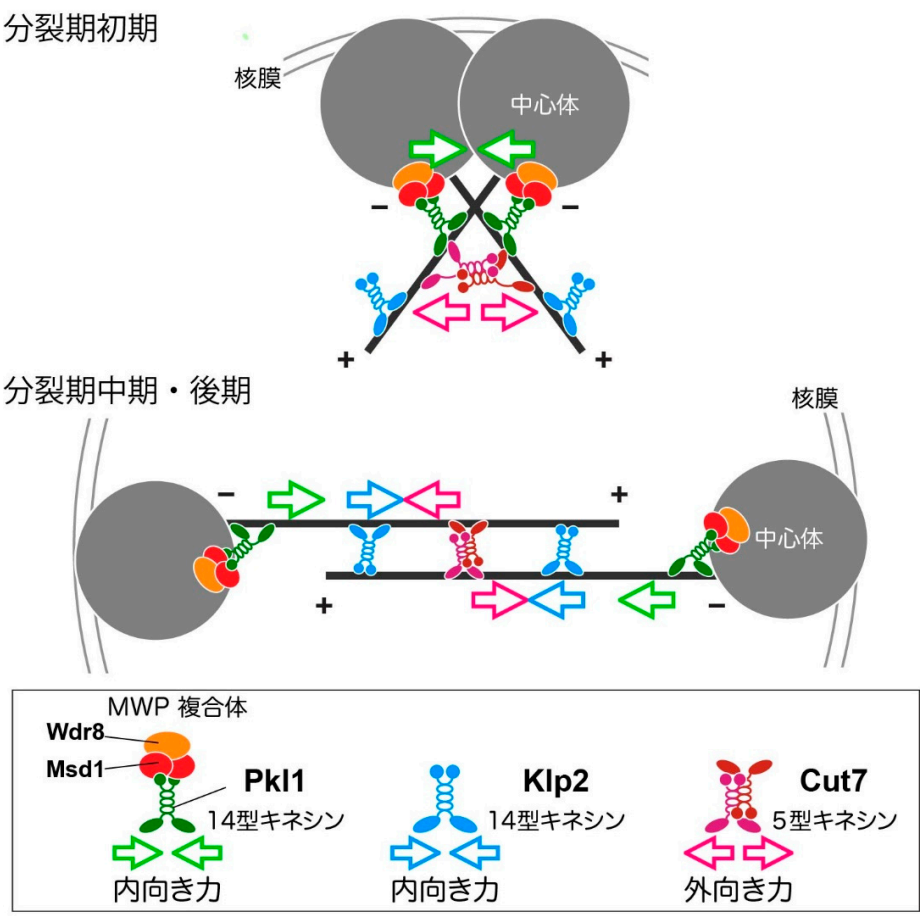
53　分裂期微小管アンカー機構解明と抗キネシン抗癌剤開発	登田　隆

【目的】微小管は、細胞内小器官である中心体を核として重合する細胞骨格で、染色体分配、細胞運動、タンパク質輸送等に重要な役割を担う。本研究では、微小管を中心体に係留するアンカー因子・MWP 複合体に関して、その制御機構の解明と生物学意義の統合的理解を研究目的とした。またヒト 14 型キネシンに対する特異的阻害剤探索を可能とする、酵母細胞を使ったアッセイ系の開発も目指した。

【方法】遺伝学が容易な分裂酵母を用いた。また *in vitro* 生化学的実験には、大腸菌で産生、精製したタンパク質を使用した。

【結果】MWP 複合体は中心体に存在し、微小管末端を中心体に係留する役割を担う。その際、構成サブユニットであるマイナス端方向性 14 型キネシン Pkl1 が、微小管に対して内向き力を付与する。本研究では、別の 14 型キネシン Klp2 が Pkl1 とは独立に、しかし協調的に内向き力を生み出すことを発見した。細胞内では Klp2 は MWP 複合体/Pkl1 とは異なり、微小管上に存在する。すなわち双極性紡錘体は、Pkl1 と Klp2 という 2 つのマイナス端方向性キネシンの時空間的共同作業によって、その形態が維持されることが判明した。さらにこれら内向き力は、プラス端方向性の 5 型キネシン Cut7 が生み出す外向き力と相反的に作用することも示した。以上の結果から、紡錘体微小管は方向性の異なるキネシン分子が生み出す相反する 2 つの力バランスによって、その構造が構築・維持されることが明らかになった。

