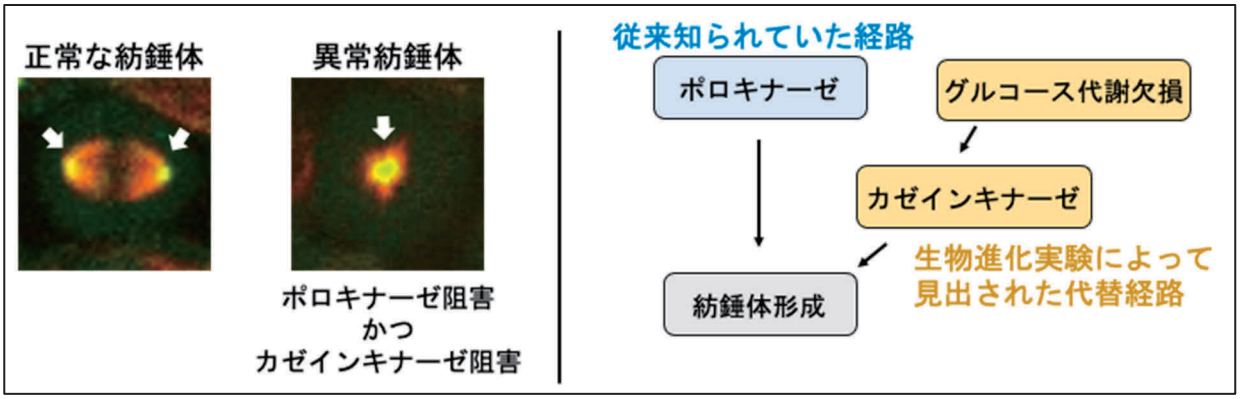
30　増殖する細胞の分裂阻害を無力化する機構の解明	五島　剛太

【目的】細胞分裂装置・紡錘体の形成には数十の遺伝子の働きが必要である。紡錘体形成に必要な遺伝子は、単細胞生物の酵母から多細胞の動物や植物に至るまで、広く共通していることが多いが、一方で、特定の遺伝子を持っていない生物種も存在する。この場合、その生物種は進化の過程で、まだ私たちが把握できていない遺伝子を使った機構を発達させたと考えられる。一方、細胞分裂制御タンパク質の阻害剤は抗癌剤として有力視されているが、別遺伝子の変異により必須性がバイパスされれば薬剤耐性となる（Synthetic Rescue：SR）。本研究では、細胞分裂に必須の遺伝子に対して SR 現象を見出し、その機構の詳細を解明することを目標とした。それにより、細胞分裂の隠された制御機構を明らかにすることだけでなく、薬剤耐性の一因となる SR 現象が生まれる要因を追究できると考えた。

【方法】紡錘体形成に必須のタンパク質リン酸化酵素「Polo キナーゼ」に着目した。細胞分裂研究のモデルとしてよく用いられる分裂酵母に対し、生物進化実験と呼ばれる、実験室内で生物の遺伝子変異を蓄積していく方法を適用した。また酵母とヒト培養細胞において、Polo キナーゼ欠失条件での紡錘体の動態をライブイメージングした。

【結果】Polo キナーゼを欠失しながら紡錘体をなお形成できる酵母の人為的作出に成功した。そのような酵母の多くはグルコース代謝経路に変化が生じていて、別のタンパク質リン酸化酵素「Casein キナーゼ 1」を介した紡錘体形成経路が働いていることがわかった。この経路が紡錘体形成に働くことはこれまで想定されておらず、新規の紡錘体形成機構が明らかになった。さらに、Polo キナーゼと Casein キナーゼ 1 の同様の関係性は、ヒトの大腸癌患者由来の培養細胞においても確かめられた。Polo キナーゼはヒトの癌細胞で発現量が上昇していることから、その阻害剤は抗癌剤として有力視されているが、癌細胞の分裂（増殖）を抑えるためには、新規機構との二重阻害が必要かもしれないことも示唆された。

