

令和元年6月12日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07041

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクス法で新規同定したGreatwallキナーゼ標的候補の解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel target of Greatwall kinase identified by chemical genetics method

研究代表者

奥村 英一 (Okumura, Eiichi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：00323808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂周期のM期は複数のM期キナーゼにより制御されている。その中のひとつであるGreatwall(Gwl)キナーゼは、生存に必須であり、M期の開始と進行を制御する。M期開始は、Arpp19/Ensaを標的としてリン酸化し、これがB55型PP2Aフォスファターゼ活性を抑制することで制御する。しかしM期進行の制御については、リン酸化の標的など制御機構は不明である。本研究では、代表者等がこれまでに見いだした15個の基質候補のうち、染色体と相互作用が示唆される一つに着目して解析を行い、これがGwlの新規基質であり、M期進行時に染色体分離を制御する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gwlによる細胞周期のM期開始制御は解析が進んでいたが、GwlによるM期進行制御は不明であった。本研究の学術的意義は、M期進行を制御する基質候補を初めて見いだした点である。細胞内での役割の詳細はさらなる解析が必要であるが、染色体と相互作用する因子を直接リン酸化し、これが染色体分離制御に関わることが示唆された。Gwlのヒト相同遺伝子はMASTLと呼ばれ、この遺伝子がないと致死であり、点変異により血小板が減少する臨床的知見がある。また染色体分離異常は、染色体数の異常やがん化の原因となる。社会的意義として、こうした異常を引き起こすメカニズムの基礎的な知見が得られたと言える。

研究成果の概要(英文)： Cell division at M-phase is controlled by several mitotic kinases. Greatwall (Gwl) is an essential mitotic kinase. Gwl down regulates PP2A-B55 phosphatase through Arpp19/Ensa phosphorylation at the mitotic entry. Gwl also controls the mitotic progression but its substrate(s) is/are unknown. This research aimed identification of the substrate(s). 15 candidates are found by chemical genetics method in our previous work. One of the candidates, that would have affinity to chromosomes, is focused to analyze. Questions are whether it is the direct target of Gwl and what is the role in the mitotic progression. A fragment peptide of the candidate was phosphorylated by active Gwl kinase in vitro. Antibody against the fragment detected a band at predicted size of the candidate. The candidate was phosphorylated at M-phase depending not only on Gwl but also on Cdk1. Several results suggested that the candidate might control chromosome segregation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Greatwall Gwl M期 染色体 ゲノム タンパク質 生理活性 生体分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞分裂は複数の分裂期 (M 期) キナーゼによる標的のリン酸化により制御されている。Greatwall(Gwl)は、比較的最近見いだされた M 期キナーゼで、M 期開始時に Arpp19/Ensa タンパク質のリン酸化を通じて、タイプ 2A 型フォスファターゼを抑制する (Mochida et al., 2010, Garbi-Ayachi et al., 2010)。これによりリン酸化が昂進し M 期へと進む。Gwl は M 期開始だけでなく M 期進行も制御すると考えられているが (Burgess et al., 2010, Voet and Wolth, 2010)、その際のリン酸化の標的については未だ不明であった。

(2) 研究代表者はこれまでにケミカルジェネティクス法 (Allen et al., 2007) を用いて Gwl の新規基質を探索し、15 個の基質候補を見いだしていた。その中には染色体との相互作用が示唆されるタンパク質が含まれていた。

#### 2. 研究の目的

(1) 研究代表者が見いだした新規基質候補について、遺伝子クローニング、タンパク質発現を行い Gwl で直接リン酸化できるかを調べることで、実際に Gwl の基質であるかを確認することを第一の目的とした。基質である確証を得た後、次にリン酸化部位を同定し、リン酸化を受けない変異体を用いて、これが M 期進行制御の分子標的であるかを調べることを目指した。

(2) 研究を進める過程で、Gwl の基質候補が、M 期の主制御因子である Cdk1 キナーゼによってもリン酸化を受けることを見いだしたため、Cdk1 と Gwl のリン酸化の連携や役割の解析も研究の目的とした。

#### 3. 研究の方法

(1) 新規基質候補について分子生物学的ならびに生化学的な解析を行うために、まず PCR を用いた遺伝子クローニングを行い、大腸菌を用いてアフィニティー tag を付加したタンパク質を発現させ、*in vitro* リン酸化解析用のタンパク質を精製した。これを基質として、これまでに調製していた活性型精製 Gwl キナーゼを用いてリン酸化を行い、Phos-tag 電気泳動法によりリン酸化されたどうかを確認した。

(2) Gwl による基質のリン酸化部位を同定するために、Gwl のリン酸化コンセンサス配列と予測される部位を、リン酸化を受けないアミノ酸に置換した変異体を作成し、これを *in vitro* で基質としたときにリン酸化されなくなるか調べる手法でリン酸化部位を同定した。

