

主論文の要約

**Plk1 Phosphorylates CLIP-170 and Regulates Its
Binding to Microtubules for Chromosome Alignment**

〔 Plk1 は CLIP-170 リン酸化により CLIP-170 の微小管結合を制御し、
分裂期の染色体整列に寄与する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
神経科学講座 神経情報薬理学分野

(指導：貝淵 弘三 教授)

掛布 真愛

【緒言】

細胞骨格の一つである微小管は、細胞の形態や機能によって様々な配向を示し、細胞遊走、極性形成、細胞分裂など多くの生命現象において必須の役割を果たしている。そのため微小管の配向の制御機構を解明することは、基礎生物学の根源的命題であることに加え、疾患に対する治療法の確立など医学的な観点からも重要である。微小管の配向は多くの微小管結合タンパク質によって決定されている。その中で伸長する微小管の末端に特異的に局在する plus-end-tracking proteins (+TIPs)と呼ばれる一群のタンパク質は、微小管の局所的ダイナミクス、微小管と細胞内構造との結合を制御することによって微小管の配向決定に重要な役割を果たしている。

最近、我々は遊走細胞内で+TIPsの一つである cytoplasmic linker protein-170 (CLIP-170) の 312 番目のセリン残基 (Ser312) が adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)によりリン酸化され、微小管ダイナミクスや接着斑のターンオーバーに関与することで、細胞遊走に重要な役割を担っていることを見出した (中野ら、Nat. Cell Biol. 2010)。しかしながら、CLIP-170 のリン酸化が、いつ、どのようにして CLIP-170 の活性を制御しているのか、また CLIP-170 の Ser312 リン酸化の生理的な意味は不明であった。

【方法と結果】

我々は微小管の配向がダイナミックに再構築される細胞周期に着目した。まず、Ser312 リン酸化型 CLIP-170 を特異的に認識する抗体と、細胞周期を同調させた HeLa 細胞抽出液を使用し、細胞周期における CLIP-170 Ser312 のリン酸化の変動を調べた。その結果、CLIP-170 Ser312 が一過的にリン酸化されることが分かった。CLIP-170 のリン酸化上昇の時期は、histone H3 の Ser10 リン酸化上昇とほぼ一致し、CLIP-170 Ser312 が分裂期特異的に、かつ一過的にリン酸化されることを見出した (Figure 1)。次に、分裂期における CLIP-170 Ser312 のリン酸化を担うキナーゼを同定するため、Ser312 を含む CLIP-170 の N 末側フラグメント (CLIP-170-NT) の精製タンパク質に対し、分裂期に活性が上昇することが知られている数種類の分裂期キナーゼを用いて *in vitro* リン酸化実験を行なった。野生型 (WT) と、Ser312 をアラニンに置換した変異型 (A312) タンパク質のリン酸化レベルを比較したところ、polo-like kinase 1 (Plk1) によってリン酸化した場合に A312 のリン酸化レベルが WT に比べ顕著に低下していた。このことから、Plk1 が *in vitro* で CLIP-170 Ser312 をリン酸化することが示された。そこで Plk1 が実際に分裂期の細胞内で CLIP-170 Ser312 をリン酸化しているのかどうか調べるため、細胞周期を同調させた HeLa 細胞に Plk1 阻害剤処理を行なった。その結果、コントロールの細胞で見られる分裂期特異的な Ser312 リン酸化の上昇が、Plk1 阻害剤で処理した細胞では見られなかった。RNA interference (RNAi) によって Plk1 の発現抑制を行なった場合も同様の結果を得た。以上より、Plk1 が分裂期において CLIP-170 Ser312 のリン酸化を担うキナーゼであることが示唆された。

CLIP-170 は、tubulin 及び+TIPs の一種である EB1/3 への結合により、微小管末端に局在する (Bieling ら、J. Cell Biol. 2008)。さらに、CLIP-170 の微小管末端への局在がリン酸化により制御されることが示唆されている (中野ら、Nat. Cell Biol. 2010、Lee ら、Mol. Biol. Cell 2010)が、その分子メカニズムは不明であった。そこで、我々は CLIP-170 の微小管結合能に対する Ser312 リン酸化の影響を調べた。その結果、Plk1 によってリン酸化された CLIP-170-NT は、非リン酸化 CLIP-170-NT と比べて *in vitro* で重合させた微小管 (tubulin) への結合が低下していた。一方、Ser312 リン酸化は CLIP-170 の EB3 への結合には影響を与えなかった。さらに、dynamic な微小管への CLIP-170 の結合がリン酸化によってどのような影響を受けるか検討するため、精製タンパク質を用いて+TIPs の挙動を *in vitro* で再構成する実験を行なった。非リン酸化 CLIP-170 は伸長する微小管末端への強い局在に加え、末端以外の部分への弱い結合が見られたが、リン酸化 CLIP-170 では末端以外への結合はほぼ見られず、末端への局在も弱くなっていた (Figure 2)。以上より、Plk1 による CLIP-170 Ser312 リン酸化は、CLIP-170 と EB1/3 への結合には影響を与えず、CLIP-170 の微小管に対する結合を特異的に抑制することが示唆された。

細胞分裂期において CLIP-170 は、微小管末端以外に前中期の動原体にも局在しており、染色体の整列に必要であることが報告されている (Tanenbaum ら、EMBO J. 2006)。そこで、我々は RNAi を用いて CLIP-170 Ser312 リン酸化が分裂期の動原体-微小管の結合及び染色体整列に関わるかどうか検討した。CLIP-170 を発現抑制すると、動原体-微小管の結合異常及び染色体の整列異常を示す細胞の割合が増加したが、RNAi 非感受性の CLIP-170-WT を発現させることでこれらの異常は回復した (染色体整列について Figure 3)。しかし、Ser312 をグルタミン酸に置換した擬似リン酸化型変異体 (E312) および非リン酸化型変異体 (A312) の発現では、CLIP-170 発現抑制によって生じた異常は回復しなかった。このことから、CLIP-170 Ser312 のリン酸化-脱リン酸化サイクルが、微小管-動原体の結合形成と染色体整列に必要であることが示唆された。

【結語】

本研究では、細胞分裂期において Plk1 が CLIP-170 の Ser312 をリン酸化することを初めて見出し、このリン酸化が CLIP-170 の微小管への結合を抑制すること及び、分裂期における染色体整列に必要であることを示した。細胞分裂の前中期における染色体整列の過程では、微小管と動原体の結合がターンオーバーを繰り返すことで不適切な結合を補正することが重要である。Plk1 による CLIP-170 Ser312 リン酸化は、動原体と微小管との相互作用を比較的弱く保ち、ターンオーバーを促進することで染色体整列に寄与しているのではないかと考えられる (Figure 4)。これらの研究成果は生物学上重要であるだけでなく、疾患の病態解明および治療法の確立に貢献することが期待される。