細胞分裂制御キナーゼで見出された必須性バイパス機構



30. 増殖する細胞の分裂阻害を無力化する機構の解明

五島　剛太

名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻 機能調節学講座 細胞内ダイナミクス

Key words：細胞分裂，Polo キナーゼ，分裂酵母，生物進化実験，グルコース

緒　言

細胞分裂装置・紡錘体の形成には数十の遺伝子の働きが必要である。紡錘体形成に必要な遺伝子は、単細胞生物の酵母から多細胞の動物や植物に至るまで、広く共通していることが多いが、一方で、特定の遺伝子を持っていない生物種も存在する。この場合、その生物種は進化の過程で、まだ私たちが把握できていない遺伝子を使った機構を発達させたと考えられる。一方、細胞分裂制御タンパク質の阻害剤は抗癌剤として有力視されているが、別遺伝子の変異により必須性がバイパスされれば薬剤耐性となる（Synthetic Rescue：SR）［1］。本研究では、細胞分裂に必須の遺伝子に対して SR 現象を見出し、その機構の詳細を解明することを目標とした。それにより、細胞分裂の隠された制御機構を明らかにすることだけでなく、薬剤耐性の一因となる SR 現象が生まれる要因を追究できると考えた。

本研究では特に、紡錘体形成に必須のタンパク質リン酸化酵素「Polo キナーゼ」に着目した［2］。細胞分裂研究のモデルとしてよく用いられる分裂酵母に対し、生物進化実験と呼ばれる、実験室内で生物の遺伝子変異を蓄積していく方法を適用し［3］、Polo キナーゼを欠失しながら紡錘体をなお形成できる酵母の人為的作出に成功した。そのような酵母の多くはグルコース代謝経路に変化が生じていて、別のタンパク質リン酸化酵素「Casein キナーゼ 1」を介した紡錘体形成経路が働いていることがわかった。Polo キナーゼと Casein キナーゼ 1 の同様の関係性は、ヒトの大腸癌患者由来の培養細胞においても確かめられた。これらの研究成果は、米国アカデミー紀要に発表された［4］。

方　法

1. 分裂酵母の進化実験

Polo キナーゼを欠失した分裂酵母株を液体培地で継代培養した。サチュレーションのたびに 1：1,000 希釈することで 100 世代以上の培養を続けた。その後、増殖の特に早いクローンを選抜し、全ゲノム DNA 配列を解読することで変異部位を同定した。

2. ライブイメージング

分裂酵母およびヒト HCT116 細胞株に対して、スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いて、微小管および中心体マーカーを継時的に撮影した。

結　果

1. Polo キナーゼを欠失した酵母の単離

新規 SR 現象を発見するために、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用い、突然変異誘発とそれに続く生物進化実験により、細胞分裂制御遺伝子破壊体のサプレッサースクリーニングを行った。その結果、Polo キナーゼのコード領域を完全に除去したにも関わらず生存可能な酵母株が単離された。Polo キナーゼは多くの細胞種に保存され、細胞分裂、とりわけ 2 極性の紡錘体の形成に必須とされていたため、生存株の取得は予想外であった。

2. Polo キナーゼの SR 原因遺伝子の同定

Polo キナーゼを欠失した生存細胞の全ゲノム配列決定とその後の遺伝的相互作用の実験から、Polo キナーゼの SR 現象は、16 の異なる遺伝子の変異を介して達成されうることが明らかになった。これらの遺伝子の既知の細胞機能に基づく分類の結果、まず、Polo キナーゼの SR 現象は、Polo キナーゼの下流にあることが示されていた微小管重合核形成因子・γ-チューブリン複合体の複数のサブユニットの点変異によって可能になることがわかった。次に、驚いたことに、細胞分裂との関連が不明なグルコース輸送に関わる遺伝子やグルコース代謝経路に含まれるプロテインキナーゼ A（PKA）経路の変異によっても、SR 現象が認められた。実際、酵母培養培地に含まれるグルコースの濃度を下げると、Polo キナーゼの完全欠失株は他の変異がないにも関わらず生育した。