(3) Gwl の新規基質候補が M 期進行時に何らかの役割を担うかを調べるために、Gwl によるリン酸化部位に変異を入れた断片を細胞内に微小注射して、M 期進行にどんな影響がでるかを観察方法で役割を解析した。全長タンパク質は不溶性であったため、リン酸化部位を含む C 末端側断片を注射に用いた。断片タンパク質での解析後に、さらに mRNA を用いて全長タンパク質を細胞内で発現させることを試みるために変異体と野生型のそれぞれの mRNA を調製した。影響の観察には、微小管と染色体を蛍光ラベルして可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で立体的・経時的に分裂の様子を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 基質候補の遺伝子をクローニングしたところ、1061 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、一次配列の中央付近をしめる大部分は核タンパク質でみられることの多い天然変性領域であった。大腸菌で発現させた全長配列タンパク質は不溶性であったため、染色体との相互作用領域と予測され、なおかつ Gwl のリン酸化予測部位を含む C 末側断片を発現したところ可溶性タンパク質として精製できた。このタンパク質は Gwl により確かにリン酸化され、この基質候補断片が少なくとも *in vitro* で Gwl の基質であることを確認することができた。

(2) 発現させた断片を抗原に作成した抗体は、細胞全体のウエスタン解析において基質候補の予想サイズの位置にバンドを強く検出した。このバンドは M 期に電気泳動の移動度変化を伴うリン酸化修飾を受けていた。作成抗体は、Gwl の基質候補を認識しているとみなすことが出来た。

(3) 内在性の候補タンパク質が M 期に受けるリン酸化が、Gwl 依存적であるかを調べたところ、電気泳動での移動度の変化を指標とした解析では、Gwl の有無によるリン酸化修飾の明確な違いは検出できなかった。Gwl を抑制した際にみられるリン酸化をさらに解析したところ、M 期の主制御キナーゼである Cdk1 が関与しており、Cdk1 依存的なリン酸化が候補移動度に大きく影響していた。基質候補の一次配列には Cdk1 のリン酸化予測部位が 28カ所も存在し、精製 Cdk1 は実際に Gwl の基質候補を直接リン酸化でき、この Gwl の基質候補は Cdk1 の基質でもあることが判明した。これらの結果から、Gwl 基質候補が、細胞内で Gwl だけでなく、Cdk1 によっても制御されている可能性が示唆された。

(4) 細胞内でのGwl基質候補のリン酸化が内在性のGwlに依存するかどうかは、in vitroでのGwlによるリン酸化部位を同定し、その部位に対する抗リン酸化抗体を作成して解析する方針をたて、基質候補のリン酸化標的部位と予測される配列をAlaに置換する方法で、in vitroでのリン酸化部位Ser917とSer1012の2カ所を同定した。

(5) リン酸化候補部位に対して作成した抗リン酸化抗体は、ウエスタン解析において基質候補をin vitroでGwlによりリン酸化した時のみ、特異的に認識した。内在性の基質候補についても、M期にリン酸化を受けることが、IPIにより基質候補を濃縮した試料のウエスタン解析から示唆された。

(6) 2カ所のリン酸化部位をAlaに置換した断片を細胞内に注射するとM期が正常に終了しないものがあり、その異常が染色体分離の異常時にみられるものと類似しており、そのためM期進行の制御に異常があったと推測された。Gwl基質候補のGwlによるリン酸化がM期進行の制御に関与する可能性を示すものといえる。

#### <引用文献>

Mochida, S., S.L. Maslen, M. Skehel, and T. Hunt. 2010. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science*. 330 : 1670 - 1673

Gharbi-Ayachi, A., J.C. Labbé, A. Burgess, S. Vigneron, J.M. Strub, E. Brioudes, A. Van-Dorsseleer, A. Castro, and T. Lorca. 2010. The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science*. 330 : 1673 - 1677

Burgess, A., S. Vigneron, E. Brioudes, J.C. Labbé, T. Lorca, and A. Castro. 2010. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107 : 12564 - 12569.

Voets, E., and R.M.F. Wolthuis. 2010. MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. *Cell Cycle*. 9 : 3591 - 3601.

Allen JJ, Li M, Brinkworth CS, Paulson JL, Wang D, Hübner A, Chou WH, Davis RJ, Burlingame AL, Messing RO, Katayama CD, Hedrick SM, Shokat KM. *Nat Methods*. 2007 Jun;4(6):511-6. Epub 2007 May 7.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hiraoka D, Aono R, Hanada S, Okumura E, Kishimoto T., Two new competing pathways establish the threshold for cyclin-B-Cdk1 activation at the meiotic G2/M transition. *J Cell Sci.*, 査読有り, 2016 Aug 15;129(16):3153-66., Epub 2016 Jul 7. doi: 10.1242/jcs.182170.

Hara M, Ariyoshi M, Okumura EI, Hori T, Fukagawa T., Multiple phosphorylations control recruitment of the KMN network onto kinetochores., *Nat Cell Biol.*, 査読有り, 2018 Dec;20(12):1378-1388. Epub 2018 Nov 12. doi: 10.1038/s41556-018-0230-0.

〔学会発表〕(計 1 件)

奥村英一、M期制御因子Greatwallキナーゼの新規基質探索、動物学会2017年9月22日 (シンポジウム「ヒトの生殖生物学 - 1-メチルアデニンの発見から半世紀」のオーガナイザーの1人として参加し口演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。