分裂酵母微小管アンカー因子と双極性紡錘体構造の構築機構



53. 分裂期微小管アンカー機構解明と抗キネシン抗癌剤開発

登田　隆

広島大学 大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻 細胞物質化学

Key words：細胞分裂，微小管，キネシン，分裂酵母，抗癌剤

緒　言

微小管は、細胞内小器官である中心体を核として重合する繊維状細胞骨格で、染色体分配、細胞運動、タンパク質・核酸の輸送等に重要な役割を担う。その形態は細胞増殖期、また発生段階でダイナミックに変化し、それぞれの過程で特徴的な構造体を形成する。例えば、増殖細胞内では、微小管は細胞周期間期に中心体を取り巻く糸状構造をとり、分裂 M 期においては中心体から伸長する紡錘体を形成する。一方、分化した神経細胞においては、先端へと伸びる長い軸索の主要構成成分である。微小管構造の欠損・制御異常は、癌、神経系障害、繊毛関連病など多くのヒト疾患と密接に関連する。しかし、微小管構造不全がこれらヒト疾患を引き起こす一方で、微小管安定化薬剤であるパクリタキセルが抗癌剤として医療現場で広く使われている。このような背景から、現在、微小管の生体内ダイナミクスを含めた動態制御、細胞機能の分子レベルでの統括的理解が、基礎生物学・医科学・臨床病理学の分野で強く希求されている。

これまで、微小管に関しては、幾多の基礎・医学的研究、またその阻害剤開発が精力的になされてきた。しかしながら、 微小管構築の根幹となる中心体に微小管を係留（アンカー）する分子機構についての知見は、皆無に等しかった。著者は 2007 年に、遺伝学が容易で、かつ高等生物と多くの点で進化上の保存度が高い分裂酵母を用い、微小管アンカーに必須な新規タンパク質（Msd1）を世界に先駆けて発見した［1］。さらに Msd1 タンパク質が、WD40 関連新規タンパク質 Wdr8、およびマイナスエンド方向性 14 型キネシン Pkl1 と複合体を形成し、三量体として細胞内で機能することを報告した（以下、Msd1-Wdr8-Pkl1 複合体を MWP 複合体と呼称する）［2，3］。MWP 複合体の 3 つの構成サブユニットは、分裂酵母からヒトまですべて保存されている。さらにゼブラフィッシュ、ヒトの Msd1 ホモログも、細胞内で微小管アンカー因子として機能することも、著者の研究から明らかになってきた［3～6］。

本研究では、MWP 複合体が微小管アンカーとして働くその分子機構の解明を、研究目的として設定した。とりわけ、MWP 複合体の中心体での機能制御機構、高等生物における生理学的役割、さらに微小管アンカーの進化上普遍的な分子基盤とその生物学的意義という所まで明らかにしたいと考えた。また MWP 複合体、特にヒト 14 型キネシンに対する特異的阻害剤探索のための、酵母細胞を使ったアッセイ系の開発も目指した。本稿では、これまでに得られた成果を報告する。ちなみに主要な結果は、すでに Molecular Biology of the Cell 誌［7］および Journal of Cell Science 誌［8］に論文発表し、特異的阻害剤のアッセイ系開発については、国際雑誌に投稿中である。

方　法

微小管アンカー因子を研究するためのモデル生物として、遺伝学が容易で、分子生物学的手法を用いた実験に適した分裂酵母を主に用いた。蛍光タンパク質でラベルしたタンパク質の生細胞内での経時観察には、DeltaVision 蛍光顕微鏡システムを導入した。*in vitro* での生化学的実験のため、T7 プロモーターを組み込んだ大腸菌を用いて目的のタンパク質を大量産生させ、タンパク質精製を遂行した［9］。

結果および考察

1. 分裂酵母 MWP 複合体と協調して機能する 14 型キネシン Klp2 の同定とその時空間的制御機構の解明

MWP 複合体は中心体に存在し、微小管末端を中心体に係留する役割を担う。その際、MWP 複合体を構成するサブユニットであるマイナス端方向性の 14 型キネシン Pkl1 が、微小管に対して内向き力を生み出すことを、著者は以前の研究から明らかにしていた［2］。分裂酵母には、Pkl1 以外にもう一つ Klp2 と名付けられた 14 型キネシンが存在することがわかっていたが、その細胞機能は不明であった。本研究では、Klp2 が MWP 複合体とは独立に、しかし協調的に内向き力を生み出すことを発見した。*pkl1* 遺伝子を欠損させた細胞（*pkl1Δ*）では、分裂期紡錘体微小管が中心体に係留（アンカー）されないため、微小管末端が中心体を突き抜ける形で、細胞長軸側へと異常伸長してしまう形態をとる（図 1A、B）。一方 *klp2* 単独欠損細胞（*klp2Δ*）では、そのような伸長微小管は観察されなかった（図 1A、B）。しかし、興味深いことに、*pkl1klp2* 二重変異体細胞（*pkl1Δklp2Δ*）では、異常な伸長微小管を示す細胞の頻度が、*pkl1* 欠損に比べて顕著に上昇した（図 1A、B）。すなわち Klp2 分子は、それ自体では微小管アンカーとしての機能は果たさないが、Pkl1 のアンカー機能を補助、増大させる役割があることが明らかになった。

