Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Centrosome-targeting region of cg-nap causes centrosome amplification by recruiting cyclin e-cdk2 complex

西村，珠子

(Degree)
博士（理学）
(Date of Degree)
2005-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3250
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003250

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 238 】

氏　　名・（本　籍）	西村　珠子	（　東京都　）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）	
学　位　記　番　号	博い第２７５号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成１７年３月２５日	

【 学位論文題目 】

巨大蛋白質ＣＧ－ＮＡＰの中心体における機能解析

審　査　委　員

主 査　教　授　小野　功貴

教　授　松田　吉弘

教　授　齋藤　尚亮

CG-NAP は、中心体およびゴルジ体に局在する分子量 450kDa の巨大蛋白質である。CG-NAP は、蛋白質リン酸化酵素 PKN、PKA、PKC 等の種々のシグナル分子との相互作用が認められている。CG-NAP の機能としては、これまでに、PKC ε を中心体／ゴルジ体領域にアンカリングし、リン酸化による maturation の際の足場として機能すること、また γ-tubulin ring complex を中心体にアンカリングし、中心体からの微小管形成に関与することが明らかとなっている。しかしながら、CG-NAP は様々な分子と相互作用することから、更なる機能が存在することが期待される。そこで、CG-NAP の中心体における機能に焦点を当てて検討を行うこととした。

中心体は、染色体複製と連動して1細胞周期に 1 度だけ、G1-S 期に複製されるが、その調節機構については不明な点が多い。中心体複製が過剰に起こると、分裂中期に紡錘体が多極になり、染色体の分配が不均等になる。多中心体はガン細胞でしばしば認められる所見である。従って、中心体複製が正確に行われることは、遺伝的安定性を保つ上で重要であると考えられる。CG-NAP は細胞周期を通じて中心体に分布することから、中心体複製の調節を司っている可能性が考えられた。

そこで、CG-NAP の種々の deletion mutant を CHO-K1 細胞に発現し、中心体をマーカー蛋白質である γ-tubulin の抗体で染色し、中心体数をカウントした。その結果、CG-NAP の中心体局在部位を含む C 末端領域(CG-NAP/D)を発現した場合に、中心体を 3 個以上有する細胞の割合が増加した。この時、内在性の CG-NAP の局在には変化が認められなかった。増加した中心体は、別の中心体マーカーである centrin-2および kendrin とも共局在した。また増加した中心体からは微小管の再形成が認められたことから、微小管形成起点としての機能を保持した中心体が増加したと考えられた。

CG-NAP/D から中心体局在部位を欠失させると、中心体数の増加作用は消失した。また、CG-NAP/D の C 末端に Ki-Ras の farnesylation 部位を付加して膜結合型にすると、中心体数の増加作用は減弱した。従って、CG-NAP/D 発現による中心体数の増加作用には、中心体への局在が必要であると考えられた。

中心体の過剰複製は、細胞周期の停止および細胞質分裂の異常によっても引き起こされることが知られている。そこで、Laser Scanning Cytometer を用いて、CG-NAP/D を発現した細胞の細胞周期分布を解析した。その結果、中心体数増加を引き起こすとされる S 期への停止、および細胞質分裂の異常の結果出現する 4N 以上の DNA 量をもつ細胞の増加は認められなかった。従って、CG-NAP/D 発現による中心体数の増加は、細胞周期の停止および細胞質分裂の異常によるものではないことが示唆された。

そこで、中心体複製に影響するとされる種々の分子と CG-NAP/D を細胞に共発現し、両者の相互作用を免疫沈降法により調べた。その結果、G1-S 期に活性化され中心体複製の開始に関与することが知られる cyclin E-cdk2 との相互作用が認められた。免疫染色により、cyclin E は核に加え中心体にも局在が認められ、CG-NAP/D を共発現すると中心体への分布量は増大した。また、CG-NAP/D の免疫沈降物には内在性の cyclin-cdk 活性が認められ、その活性は cyclin E および cdk2 の共発現により上昇したことから、CG-NAP/D が活性体の cyclin E-cdk2 と相互作用していることが示唆された。さらに、CHO-K1 細胞から調製した中心体には内在性の cdk2 が検出され、また CG-NAP/D を発現した細胞から調製した中心体には、より多くの内在性 cdk2 が検出された。従って、CG-NAP は C 末端領域を介して cyclin E-cdk2 を中心体にアンカリングすることが示唆された。

次に、CG-NAP/D による中心体数増加作用が cyclin E-cdk2 との相互作用によるものかを検討した。CHO-K1 細胞に CG-NAP/D と cyclin E を共発現すると、中心体数は CG-NAP/D を単独で発現した場合よりも増加した。核移行シグナルの除去により細胞質や中心体に分布する cyclin E mutant を CG-NAP/D と共発現すると、中心体数はさらに増加した。一方、核移行シグナルを除去し、且つ cdk2 と相互作用しない不活性の cyclin E mutant を CG-NAP/D と共発現すると、中心体数は CG-NAP/D の単独発現時よりも減少した。従って、CG-NAP/D は、cyclin E-cdk2 と相互作用することにより中心体数を増加させていると考えられた。

（氏名：　西村　珠子　　NO.　3　　）

以上の結果から、CG-NAP の C 末端部分は、過剰量の cyclin E-cdk2 を中心体にアンカリングすることで中心体を過剰複製したと考えられ、また CG-NAP が通常の細胞周期においても cyclin E-cdk2 を中心体にアンカリングすることにより中心体複製に関与しているという可能性が示唆された。

（別紙１）　　論文審査の結果の要旨

氏名	西村　珠子		
論文題目	巨大蛋白質 CG-NAP の中心体における機能解析		
審査委員	区　分	職　名	氏　　名
	主　査	教授	小野　功貴
	副　査	教授	松田　吉弘
	副　査	教授	斎藤　尚亮
	副　査		印
	副　査		印

