

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

牧原 弘幸

論文題目

Cdk1 によるデスミンのリン酸化は細胞質分裂に必要であり、デスミン **Ser 31** のリン酸化特異的抗体は筋組織や横紋筋肉腫の分裂期細胞を検出できる

<緒言>

中間径フィラメントは微小管やアクチンフィラメントと共に全ての脊椎動物において細胞骨格を形成する。中間径フィラメントを構成するタンパク質は6つのグループに分けられ、それぞれ細胞特異性がある。Ⅲ型中間径フィラメントであるビメンチンは全ての間葉系細胞で発現する。また、他のⅢ型中間径フィラメントであるGFAPは星状膠細胞、デスミンは筋細胞で発現する。

中間径フィラメントは、ヘッド、ロッド、テイルの3つのドメインからなり、その脱重合は、ヘッドドメインのセリン (Ser: S)、スレオニン (Thr: T) 残基のリン酸化によって制御されると考えられている。リン酸化状態を認識する抗リン酸化抗体は細胞内の部位特異的な中間径フィラメントのリン酸化を証明する有用なツールである。所属する研究室では、GFAPの4つの異なるリン酸化部位に対する抗リン酸化抗体を用いて、少なくとも2種類のプロテインキナーゼによって細胞分裂期にGFAPがリン酸化されることを過去に示した。即ち、分裂前中期から分裂中期においてCdk1によりGFAPのSer 8がリン酸化され、このリン酸化は細胞質全体のGFAPフィラメントで検出できる。また、GFAPのThr 7、Ser 13、Ser 38のリン酸化は、分裂後期から分裂終期において、細胞内の分裂溝でのみ認められる。さらに詳細な研究では、異なる2種類のプロテインキナーゼが分裂溝に特異的なGFAPのリン酸化に関与することが明らかとなった。その1つは分裂溝の細

胞膜直下で活性化される Rho-k であり、もう一つは紡錘体で活性化する Aurora B である。当研究室では、Ⅲ型中間径フィラメントが欠失した T24 細胞株でリン酸化部位の Ser/Thr を Ala に置換した変異 GFAP を一過性に発現する系を用いて、分裂溝特異的な GFAP リン酸化不全による脱重合不全により細胞質分裂過程において 2 つの娘細胞が分離せず架橋している構造 (IF-bridge) を形成すること、Cdk1 部位 (Ser 8) の変異は IF-bridge を示さないことを報告した。

このような 2 種類の分裂期における中間径フィラメントのリン酸化はビメンチンにおいても保存されている。一方で、プロテインキナーゼ C (Protein kinase C: PKC) と Polo 様キナーゼ 1 (Polo-like kinase 1: Plk1) も分裂期ビメンチンのリン酸化に関与している。GFAP 同様、Rho-k と Aurora B による分裂溝に特異的なビメンチンのリン酸化は細胞質分裂時におけるビメンチンフィラメントを効率的に分離するために非常に重要である。また、GFAP とは異なり、Cdk1 を含む他のプロテインキナーゼによるビメンチンのリン酸化も細胞分裂時のビメンチンフィラメントの分離に寄与している。

デスミンは Rho-k により Thr 16、Thr 75、Thr 76 が、Aurora B により Ser 11、Thr 16、Ser 59 がリン酸化される。Rho-k や Aurora B によるデスミンのリン酸化は分裂溝で特異的に検出され、細胞質分裂時のデスミンフィラメントの効率的な分離のために必要である。所属する研究室ではこれ

までに、試験管内で Cdk1 によってデスミンがリン酸化されることを報告してきたが、個体内におけるリン酸化の生理的な意義は全く明らかになっていなかった。本研究では Cdk1 によるデスミンのリン酸化が細胞分裂時にデスミンフィラメントの効率的な分離に寄与するか、および、このリン酸化は一般的に個体内における分裂期の筋細胞で検出できるかを調べることを目的とした。

<方法・結果>

はじめに、マウス・デスミンの Cdk1 によるリン酸化部位として Ser 6、Ser 27、Ser 31 を配列情報から推定し、Ser を Ala に置換したマウス・デスミン変異蛋白質を作製した。Cdk1 によるマウス・デスミンへの ^{32}P の取り込みを検討したところ Ser 27、Ser 31 がメジャーサイトと考えられ、Ser 6 もリン酸化部位であることが明らかになった。Ser 31 は、ヒトやトリでも保存されているためマウスの Ser 31 に対応したラットモノクローナル抗リン酸化抗体 (TD31 と呼ぶ) を作製した。