次に、GFP 蛍光タンパク質と結合させた Klp2 融合タンパク質（GFP-Klp2）を細胞内で発現させ、Klp2 タンパク質の細胞内局在を詳しく調べた。その結果、GFP-Klp2 は細胞周期 M 期において、紡錘体微小管上ドット状に局在することが明らかになった（図 2）。一方、GFP-Pkl1 は以前の著者たちの結果通り、中心体に局在した。以上のことから、分裂酵母の 2 つの 14 型キネシンは、それぞれ異なる細胞内局在をとることによって、微小管に対して内向き力を協調的に付与することが判明した。また Pkl1 あるいは Klp2 をそれぞれ細胞内で過剰発現させたところ、単極性微小管しか現れず、細胞は致死となった［8］。この結果は、Pkl1 または Klp2 によって生み出される内向きの力が過剰になると、中心体分離を阻害することを証明したものである。すなわち双極性紡錘体は、Pkl1 と Klp2 という 2 つのマイナス端方向性キネシンの細胞内局在制御を介した共同作業によって、その形態が維持されることが判明した。

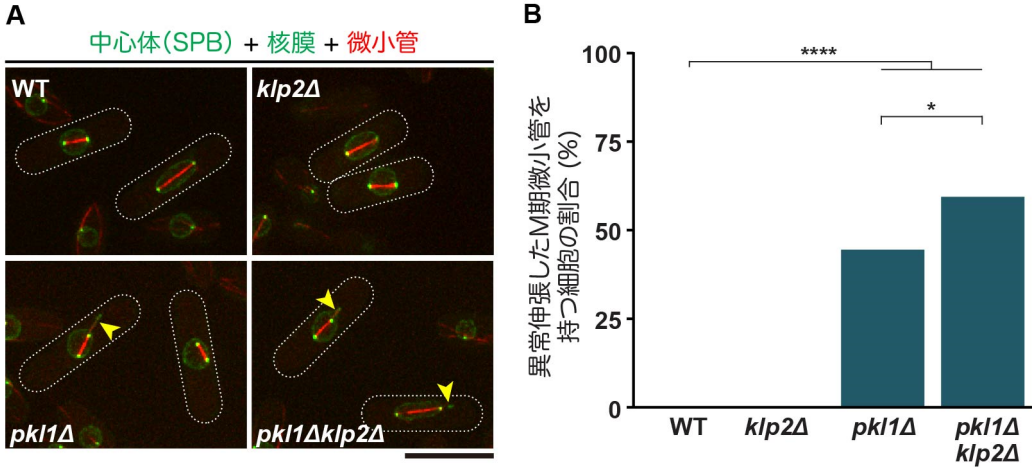


図 1. 2 つの 14 型キネシン分子は協調的に微小管を中心体にアンカーする

A. 各細胞株の代表的な M 期微小管形態を示した。中心体（酵母ではスピンドル極体-SPB-と呼称する）は GFP–Alp4、核膜は Cut11-GFP、微小管は mCherry-Atb2 で可視化した。スケールバーは 10 µm。B. *pkl1* 欠損株（*pkl1Δ*）では、45%の M 期微小管が異常に伸長する。*klp2* 欠損株（*klp2Δ*）では、野生型（WT）同様、そのような異常微小管は観察されなかった。ところが *pkl1 klp2* 二重欠損株酵母（*pkl1Δ klp2Δ*）では、異常伸長した微小管を持つ細胞の頻度が 60%に上昇した。 全ての p 値は χ^2 検定に基づく（*P < 0.05 ; ****P < 0.0001）。本図は文献 8 で発表のものを一部、改変した。