要　　旨

中心体は細胞内微小管ネットワークの起点となる重要な細胞内小器官である。中心体は各細胞に１個存在し、細胞周期の間期に正確に１回複製されて２個になり、分裂期に娘細胞に１個ずつ分配される事が正確な細胞分裂には必要不可欠であるが、その複製の調節機構については未だ不明な点が多い。

本研究では、蛋白質リン酸化酵素 PKN と相互作用し、細胞周期を通じて中心体に分布する CG-NAP(centrosome and Golgi localized PKN-associated protein)の中心体における機能、特に中心体複製への関与について検討を行っている。CG-NAP は、蛋白質リン酸化酵素 PKN、PKA、PKC 等の種々のシグナル分子との相互作用が認められており、その機能としては、これまでに、PKCε を中心体／ゴルジ体領域にアンカリングし、リン酸化による機能蛋白質としての成熟の際の足場として機能すること、またγ-tubulin ring complex を中心体にアンカリングし、中心体からの微小管形成に関与することが明らかとなっている。しかしながら、CG-NAP は様々な分子と相互作用することから、更なる機能が存在することが期待される。そこで、申請者は、CG-NAP の中心体における機能に焦点を当てて検討を行った。

中心体は、染色体複製と連動して１細胞周期に１度だけ、G1-S 期に複製されるが、その調節機構については不明な点が多い。中心体複製が過剰に起こると、分裂中期に紡錘体が多極になり、染色体の分配が不均等になる。多中心体はガン細胞でしばしば認められる所見である。従って、中心体複製が正確に行われることは、遺伝的安定性を保つ上で重要であると考えられる。CG-NAP は細胞周期を通じて中心体に分布することから、中心体複製の調節を司っている可能性が考えられた。

そこで、CG-NAP の種々の欠失変異体を CHO-K1 細胞に発現させ、中心体をマーカー蛋白質であるγ-tubulin の抗体で染色し、中心体数をカウントした。その結果、CG-NAP の中心体局在部位を含む C 末端領域(CG-NAP/D)を発現した場合に、中心体を３個以上有する細胞の割合が増加した。この時、内在性の CG-NAP の局在には変化が認められなかった。増加した中心体は、別の中心体マーカーである centrin-２および kendrin とも共局在した。また増加した中心体からは微小管の再形成が認められたことから、微小管形成起点としての機能を保持した中心体が増加したと考えられた。

CG-NAP/D から中心体局在部位を欠失させると、中心体数の増加作用は消失した。また、CG-NAP/D の C 末端に Ki-Ras の脂肪酸修飾部位を付加して膜結合型にすると、中心体数の増加作用は減弱した。従って、CG-NAP/D 発現による中心体数の増加作用には、中心体への局在が必要であると考えられた。

中心体の過剰複製は、細胞周期の停止および細胞質分裂の異常によっても引き起こされることが知られている。そこで、Laser Scanning Cytometer を用いて、CG-NAP/D を発現した細胞の細胞周期分布を解析した。その結果、中心体数増加を引き起こすとされる S 期への停止、および細胞質分裂の異常の結果出現する 4N 以上の DNA 量をもつ細胞の増加は認められなかった。従って、CG-NAP/D 発現による中心体数の増加は、細胞周期の停止および細胞質分裂の異常によるもの

氏名	西村　珠子

ではないことが示唆された。

そこで、中心体複製に影響するとされる種々の分子と CG-NAP/D を細胞に共発現し、両者の相互作用を免疫沈降法により調べた。その結果、G1-S 期に活性化され中心体複製の開始に関与することが知られる cyclin E-cdk2 との相互作用が認められた。免疫染色により、cyclin E は核に加え中心体にも局在が認められ、CG-NAP/D を共発現すると中心体への分布量は増大した。また、CG-NAP/D の免疫沈降物には内在性の cyclin-cdk 活性が認められ、その活性は cyclin E および cdk2 の共発現により上昇したことから、CG-NAP/D が活性体の cyclin E-cdk2 と相互作用していることが示唆された。さらに、CHO-K1 細胞から調製した中心体には内在性の cdk2 が検出され、また CG-NAP/D を発現した細胞から調製した中心体には、より多くの内在性 cdk2 が検出された。従って、CG-NAP は C 末端領域を介して cyclin E-cdk2 を中心体にアンカリングすることが示唆された。

次に、CG-NAP/D による中心体数増加作用が cyclin E-cdk2 との相互作用によるものかを検討した。CHO-K1 細胞に CG-NAP/D と cyclin E を共発現すると、中心体数は CG-NAP/D を単独で発現した場合よりも増加した。核移行シグナルの除去により細胞質や中心体に分布する cyclin E mutant を CG-NAP/D と共発現すると、中心体数はさらに増加した。一方、核移行シグナルを除去し、且つ cdk2 と相互作用しない不活性の cyclin E mutant を CG-NAP/D と共発現すると、中心体数は CG-NAP/D の単独発現時よりも減少した。従って、CG-NAP/D は、cyclin E-cdk2 と相互作用することにより中心体数を増加させていると考えられた。

以上の結果から、CG-NAP の C 末端部分は、過剰量の cyclin E-cdk2 を中心体にアンカリングすることで中心体を過剰複製したと考えられ、また CG-NAP が通常の細胞周期においても cyclin E-cdk2 を中心体にアンカリングすることにより中心体複製に関与しているという可能性が示唆された。

以上のように、本研究は、CG-NAP の中心体複製における生理機能について解析を進めたもので、本蛋白質の細胞増殖・細胞内情報伝達機構における役割を考える上でも重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって学位申請者の　西村珠子　は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。