

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 高橋 元子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 682 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A.
(ヒト分裂期染色体を用いたリン酸化プロテオーム解析によりクロモキネシンの KIF4A がリン酸化タンパク質として同定された)

論文審査委員 主査 教授 小松 雅明
副査 教授 若井 俊文
副査 教授 五十嵐 道弘

博士論文の要旨

【 背景と目的 】

分裂期には染色体の構築、分配といった正確な遺伝情報の継承に必須の過程が進行する。これら分裂期の事象は、Cdk1 に代表される分裂期キナーゼによる基質のリン酸化修飾により、時間的空間的に制御されている。したがって分裂期事象の制御メカニズムを解き明かすためには、関連タンパク質の同定と、そのキナーゼの探索が必須である。近年、リン酸化プロテオーム解析の進歩により、タンパク質リン酸化に関する膨大なデータが生み出されている。網羅的にリン酸化情報を得る上では強力なツールであるが、一方でそのデータと細胞内事象との関連づけは必ずしも容易ではない。本研究で申請者らは、染色体構築に関わるタンパク質とそのリン酸化制御をより効率的に調べるために、染色体上のタンパク質に標的を絞り、分裂期にリン酸化修飾を受けるものをリン酸化認識結合モジュールである Polo-box domain (PBD) を用いて同定することを目的とした。

【 方法 】

基質候補の同定のために、申請者らは Plk1 のリン酸化認識結合モジュールである PBD に着目した。PBD の結合モチーフ (S-pS/pT-P/X) 内の pS/pT-P は、Cdk1 のリン酸化モチーフと一致することから、PBD による Cdk1 の基質の認識が可能であると考えた。そこで、PBD 領域を含む Plk1 の C 末側 (305~603a. a.) のリコンビナントタンパク質を大腸菌より精製し、細胞の抽出液を用いてプルダウン法を行った。PBD には非結合型変異体 (H538A, K540M) が報告されており、これを用いることで、非特異的結合タンパク質を除外し、野性型に特異的に結合するタンパク質を同定した。また細胞の抽出液には、分裂期に同調した HeLa 細胞の染色体画分を用いた。PBD に結合したタンパク質を SDS-PAGE によりゲル上に展開し、銀染色にて野性型 PBD に特異的なバンドに含まれるタンパク質の同定を質量解析 (LC-MS/MS) により行った。この解析で基質候補となった KIF4A については、ウエスタンブロッティングによるリン酸化解析、キナーゼ阻害剤

を用いて関連キナーゼを同定した。

【 結果 】

質量解析で検出されたタンパク質には、コヒーシン及びコンデンシン複合体のサブユニットである SMC タンパク質群、クロモキネシンの一つである KIF4A、トポイソメラーゼの TOP1 といった染色体構成因子が多く含まれた。申請者らは、これらの基質候補の中から、染色体軸索上に局在し、RNA 干渉法を用いたノックダウンにより染色体の構築異常を来すことが知られている KIF4A に着目した。KIF4A の配列内には、PBD 結合モチーフ、Cdk1、Plk1、Aurora B のリン酸化モチーフとなりうる箇所が実際に存在した。細胞周期を S 期から M 期まで同調した HeLa 細胞のウエスタンブロット解析により、KIF4A は分裂期特異的にリン酸化バンドシフトアップを示すことを見いだした。また、このバンドシフトアップは、Cdk1 と Aurora B 阻害剤を用いることで、それぞれキャンセルされることから、KIF4A は Cdk1 と Aurora B により、分裂期にリン酸化を受けることが示唆された。KIF4A は染色体の形成を促進するコンデンシンと相互作用することがこれまでに示唆されている。そこで、今回見いだしたリン酸化の意義を調べるため、KIF4A とコンデンシン I の相互作用の可否を、キナーゼ阻害剤を併用した免疫沈降実験にて検証した。すると、Cdk1 の阻害により、両者の相互作用が顕著に阻害され、Aurora B 阻害下にも部分的に阻害されることを見いだした。

【 考察と結論 】

今回、染色体画分を用いた質量解析により、細胞抽出液を用いた場合と比較し、効率的に染色体構築、分配に関わる基質の探索に成功した。候補タンパク質の中から、ノックダウンによる細胞表現型を元に目的となる染色体構築に関わるタンパク質を絞り込み、最終的に KIF4A が Cdk1、Aurora B によるリン酸化を受けること、また、Cdk1 と Aurora B 活性依存的に KIF4A とコンデンシン I が相互作用することを見いだした。KIF4A のリン酸化自体がこの相互作用を引き起こすかについては、今後リン酸化部位の同定と非リン酸化型変異体を作成しての更なる検証が必要であり、非リン酸化変異体は KIF4A とコンデンシン I の相互作用の染色体構築に果たす役割の解明に多いに役立つことが予見される。Aurora B はコンデンシン I などの染色体タンパク質を染色体に局在させる役割が知られており、Aurora B 活性を背景としたコンデンシン I と KIF4A の相互作用がコンデンシン I の染色体局在に必要なのではないか、という可能性も浮上する。こうした問いは、染色体構築の謎に迫るポテンシャルを秘めたテーマであると考えられ、今後の研究が待たれる。

審査結果の要旨

細胞分裂期の染色体の構築、分配におけるタンパク質のリン酸化制御機構の解明を目的とした。染色体分配に寄与するキナーゼ Plk1 のリン酸化タンパク質認識結合モジュール(PBD)を利用し、分裂期の細胞抽出液を用いたプルダウン、それに引き続く質量分析解析を行った。その結果、KIF4A が PBD 結合タンパク質の一つとして同定された。KIF4A は分裂期特異的にリン酸化されること、そのリン酸化は分裂期キナーゼ Cdk1、Aurora B の阻害剤により部分的に抑制された。さらに、KIF4A がコンデンシンと相互作用すること、その相互作用は Cdk1、Aurora B の阻害剤により抑制された。これらのことから、分裂期特異的な KIF4A のリン酸化が染色体構築に寄与することが示唆された。

ストレートフォワードな研究内容である。染色体構築、分配における新たなリン酸化タンパク質の同定方法は見事であり、実際 新規の基質として KIF4A の同定に成功している。その後の生化学的解析も適切で

あり、学位論文としての価値を満たすと判定した。