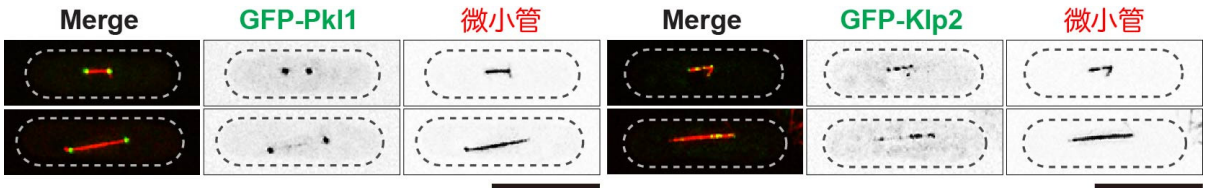


図 2. 2 つの 14 型キネシン分子の異なる細胞内局在

Pkl1 は中心体に局在し、Klp2 は微小管上にドットとして存在する。微小管を Cherry 蛍光タンパク質（mCherry-Atb2）で可視化した細胞に、14 型キネシンと GFP の融合タンパク質（GFP-Pkl1、GFP-Klp2）を発現させた。スケールバーは 10 μm。本図は文献 8 で発表のものを一部、改変した。

2. 2 つの 14 型キネシンと拮抗的に作用する 5 型キネシン Cut7 の新機能の同定

著者は先に MWP 複合体が生み出す内向き力が、5 型キネシン Cut7 による外向き力と拮抗作用することを報告していた［2］。では Klp2 と Cut7 の関係はどうであろうか？遺伝学的解析から、Klp2 も Pkl1 同様、Cut7 と拮抗することが明らかになった。具体的には、温度感受性 *cut7* 変異体が、*pkl1Δ*のみならず *klp2Δ*と組み合わすことによっても、その表現型が抑制されることがわかった（図 3）。以上の知見から著者らは、細胞周期 M 期において Cut7 が 2 つの異なる 14 型キネシンと拮抗的に作用しながら、双極性紡錘体微小管を構築するモデルを提唱した（図 4）［7，8］。

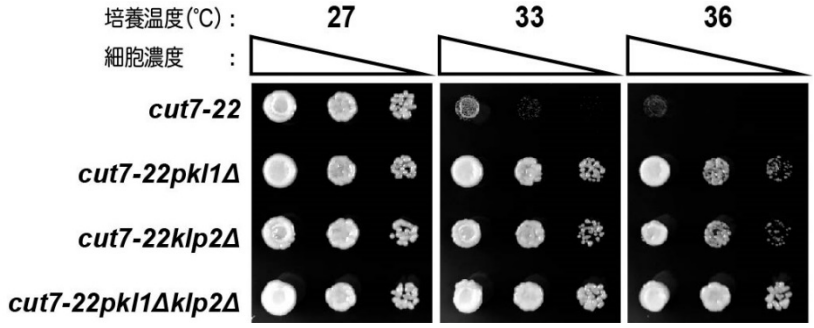


図 3. 温度感受性 *cut7-22* 変異体の *pkl1*, *klp2* 欠損による抑制

それぞれの分裂酵母株を左から 10 倍希釈でプレート上にスポットし、27℃、33℃、36℃で 2～3 日間培養した。温度感受性 *cut7-22* 変異体はそれ自体では制限温度下（33℃，36℃）で生育できないが、14 型キネシンをコードする遺伝子、*pkl1*、*klp2* 欠損との二重変異体（*cut7-22pkl1Δ*、*cut7-22Δklp2Δ*）あるいは 3 重変異体（*cut7-22pkl1Δklp2Δ*）では、どちらの温度でもコロニー形成が可能となった。本図は文献 8 で発表のものを一部、改変した。

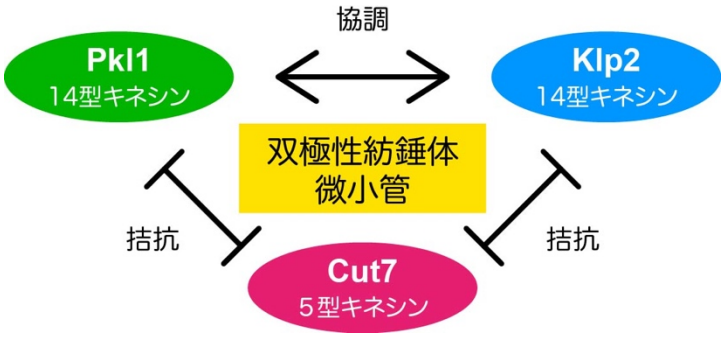


図 4. 5 型キネシンと 14 型キネシン間の拮抗作用を介した双極性紡錘体形成

2 つの 14 型キネシン Pkl1 と Klp2 は協調的に、一方、5 型キネシン Cut7 は Pkl1/Klp2 と拮抗的に機能し、双極性紡錘体形成を促進する。14 型キネシンが欠失すると末端が異常伸長した微小管が形成され、一方 5 型キネシンが欠損すると中心体分離が阻害され、単極性微小管のみが形成される。14 型キネシンは微小管上で内向き力を生み出すのに対して、5 型キネシンはそれとは逆の外向き力を生み出す。

