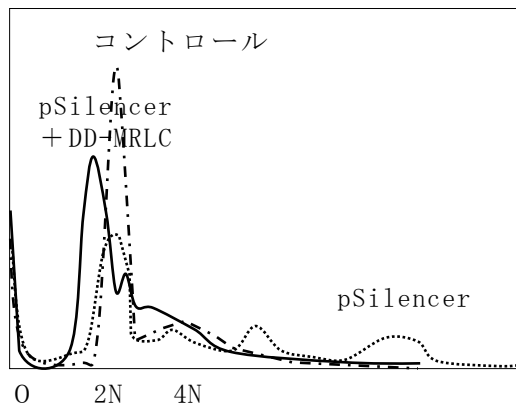


図2. 正常細胞とPKU-beta/TLK1-Silencer導入細胞、PKU-beta/TLK1-Silencer + DD-MRLC導入細胞のFACS

見かけ上、細胞はM期を通過してS期に入り、S期で停止あるいは減速したと考えられる。S期ではPKU-beta/TLK1はAsf1をリン酸化するため、その欠損は細胞をS期で停止することが知られている。

こうしたことから、PKU-beta/TLK1欠損が引き起こしたM期全般にわたる分裂装置の異常はMRLCの低リン酸化によるものであることが明らかとなった。ただ、M期後期に関しては顕著なP-MRLCが認められておらず、このことはM期前期のMRLCリン酸化がM期の終期まで影響をおよぼしたのか、あるいは初期、後期、終期の各ポイントにおいてPKU-beta/TLK1からのシグナルが届いていなかったのかの点に関してはまだ不明である。

(8) PKU-beta/TLK1で支配されるMRLCキナーゼ候補としてオーロラBに焦点をあてて解析したが、PKU-beta/TLK1と変異MRLC (AA-MRLC) と直接相互作用するものリン酸化と活性化と関連に至る結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① PKU-beta/TLK1 regulates myosin II activities, and is required for accurate equaled chromosome segregation. M. Hshimoto M, T, Matsui, K. Iwabuchi, T. Date. Mutat. Res., 657:

p63-67, 2008

[学会発表] (計4件)

① M. Hshimoto, T. Matsui, K. Iwabuchi, T. Date: PKU-b/TLK1 regulates myosin II activities, and required for centrosome separation and chromosome segregation, 8th International Symposium on Chromosome Aberrations (Hyogo, Japan, 10.5), 2008

② T. Date, M. Hashimoto, T. Matsui, M. Ozaki, K. Iwabuchi: PKU-beta/TLK1 plays a dual role in both centrosome separation and chromosome segregation, 33th FEBS Congress 11th IUBMB Conference, (Athens, 8.06), Abstracts, 112, 2008.

③ 橋本光正、松井理、岩淵邦芳、伊達孝保: PKU-b/TLK1 の細胞周期M期における役割-中心体の移動と姉妹染色体均等分裂への関与 日本生化学会北陸支部 第26回大会 (5.31. 石川県) 2008.

④ 橋本光正、松井理、岩淵邦芳、伊達孝保: セルソーターによる細胞周期の同調と TLK1/PKU-b による細胞周期チェックポイント 30回年会/日本生化学会大会 第80回大会 (合同大会、12.12. 神奈川県) 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊達 孝保 (DATE TAKAYASU)
金沢医科大学・付置研究所・教授
研究者番号: 50019676

(2) 研究分担者

尾崎 守 (OZAKI MAMORU)
金沢医科大学・付置研究所・助教
研究者番号: 50319068

(3) 連携研究者

なし