3. SR 条件下での Casein キナーゼ 1 の役割

グルコース輸送経路を低下されたときに見られた SR 現象の機構を調べるため、合成致死スクリーニングを行ったところ、Casein キナーゼ 1 が重要であることがわかった。Casein キナーゼ 1 は、少なくとも分裂酵母や主要なモデル動物細胞株において、主要な細胞分裂制御因子とはみなされていなかった。しかし、分裂酵母でライブイメージングを行うと、Polo キナーゼの非存在下では紡錘体の形成に決定的に重要であること、Polo キナーゼの存在下でも一定の役割を果たすことを見出した。また、特異的な阻害剤を用いた実験から、ヒト大腸癌由来 HCT116 細胞株において、Polo キナーゼと Casein キナーゼ 1 を同時に阻害すると、単独で阻害したとき以上にシビアな紡錘体形成異常が認められた（図 1）。

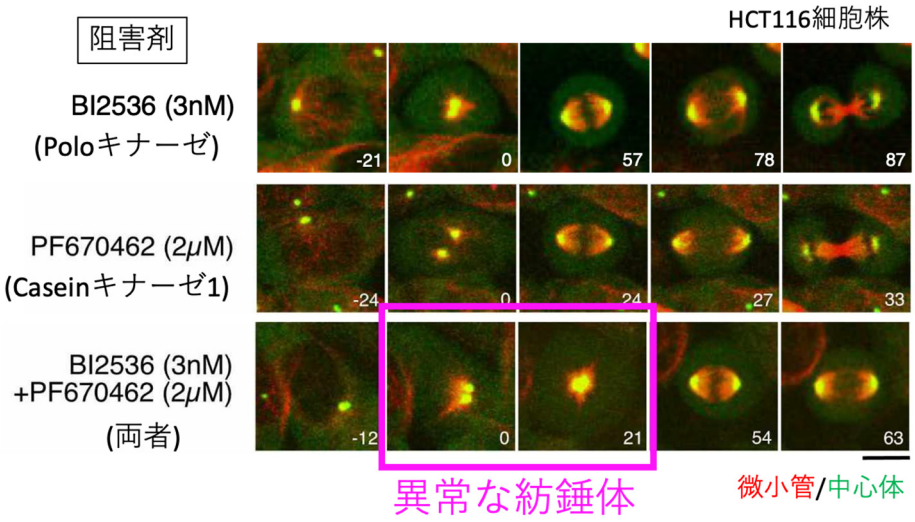


図 1. Polo キナーゼと Casein キナーゼ 1 の同時部分阻害により紡錘体に欠損が出る
TubG1 を mClover で標識して中心体を可視化したヒト HCT116 細胞株の微小管を SiR-tubulin で染色した。生細胞を左に記した阻害剤の存在下で継時観察した（37℃）。表示の白色数字は分である。分裂前中期の開始（核膜崩壊時）を 0 分とした（スケールバー：10μm）。

考　察

分裂酵母を用いた研究で得られた結果は、Casein キナーゼ 1 が、通常は Polo キナーゼが支配的である微小管形成の代替機構を構成していることを示唆している。また、ヒト培養細胞株では、Polo キナーゼおよび Casein キナーゼ 1 阻害剤により、合成的に紡錘体の形成異常が引き起こされた（図 2 左）。すなわち、両者の遺伝的相互作用は、ヒト細胞株で保存されていた。本研究は Casein キナーゼ 1 の重要性を明らかにすることで、紡錘体形成機構に新知見を与えた。