3. 分裂酵母細胞を利用したヒト 14 型キネシン阻害剤探索

ヒト 14 型キネシンは多くのがん細胞で過剰発現されており、その活性を低下させるとがん細胞が特異的に致死となることが知られている［10］。このことから、ヒト 14 型キネシン阻害剤は新しい抗がん剤として大きな注目を集めている。しかし阻害剤をスクリーニングするために適した *in vivo* 系が、開発されていなかった。著者は分裂酵母を用いて、ヒト 14 型キネシン阻害剤を効率良くスクリーニングできるシステムの開発を試みた。本事業は現在、鋭意進行中である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学・大学院先端物質科学研究科・分子生命機能科学専攻・細胞物質化学研究室の湯川格史助教と岩手大学・農学部・応用生物化学科・天然物生化学研究室の木村賢一教授である。本研究の遂行には、細胞物質科学化学研究室に属する学部学生・院生の皆さん（岡崎雅紀、山内智瑛、河上友基、山田侑亮、大石充輝、寺谷康宏）と技術補助員の稲田彩花さんの寄与が大きかった。ここに感謝の意を表したい。

文　献

1) Toya M, Sato M, Haselmann U, Asakawa K, Brunner D, Antony C, Toda T. γ-Tubulin complex-mediated anchoring of spindle microtubules to spindle-pole bodies requires Msd1 in fission yeast. Nat Cell Biol 2007 Jun; 9(6):646-53. PMID: 17486116 DOI: 10.1038/ncb1593.

2) Yukawa M, Ikebe C, Toda T. The Msd1-Wdr8-Pkl1 complex anchors microtubule minus ends to fission yeast spindle pole bodies. J Cell Biol 2015 May; 209(4):549-62. PMID: 25987607 DOI: 10.1083/jcb.201412111.

3) Hori A, Morand A, Ikebe C, Frith D, Snijders AP, Toda T. The conserved Wdr8-hMsd1/SSX2IP complex localises to the centrosome and ensures proper spindle length and orientation. Biochem Biophys Res Commun 2015 Dec; 468(1-2):39-45. PMID: 26545777 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.169.

4) Hori A, Toda T. Regulation of centriolar satellite integrity and its physiology. Cell Mol Life Sci 2017, Jan; 74(2):213-229. PMID: 27484406 DOI: 10.1007/s00018-016-2315-x.

5) Hori A, Peddie CJ, Collinson LM, Toda T. Centriolar satellite- and hMsd1/SSX2IP-dependent microtubule anchoring is critical for centriole assembly. Mol Biol Cell 2015 Jun; 26(11):2005-19. PMID: 25833712. DOI: 10.1091/mbc.E14-11-1561

6) Hori A, Ikebe C, Tada M, Toda T. Msd1/SSX2IP-dependent microtubule anchorage ensures spindle orientation and primary cilia formation. EMBO Rep 2014 Feb; 15(2).175–84. PMID: 24397932 DOI: 10.1002/embr.20133792910.
7) Yukawa M, Kawakami T, Okazaki M, Kume K, Tang NH, Toda T. A microtubule polymerase cooperates with the Kinesin-6 motor and a microtubule crosslinker to promote bipolar spindle assembly in the absence of Kinesin-5 and Kinesin-14 in fission yeast. Mol Biol Cell 2017 Dec; 28(25):3647-59. PMID: 29021344 DOI: 10.1091/mbc.E17-08-0497.
8) Yukawa M, Yamada Y, Yamauchi T, Toda T. Two spatially distinct Kinesin-14 Pkl1 and Klp2 generate collaborative inward forces against Kinesin-5 Cut7 in S. pombe. J Cell Sci 2018 Jan; 213(1):1-11. PMID: 29167352 DOI: 10.1242/jcs.210740.
9) Matsuo Y, Maurer SP, Surrey T, Toda T. Purification and characterisation of the fission yeast Ndc80 complex. Protein expression and purification 2017 Jul;135(7):61-69. PMID: 28502666 DOI: 10.1016/j.pep.2017.05.002.
10) Godinho SA, Kwon M, Pellman D. Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. Cancer Metastasis Rev 2009 Jun;28(1-2):85-98. PMID: 19156503 DOI: 10.1007/s10555-008-9163-6.