作製した抗体を用いて抗体吸収試験を行うと、TD31 の免疫反応は抗リン酸化ペプチドで前処理することで完全に消失した。また、TD31 は Cdk1 で処理したデスミンには反応するが他のキナーゼ (Aurora B、Rho-k) で処理したデスミンには反応しなかった。Cdk1 によってリン酸化したデスミンへの TD31 の免疫反応は、Ser 31 の Ala への変異によって完全に消失した。しか

しながら、Ser 6 または Ser 27 に変異を導入しても、TD31 の免疫反応には変化を認めなかった。このことは、TD31 がデスミン Ser 31 のリン酸化に特異的であることを示している。

デスミン陽性細胞である C2C12 (murine myoblast) 細胞と BHK (Baby Hamster Kidney) 細胞の分裂期早期 (前中期から中期) の細胞では TD31 は特異的に反応を示すが、間期および分裂期の後期、終期の細胞では認めなかった。一方で TD31 の免疫反応はデスミン陰性細胞である HeLa 細胞または U251 細胞では分裂期早期においても検出できなかった。これらの結果は TD31 がデスミン Ser 31 のリン酸化を特異的に認識することを示唆している。

また、Ⅲ型中間径フィラメントが欠損している T24 細胞において、外来性にⅢ型中間径フィラメントを発現させ、デスミンのリン酸化不全による細胞質分裂障害への影響を検討した。その結果、Cdk1、Rho-k、Aurora B によるリン酸化部位の変異デスミンの発現は2つの娘細胞の間に形成されるブリッジ構造を誘導した。一方で、野生型のデスミンを発現させた場合にはブリッジ構造は観察されなかった。Cdk1 のリン酸化部位のみに変異を導入した場合のブリッジ構造の出現は Aurora B と Rho-k によるリン酸化部位に変異を導入したものより低い。Cdk1 を含む3つのキナーゼ (Cdk1、Aurora-B、Rho-k) によるリン酸化部位全てに変異を導入するとブリッジ構造の出現頻度が有意に増加した。これらの結果は、Aurora-B と Rho-k に比べて寄与は低い可能性があるが、Cdk1 によるデスミンのリン酸化も細胞質

分裂の際のデスミンフィラメントの効率的な分離に寄与していることを示唆している。

次に、個体内でデスミン Ser 31 のリン酸化が同定できるか、マウスの筋組織（胎生 15.5 日、生後 0 日と 6 週）を用いて検討した。デスミン Ser 31 のリン酸化は、胎生 15.5 日のマウス（心臓、骨格筋、舌、尾部）の分裂期・筋細胞で認められた。これらの組織でのデスミン Ser 31 のリン酸化の頻度は、胎仔期と比べ出生直後で有意に減少し、生後 6 週ではほとんど認められなかった。

次に、デスミン陽性である筋組織由来の腫瘍における分裂期細胞の同定を試みた。検体採取元である名古屋大学附属病院の倫理委員会の承認およびインフォームドコンセントを得て採取された、2 例の異なる原発部位の横紋筋肉腫患者由来の組織（14 歳の上腕、4 歳の下肢）を TD31 で染色した結果、ヒト横紋筋肉腫の分裂期細胞を同定することができた。以上の結果から培養細胞だけでなく、細胞分裂期の筋細胞を含む組織においても、デスミンは Cdk1 によって分裂期にリン酸化されることが示唆された。

<まとめ>

本研究では、Cdk1 によるデスミンのリン酸化部位を同定するとともに、その意義を細胞・組織レベルで明らかにすることを目的とした。また、そのリン酸化部位特異的抗体を作製し、臨床応用を目指した。その結果マウ

ス・デスミンの Cdk1 によるリン酸化部位として Ser 6、Ser 27 および Ser 31 を同定した。

また、培養細胞において Cdk1 によるデスミンのリン酸化は、分裂溝で特異的なリン酸化を担う Aurora B、Rho-k によるデスミンのリン酸化と同様に、細胞質分裂のフィラメントの効率的な分離に必要であることが示唆された。さらに、Ser 31 のリン酸化部位特異的抗体を作製し (TD31)、組織染色した結果、筋組織の細胞分裂部位を同定することができた。この結果から TD31 は、これまで有用な腫瘍マーカーが存在しなかった横紋筋肉腫の診断の新たなツールになり得ると考えられ、今後のさらなる研究が期待される。