紡錘体を構築するために必要なタンパク質はいくつかの細胞種で網羅的に同定されているが、そのリストはまだ不完全なものである可能性がある。

本研究では、グルコース代謝による紡錘体形成制御という予想外の発見もあった（図 2 右）。データは現在のところ酵母でのものであり、同様のことが動物でも保存されているのかは興味深い。本研究はまた、これまでほとんどわかっていない、細胞分裂制御因子の SR 現象の要因を明らかにし、細胞分裂標的薬剤の耐性問題に重要な示唆を与えている。Polo キナーゼは多くの細胞で必須の役割を果たし各種癌細胞で発現量が上昇していることから、抗癌剤として有力視されている［1］。しかし、癌細胞の分裂を完全に阻害するためには、場合によっては Casein キナーゼ 1 との二重阻害が必要であることが示唆された。

最後に、本研究は、分裂酵母の SR スクリーニング系の有用性の実証となった。細胞分裂に関しては長年、細胞種ごとに様式や必要因子の違いが見出されていたが、その違いの基盤を理解するのはそれぞれの細胞種を扱う必要があり困難だった。SR 現象に着目した解析は、分裂機構の多様性を研究する有力手法を提示することになった。

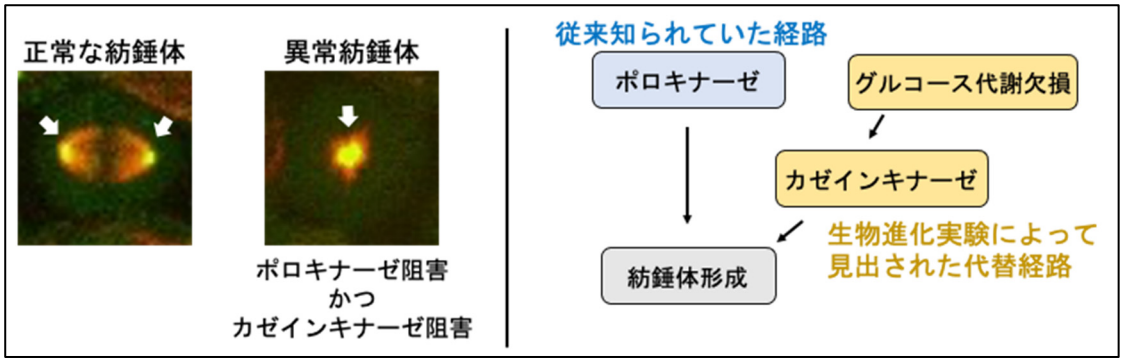


図 2. 細胞分裂制御キナーゼで見出された必須性バイパス機構

左）ポロキナーゼとカゼインキナーゼの二重阻害による紡錘体異常（ヒト HCT116 細胞）。

右）分裂酵母の進化実験によって、グルコース代謝やカゼインキナーゼが関わる紡錘体形成経路の存在が明らかになった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、当研究室の大学院生の Juyoung Kim 氏（本成果により博士号取得）である。

文　献

1） Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2017;17(2):93-115. Epub 2017/01/28. doi: 10.1038/nrc.2016.138. PubMed PMID: 28127048; PubMed Central PMCID: PMCPMC5345933.

2） Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(4):265-75. Epub 2009/03/24. doi: 10.1038/nrm2653. PubMed PMID: 19305416.

3） LaBar T, Phoebe Hsieh YY, Fumasoni M, Murray AW. Evolutionary Repair Experiments as a Window to the Molecular Diversity of Life. Curr Biol. 2020;30(10):R565-R74. Epub 2020/05/20. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.046. PubMed PMID: 32428498; PubMed Central PMCID: PMCPMC7295036.

4） Kim J, Goshima G. Mitotic spindle formation in the absence of Polo kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022;119(12):e2114429119. Epub 2022/03/15. doi: 10.1073/pnas.2114429119. PubMed PMID: 35286199; PubMed Central PMCID: PMCPMC8944928.